

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293127

研究課題名(和文) 糖尿病臓器合併症の個別化医療にむけた抗エリスロポエチン受容体抗体の基礎臨床的検討

研究課題名(英文) Association of anti-erythropoietin receptor antibodies with organ involvement of diabetic complications

研究代表者

和田 隆志 (Wada, Takashi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40334784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エリスロポエチン(EPO)とその受容体EPORを介する臓器合併症、ことに腎症の機序解明を目指し、糖尿病臓器合併症の共通進展機序である炎症、線維化に着目した。ヒト培養血管内皮細胞を用いて高糖、EPO投与有無による網羅解析とそこから得られる特異的応答分子機構を検討した。新規バスウェイとしてthioredoxin interacting proteinなどインフラマソーム活性化につながる経路を同定した。一方、EPO投与により炎症、線維化シグナル、サイトカイン発現の低下を確認した。これらより、EPOはその受容体を介して、炎症、線維化カスケードの制御を行い病態に影響を与えている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Diabetic nephropathy is a leading cause of end-stage kidney disease requiring renal replacement therapy in the world. Therefore, it is of importance to examine the pathogenesis of progressive organ involvement in diabetic condition. Thus far, the presence of anemia is an independent risk factor for the progression of diabetic nephropathy. In this study, we focused on the role of erythropoietin (EPO) and its receptor (EPOR), which are closely related to anemia in kidney diseases, especially in the inflammatory processes during the progression of diabetic nephropathy. Endothelial cells express inflammatory and fibrotic mediators through the activation of inflammasome in response to high glucose conditions, which could be modulated by the presence of EPO. These results suggest that EPO-EPOR axis may play a role in the pathogenesis of diabetic nephropathy.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：糖尿病性腎症 炎症 エリスロポエチン エリスロポエチン受容体 自己抗体 バイオマーカー 心血管病変 バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症はじめ心血管病変など糖尿病臓器合併症は増加の一途である。しかも、糖尿病臓器合併症例は生命予後が不良である。しかし、これら臓器合併症の病態解明と新規治療標的分子の同定、バイオマーカー確立等、予後改善に向けた基盤形成はいまだ不十分である。申請者は研究代表者として、平成 21 年度より、厚生労働科学研究費補助金(腎疾患対策研究事業)「糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発」ならびに平成 24 年度より「糖尿病性腎症ならびに腎硬化症の診療水準向上と重症化防止にむけた調査・研究」において、糖尿病臓器合併症の病態解析とバイオマーカー開発を進めている。この中で、厚生労働省、日本腎臓学会とともに血液・尿検体の収集を伴った糖尿病レジストリーを立ち上げ、本邦の臨床研究基盤形成に関わってきた。登録症例を前向きに調査し臓器合併症、予後を経時的に検討している。加えて、申請者は約 9800 例の腎生検標本、血液、尿検体を経時的に保管し、40 年超の腎・心血管病変・生命の長期予後が追える世界有数の金沢コホートを有している。従って、バイオマーカーの臨床的検証を行う基盤が整っている。

貧血は糖尿病臓器合併症の重要な進展因子である。特に腎不全に使用されるエリスロポエチン製剤(ESA)は約 40 万人に投与され、この約 5%は ESA 低反応性である。この低反応例こそ臓器合併症が多く生命予後が不良であるが機序は不明である。申請者らは世界に先駆けて新規抗 EPOR 抗体とその測定系を樹立した。糖尿病性腎症例でも約 10%に陽性例がみられ、貧血と関連することを示した。さらに、貧血が心、腎など糖尿病臓器合併症、生命予後に重要であることを金沢コホートにより検証した(Diabetes Care 2013)。以上より、腎・心など糖尿病臓器合併症、EPO 低反応性、貧血、生命予後と抗 EPOR 抗体との関

