

腎性貧血における可溶性エリスロポエチンレセプターの関与の可能性

坂口美佳 前田裕弘 内木義人
長谷川廣文 金丸昭久

Possible role of soluble erythropoietin receptors in renal anemia

Mika SAKAGUCHI, Yasuhiro MAEDA, Yoshito NAIKI, Hirofumi HASEGAWA,
and Akihisa KANAMARU

Department of Internal Medicine, Division of Hematology, Nephrology, and Rheumatology,
Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan

Recombinant human erythropoietin (rHuEpo) is effective for the treatment of renal anemia associated with chronic renal failure (CRF). However, we have encountered some patients with CRF who have sometimes developed a resistance to rHuEpo. This resistance can be due to iron or folate deficiency, aluminum toxicity, hyperparathyroidism, or auto-antibodies for rHuEpo. In this study, we focused on the soluble erythropoietin receptor (sEpoR), which can bind to rHuEpo. To demonstrate the possibility that the sweeping of rHuEpo by sEpoR results in resistance to rHuEpo, we performed a bioassay using the rHuEpo-dependent cell line, UT7/EPO. The results showed that recombinant mouse sEpoR (rmsEpoR) can reduce the proliferation of UT7/EPO induced by rHuEpo in a dose-dependent manner. We consider that this cell line could be a useful tool in a bioassay to detect the inhibitory factor(s) against Epo. We selected sera from three groups of patients with renal anemia associated with CRF who were receiving hemodialysis three times a week: the first was a patient group that needed a high dose of rHuEpo (7,500 ~9,000 unit/dialysis), the second was a patient group that needed an intermediate dose of rHuEpo (4,500 unit/dialysis), the third was a patient group that needed a low dose of rHuEpo (below 1,500 unit/dialysis). Interestingly, the proliferation of UT7/EPO determined with [³H]-thymidine incorporation was reduced by the addition of sera from the first group, but not by the addition of sera from the third group.

These results suggested that serum sEpoR may play an important role in signal transduction via EpoR on erythroid progenitor in CRF patients.

Jpn J Nephrol 2002 ; 44 : 524-529.

Key words : renal anemia, Epo resistant, Epo, soluble Epo receptor

緒 言

腎性貧血症例に対して recombinant human erythropoietin (rHuEpo) が保険適用となってから 10 年以上経過した。これにより 90% 以上の症例に輸血なしでヘマトクリット (Ht) 25% 以上を維持することが可能となっている。しかし、目標 Ht 値を維持するための rHuEpo 必要量

については投与不必要な例から週に 9,000 単位以上を要する例、さらにそれでも目標 Ht 値に到達できず、中等度～高度の貧血が持続している例などさまざまである。その原因としては鉄欠乏、ビタミンや栄養素の欠乏、尿毒素、炎症性疾患の合併などがあげられるが、解明できていない部分も多い。

Epo は BFU-E や CFU-E などの赤芽球系細胞に発現し

ているエリスロポエチンレセプター(EpoR)に結合して、細胞内にシグナルが伝達されて分化や増殖を促している。EpoRにはcDNA解析によりfull length type, truncated type, soluble typeの3種類の異なった蛋白をコードするmRNAが存在することが報告されており¹⁻⁵⁾, truncated typeは主にBFU-Eに、full length typeはCFU-E以降の成熟傾向にある赤血球系前駆細胞に主に発現している¹⁾。

ヒトの可溶性EpoR(soluble EpoR:sEpoR)はalternative splicingによってexon I~IVとintron Vの一部を含み、exon VよりもC末端側を欠き、膜貫通部位を持たないため細胞外に分泌されていると考えられ、Western blottingやELISA法などによって確認され報告されている⁶⁻⁸⁾。

