公募研究助成 〈報告書〉

透析患者における血清 Calprotectin（MRP8/14）の臨床的意義と機能的メカニズムの解明

桒原孝成
熊本大学大学院生命科学研究部腎臓内科学

key words：Calprotectin，高リン血症，炎症，透析

要　旨

慢性炎症（自然炎症）は生活習慣病や癌などの病態に関与，血液透析（HD）患者では生命予後や心血管疾患発症に重要な役割を果たしている．炎症メディエーター（calprotectin; CPT，別名 myeloid-related protein 8/14［MRP8/14］）は，自然免疫受容体の toll-like receptor 4（TLR4）シグナルを増強して病態悪化に寄与する内因性リガンドの一つであり，敗血症性ショック，自己免疫疾患や腫瘍細胞の転移，心血管疾患などの病態に重要である．腎疾患においても虚血性急性腎障害や糖尿病性腎症，半月体形成性糸球体腎炎などに寄与する．今回，CPT が血液透析患者の心血管合併症を含む病態に関与しうるという仮説のもと，HD 患者における血清 CPT の臨床的意義について検討したところ，血清 CPT 高値は白血球数や高感度 CRP と良好な正相関を示し，高リン血症群における死亡リスク予測因子となることが明らかとなった．さらに in vitro において，CPT は合成した 2 次 calciprotein particles（CPP）による炎症シグナルを増強することで，高リン血症における予後不良の病態に寄与している可能性が考えられた．CPT は透析患者あるいは慢性腎臓病患者における新たな治療ターゲットとして期待される．

1　本研究の背景

本邦の CKD 患者数は 1,300 万人を超えており，透析導入患者数は年間約 4 万人，透析患者は 30 万人を超えており年々増加傾向にある．透析患者の予後は一般人口より不良であり，死亡原因は一般人と比較して心血管疾患が多く 30～40% を占める[1]．慢性炎症は，傷害やストレスを受けた細胞から放出される分子（ダメージ関連分子パターン（damage-associated molecular patterns; DAMPs））と，TLR4 などの病原体センサー間の相互作用により誘導され，生活習慣病や癌[2]に加え，HD 患者の最大の死因である心血管疾患の病態に重要である[3]．著者らが着目している CPT は好中球顆粒より発見，同定された細胞質内 Ca 結合蛋白であり[4]，myeloid-related protein 8（MRP8，S100A8）と MRP14（S100A9）の heterodimer で構成されている[5]．障害時には TLR4 や RAGE（Receptor for AGE）などの内因性リガンドとして作用し，敗血症性ショック，SLE，腫瘍転移など様々な病態で自然炎症に重要な役割を果たすことが報告されている[6~8]．著者らは糖尿病性腎症や半月体形成性糸球体腎炎の病態進展に重要な役割を果たすことを報告してきた[9~11]．さらに血清 CPT は慢性関節リウマチなど様々な病態下における慢性炎症の誘導に関与しており[12]，急性冠症候群や ANCA 関連血管炎のマーカーになりうるとの報告もなされている[13, 14]．

HD 患者では，酸化ストレスや uremic toxin，蛋白質のカルバミル化，透析膜による白血球活性化などにより，全身性慢性炎症が誘発される．高感度 CRP（high-sensitivity CRP; hsCRP）は，HD 患者においても非透析患者と同様，総死亡率と心血管死の強力な予後予測マーカーである[15]．前述の通り，CPT の臨床的意義や種々の病態に果たす機序は複数の報告がなされ

Clinical Significance and Functional Mechanisms of Serum Calprotectin（MRP8/14）in Dialysis Patients
Takashige Kuwabara

ている．また末期腎不全患者における報告は多くないものの，腹膜透析患者の生命予後，CV イベントについて報告されている[16]．これらの背景を踏まえ，CPT と透析患者の予後との関連，そして病態形成に果たす役割について検討を行った．

2　維持血液透析患者における血清 CPT 値の臨床的意義[17]

HD 患者の心血管合併症の病態に CPT が重要な可能性を想定，熊本県内の関連施設（仁誠会クリニック 5 施設）通院中の維持血液透析患者で血清 CPT を測定し，観察開始時の血清 CPT と各臨床パラメータ，死亡を含めたイベントとの関連を，横断的および前向きコホート研究（2012 年から 6.5 年間）で検討した．前述の通り，CPT は骨髄細胞由来の炎症性蛋白であり，HD 患者において血清 CPT は白血球数，hsCRP と比較的強い正相関を示すことが確認された（図 1）．生命予後については，単指標解析では高 hsCRP，低 P に加えて高 CPT が予後悪化因子であった．しかしながら，複数因子の組み合わせによる Kaplan-Meier 生命予後曲線を解析したところ，高 hsCRP と低 P は生命予後に対して相乗的な悪化を示した一方，CPT 高

