

Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1に着目した 血液透析患者における心血管イベント予測法の開発

小林洋輝¹⁾, 常見明子¹⁾, 村田悠輔¹⁾, 松岡友実¹⁾, 中村吉宏¹⁾, 阿部雅紀¹⁾

Elucidating the Role of Neuroblastoma Suppressor of Tumorigenicity 1 in Predicting Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients

Hiroki KOBAYASHI¹⁾, Akiko TSUNEMI¹⁾, Yusuke MURATA¹⁾, Tomomi MATSUOKA¹⁾,
Yoshihiro NAKAMURA¹⁾, Masanori ABE¹⁾

要旨

本研究は、心血管イベントの高リスク群である維持透析患者において、血中Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1) が心血管疾患の予測バイオマーカーとなり得るかを明らかにすることを目的とした。関連6施設の透析患者を対象に保存血液検体を用い、Olink explore HTによる網羅的血中蛋白解析を実施した。その結果、注目していたNBL1は心血管イベントとの有意な関連を示さなかったが、炎症、血管障害、代謝異常、線維化、細胞ストレス応答などに関与する多数の新規蛋白が心血管イベント発症群で有意に変動していた。今後、これらの候補分子を組み合わせた多因子予測モデルの構築や、再現性検証を通じた新規治療標的の探索が期待される。

1. はじめに

慢性腎臓病の末期像である維持血液透析患者では、心血管死のリスクが一般人口と比較して極めて高いことが知られている。特に透析導入後早期の心血管イベント発症は予後を大きく左右する要因であり、その発症予測と早期介入は、医療経済的観点からも喫緊の課題である。透析患者における冠動脈疾患の高率な合併の背景には、高齢、糖尿病、高血圧、脂質異常など古典的リスク因子の蓄積に加え、慢性炎症や酸化ストレス、カルシウム・リン代謝異常といった腎不全に特有の病態が関与していると考えられている。

しかしながら、こうした既知の危険因子のみではすべての心血管イベントを十分に説明できず、腎不全という特殊な病態環境下において心筋障害や血管障害を促進する内因性分子メカニズムの解明が求

められている。

研究代表者はこれまでに、糖尿病性腎症患者における血漿中プロテオームを網羅的に解析し、新規BMP拮抗分子であるNeuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 (NBL1) が末期腎不全 (End-Stage Renal Disease: ESRD) の進展を強力に予測するバイオマーカーであることを世界で初めて報告した^{1,2)}。さらに、NBL1ノックアウトマウスを用いた腎線維化モデルにおいては、腎組織の線維化進展が有意に抑制されることが示され、NBL1が単なるマーカーにとどまらず、病態進展に関与する因子である可能性が示唆された。加えて、ヒト近位尿細管細胞を用いたin vitro解析では、NBL1添加により上皮間葉転換 (EMT) 様の形態変化や線維化関連マーカーの発現上昇が認められ、BMP7の抗線維化作用に対してNBL1が拮抗的に作用する可能性も見出されている。

1) 日本大学医学部 内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野
責任者連絡先: 小林洋輝, kobayashi.hiroki@nihon-u.ac.jp

これら一連の成果から、NBL1は腎臓に限らず、同様に線維化病態が進行する心臓組織においても病態修飾因子として機能する可能性があるとして着想した。特に、腎不全患者においては、心腎連関により心筋線維化が進行しやすく、NBL1がこの連関における共通の線維化促進因子として関与している可能性がある。

以上の背景を踏まえ、本研究では、NBL1が維持透析患者における心血管イベントの予測バイオマーカーとなりうるかを明らかにすることを目的とした。血中NBL1の定量を起点としつつ、Olink explore HTを用いた網羅的血中蛋白解析により、新たなバイオマーカーの探索を行うことで、より精度の高いリスク層別化や個別化予防介入への応用を目指した。

2. 対象及び方法

本研究は、維持血液透析患者における心血管イベントの予測因子としての血中NBL1の有用性を検討することを目的とした前向き観察研究である。対象は、日本大学医学部附属板橋病院の関連透析クリニック6施設に通院する維持血液透析患者とし、同意を得た上で保存血液検体および臨床情報を収集した。