可溶性サイトカインレセプターのなかには生理的に重要な機能を有していることが報告されているものもあるが、sEpoRに関しては不明であり^{9,10)}, また、透析症例の血中では可溶性サイトカインレセプターが正常よりも増加しているとも報告されている。本研究においては、rHuEpo依存性細胞株であるUT7/EPOを用いて、sEpoRによるrHuEpoの結合阻害を確認すると同時に、腎性貧血患者血清中sEpoRをbioassay法で測定した。

対象と方法

1. 細胞株と培養

UT7/EPO(自治医大小松則夫博士から供与)は10% fetal calf serum(FCS)を含むIscove's modified Dulbecco's medium(IMDM)に1 IU/mlの濃度になるようにrHuEpoを添加して維持培養した。

2. 患者および血清採取

Table 1に示すように、健常者(C, n=5)、慢性腎炎ないし糖尿病性腎症由来の腎不全症例のなかで、少なくとも8週間以上rHuEpoの投与量を変更していない症例を対象とした。さらに対象症例をEpo不要ないし少量(1,500単位/週以下)投与群(L, n=5)、Epo中等量(4,500単位/週)投与群(M, n=5)、Epo大量(7,500~9,000単位/週)投与群(H, n=5)に分けて血清を採取した。なお、採取日は直前のrHuEpo投与から約44時間後(中2日のHD前)に行った。3群間での透析パラメータを測定し比較した。また、ヘルシンキ宣言に従い、informed consentを取得した後、血清を採取した。

Table 1. Case profile of hemodialysis patients

	Epo L(n=5)	Epo M(n=5)	Epo H(n=5)
Age	57.8±8.3	57.6±7.5	44.4±17.2
BUN	76.8±18.23	84.24±12.43	84.64±18.03
Cr	12.86±2.66	13.38±2.527	13.88±2.738
WBC	5,580±1,226	5,864±1,700	6,016±1,138
CRP	0.142±0.129	0±0	0±0
Fe	83.2±44.51	87.8±34.38	76.6±30.79
Ferritin	64.24±59.66*	159.2±60.78*	117.3±87.33
β ₂ -MG	40.04±11.48	36.62±4.12	35.5±6.64
PTH	159.8±175.4	32.8±27.84**	103.6±62.87**

***p<0.05

L group : a group of patients receiving low dose rHuEpo, M group : a group of patients receiving intermediate dose rHuEpo, H group : a group of patients required high dose rHuEpo

3. サイトカインと可溶性リコンビナントマウスエリスロポエチン受容体(rmsEpoR)

rHuEpo, IL-3およびGM-CSFはキリンビール株式会社から、また、rmsEpoRは京都大学農学部佐々木隆造博士から供与いただいた。

4. UT7/EPOの細胞増殖能測定法

UT7/EPOはrHuEpoを含まない10% FCS加IMDMで48時間starving後、 1×10^5 /mlに細胞数を調整し、96穴マイクロプレート(IWAKI, Japan)に200μlずつ注入した後、最終濃度が0.1, 1, 10 IU/mlの濃度になるようにrHuEpoを添加した。培養終了4時間後の³H-thymidineの取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。増殖抑制能の検討は、上述したようにセットしたウエルにそれぞれの濃度のrmsEpoRや血清を添加して、同様に³H-thymidineの取り込みで判定した。また、それぞれの測定はtriplicateで行い、その平均値を使用した。

5. rHuEpo結合試験

10% FCSを含むIMDM中のUT7/EPOを10⁶/tubeとなるように調整し、¹²⁵Iで標識したrHuEpo(Amersham International plc)を0.6~125 pMになるようにそれぞれのチューブに添加した。その後37°Cで20分間反応させ、3,000 rpmで15秒間遠心した。次に、アシストチューブNo. 72.700(アーガス・サイエンス)にオイルミックス(Di-n-butyl phthalate : olive oil=8 : 2)を注入し、その上に遠心した反応混合液を重層後7,000 rpmで2分間遠心した。その後pelletと上清の放射活性をγカウンターで測定した。rmsEpoRによる結合阻害については、前述の反応混合液にさらに各濃度のrmsEpoRを添加して反応させた。

