

薬剤紹介

遺伝子組換えヒトエリスロポエチン recombinant human erythropoietin (EPOCH)

谷口 興一*

1. 緒言

腎は renal erythropoietin factor (REF) という酵素性物質を分泌するが、この REF は血中の α_2 グロブリン分画に存在するといわれている基質 (erythropoietin precursor) に作用して赤血球産生促進因子である erythropoietin (EPO) を生成する。一方、赤血球は身体の長管骨中に存在する骨髓において赤芽球が成熟して産成される。骨髓中には血球の母細胞である赤芽球、骨髓芽球、巨核球などに分化しうる幹細胞が存在し、この幹細胞は EPO の刺激によって赤芽球に分化する。さらに赤芽球は数回分裂して成熟し、赤血球に成長する。すなわち、EPO は赤血球の分化・増殖を進め、成熟を促す糖タンパク質である。

近年、遺伝子工学技術の進歩により、従来量の確保が不可能であった、純化 EPO の量産が確立され、臨床応用が可能となった。最近市販が許可され、血液透析臨床に広く活用されている遺伝子組換えヒトエリスロポエチン recombinant human erythropoietin (EPOCH) についてその概要を紹介する。

2. EPOCH の構造と組織

EPOCH は中外製薬株式会社によって開発された遺伝子組換えヒトエリスロポエチン (recombinant human erythropoietin) である。EPOCH の構造の特徴は、タンパク質部分および糖鎖部分の構造と組成を分析することによって明らかにされた。

1) タンパク質部分の構造と組成

EPOCH のタンパク質部分の構造決定に関しては、アミノ酸組成分析、末端アミノ酸配列分析、ジスルフィド結合位置、ペプチドマップ、全アミノ酸配列分析、および糖鎖結合位置を検討し、cDNA (ヒト由来 EPO 遺伝子) の塩基配列から予想されるアミノ酸の配列が確認された。

EPOCH を構成するタンパク質部分のアミノ酸配列は表1のごとくである。一次構造解析によれ

表1 EPOCH のアミノ酸組成 (文献2)

アミノ酸	理論値*1	実測値*2
Asx	12	12.0
Thr	11	10.2
Ser	10	10.5
Glx	19	19.0
Pro	8	8.1
Gly	9	10.5
Ala	19	18.4
Cys	4	3.3
Val	11	10.6
Met	1	0.5
Ile	5	4.6
Leu	23	22.7
Tyr	4	3.8
Phe	4	4.0
Lys	8	7.8
His	2	2.0
Arg	13	11.3
Trp	3	2.9

*1: cDNA から予想される構成アミノ酸をもとにして計算した各アミノ酸のモル数を示す。

Asx は (Asn+Asp) を示す。

*2: Glx(Glu+Gln)=19 としたときのポエチン 1 mol あたりのアミノ酸個数を示す。

*東京医科歯科大学霞ヶ浦分院

ば、C末端166番目の欠失した Arg を除き、1～165番目のアミノ酸配列は erythropoietin をコードとする cDNA の塩基配列から予想されるアミノ酸配列と一致している (図1)。また、構成アミノ酸のうち Cys 7 と Cys 161 および Cys 29 と Cys 33 の間で2本のジスルフィド結合を形成している。さらに Asn 24, Asn 38 および Asn 83 にはN-グリコシド型糖鎖, Ser 126 にはO-グリコシド糖鎖がそれぞれ結合し、EPOCH は分子内に糖鎖が4本存在する。EPOCH の全アミノ酸配列は uEPO (精製された尿エリスロポエチン) と一致している。

2) 糖鎖の構造と組成

EPOCH におけるタンパク質部分のアミノ酸配列のなかで、24位、38位および38位のアスパラギン残基にはN-グリコシド型糖鎖および126位のセリン残基にはO-グリコシド型糖鎖が結合している。この糖鎖部分の構造と組成を明らかにすることは、EPOCH の活性発現に関与するため重要であり、構成単糖組成比、構造解析および糖鎖分析 (糖鎖マッピング) により明らかにされた。

糖鎖部分を構成する単糖は, Man, Gal, Fuc, GalNAc, GlcNAc および NeuNAc であり、糖含量は約35%であり、糖鎖構造は、複合型のN-グリコシド型糖鎖およびムチン型のO-グリコシド型糖鎖である。N-グリコシド型糖鎖 (図2) には、NeuNAc の結合数の相違により大別して4

