

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07844

研究課題名(和文)新規Epo抵抗性因子の探索と分子機序の解明：赤芽球分化・増殖と脂質代謝の関連性

研究課題名(英文) Investigation of new erythropoietin resistance factors and the mechanisms: with special attentions to associations between erythropoiesis and lipid metabolism

研究代表者

木村 秀樹 (Kimura, Hideki)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・准教授

研究者番号：20283187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：安定した透析患者で各種アシルカルニチン(AC:C2-C18)を解析した。TGとC18:1が網赤血球数と独立正相関し、TCと酸化促進指標C2/(C16-C18)がエリスロポエチン抵抗性(ERI)と独立負相関した。ERIに対する各種ACの相関係数値とアシル基炭素数との回帰分析では、炭素数の増加に伴い負相関から正相関へ有意に変化した。以上から、脂肪酸酸化の遅延とERIの増加との関連性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

保存期腎不全・透析患者の腎性貧血にエリスロポエチン(Epo)製剤が汎用され、世界的には7000億、本邦では約1000億の医療費となっている。本研究から、新たなEpo抵抗性の脂質関連マーカーが検出されれば、より適切なEpo製剤の使用法が計画できる。性別、新規の脂質指標を考慮してEpo、カルニチンを使い分け、医療費削減につながる。貧血の改善は、慢性腎臓病進展と心血管疾患発症の予防にも貢献する。

研究成果の概要(英文)：Recent reports showed that division and proliferation of erythroid progenitor cells required an energy source shift from glucose to lipid. Therefore, some associations may occur between erythropoiesis and lipid metabolism including fatty acid -oxidation. Here, various acylcarnitines (AC:C2-C18) were measured and analyzed for the correlation with erythropoiesis status in stable hemodialysis patients. TG and C18:1 were independently positively correlated with reticulocyte counts, and TC and a putative index for -oxidation enhancement, C2/(C16+C18+C18:1) were independently negatively correlated with erythropoietin resistance (ERI). When the regression analysis was performed to investigate the impact of the number of acyl group carbons on the correlation coefficients between various ACs on ERI, a significant change from negative to positive correlation was observed with increasing carbon number. These suggest that lower fatty acid -oxidation may be associated with higher ERI.

研究分野：腎臓内科学，臨床検査医学

キーワード：腎性腎血 エリスロポエチン 血液透析患者 アシルカルニチン 脂肪酸酸化 血清脂質 網赤血球数

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末期腎不全患者(透析患者)を含む慢性腎不全患者では、赤血球系造血因子である エリスロポエチン(Epo)の産生が相対的に低下して腎性貧血が発症する。その治療にはEpo 補充療法が必須で、医療費も全世界で約 7000 億(本邦で 1000 億)に上る。目標 Hb 値(10-13g/dL)を維持するためのEpo 製剤の必要量はEpo 抵抗性とも呼ばれ、大きな個人差があり高用量を必要とする抵抗群からEpo 不要群まで存在する。腎不全のEpo 抵抗性は、栄養状態(鉄、亜鉛、ビタミン B12、葉酸等の欠乏)と炎症が関与するが 1)、Epo 抵抗性の原因解析は不十分であった。一方、地域住民の臨床研究から血清脂質(TG, TC)が赤血球数に促進的に関与し、脂質代謝調整因子であるアディポネクチン(APN)が造血を抑制するとの報告もあった 2)、3)。研究者も Epo 必要量が患者で大きく異なることを経験し、その要因が不明である患者を数多く経験し、既報以外の要因が存在すると推測していた。

2. 研究の目的

- (1) 透析患者の質量分析での血清脂質プロフィール解析を加えて APN、カルニチン、アシルカルニチン(AC)を含めて網赤血球数(RetC)に影響する臨床因子を探索する。
- (2) 透析患者の質量分析での血清脂質プロフィール解析を加えて APN、カルニチン、アシルカルニチン(AC)を含めてエリスロポエチン抵抗性指数(ERI)に影響する臨床因子を探索する。
- (3) K562 を赤芽球から網赤血球へ誘導し、その過程でエネルギー源のシフトが行われているか否かを検討する。