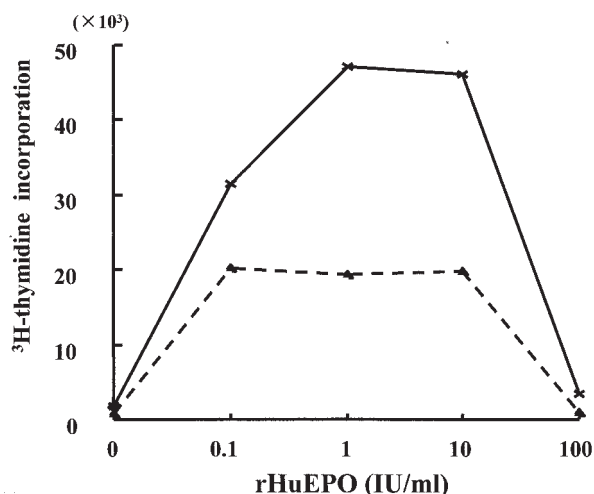


Fig. 1. Proliferation of UT7/EPO cells (1×10^5 /ml) after treatment with rHuEpo 0~100 IU/ml, ----- 24 hr, —— 48 hr

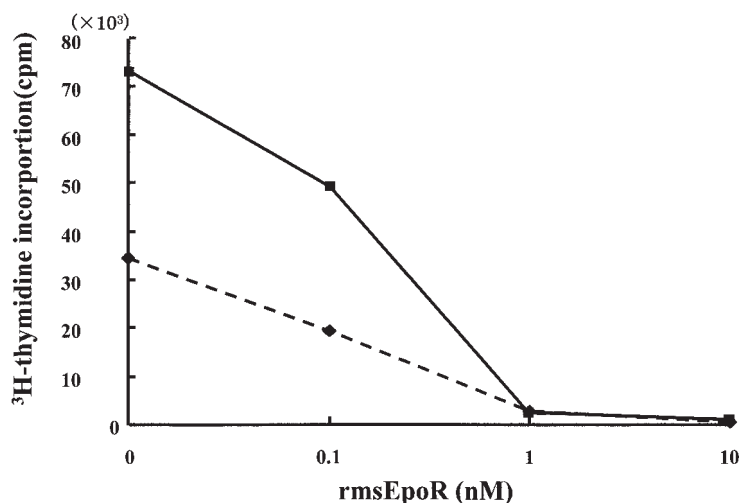


Fig. 2. Growth inhibition of UT7/EPO cells after treatment with rmsEpoR rHuEpo 1 IU/ml, 0~10 nM rmsEpoR, ----- 48 hr, —— 72 hr

その後、同様の方法で pellet と上清の放射活性を測定し結合阻害効果について検討した。

6. 腎不全患者血清添加による UT7/EPO 増殖抑制試験

前述のように、健常者(C群, n=5)、慢性腎炎ないし糖尿病性腎症由来の腎不全症例のなかで rHuEpo 不要ないし少量(1,500 単位/週以下)投与群(L群, n=5)、rHuEpo 中等量(4,500 単位/週)投与群(M群, n=5)、rHuEpo 大量(7,500~9,000 単位/週)投与群(H群, n=5)に分けて血清を採取した。なお、採取日は直前の rHuEpo 投与から約 44 時間後(中 2 日の HD 前)に行った。これらの血清を UT7 1×10^5 /ml とともに rHuEpo 1 IU/ml の IMDM で 48 時間培養後、 ^3H -thymidine の取り込みで増殖能を測定した。

7. 統計解析

ANOVA 法で検定後、Bonferroni test で各群間の有意差を解析した。

結 果

1. UT7/EPO 細胞の Epo 反応性

Fig. 1 に各濃度の rHuEpo 添加による UT7/EPO の増殖能を示した。rHuEpo 濃度 10 IU/ml までは濃度依存性に増殖能が促進されたが、それ以上の濃度になると逆に増殖は抑制された。また、UT7/EPO の GM-CSF 0.5 IU/ml での ^3H -thymidine の取り込みは 291 cpm, IL-3 0.5 IU/ml では 203 cpm(コントロール: 213 cpm)で、両者による増

