【11】

氏　　　名	石(いし) 光(みつ)　晃(あきら)
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第807号
学位授与の日付	令和４年３月４日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項 （内科学（腎臓・高血圧））
学位論文題目	**Role of circulating endothelial progenitors in responsiveness to erythropoiesis-stimulating agents in hemodialysis patients** **（血液透析患者のエリスロポエチン反応性における血管内皮前駆細胞の役割）**
論文審査委員	（主　査）教授　三　谷　絹　子 （副　査）教授　杉　本　博　之 教授　倉　沢　和　宏

論文内容の要旨

【背　　景】

慢性腎臓病（chronic kidney disease：CKD）患者には高頻度で貧血が認められ、最も重要な原因の１つは、腎臓で産生され骨髄での赤血球造血を促すエリスロポエチン（EPO）の低下である。EPOを製剤化した赤血球造血刺激因子製剤（erythropoiesis-stimulating agents：ESA）により腎性貧血は近年著しく改善された。

しかしESAの反応性には個人差が大きく、特に透析患者に多いESA低反応性は依然として臨床上の重要な課題である。ESA低反応性の患者では、生命予後、心血管予後の悪化が広く報告されている。ESA低反応性の原因として鉄欠乏、炎症、低栄養や二次性副甲状腺機能亢進症などが報告されているが、特に心血管予後悪化との関連についての機序は十分に知られていない。

動脈硬化性疾患において、血管内皮機能の低下は比較的早期から認められる。血管内皮機能の評価としてFMD（flow-mediated dilatation）検査などのほか、末梢流血中の血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell：EPC）数が指標になることが知られている。EPCは血管内皮保護的な作用をもつ、単核球分画中のCD34/Flk-1共陽性細胞として同定された。その後EPCとしてCD133を発現するものなど、複数のタイプが報告され、心血管予後との関連性が広く示されている。

【目　　的】

血液透析患者におけるESA低反応性と血管内皮機能の関連性を明らかにするため、EPC数を含めた種々の臨床パラメーターを含めて横断的に検討した。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学病院生命倫理委員会で承認され（R-20-1J）、獨協医科大学病院で血液透析治療を受けた101人の維持透析患者（入院患者を含む）よりインフォームドコンセントを得て行われた。

ESA低反応性の指標として、週あたりのESA投与量（epoetin換算）を体重とヘモグロビン値で除したEPO抵抗性指数（Erythropoietin Resistance Index：ERI）を計算した（ERI=weekly ESA dose (IU)/kg/Hb（g/dl））。異なるESA製剤間の換算は、darbepoietin（DA）1μgに相当する量をepoetin 250 IU、およびepoetin beta pegol（continuous erythropoietin receptor activator［CERA］）1.2μgとみなして行った。

末梢血中のEPC数をフローサイトメトリーで測定した。透析開始時に採取したヘパリン化全血８mlから密度勾配遠心法により得た単核球分画100μLに、抗体（CD133/PE、CD34/PE、Flk-1/PerCr）を各々10μL混合し暗所で15分間染色、BD FACSCaliburにて測定した。EPC細胞数として、CD133/Flk-1およびCD34/Flk-1共陽性細胞数の割合を算出した。

重回帰分析を含む統計解析にはSPSS version 27を使用した。

【結　果】

被験者の93％は、種々の併存疾患のある入院患者であった。全被験者のERI（18.4［7.2–33.0］IU/週/kg/g/dL）とESA投与量（161.6［75.0–320.9］IU/週/kg）は比較的高値であった。

CD133/Flk-1陽性EPCとCD34/Flk-1陽性EPCの間には高い相関（r=0.842）が認められた。いずれのEPC数（％値）も対数変換により正規分布が得られたため、以下の解析ではこの対数値を用いた。

２つのEPCのいずれかと有意な負の相関が認められた因子は、年齢、透析歴、CRP、脈拍、ESA投与量、ERI、および末梢動脈閉塞症（PVD）の有無であった。また同様に有意な正の相関が認められた因子は、性別（男性）、収縮期血圧、およびCERAの使用であった。２つのEPCは各種因子との相関の傾向は類似していたが、CD133/Flk-1陽性EPCのほうが年齢、透析歴、CRP、ERIなどと相関性が強い傾向があり、CD133/Flk-1陽性EPCを予測する因子を、さらに多変量にて解析した。

線形重回帰分析を行うにあたり、上記の因子のうち、原因としての機序的な妥当性、多重性の有無などの観点から、解析に適する説明変数を抽出した。説明変数として年齢、性別、透析歴、CRP、収縮期血圧、脈拍、ERIを投入した結果、CD133/Flk-1陽性EPC数（の多さ）の独立した予測因子として年齢（p=0.018）、ERI（p=0.039、標準化係数β-0.202）、性別（男性）（p=0.047）が得られた。

DAは65人の患者で使用され、特にESA投与量の高い患者での高頻度の傾向がみられたが、相関や多変量解析にて、DA使用の有無によりERIとEPC間の逆相関性における実質的な差異は示されなかった。鉄欠乏（フェリチン<100ng/ml, かつTSAT<20％）の有無も、ERIとEPCの負の相関性やEPC数に影響しなかった。

【考　察】

ESA低反応性の定量的な定義は確立されていない。心血管および死亡の予後に関して、ERI 11.31が閾値として予測能をもつとの報告がある。本研究ではERI中央値18.5であり、大半がESA低反応に該当し全体として低反応性が強いコホートと考えられる。