以上より、脂質代謝の変容が赤血球の造血動態へ影響し、新規の ERI 規定因子となりうるかを検討することが目的である。

3. 研究の方法

- (1) 血液透析患者における RetC と ERI の新規の規定因子の探索：

福井大学病院と研究協力者の病院において倫理審査委員会で本臨床研究計画は承認済みである。

対象：研究協力者が所属する関連病院の血液透析患者を対象とする。年に 1-2 回血算・血清(既存検体)の提供と医療情報の提供を受けた。2017 年～2021 年に血清の提供を受けた(約 300 検体、-80℃ 保存中)。貧血管理は腎臓専門医が慢性腎臓病患者における腎性貧血治療のガイドライン(2015 年版)に則り行った。

方法：研究協力者の病院から、以下の項目の情報提供を受ける[基本独立変数；年齢、性別、身長、体重、透析歴、服薬、糖尿病の有無、透析効率、推定蛋白摂取量、Epo 製剤種類・使用量、ルーチン検査[血算・生化学、Fe、TIBC、CRP、血清脂質(TC, TG, LDL-C, HDL-C)]。ルーチン検査は当該病院で実施した、APN、Zn は当院検査部にてラテックス凝集法試薬(CV<5%)で測定した。ビタミン B12、葉酸、フェリチンは外注検査で測定する。脂質関連因子のカルニチン、アシルカルニチン(AC)については質量分析法(LC/MS)を用いて測定した。

Epo 抵抗性の評価と解析：Epo 製剤はダルベポエチン(μg)、エポエチン ペゴル(μg)であった。Epo 抵抗性指数(ERI)は目標 Hb(10-13g/dL)を目標に管理した上で、検査日における単位体重・Hb 当たりの Epo 量(μg/kg/Hb g/dL/ト ライ体重/4 週)で算出した。

RetC あるいは ERI を従属変数として、収集した上記の独立変数のデータとの単相関分析、重回帰分析を行い、RetC ならびに ERI の独立した規定因子を検出する。APN, TG, TC に加えて AC などに有意な RetC あるいは ERI の規定因子がないかを検討する。

- (2) K562 細胞を用いた赤血球分化誘導の基礎実験：

NaB(1mM)による K562 細胞の赤芽球への分化誘導を実施した。Hb の増強強度、PDH、リン酸化 PDH、CPT 発現をイムノブロット法で解析した。赤芽球の分化過程で糖・脂肪酸酸化の好気性糖酸化から嫌気性解糖へシフトする可能性が考えられ、AC 動態の背景となった。

4. 研究成果

- (1) 血液透析患者における RetC と ERI の新規の規定因子の探索：

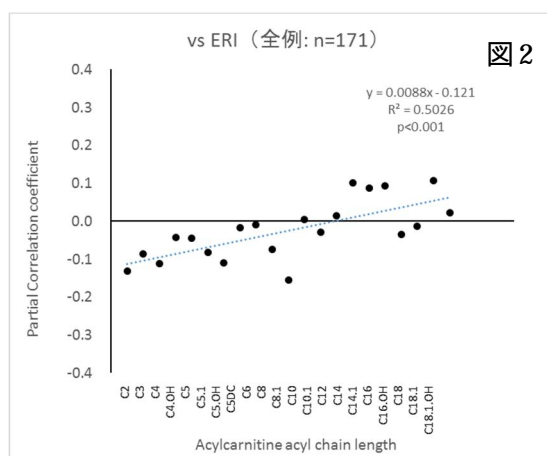
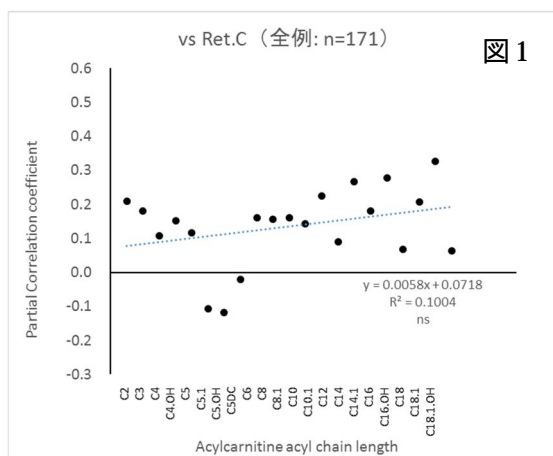
血液透析患者全 264 例の血清でアシルカルニチン(AC:C2-C18)のプロフィールを測定した。この