測定には、保存血液検体（ -80°C 保管）を用い、Olink社の高感度網羅的蛋白質解析プラットフォーム「Olink Explore HT (High Throughput)」を用いて、5,440種類の血中タンパク質を定量した。測定値は相対発現量としてNPX (Normalized Protein expression) スケールで算出された。

アウトカムは、登録後2年間に発症した心血管イベント（致死性、非致死性の心筋梗塞、脳卒中、狭心症）とし、診療録の定期的なレビューにより確認した。イベントの定義と判定は事前に定めた基準に基づき、2名以上の医師により評価された。

統計解析は、NBL1および全血中蛋白について、将来の心血管イベント発症の有無による群間比較を行い、 $\log_2$ fold changeを算出した。さらにFalse Discovery Rate (FDR) 補正を行った上で、多重検定の影響を制御し、有意な変動タンパク質の同定を行った。

本研究は、日本大学医学部附属板橋病院の臨床研究倫理審査委員会にて審査・承認を受けた（承認番

号：RK-220308-1）。すべての参加者から文書によるインフォームド・コンセントを取得し、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮のもとに実施した。

3. 結果

維持透析患者における血中蛋白と将来のCVD発症との関連の検討において、注目していたNBL1については、血中濃度と2年以内のCVD発症との間に有意な関連は認められなかった。一方で、網羅的な探索により、多数の新規蛋白がCVDリスクと有意に関連することが明らかとなった。図に示すように (Fig.1参照)、全5440蛋白のうち、152蛋白がCVD発症群で有意に上昇 ($\log_2\text{FC} \geq 0.263$, $\text{FDR} < 0.1$)、15蛋白が有意に低下 ($\log_2\text{FC} \leq -0.263$, $\text{FDR} < 0.1$) していた (図：Volcano plot)。これらの候補蛋白群には、NBL1が関連する重要な線維化 signaling であるTGF- β pathwayに含まれる蛋白に加えて、以下のような生物学的特性が確認された：

- ・慢性炎症・免疫調節に関与するサイトカインやケモカイン様分子：慢性炎症状態が持続する透析患者では、軽微な免疫活性化がCVD進展の重要な引き金となる可能性があり、本研究で同定された複数の分子は、自然免疫系やT細胞活性と関連していた。
- ・血管構造や機能に関与する内皮細胞関連因子：血管内皮障害、血管リモデリング、マトリックス代謝に関与する因子が複数含まれており、透析患者に特有の動脈硬化の進行メカニズムを反映している可能性がある。

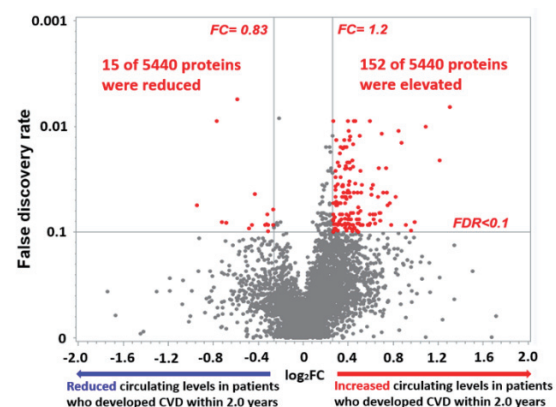


Fig 1. CVD 発症群と非発症群における血中蛋白プロファイルの違い

- ・代謝・ミトコンドリア機能に関与する酵素や構造蛋白：酸化ストレスやエネルギー代謝異常が心筋障害に波及する経路として注目されており、関連分子のいくつかはミトコンドリア局在や脂質代謝に関与していた。
- ・線維化や組織修復に関連する因子：特に心不全病態との関連が示唆される因子も複数含まれており、リモデリングに伴う組織硬化の進展が心血管イベントの背景にあることが示唆される。
- ・細胞ストレス応答やアポトーシスに関連する分子：カスパーゼ、ヒートショックタンパク、ユビキチン関連分子など、透析患者における細胞損傷と修復のバランス破綻を反映する可能性がある。