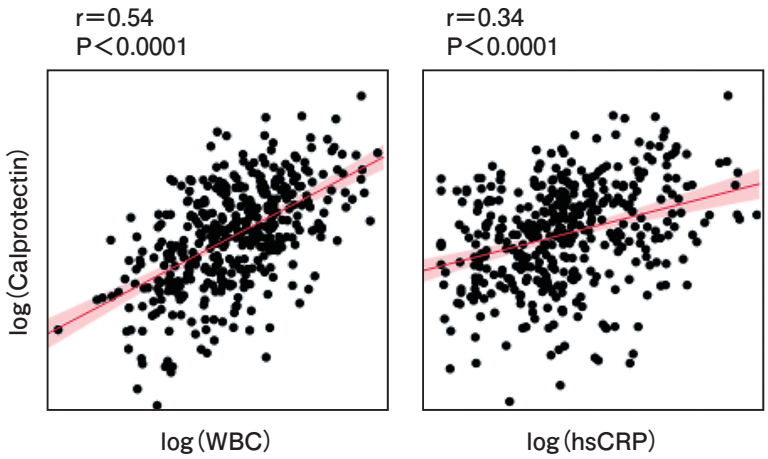
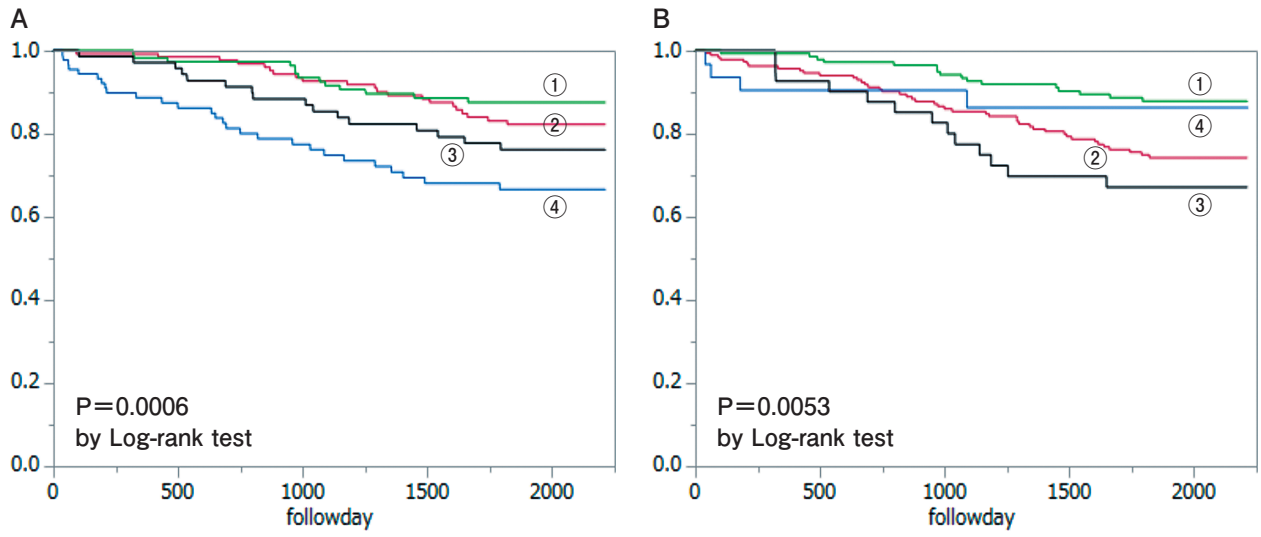


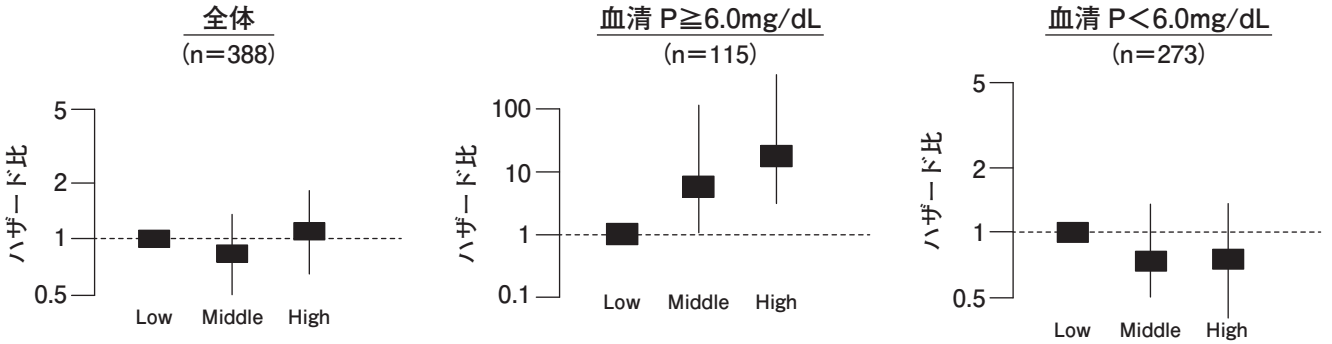
図 1　HD 患者における血清 Calprotectin 濃度と従来の炎症指標との相関
血清 Calprotectin と白血球数，高感度 CRP は正相関を示した．