うち解析対象は、CRP < 0.3mg/dL、フェリチン < 300ng/mL、出血・感染症を有さない安定した透析患者 171 例とした。

新規の造血規定因子の探索：全例では、logTG、log(C18:1)が網赤血球数(Ret)の正の独立規定因子で、Fe、男性が負の独立規定因子であった。男性群では白血球数、log(C10:1)が正の独立規定因子であった。女性群ではlogTG、log(C3)が正の独立規定因子であった。

新規のEpo抵抗性(ERI)規定因子の探索：全例で、TC、DM、脂肪酸酸化促進指標であるlog(C2/C16+C18+C18:1)、Fe、血小板数がERIの負の独立規定因子であった。男性群ではlog(C2/C16+C18+C18:1)、Feが負の独立規定因子であり、女性群では血小板数とTSATが負の独立規定因子であった。

RetC、ERIに対する各種ACの相関係数値とACアシル基炭素数との相関：RetCとは殆どのACが正相関でより長鎖で高値であった(図1)。中鎖と長鎖のACはミトコンドリアのマトリックスに限局して存在し4)、脱核後の網赤血球ではミトコンドリアが細胞外(血中)へ放出されるため5)、各AC濃度は網赤血球と正相関すると考えられた。各種ACとERIとは有意な相関は少ないが、炭素数の増加に伴い負相関から正相関へ有意に変化した(図2)。より短鎖のACがERIと負相関し、より長鎖が正相関する現象は、酸化の遅延がERIの増加に關与する可能性を示していると考えられた。



造血幹細胞や赤血球系前駆細胞が分化・増殖する際に脂肪酸酸化を必要とする報告があり6)、7)、これが反映されていると推測した。

(2) K562細胞を用いた赤血球分化誘導の基礎実験：

臨床データではAC全般でRetCとの正相関があり、AC蓄積が終末の赤血球造血と関連すると推測されたため、NaB(1mM)によるK562細胞の赤芽球への分化誘導を試みた。Hbの発現増強は確認できなかったが、PDHのリン酸化の増強とCPT発現の低下があり、既報8)にあるように、赤芽球の分化過程で糖・脂肪酸酸化の好気性糖酸化から嫌気性解糖へシフトする可能性が考えられた。

(1)、(2)の結果から、エリスロポエチンに対する近接の造血反応においては中性脂肪値、性別、血小板の造血能が影響し、この項目に注目して使用することが重要と考えられた。また、長期的効果を示すERIについては、コレステロール値、血小板数だけでなく脂肪酸酸化の亢進もERIの低値と関連しており、エリスロポエチンの反応性に影響する因子として注目すべきと考えた。既知の影響因子に加えて、造血のエネルギー代謝の変容にも考慮する必要があると考えられた。

<引用文献>

- 1) Wu HHL, Chinnadurai R. Erythropoietin-Stimulating Agent Hyporesponsiveness in Patients Living with Chronic Kidney Disease. *Kidney diseases* 2022; **8**: 103-114.
- 2) Kohno K, Narimatsu H, Shiono Y, *et al.* Management of erythropoiesis: cross-sectional study of the relationships between erythropoiesis and nutrition, physical features, and adiponectin in 3519 Japanese people. *European journal of haematology* 2014; **92**: 298-307
- 3) Kim H, Yun HR, Park S, *et al.* High serum adiponectin is associated with anemia development in chronic kidney disease: The results from the KNOW-CKD study. *Cytokine* 2018; **103**: 1-9.
- 4) Adeva-Andany MM, Carneiro-Freire N, Seco-Filgueira M, *et al.* Mitochondrial beta-oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion* 2019; **46**: 73-90.
- 5) Carayon K, Chaoui K, Ronzier E, *et al.* Proteolipidic composition of exosomes changes during reticulocyte maturation. *The Journal of biological chemistry* 2011; **286**:

34426-34439.