連を評価し、抗 EPOR 抗体の臨床的意義と個別化医療にむけたバイオマーカーとしての確立を目指す。

これまで申請者は臨床検査診断法の新規開発と臨床応用を着々と進めている。すでに、抗EPOR抗体に関しては特許登録が終了し実用化にむけて展開している。加えて、EPO-EPORの分子機序の解析基盤として、腎症や腎障害に伴う心臓病の分子機序を検討してきた。糖尿病モデル動物を用いた臓器合併症の基礎的検討や腎・心などの臓器合併症を包括的に解析するシステムを重ねてきた。さらに、平成 23年度より腎・心における慢性炎症に関するCRESTの研究分担者を務めるとともに、次世代シーケンサー+パイオインフォマティクス技術を導入し、分子基盤の研究体制を確立している。

2. 研究の目的

腎症など糖尿病臓器合併症は予後不良であり、病態の解明を背景としたバイオマーカー確立は喫緊の課題である。さらにそのマーカーが関連する病態解明は重要である。本研究では、腎症など臓器合併症、生命予後に重要な貧血に注目し、エリスロポエチン(EPO)ならびにその受容体(EPOR)シグナリングを介する臓器合併症の機序解明、個別化医療にむけた EPO-EPOR の意義の確立を目指すものである。この仮説のもと、高糖刺激による血管内皮細胞の EPOR シグナルを解析する、線維化に関連する骨髄由来細胞と EPOR シグナルとの関連を検討する、糖尿病モデルの腎・心病変にはたす EPO-EPOR シグナルを介した分子基盤を確立する。本研究により、EPOR 阻害を介した臓器合併症の新規機序を確立したい。

3. 研究の方法

1) 高糖状態におけるヒト培養血管内皮細胞、新規骨髄由来線維化担当細胞におけるEPO-EPOR機構の解明

ヒト培養血管内皮細胞、骨髄由来細胞で線維化に関連する細胞群を用いて、EPORの発現動態、高糖刺激に伴う動態などを包括的に検討する。血管病変始め糖尿病臓器合併症の基本病態は血管障害であるため、内皮細胞に着目する。網羅解析により特殊な線維化担当細胞である骨髄由来細胞群の特異的な遺伝子発現、高糖に対する応答分子群の同定を目指す。これまで申請者が報告してきた新規の骨髄由来かつ線維化に関連する細胞の動態を評価することは独創性が高い研究となる。糖尿病臓器合併症にはたす新規骨髄由来線維化担当細胞におけるEPO-EPOR機構の解明についても取り組む。

2) 糖尿病モデル動物による腎・心障害機序にはたすEPO-EPOR機構の解明

糖尿病臓器合併症の共通進展機序である高糖刺激に着目し、網羅解析で得られた特異的・共通応答分子の検証とその障害機構の解明を目指す。腎・心障害をきたすモデルとしてストレプトゾトシン誘発モデルを用いて、貧血改善作用を持たないESA(カルバミル化EPO)を投与し、腎、心の臓器病変の改善効果を検討する。さらに、*in vitro*研究で得られたEPOR関連の特異的遺伝子(因子)情報を用いて、動物モデルで機能解析を行い、その有用性を検証する。さらに、小動物SPECTを用いて、カルバミル化EPOを標識し、動物モデルのEPORの経時的発現を定量的に解析する。この非侵襲的、経時的にEPORの発現を可視化することは独創性、新規性が高い。