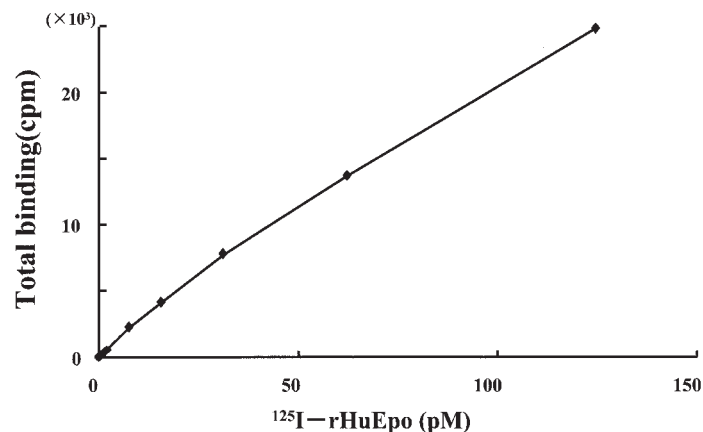


Fig. 3. Binding capacity of ^{125}I -rHuEpo to UT7/EPO cells

殖促進効果は認められなかった。

2. rmsEpoR による UT7/EPO に対する増殖抑制効果

rHuEpo 1 IU/ml の培養液中の各濃度の rmsEpoR を添加し増殖能を観察した。その結果、Fig. 2 に示すように、rmsEpoR の添加(0.1 nM, 1 nM, 10 nM)により、UT7/EPO の rHuEpo による増殖は著明に抑制された。この現象は rmsEpoR の添加による rHuEpo の EpoR への結合阻害によるものではないかと考えられた。

3. rmsEpoR による UT7/EPO への ^{125}I -rHuEpo の結合阻害

Fig. 3 に UT7/EPO への ^{125}I -rHuEpo の結合能を示した。また、rmsEpoR 添加により、この結合が著明に阻害される現象が観察された(Fig. 4)。また Table 2 に rmsEpoR 添加による UT7/EPO と ^{125}I -rHuEpo の結合阻害率

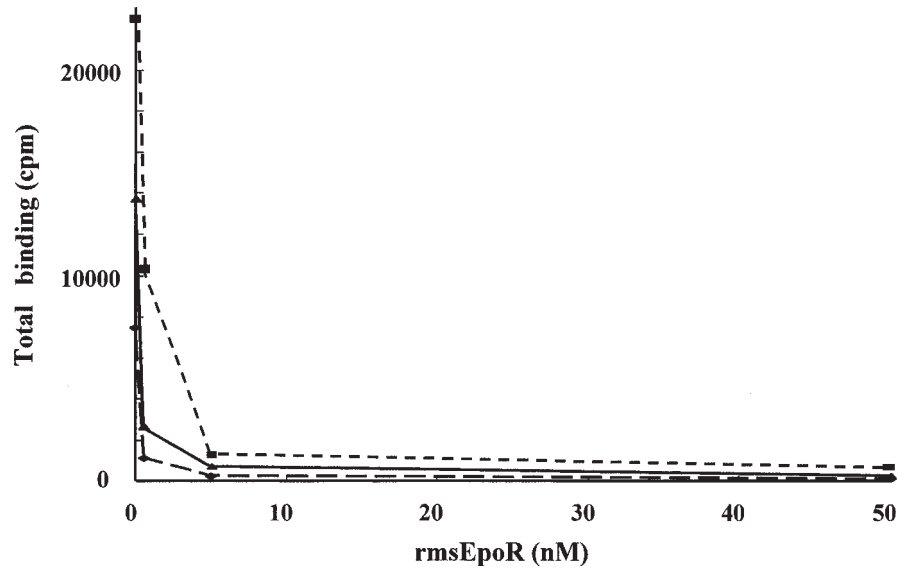


Fig. 4. Inhibition of ^{125}I -rHuEpo binding to UT7/EPO cells by rmsEpoR
 1.25 nM, — 2.5 nM, ---- 5 nM rHuEpo, -.-.- 0.5~50 nM rmsEpoR