- 6) Ito K, Carracedo A, Weiss D, *et al.* A PML-PPAR-delta pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nature medicine* 2012; **18**: 1350-1358.
- 7) Huang NJ, Lin YC, Lin CY, *et al.* Enhanced phosphocholine metabolism is essential for terminal erythropoiesis. *Blood* 2018; 131: 2955-2966.
- 8) Goto T, Ubukawa K, Kobayashi I, *et al.* ATP produced by anaerobic glycolysis is essential for enucleation of human erythroblasts. *Experimental hematology* 2019; **72**: 14-26 e11.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kimura H, Kamiyama K, Imamoto T, Takeda I, Masunaga S, Kobayashi M, Mikami D, Takahashi N, Kasuno K, Sugaya T, Iwano M.	4. 巻 30
2. 論文標題 Fenofibrate reduces cisplatin-induced apoptosis by inhibiting the p53/Puma/Caspase-9 pathway and the MAPK/Caspase-8 pathway rather than by promoting autophagy in murine renal proximal tubular cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2022.101237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Muso E, Sakai S, Ogura Y, Yukawa S, Nishizawa Y, Yorioka N, Saito T, Mune M, Sugiyama S, Iino Y, Hirano T, Hattori M, Watanabe T, Yokoyama H, Sato H, Uchida S, Wada T, Shoji T, Oda H, Mori K, Kimura H, Ito O, Nishiyama A, Maruyama S, Inagi R, Fujimoto S, Tsukamoto T, Suzuki Y, Honda H, Babazono T, Tsuruya K, Yuzawa Y.	4. 巻 26
2. 論文標題 Favorable therapeutic efficacy of low-density lipoprotein apheresis for nephrotic syndrome with impaired renal function	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ther Apher Dial.	6. 最初と最後の頁 220-228
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1744-9987.13694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hisada K, Hida Y, Kawabata N, Kawashima Y, Soya Y, Shimada A, Iwano M, Kimura H.	4. 巻 184
2. 論文標題 Development and evaluation of a novel quenching probe PCR (GENECUBE) assay for rapidly detecting and distinguishing between Chlamydia pneumoniae and Chlamydia psittaci	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Microbiol Methods.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shan J, Kimura H, Yokoi S, Kamiyama K, Imamoto T, Takeda I, Kobayashi M, Mikami D, Takahashi N, Kasuno K, Sugaya T, Iwano M.	4. 巻 25
2. 論文標題 PPAR- activation reduces cisplatin-induced apoptosis via inhibiting p53/Bax/caspase-3 pathway without modulating autophagy in murine renal proximal tubular cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 598-607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-021-02039-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi N, Yoshida H, Kimura H, Kamiyama K, Kurose T, Sugimoto H, Imura T, Yokoi S, Mikami D, Kasuno K, Kurosawa H, Hirayama Y, Naiki H, Hara M, Iwano M.	4. 巻 35
2. 論文標題 Chronic hypoxia exacerbates diabetic glomerulosclerosis through mesangiolysis and podocyte injury in db/db mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 1678-1688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ndt/gfaa074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoi S, Kasuno K, Nishimori K, Nishikawa S, Nishikawa Y, Morita S, Kobayashi M, Fukushima S, Mikami D, Takahashi N, Oota Y, Kimura H, Soya Y, Kimata S, Nishimura K, Ono T, Muso E, Yoshida H, Yodoi J, Iwano M.	4. 巻 507