4. 研究成果

増加の一途をたどる糖尿病により、腎症はじめ全身の臓器合併症が生じる。この臓器合併症のひとつである糖尿病性腎症は新規透析導入原疾患の第1位であり、その克服が期

待されている。本研究は、腎症など臓器合併症、生命予後に重要な貧血に関連し、かつ腎臓から産生されるエリスロポエチン(EPO)に注目した。これまで我々は新規のエリスロポエチン受容体(EPOR)阻害作用を有する抗EPOR抗体を同定した。最近になり、本抗体と全身性エリテマトーデスの臓器病変との関連を報告した(J Rheumatol 2016)。本研究では、EPO-EPORを介する臓器合併症の機序解明を目指し、糖尿病臓器合併症の共通進展機序である炎症、線維化に着目した。血管病変の基本病態として、ヒト培養血管内皮細胞を用いてEPO投与有無による網羅解析とそこから得られた特異的な共通応答分子とその障害機構を検討した。新たなパスウェイとしてthioredoxin interacting proteinなどインフラマゾーム活性化につながる経路を同定した。一方、EPO投与により生体環境のホメオスターシス維持に関与する遺伝子の発現亢進、炎症シグナルの低下を確認している。最終的に炎症性サイトカイン発現の低下を確認した。また、EPOシグナルが自身のレセプターの発現に関与し、高糖刺激による細胞障害を抑制していることを示した。

糖尿病性腎症では、慢性炎症から腎線維化へと進展し、慢性腎不全へと至る。これまで腎などの臓器線維化に関与することを報告してきた骨髄由来細胞fibrocyte(PNAS2006)を用いて、EPOの役割を検討した。その結果、炎症に続く、線維化の過程においても、EPOシグナルが病態へ関与することを明らかにした。これらの結果より、EPOはその受容体を介して、炎症、線維化カスケードの制御を行い病態に影響を与えている可能性がある。

今回の研究成果を基盤として、血管内皮細胞ならびにfibrocyteを中心に高糖刺激に伴う既知ならびに未知の細胞の障害ならびに保護に関連する遺伝子とそのシグナル伝達、核内転写因子のパスウェイの同定とその遺伝子群の検証を行う。さらに、現在、高糖に

より誘導される炎症関連の新たなパスウェイを同定し、関連する遺伝子の改変したマウスを作成した。このマウスを用いて実験糖尿病モデルを作成し機能解析が進んでいる。引き続き貧血改善作用を持たないカルバミル化 EPO を投与し、EPO ならびにその受容体の病態での動態とその意義について検討を進めていく。これを通じて EPO-EPOR を介した糖尿病性臓器合併症の機序、ことに炎症制御機構の解明を目指して研究に邁進する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Sakai N, Chun J, Duffield JS, Lagares D, Wada T, Luster AD, Tager AM. Lysophosphatidic acid signaling through its receptor initiates profibrotic epithelial cell fibroblast communication mediated by epithelial cell derived connective tissue growth factor. *Kidney Int* 査読有 91(3):628-641, 2017 DOI: 10.1016/j.kint.2016.09.030.
2. Oshima M, Iwata Y, Furuichi K, ほか 12 名 (12 番目). Association of apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression with urinary protein and kidney dysfunction. *Clin Exp Nephrol* 査読有 21(1):35-42, 2017 DOI: 10.1007/s10157-016-1240-5.
3. Sakai N, Furuichi K, Wada T. Inhibition of NLRP3 inflammasome as a therapeutic intervention in crystal-induced nephropathy. *Kidney Int* 査読無 90(3):466-468, 2016 DOI: 10.1016/j.kint.2016.05.003.
4. Hara A, Furuichi K, Yamahana J, Yasuda H, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Wada T. Effect of autoantibodies to erythropoietin receptor in systemic lupus erythematosus with biopsy-proven lupus nephritis. *J Rheumatol* 査読有 43(7):1328-2334, 2016 DOI: 10.3899/jrheum.151430
5. Kitajima S, Iwata Y, Furuichi K, Sagara A, Shinozaki Y, Toyama T, Sakai N, Shimizu M, Sakurai T, Kaneko S, Wada T. Messenger RNA expression profile of sleep-related genes in peripheral blood cells in patients with chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 査読有 20(2):218-225, 2016 DOI: 10.1007/s10157-015-1150-y
6. Shimizu M, Furuichi K, Toyama T, Yamahana J, Ohkawa R, Igarashi K, Aoki J, Kaneko S, Yatomi Y Wada T. Serum Autotaxin Levels Are Associated with Proteinuria and Kidney Lesions in Japanese Type 2 Diabetic Patients with Biopsy-proven Diabetic Nephropathy. *Intern Med* 査読有 55(3): 215-221, 2016 DOI: 10.2169/internalmedicine.55.5473.
7. Nakade Y, Toyama T, Furuichi K, Kitajima S, Miyajima Y, Fukamachi M, Sagara A, Shinozaki Y, Hara A, Shimizu M, Iwata Y, Oe H, Nagahara M, Horita H, Sakai Y, Kaneko S, Wada T. Impact of kidney function and urinary protein excretion on intima-media thickness in Japanese patients with type 2 diabetes. *Clin Exp Nephrol* 査読有 19(5):909-917, 2015 DOI: 10.1007/s10157-015-1088-0.
8. Haneda M, Utsunomiya K, Koya D, Babazono T, Moriya T, Makino H, Kimura K, Suzuki Y, Wada T, ほか 9 名. A new classification of Diabetic Nephropathy 2014: a report from Joint Committee on Diabetic Nephropathy.