Table 2. Property of binding inhibition by rmsEpoR

Pre-incubation		rmsEpoR (pM)					
		12.5		125		1250	
		-	+	-	+	-	+
^{125}I -rHuEpo (pM)	31.25	67	85.3	89	96	95.6	98.6
	62.5	38.1	81	88.4	94.9	97.8	98.2
	125	43.8	58.1	85.8	94.6	97.4	97.3

(%)

を示した。これらの活性は細胞を添加する前に、rmsEpoR と ^{125}I -rHuEpo を pre-incubate することにより結合阻害率はより高値となった。rHuEpo と同濃度の rmsEpoR では pre-incubate することにより 94.6%，pre-incubate しない場合は 85.8% の結合阻害を示した。

4. 血清添加による UT7/EPO 増殖能の変化

rHuEpo 投与不要，ないし少量投与透析症例血清(L 群)，rHuEpo 中等量投与透析症例血清(M 群)，rHuEpo 大量投与ないし不応透析症例(H 群)および健常人血清(C 群)をそれぞれ UT/EPO に rHuEpo とともに添加した (Fig. 5)。これらのグループ間(L, H, M)の年齢，その他貧血に影響すると考えられるパラメータを比較した (Table 1)。L 群と M 群で Ferritin が，また M 群と H 群で PTH がそれぞれ有意差を示したが，それ以外のパラメータには有意差を認めなかった。UT7/EPO 増殖能は Fig. 5 に示したように，健常人(C 群)や rHuEpo が不要ないし少量投与群(L 群)に比べて rHuEpo 投与量が高用量のグループ

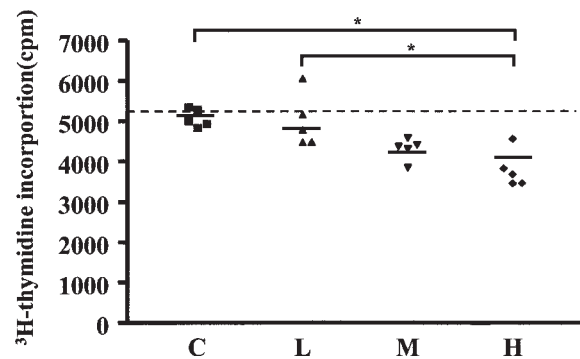


Fig. 5. Growth inhibition of UT7/EPO cells by treatment with sera from patients with renal anemia

* $p < 0.01$, dotted line indicates growth without serum, C : control sera from normal individuals, L : sera from patients receiving low dose rHuEpo, M : sera from patients receiving intermediate dose rHuEpo, H : sera from patients required high dose rHuEpo

(H群)では有意に増殖能が抑制された。rHuEPO投与量が中等量(M群)のグループは多群間比較でその他のグループと有意な差は認められなかった(Bonferroni test)。

以上より、腎性貧血患者血清中にUT7/EPOのrHuEpoによる増殖を抑制する物質の存在が考えられた。さらに、rHuEpo投与量の多い患者血清群(H)がrHuEpo少量投与患者血清群よりもUT7/EPOの増殖抑制能が強く、sEpoRの存在および量的な相違が考えられた。

