

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790944

研究課題名（和文）腎性貧血における成熟赤血球膜のSHP-1発現の検討

研究課題名（英文）Expression of SHP-1 in the membrane of red blood cells in renal anemia

研究代表者

赤木 滋（AKAGI SHIGERU）

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：80509315

研究成果の概要（和文）：腎性貧血を呈する腎不全患者の病態解明を目的として、赤血球内SHP-1の発現や、赤血球膜構成蛋白の発現プロファイルについて検討した。腎性貧血モデルマウス（5/6腎臓摘出モデル）の作成、腎性貧血マウスの赤血球膜分離・蛋白抽出によるSHP-1、および赤血球膜における構成蛋白の発現パターンの検討を行った。結果、赤血球膜におけるspectrinの存在を確認し、またSHP-1については、発現が弱いが存在を確認した。しかし、5/6腎摘モデルとコントロールの比較ではSHP-1、spectrinの発現について有意差はみられなかった。

研究成果の概要（英文）：To elucidate mechanism of renal anemia in chronic renal failure, the expression of Src Homology-2 containing hematopoietic phosphatase-1 (SHP-1) and protein in the RBC membrane was examined in renal anemia model mice (5/6 nephrectomy). The expression of spectrin, one of the composition of RBC membrane was confirmed and SHP-1 was also detected. However, no significant difference was observed in the expression of spectrin or SHP-1 between 5/6 nephrectomy model and control mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：慢性腎不全における腎性貧血

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：SHP-1、腎性貧血、赤血球膜、spectrin

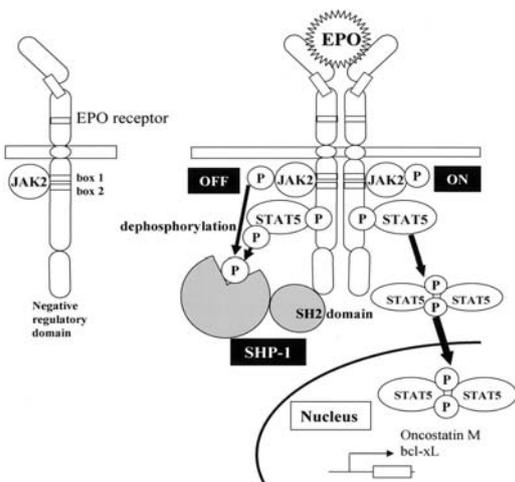
1. 研究開始当初の背景

血液透析患者に合併する貧血に対して赤血球生成刺激薬（ESA; Erythropoiesis stimulating agent）が用いられているが、依然高用量のESA投与にもかかわらず十分

なヘモグロビン（Hb）値を維持できないESA低反応性貧血患者が存在する。医療経済的な面も含めてEPO等のESA投与への反応に乏しいESA低反応性が透析医療における1つの大きな問題となっている。ESA低反応

性の原因としては、鉄欠乏、透析不足・重度の副甲状腺機能亢進症、水溶性ビタミン不足などが指摘されているが、その分子機序については依然解明されていない。

これまでの当教室での研究で、ESA低反応性の血液透析患者の末梢血よりCD34陽性造血前駆細胞を分離して、rHuEPO、stem cell factor(SCF)やinterleukin(IL)-3等のサイトカインを添加したメチルセルロース半固形培地で培養したところ、EPO反応性あるいはEPOが不要である透析患者と比較して明らかに赤芽球系コロニー (BFU-E ; burst forming unit of erythroid)の形成が明らかに低下していた。また、ESA低反応の血液透析患者では、CD34陽性造血前駆細胞の細胞質内に存在するSrc homology-2 domain containing tyrosine phosphatase-1 (SHP-1) の発現がmRNAレベル、蛋白レベル、リン酸化のいずれにおいても亢進しており、その結果 signal transducer and activators of transcription 5 (STAT5) が脱リン酸化されることによりEPO受容体を介した造血前駆細胞内シグナル伝達が減弱すると報告した。



さらに、CD34 陽性造血前駆細胞に、HVJ-envelope ベクターを用いて SHP-1 の antisense oligodeoxynucleotide (S-oligo)

を導入して培養すると、培養細胞における SHP-1 発現の減弱、リン酸化 STAT5 発現の増強、およびメチルセルロース培地の BFU-E コロニー数の増加がもたらされ、血液透析患者の ESA 低反応に、SHP-1 発現亢進による造血細胞内シグナルの異常が関与している可能性が示唆された (Akagi S et al.; JASN, 2004)。