2. 論文標題 Analytical and clinical validation of rapid chemiluminescence enzyme immunoassay for urinary thioredoxin, an oxidative stress-dependent early biomarker of acute kidney injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Chim Acta	6. 最初と最後の頁 271-279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2020.04.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mikami D, Kobayashi M, Uwada J, Yazawa T, Kamiyama K, Nishimori K, Nishikawa Y, Nishikawa S, Yokoi S, Kimura H, Kimura I, Taniguchi T, Iwano M.	4. 巻 1865
2. 論文標題 Short-chain fatty acid mitigates adenine-induced chronic kidney disease via FFA2 and FFA3 pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids	6. 最初と最後の頁 158666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2020.158666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木戸口 周平, 岩村 菜々美, 鳥居 国雄, 山野 智子, 川田 知恵子, 宮崎 良一, 重松 陽介, 岩野 正之, 木村 秀樹
2. 発表標題 血液透析患者におけるカルニチン欠乏に関する臨床因子と造血動態との関連
3. 学会等名 第69回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩村菜々美、木戸周平、旭 ななえ、松田 航平、宮崎 良一、木村 秀樹
2. 発表標題 血液透析患者における高感度トロポニンIと生命予後との関連性 7年間前向き研究
3. 学会等名 第69回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木戸口 周平, 岩村 菜々美, 鳥居 国雄, 山野 智子, 川 田 知恵子, 宮崎 良一, 重松 陽介, 岩野 正之, 木村 秀 樹
2. 発表標題 血液透析患者におけるカルニチンと造血動態関連因子の解析
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木戸口周平、乾菜々美、今本 徹、武田 泉、 鳥居国雄、宮崎良一、岩野正之、木村秀樹
2. 発表標題 血液透析患者における血中アディポネクチン濃度と臨床所見の関連性の検討ー特に性差の観点からー
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木戸口周平、乾菜々美、今本 徹、武田 泉、 鳥居国雄、木村秀樹
2. 発表標題 血液透析患者における新規造血因子の解析 - 特に脂質因子に注目して -
3. 学会等名 第39回日本臨床化学会東海・北陸支部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木戸口周平、岩村菜々美、鳥居国雄、橋本儀一、木村秀樹
2. 発表標題 血液透析患者における造血動態関連因子の解析 - エリスロポエチン抵抗性を含めて -
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木戸口 周平、橋本 儀一、川田 知恵子、宮崎 良一、木村 秀樹
2. 発表標題 血液透析患者におけるアディポネクチンの臨床規定因子解析と生命予後の検討
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木戸口 周平、岩村 菜々美、鳥居 国雄、橋本 儀一、川田 知恵子、宮崎 良一、木村 秀樹
2. 発表標題 血液透析患者における血中アディポネクチン濃度と生命予後の性差を含めた検討
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上山 和子、木戸口 周平、岩村 菜々美、橋本 儀一、竹内 貴洋、今本 徹、武田 泉、増永 慎也、岩野 正之、木村 秀樹
2. 発表標題 ジクロロ酢酸はcFLIP発現増強と14-3-3蛋白リン酸化抑制を介してシスプラチン腎障害を軽減する
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上山和子、木村秀樹、今本 徹、武田 泉、竹内貴洋、増永慎也、岩野正之
2. 発表標題 ジクロ口酢酸はcFLIP発現増強と14-3-3蛋白リン酸化抑制を介してcaspase経路を抑制しシスプラチン腎障害を軽減する
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木戸口周平、今本 徹、武田 泉、鳥居国雄、乾 菜々美、岩野正之、宮崎良一、木村秀樹
2. 発表標題 血液透析患者におけるアディポネクチンと心血管疾患発症ならびに生命予後との関連性の解析
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山内 高弘 (Yamauchi Takahiro) (90291377)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	
研究分担者	鳥居 国雄 (Torii Kunio) (40534045)	福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・主任臨床検査技師 (13401)	
研究分担者	丹羽 明 (Niwa Akira) (20546999)	京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	宮崎 良一 (Miyazaki Ryoichi)		
研究協力者	木戸口 周平 (Kidoguchi Shuhei)		
研究協力者	重松 陽介 (Shigematsu Yosuke)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関