- Clin Exp Nephrol 査読無 19(1):1-5, 2015 DOI: 10.1007/s10157-014-1057-z.
9. Sakai N, Wada T. Revisiting inflammation in diabetic nephropathy: the role of the Nlrp3 inflammasome in glomerular resident cells. Kidney Int 査読無 87(1):12-14, 2015 DOI: 10.1038/ki.2014.322.
 10. Toyama T, Shimizu M, Furuichi K, Kaneko S, Wada T. Treatment and impact of dyslipidemia in diabetic nephropathy. Clin Exp Nephrol 査読有 18(2):201-205, 2014 DOI: 10.1007/s10157-013-0898-1.
 11. Iwata Y, Furuichi K, Hashimoto S, Yokota K, Yasuda H, Sakai N, Kitajima S, Toyama T, Shinozaki Y, Sagara A, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Pro-inflammatory/Th1 gene expression shift in high glucose stimulated mesangial cells and tubular epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 査読有 443(3):969-974, 2014 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.072.
 12. 和田隆志: 糖尿病性腎症: 最近の進歩, 日本内科学会雑誌 査読無 105(9):1870-1876, 2016
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/naika/-char/ja>
 13. 原章規・和田隆志: ESA 低反応性貧血, 臨床化学 査読無 45:110-116, 2016
<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jsc1971b/-char/ja/>
 14. 中出祐介・和田隆志: 腎臓を軸とした生体ネットワークの解明, 臨床病理 査読無 64(4):387-391, 2016
<http://www.jslm.org/books/journal/contents.html>
 15. 和田隆志: 糖尿病性腎症の臨床, 日本内科学会雑誌 査読無 105(3):482-487,

2016

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/naika/-char/ja>

〔学会発表〕(計 17件)

1. 中出祐介・和田隆志: 腎臓を軸とした生体ネットワーク機構解明への試み, 第56回日本臨床化学会年次学術集会 2016年12月3日 くまもと県民交流館パレア(熊本)
2. 和田隆志・原章規・岩田恭宜・古市賢吾: 糖尿病性腎症におけるバイオマーカー: 抗エリスロポエチン受容体抗体の可能性, 第59回日本腎臓学会学術総会 2016年6月17日 パシフィコ横浜(神奈川県)
3. 相良明宏・坂井宣彦・岩田恭宜・古市賢吾・山本靖彦・和田隆志: 骨髄由来細胞による心腎連関機序, 第59回日本腎臓学会学術総会 2016年6月17日 パシフィコ横浜(神奈川県)
4. 和田隆志: 糖尿病性腎症: 最近の進歩, 第113回日本内科学会総会・講演会 2016年4月17日 東京国際フォーラム(東京)
5. 和田隆志: 糖尿病性腎症の病態と診療, 第53回日本内科学会四国支部生涯教育講演会 2015年12月6日 かがわ国際会議場(香川)
6. 和田隆志: 糖尿病性腎症と臨床検査, 第62回日本臨床検査学会学術集会 2015年11月22日 長良川国際会議場(岐阜)
7. 和田隆志: 腎臓病の病態とバイオマーカー探索, 日本薬物動態学会第30回年会 2015年11月12日 夕-ホール船堀(東京)
8. 古市賢吾・和田隆志: 本邦における糖尿病性腎症研究: 臨床、病理、バイオマーカーの接点と展開, 第45回日本腎臓学会西部学術大会 2015年10月24日 金沢歌劇座(金沢)
9. 和田隆志: 糖尿病性腎症の臨床, 第27