考 察

慢性腎不全に伴う貧血におけるsEpoRの占める役割について検討した。今回用いたEpo依存性細胞株UT7/EPOはFig. 1に示すように、rHuEpo濃度依存性に増殖した。さらに、rmsEpoR濃度依存性に、その増殖が抑制される現象が観察された(Fig. 2)。¹²⁵I-rHuEpoを用いたbinding assayでも、rmsEpoR添加により、UT7/EPOにおける¹²⁵I-rHuEpoの結合を阻止できることが観察された(Fig. 4)。以上の結果より、UT7/EPOを用いたbioassay法により、慢性腎不全患者血清中のsEpoRの機能面を考慮した半定量が可能であると考えられた。

EpoRはマウス、ヒト間においてアミノ酸レベルで82%の相同性がある¹¹⁾。以前からsEpoRの存在についてはヒト、マウスともに報告されており、mRNAの解析からはalternative splicingによる膜貫通ドメインをもたないEpoRが確認されている。可溶性レセプターは主に2つの方法で産生され、上記以外に細胞膜結合型レセプターがプロテアーゼによってcleavageされ遊離してくるものもある。透析症例で増加しているsEpoRはいずれのタイプか不明ではあるが、今回使用したrmsEpoRと同様の機能を有する可能性が考えられる。また、EpoRは赤血球系前駆細胞だけでなく神経細胞や血管内皮細胞にも発現していることが確認されており^{12,13)}、sEpoRの由来については現時点では確認困難である。

次に、UT7/EPOのrHuEpoによる増殖系を使ってヒト血清中のsEpoRのbioassay法による定量を試みた。Fig. 5に示したように、健常者の血清は培養液に添加しても増殖は抑制されないが、透析症例、特に高用量のrHuEpoを必要としているような症例の血清はUT7/EPOの増殖能を抑制する傾向を示した。透析症例の血清中にはさまざまな尿毒素が含まれており、細胞毒性に機能している可能性が考えられるが、他のEPO非依存性細胞株であるU937を用いた場合は同様の現象はみられなかった(結果

未発表)。また、造血能に影響すると考えられる尿毒症物質、鉄、感染症などの炎症、副甲状腺機能などのパラメータも測定し一部群間に差が認められた。しかしそれぞれの数値を比較すると、この解析に関して特に問題のある影響は及ぼさないものと考えられた(Table 1)。また、多発性嚢胞腎以外の透析症例で血中EPO濃度を測定したところ正常下限前後で、患者間の差はほとんど認められなかった(結果未発表)。

以上より、rHuEpo依存性の細胞にのみ認められるような増殖抑制物質、すなわちsEpoRと類似の機能を持つ因子が透析症例、特にrHuEpoを大量に必要とする症例の血清中に多く存在することが示唆された。一般に腎不全症例は腎臓で排出されるべき物質が貯留し、小分子量の物質については透析することにより除外されるが、中～大分子量物質については透析での除去が悪く、体内に蓄積する傾向にある。これまでの報告では、透析症例において可溶性のサイトカインレセプターが健常人よりも増加しているといわれており¹⁴⁾、sEpoRについても同様の現象が考えられる。これには、sEpoRを含む可溶性サイトカインレセプターの多くが数10 Kdの分子量物質であり、通常の透析膜では除去されないことが関係している可能性がある。この場合 β_2 -MGなど中分子量物質のクリアランスの良い高性能透析膜であれば、これらの可溶性サイトカインレセプターもある程度除去することが可能と予想される。本研究における対象症例の透析膜に関しては各群間で差はなかったが、膜の性能別でも今後検討する必要があると考えられる。

可溶性サイトカインのなかには疾患において重要な意味を示すものがある。例えば成人T細胞白血病のsoluble IL-2R¹⁵⁾、ホジキン病のsoluble CD30(TNFR family)¹⁶⁾などは病勢と相関するとされており、多発性骨髄腫のsoluble IL-6R¹⁷⁾、慢性リンパ性白血病のsoluble Fc ϵ R II¹⁸⁾などは治療反応性に関係するといわれている。sEpoRに関しては、これまでにヒトのイムノブロットやELISA法などを使用して定量した報告も発表され⁶⁻⁸⁾、その機能についてはほとんど検討されていないが、個々にかなり量的な差を示しているようである。しかし、検討例はほとんど血液疾患であり、腎性貧血症例における解析はほとんどされていない。今回の実験では、イムノブロットやELISA法での定量は施行しなかったが、bioassay法による定量との比較検討により、sEpoRの機能がさらに解明されると推測すると同時に、腎性貧血症例におけるrHuEpoの治療反応性の予測も可能であると考えられる。