① hsCRP 低，P 高
② hsCRP 低，P 低
③ hsCRP 高，P 高
④ hsCRP 高，P 低

① Calprotectin 低，P 高
② Calprotectin 低，P 低
③ Calprotectin 高，P 高
④ Calprotectin 高，P 低

図 2　HD 患者の Kaplan-Meier 生存率曲線
hsCRP 高値かつ P 低値が相乗的な予後不良指標となる一方，MRP8/14 高値群では P 高値の予後が明らかに不良であり，P 値による生命予後の逆転が認められた．



CPT(三分位)	ハザード比(95% 信頼区間)
Low	1.00(基準)
Middle	0.833(0.502-1.366)
High	1.130(0.675-1.877)

CPT(三分位)	ハザード比(95% 信頼区間)
Low	1.00(基準)
Middle	5.967(0.999-114.7)
High	18.14(3.151-345.9)

CPT(三分位)	ハザード比(95% 信頼区間)
Low	1.00(基準)
Middle	0.730(0.414-1.260)
High	0.755(0.396-1.401)

図 3　Cox 比例ハザードモデルによる血清 CPT 値と死亡リスクとの関連
補正因子：年齢，性別，DM，リウマチ，腫瘍，冠動脈疾患既往，血清 Alb，血清 Cr，CRP
血清 CPT 値は全体でみると生命予後予測に補正後の有意性が消失した一方，血清 P 値≧6.0 mg/dL の群では血清 CPT 高値では有意に生命予後不良であった．CPT 三分位による解析．

値群/低値群で分けた場合には，hsCRP＋P の組み合わせとは全く異なる結果であった．具体的には，CPT 低値群では低 P が予後不良であるが，CPT 高値群では逆に高 P で明らかに予後不良であった（図 2）．そこで血清 P 値で分けて Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を行った結果，血清 P≧6.0 mg/dL を示した高リン群において，血清 CPT 高値が有意な生命予後予測因子であった（図 3）．

3　CPT が病態形成に果たす機能的意義

HD 患者はもとより，HD 導入前の保存期 CKD においてリン代謝が生命予後，心血管合併症に重要なことは周知の事実である．今回著者らの臨床的検討によって見出した，なぜ高リン血症群において高 CPT 血症が生命予後不良を示すのか，その病態機序を明らかにすることができれば，リン代謝異常をきたす CKD 患者における血管合併症の病態について新たな側面を見出せる可能性がある．一つの仮説として，calciprotein particles（CPP）の関与を想定している．血中リン酸は CPP と呼ばれるカルシウムおよび Fetuin-A を有する不溶性ナノ粒子を形成しており[18]，CKD 患者では血中 CPP 値は血清リン濃度と相関する[19]．さらに CPP による病態形成には TLR4 を介した炎症が重要である[20]．高リン血症を呈する患者血中には高濃度な CPP が形成されていると想定される．

ヒト血清，リン酸ナトリウム，塩化カルシウムから 1 次 CPP，2 次 CPP を作成（プロトコールは既報[21, 22]を改変）した．NanoSight で測定すると，1 次 CPP の主な粒子サイズ 50.2 nm（1 次 CPP の粒子サイズは 50～100 nm）および 2 次 CPP の主な粒子サイズ 127.9 nm（2 次 CPP の粒子サイズは 100～200 nm）であり，1 次および 2 次 CPP が形成されたことが確認された．THP-1 reporter 細胞を用いて，NF-κB 誘導活性に関して評価を行ったところ，1 次 CPP は活性を有さない一方で，2 次 CPP は非常に強い誘導活性を示したことから，病的作用を有する 2 次 CPP の形成が確認できた．さらに重要なことに，CPT は 2 次 CPP による NF-κB 誘導活性を増強する可能性が確認された．

おわりに

今回の研究により，血液透析患者における予後予測マーカーとしての血清 CPT の可能性が示唆された．とりわけ高 P 血症群において，予後との関連が認められており，病態形成に果たす機能的役割を明らかにすることができれば，新たな治療標的となりうることが期待される．

謝　辞

本研究に多大なる支援を賜りました，日本透析医会および関係者の方々に深謝いたします．

令和元年度日本透析医会公募研究助成により得られた成果は，原著論文として『BMC Nephrology』に報告したため[17]，二重投稿となることを避け，本報告書

ではその概要を総説的に記載した．なお，原著論文は2020年5月に下記論文として公表された．

Kanki T, Kuwabara T, Morinaga J, et al. : The predictive role of serum calprotectin on mortality in hemodialysis patients with high phosphoremia. BMC Nephrol 2020; 21 : 158.