本研究は横断研究であり、正確な因果関係は明らかでない。ESAやEPO自体の血管内皮機能やEPCへの直接的作用に関して、文献上、保護的なものも報告されているが、EPOによる種々の機序を介した血圧上昇作用が広く報告されるなど、一様ではなく両義的である。それらの作用も含めて、全身的なCKD病態における何らかの血管内皮に直接影響する機序が、ESA低反応性にも共通して関わる可能性を、本研究は示している。あるいは、骨髄は赤血球造血とEPC産生がともに行われる場であり、CKD貧血やその予後において骨髄が重要な役割をはたす可能性を、本研究が示唆するとも考えられる。

【結　論】

ERIは、さまざまな併存疾患を伴う血液透析患者コホートにおいて、EPC低下の独立した予測因子であった。ESA低反応性と血管内皮機能障害が密接に関連する可能性が本研究によりはじめて示された。心血管予後も考慮した、適切な腎性貧血の治療の策定に有用な知見となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

【論文概要】

腎不全患者におけるエリスロポエチン（erythropoietin：EPO）産生低下による腎性貧血の治療には赤血球造血刺激因子製剤（erythropoiesis stimulating agent：ESA）が用いられるが、ESAに対する反応性には個人差が大きく、ESA低反応性の患者は、心血管病リスクが高く、生命予後が不良であることが報告されている。ESA低反応性には鉄欠乏、低栄養、炎症などが関与するが、本研究では、血液透析患者において循環血液中の血管内皮前駆細胞（endothelial progenitor cell：EPC）数がESA低反応性に関係する可能性について検討した。

慢性維持血液透析患者（hemodialysis：HD）101例を対象として、密度勾配遠心法により分離した末梢血の単核球分画中のEPC数をフローサイトメトリーで測定した。蛍光プローブで標識した抗体で染色し、EPC細胞数として、CD133/Flk-1およびCD34/Flk-1陽性細胞数の割合を算出した。ESA低反応性の指標として、週あたりのESA投与量（epoetin換算）を体重とヘモグロビン値で除したEPO抵抗性指数（erythropoiesis resistance index：ERI）を計算した（ERI=週あたりESA投与量（IU）/kg/Hb（g/dl））。

対象者のESA投与量は平均162IU/週/kg、ERIは18.4IU/週/kg/(g/dL）と比較的高値であった。CD133/Flk-1陽性EPCとCD34/Flk-1陽性EPCの間には高い相関が認められ（r=0.842）、いずれも対数変換により正規分布を示したため、統計解析にはこの対数値を用いた。２つのEPCのいずれかと有意な負の相関が認められた因子は、年齢、透析歴、CRP、脈拍、ESA投与量、ERI、および末梢動脈閉塞症(PVD)の有無であった。また同様に有意な正の相関が認められた因子は、性別(男性)などであった。一方、フェリチンやトランスフェリン飽和度（TSAT）などによる鉄欠乏の有無はEPC数に影響しなかった。多変量解析にてCD133/Flk-1陽性EPC数に関係する因子としては、年齢（p=0.018)、性別（男性）（p=0.047）とともにERI（標準化係数β=-0.202、p=0.039）が有意な相関を示す説明変数であった。

骨髄は赤血球造血とEPC産生がともに起こる場であり、腎不全患者の貧血や血管障害の進行に骨髄が重要な影響を及ぼすことが推測される。本研究においてERIは、様々な併存疾患を伴う血液透析HD患者コホートにおいて、EPC低下の独立した予測因子であった。従って、ESA低反応性と血管内皮機能障害が関連する可能性が考えられ、心血管予後も考慮した、適切な腎性貧血の治療の策定に有用な知見となることが期待される。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、同意を得た血液透析患者101名を対象として、背景因子、身体所見、一般検査所見とともに、確立された方法により末梢血中のEPC数の計測やERIの評価などを行い、それらの指標の相互関係を解析することにより、心血管系の病態や予後との関連を検討している。得られたデータは客観的に統計解析されており、その検定も適切であり、本研究の方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

腎不全患者では心血管疾患のリスクが高く、その基盤となる動脈硬化の抑制は予後を改善する上で重要である。その進展には高血圧や糖尿病などの古典的な危険因子とともに、炎症、酸化ストレスなどが寄与すると考えられており、本研究で検討されたEPCやERIもこれに関係する可能性が想定されている。申請論文の成績は、これらの因子の心血管系における意義を示している点が独創的であり、新奇性が認められる。

【結論の妥当性】

慢性腎臓病と心血管疾患の密接な関係は心腎連関として注目されており、その初期段階においては血管内皮障害が共通する病態であると考えられる。腎不全患者における腎性貧血は両者に影響を与える因子であり、心腎貧血症候群という概念が提唱されている。申請論文では、血管内皮の再生を促進するEPCと貧血の規定因子であるERIの間に有意な相関が認められており、心腎連関と腎性貧血の関係を指示する妥当な成績である。

【当該分野における位置付け】

高齢化の進行とともに透析医療を受ける末期腎不全患者は増加傾向にあり、その長期予後の向上は重要な問題である。特に腎不全患者では心血管疾患の発症が多く、予後を改善するためには心血管疾患の基盤となる動脈硬化の進展を抑制することが必要である。申請論文の成績はこれに対し効果的な介入を構築する上で、細胞生物学的な観点から有用な情報を提供するものである。

【申請者の研究能力】

申請者は、腎臓病学に加え循環器病学に関し幅広い学識を修得しており、過去の報告を踏まえ、血液透析患者における血管障害と貧血の関係という実地臨床に即した研究に着手している。臨床および検査データの収集方法やその統計学的解析・評価も適切であり、そこから得られる情報に関し適切な考察を行い意義のある結論を導き出している。よって、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は、腎不全患者における血管障害と貧血の病態に関し実地臨床と密接に関連する新しい知見を示したという点で独創的かつ優れた研究内容であり、今後の腎不全診療に有用かつ当該分野におけ

る貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判断した。

（主論文公表誌）

Renal Replacement Therapy

（7：57, 2021）