年度日本内科学会生涯教育講演会 B セッション(第2回) 2015年10月18日 本多の森ホール(金沢)

10. 和田隆志: 糖尿病性腎症の病態と病期分類, 第49回糖尿病学の進歩 2015年2月21日 岡山コンベンションセンター(岡山)
11. 和田隆志・古市賢吾: 糖尿病性腎症レジストリーの現況と今後の展開, 第37回日本高血圧学会総会 2014年10月19日 パシフィコ横浜(神奈川)
12. 古市賢吾・和田隆志: 本邦における糖尿病性腎症のレジストリーと臨床疫学, 第57回日本腎臓学会学術総会 2014年7月5日 パシフィコ横浜(神奈川)
13. 和田隆志: 臨床検査の視点からみた腎臓と生体ネットワーク, 第63回日本医学検査学会 2014年5月17日 朱鷺メッセ(新潟)
14. Takashi Wada: Chronic inflammation and fibrosis in kidney diseases. The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience 2017年1月21日 武田薬品研修所(大阪)
15. Takashi Wada: DAMPING Signals in Glomerular Resident Cells. ASN Kidney Week 2016 2016年11月18日 シカゴ(アメリカ)
16. Yasunori Iwata, Akinori Hara, Kengo Furuichi, Takashi Wada.: The Protective Effect of Erythropoietin on High Glucose Stimulated Endothelial Cell 53rd Congress ERA-EDTA 2016年5月23日 ウィーン(オーストリア)
17. Yasunori Iwata, Yasuyuki Shinozaki, Haruka Yasuda, Kengo Furuichi, Norihiko Sakai, Takashi Wada.: Erythropoietin Protects Endothelial Cell from High Glucose Induced Injury. 12th World Congress on Inflammation

2015年8月11日 ポストン(アメリカ)

〔図書〕(計 7件)

1. 中川詩織・和田隆志: 糖尿病性腎症と腎硬化症の鑑別, 腎疾患・透析 最新の治療 2017-2019 5-9, 2017 南江堂
2. 和田隆志: 糖尿病性腎症, 今日の治療指針 2016年版 640-644, 2015 医学書院
3. 古市賢吾・北島信治・清水美保・和田隆志: 日本人の糖尿病性腎症の予後因子(多施設共同研究から), Annual Review 2016 腎臓 196-201, 2016 中外医学社
4. 和田隆志: 10. 糖尿病性腎症, 腎臓内科レジデントマニュアル 改訂第7版 227-239, 2015 診断と治療社
5. 遠山直志・和田隆志: 糖尿病性腎症における脂質代謝異常, Annual Review 2015 腎臓 151-156, 2015 中外医学社
6. 遠山直志・和田隆志: 糖尿病性腎症: 病期からみた治療原則, 腎疾患・透析 最新の治療 2014-2016 175-177, 2014 南江堂
7. 古市賢吾・和田隆志: 糖尿病性腎症の結節性病変とメサンギウム融解, Annual Review 腎臓 47-52, 2014 中外医学社

〔その他〕

ホームページ等

<http://lab-med.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 隆志 (WADA, Takashi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 40334784

(2) 研究分担者

古市 賢吾 (FURUICHI, Kengo)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号: 50432125