利益相反自己申告：

講演料：アストラゼネカ，田辺三菱製薬，第一三共

研究費・助成金：京都創薬

文　献

1） Nakai S, Watanabe Y, Masakane I, et al. : Overview of regular dialysis treatment in Japan（as of 31 December 2011）. Ther Apher Dial 2013; 17 : 567–611.

2） Donath MY, Shoelson SE : Type 2 diabetes as an inflammatory disease. Nat Rev Immunol 2011; 11 : 98–107.

3） Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, et al. : Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. Kidney Int 1999; 55 : 648–658.

4） Odink K, Cerletti N, Bruggen J, et al. : Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. Nature 1987; 330 : 80–82.

5） Korndorfer IP, Brueckner F, Skerra A : The crystal structure of the human（S100A8/S100A9）2 heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins. J Mol Biol 2007; 370 : 887–898.

6） Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, et al. : Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. Nat Med 2007; 13 : 1042–1049.

7） Loser K, Vogl T, Voskort M, et al. : The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. Nat Med 2010; 16 : 713–717.

8） Pruenster M, Kurz AR, Chung KJ, et al. : Extracellular MRP8/14 is a regulator of beta2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. Nat Commun 2015; 6 : 6915.

9） Hata Y, Kuwabara T, Mori K, et al. : Ablation of Myeloid Cell MRP8 Ameliorates Nephrotoxic Serum-induced Glomerulonephritis by Affecting Macrophage Characterization through Intraglomerular Crosstalk. Sci Rep 2020; 10 : 3056.

10） Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, et al. : Exacerbation of diabetic nephropathy by hyperlipidaemia is mediated by Toll-like receptor 4 in mice. Diabetologia 2012; 55 : 2256–2266.

11） Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, et al. : Macrophage-mediated glucolipotoxicity via myeloid-related protein 8/toll-like receptor 4 signaling in diabetic nephropathy. Clin Exp Nephrol 2014; 18 : 584–592.

12） De Rycke L, Baeten D, Foell D, et al. : Differential expression and response to anti-TNFalpha treatment of infiltrating versus resident tissue macrophage subsets in autoimmune arthritis. J Pathol 2005; 206 : 17–27.

13） Altwegg LA, Neidhart M, Hersberger M, et al. : Myeloid-related protein 8/14 complex is released by monocytes and granulocytes at the site of coronary occlusion : a novel, early, and sensitive marker of acute coronary syndromes. Eur Heart J 2007; 28 : 941–948.

14） Pepper RJ, Hamour S, Chavele KM, et al. : Leukocyte and serum S100A8/S100A9 expression reflects disease activity in ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis. Kidney Int 2013; 83 : 1150–1158.

15） Kaptoge S, Di Angelantonio E, Lowe G, et al. : C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality : an individual participant meta-analysis. Lancet 2010; 375 : 132–140.

16） Poon PY, Szeto CC, Kwan BC, et al. : Relationship between myeloid-related protein 8/14 and survival of Chinese peritoneal dialysis patients. Kidney Blood Press Res 2012; 35 : 489–496.

17） Kanki T, Kuwabara T, Morinaga J, et al. : The predictive role of serum calprotectin on mortality in hemodialysis patients with high phosphoremia. BMC Nephrol 2020; 21 : 158.

18） Kuro OM : A phosphate-centric paradigm for pathophysiology and therapy of chronic kidney disease. Kidney Int Suppl（2011）2013; 3 : 420–426.

19） Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, et al. : Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. Nephrol Dial Transplant 2012; 27 : 1957–1966.

20） Kuro-o M : Klotho, phosphate and FGF-23 in ageing and disturbed mineral metabolism. Nat Rev Nephrol 2013; 9 : 650–660.

21） Aghagolzadeh P, Bachtler M, Bijarnia R, et al. : Calcification of vascular smooth muscle cells is induced by secondary calciprotein particles and enhanced by tumor necrosis factor-alpha. Atherosclerosis 2016; 251 : 404–414.

22） Cai MMX, Smith ER, Tan SJ, et al. : The Role of Secondary Calciprotein Particles in the Mineralisation Paradox of Chronic Kidney Disease. Calcif Tissue Int 2017; 101 : 570–580.