以上のように、本研究ではNBL1自体の有意性は確認されなかったものの、透析患者におけるCVD発症の新たな分子基盤が明らかとなった。今後は、これらの蛋白を含む多因子予測モデルの構築、および外部コホートにおける再現性検証を通じて、個別化予防介入や治療標的の探索に発展させる必要がある。

4. 考察

本研究では、維持透析患者において、血中NBL1が心血管イベントの予測バイオマーカーとなり得るかを検討したが、予測能に関する有意な関連は確認されなかった。この結果は、NBL1が腎線維化においては重要な役割を果たす一方で、心血管病態、特にイベント発症予測においては単独の指標としての有用性が限定的である可能性を示唆している。

一方で、Olink Explore HTを用いた網羅的蛋白解析により、心血管イベント発症群では152種類の蛋白が有意に上昇し、15種類が有意に低下しており、透析患者におけるCVDリスクに関与する多彩な分子群が新たに明らかとなった。特に、これらの蛋白の多くは、慢性炎症、免疫調節、血管内皮機能障害、代謝異常、ミトコンドリア機能低下、組織線維化、アポトーシスなどの多様な生物学的経路と関係しており、透析患者の病態の複雑性を反映する結果であった。

慢性炎症および免疫活性化は、透析患者において低レベルながら持続しやすく、動脈硬化の進展や左室肥大といった心血管病変の基盤となる。今回同定されたサイトカインやケモカイン様分子の多くは、

自然免疫系やT細胞関連経路に関与しており、無症候性で進行する炎症環境がCVDリスクを高めることを支持している。

また、内皮細胞由来の分子やマトリックスリモデリング関連因子の増加は、血管リモデリングや動脈硬化、石灰化病変の進行と関連し、透析患者における独特な血管病態の一端を示している。さらに、代謝およびミトコンドリア機能に関与する分子の変動も複数観察され、エネルギー代謝異常や酸化ストレスが筋細胞の脆弱性を高め、心不全の進展に寄与している可能性が示唆された。

線維化や組織修復関連分子の上昇もまた注目すべき知見である。NBL1が関与するTGF- β /BMPシグナル経路の他にも、組織硬化や心室リモデリングを誘導する経路に属する因子が多数同定され、透析患者においては、腎臓同様に心筋においても線維化が進行しやすい背景があると考えられる。

さらに、ユビキチンプロテアソーム系やヒートショック蛋白など、細胞ストレス応答およびアポトーシス関連分子の異常は、細胞損傷と修復の恒常性が破綻していることを示唆しており、慢性腎疾患に特徴的なミクロな組織障害が心血管病態に波及していることがうかがえる。

以上の結果から、本研究では当初想定していたNBL1単独の予測的有用性は確認できなかったものの、透析患者における心血管イベント発症に関わる新たな分子群を多数同定することができた点は重要である。これらの知見は、従来のリスク因子だけでは捉えきれなかった病態の分子基盤を明らかにするものであり、今後、これらの分子を統合した多因子予測モデルの構築や、独立した外部コホートにおける再現性検証を経て、より精緻なリスク層別化や個別化予防戦略の開発につながることを期待される。

5. 結語

本研究により、NBL1単独の予測能は確認されなかったものの、多数の新規蛋白が透析患者のCVD発症と関連することが明らかとなり、今後の予測モデルや治療標的の開発に貢献する基盤が得られた。

謝辞

本研究は令和6年度医学部小澤研究費の助成を受けて行われたものであり、ここに謝意を表します。

文 献

- 1) Kobayashi H, Looker HC, Satake E, et al. Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 is a circulating protein associated with progression to end-stage kidney disease in diabetes. *Sci Transl Med* 2022;14(657):eabj2109.
- 2) Kobayashi H, Satake E, Murata Y, et al. Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity 1 is associated with the severity of interstitial fibrosis and kidney function decline in IgA nephropathy. *J Nephrol* 2023;36(8):2245-2256.