文 献

1. Nakamura Y, Komatsu N, Nakauchi H. A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells. *Science* 1992; 257: 1138-41.
2. Nakamura Y, Nakauchi H. A truncated erythropoietin receptor and cell death : a reanalysis. *Science* 1994; 264: 588-9.
3. Barron C, Migliaccio AR, Migliaccio G, Jiang Y, Adamson JW, Ottolenghi S. Alternatively spliced mRNAs encoding soluble isoforms of the erythropoietin receptor in murin cell lines and bone marrow. *Gene* 1994; 147: 263-8.
4. Todokoro K, Kuramochi S, Nakagawa T, Abe T, Ikawa Y. Isolation of a cDNA encoding a potential soluble receptor for human erythropoietin. *Gene* 1991; 106: 238-4.
5. Kuramochi S, Ikawa Y, Todokoro K. Characterization of murin erythropoietin genes. *J Mol Biol* 1990; 216: 567-75.
6. Baynes RD, Reddy GK, Shin YJ, Skikne BS, Cook JD. Serum form of the erythropoietin receptor identified by a sequence-specific peptide antibody. *Blood* 1993; 82: 2088-95.
7. Yoshida S, Bessho M, Sakate K, Hirasawa I, Murayoshi M, Hirashima K. Lack of relationship between soluble erythropoietin receptor levels and erythroid parameters in anemic patients. *Blood* 1996; 88: 3246-7.
8. Baynes RD. Two serum forms of the erythropoietin receptor. *Blood* 1996; 88: 3247.
9. Nagao M, Masuda S, Abe S, Ueda M, Sasaki R. Production and ligand-binding characteristics of the soluble form of murin erythropoietin receptor. *Biochem Biophys Res Com* 1992; 188: 888-97.
10. 小松則夫. UT 7. *血液・腫瘍科* 1992; 24: 331-41.
11. Jones SS, D'Andrea AD, Haines LL, Wong GG. Human erythropoietin receptor : cloning, expression, and biologic characterization. *Blood* 1990; 76: 31-5.
12. Anagnostou A, Liu Z, Steiner M, Chin K, Lee ES, Kes-simian N, Noguchi CT. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3974-8.
13. Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y, Galiyas F Jr, Tabira T, Sasaki R. Function erythropoietin receptor of the cell with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 11208-16.
14. Takamatsu T, Yasuda N, Ohno T, et al. Soluble interleukin-2 receptors in the serum of patients with chronic renal failure. *Tohoku J Exp Med* 1998; 155: 343.
15. Kamihara S, Atogami S, Sohda H, Momita S, Yamada Y, Tomonaga M. Significance of soluble interleukin-2 receptor levels for evaluation of the progression of adult T-cell leukemia. *Cancer* 1994; 73: 2753-8.
16. Pizzolo G, Vinante F, Chilosi M, Dallenbach F, Josimovic-Alasevic O, Diamantstein T. Serum levels of soluble CD30 molecule (Ki-1 antigen) in Hodgkin's disease: relationship with disease activity and clinical stage. *Br J Haematol* 1990; 75: 282-4.
17. Kyrtonis MC, Dedoussis G, Zervas C, Perifanis V, Baxevanis C, Stamatelou M, Maniatis A. Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R), a new prognostic factor in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1996; 93: 398-400.
18. Beguin Y, Lampertz S, De Groote D, Igot D, Malaise M, Fillet G. Soluble CD23 and other receptors (CD4, CD8, CD25, CD71) in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1993; 7: 2019-25.