近年、赤血球研究の進歩により、急性腎不全および慢性腎不全患者において赤血球膜の構成成分である band3 蛋白の減少や、赤血球での陰イオン交換の異常が報告され、腎不全病態との関連が示唆された (Saradhadevi V et al.; Mol Cell Biochem, 2005)。その後、興味深いことに、正常のヒト赤血球の band 3 を生理的ターゲットとする分子の1つとして SHP-1 の報告がなされ、SHP-1 が造血前駆細胞のみでなく、赤血球膜にも存在し、band3 のリン酸化に関与していることが示唆された (Bragadin M et al.; Ann N Y Acad Sci, 2007) が、その作用機序については未だ不明である。

そこでこの度、腎性貧血モデル動物、および ESA 低反応血液透析患者において、赤血球内の SHP-1 蛋白発現や、赤血球膜における生理的作用について検討する。この研究により、腎性貧血患者、維持血液透析患者の ESA 低反応性貧血の機序について理解が深められ、病態改善への寄与が期待できると考える。

2. 研究の目的

腎性貧血、およびESA低反応性貧血を呈する維持血液透析患者の病態解明を目的として、赤血球内SHP-1の発現や、赤血球膜構成蛋白の発現プロファイルについて検討する。

3. 研究の方法

1)腎性貧血モデルの作成と腎性貧血発症の確認

腎性貧血モデル（5/6腎臓摘出マウス）を作成し、腎摘出前、摘出後週一回の採血を行い、ヘマトクリット値や血清尿素窒素を測定し、研究モデルとして適切かどうかの検討を行う。予備実験では、C57BL/6マウスの5/6腎臓摘出施行後4週間の採血にて、有意なHb値の低下および尿素窒素・クレアチニン値の上昇を確認しているが、さらなる観察にてサンプリングを行う適切な週数について検討する。コントロールとして同数のC57BL/6マウスを用いて以下の検討を行う。

2)腎性貧血モデルマウスの赤血球膜のSHP-1発現およびリン酸化の検討

C57BL/6Jマウスに5/6腎臓摘出を施行し、経時的にヘマトクリット値、血清尿素窒素およびクレアチニン値を測定し、腎性貧血発症を確認する。マウスより血液を採取して遠心分離法を用いた赤血球膜の分離を行い、蛋白を抽出してウエスタンブロットおよび免疫沈降にてSHP-1の発現およびリン酸化について、コントロールとの比較検討を行う。

3)腎性貧血モデルマウスの赤血球膜におけるSHP-1発現と赤血球膜構成蛋白の関連についての検討

SHP-1発現の検討と同時に、腎性貧血モデルマウスの赤血球膜からタンパク抽出を行い、膜の構成蛋白であるspectrin、protein4.1およびband3などの発現について調べ、これらの発現パターンについてコントロールとの比較検討を行う。また、SHP-1がこれらの構成蛋白のリン酸化に関与しているかどうか、免疫沈降法を用い検討を試みる。さら

に、腎性貧血マウスにESA投与を行い、投与前後でのSHP-1の発現、リン酸化の変化および前述の赤血球膜構成蛋白の発現変化についても検討する。

4)ESA低反応透析患者の赤血球膜におけるSHP-1発現/リン酸化や、赤血球膜構成蛋白の発現プロファイルについての検討

高用量のESA投与にもかかわらず十分なヘモグロビン（Hb）値を維持できないESA低反応性貧血患者における赤血球膜におけるSHP-1発現およびリン酸化、また構成蛋白の発現プロファイルについて、ESA反応症例との比較検討を行う。症例数については、低反応群、反応群ともに20例以上を目標とする。

4. 研究成果

腎性貧血モデル（5/6腎臓摘出マウス）を作成して腎摘出前と摘出後週1回採血を行い、ヘマトクリット値や血清尿素窒素を測定し、研究モデルとして適切かどうかの検討を行った。

予備実験において、C57BL/6マウスの5/6腎臓摘出施行後8週の採血で、有意なHb値の低下およびクレアチニン値の上昇を確認した。

C57BL/6Jマウスに5/6腎臓摘出を施行後、4週および8週の時点において、マウスから血液を採取して遠心分離法を用いた赤血球膜分離

、膜蛋白を抽出した。8週の時点で分離した赤血球膜においてspectrinの存在を確認した。

また、SHP-1については、発現が弱いが存在を確認した。しかし、5/6腎摘モデルとコントロールの比較ではSHP-1、spectrinの発現について有意差はみられなかった。

本検討においては、他の赤血球膜の構成蛋白であるprotein4.1およびband3の検出が困難な状況が続いている。その理由としては、赤血球膜を分離する過程での分離方法自体の問題や、あるいはこれらの構成蛋白の量が不十

分である可能性が考えられた。

現在のところ、赤血球膜の膜構成蛋白の発現解析はできていないが、慢性腎不全、維持血液透析患者においては、赤血球膜の脆弱性が貧血に関与していると考えられており、赤血球膜構成蛋白に関して、その発現および機能解析を進めることで病態を解明していく必要があると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤木 滋 (AKAGI SHIGERU)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：80509315

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者