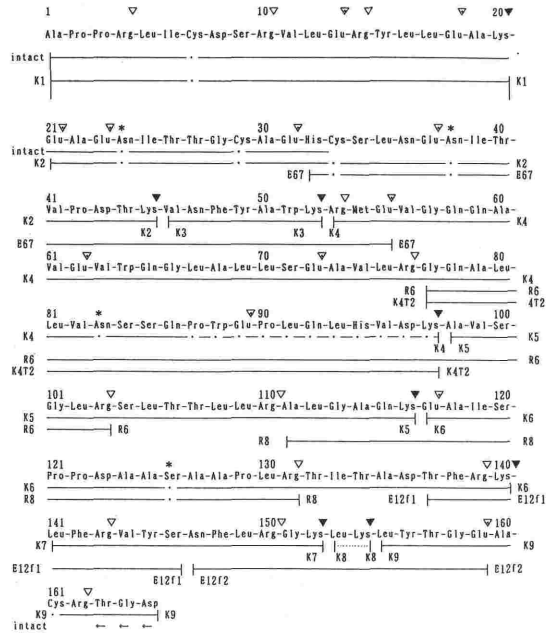


図1 EPOCH のアミノ酸配列 (文献2)

▽▽▽: Endo Arg C, Endo Glu C および Endo Lys C 消化による切断部。Intact' R シリーズ, E シリーズ, K シリーズおよび T シリーズは EPOCH, Endo Arg C, Endo Glu C, Endo Lys C 消化およびトリプシン消化によるペプチドのアミノ酸配列。各シリーズの添付数字はN末端からのペプチドの順序。※印: 糖鎖結合アミノ酸残基, *印: エドマン分析法により決定できなかったアミノ酸残基。←印: C Pase 消化により決定されたアミノ酸残基。...印: K8ペプチドは単利でできなかった。

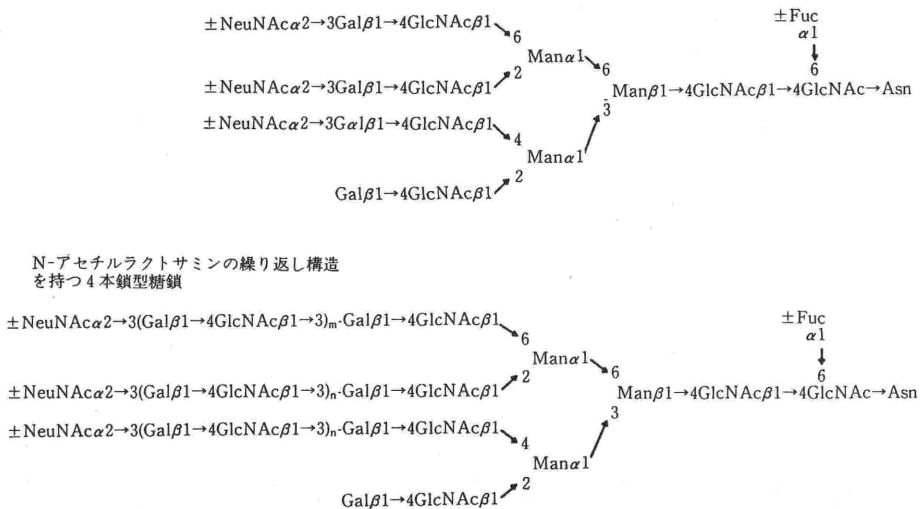


図2 EPOCH のN-グリコシド型糖鎖の代表的な構造 (文献4) m, n, o は0 または1である。m+n+o=3 のとき Lac-3, m+n+o=2 のとき Lac-2, m+n+o=1 のとき Lac-1, 4本型糖鎖。

種類に分けられ、また糖鎖残基数および結合位置の相違により11種類の分子種が認められる。さらに、N-グリコシド型糖鎖は、2本鎖型糖鎖の構成比(表2)は少なく、4本鎖型糖鎖を中心として分布し、4本鎖型糖鎖には、N-アセチルラクツサミンの繰返し構造の存在が高比率であり、かつ繰返し構造が特定の位置に認められる。一方、O-グリコシド型糖鎖(図3)には、NeuNAcの結合数により3種類の分子種が認められ、アシアロ糖鎖は約5%存在し、モノシアロ糖鎖とジシアロ糖鎖はほぼ同じ割合で存在する。モノシアロ体ではNeuNAcは非還元末端のGalに結合している⁴⁾。なお、uEPOの糖組成および糖鎖の組成はEPOCHとほぼ同じである(表3)。

表2 N-グリコシド型糖鎖の構成比(文献4)

糖鎖の種類	構成比(%)	
	トリチウム標識法	蛍光標識法
biantennary	4.7	2.0
triantennary	10.0	8.6
tetraantennary*1	48.6	38.8
tetraantennary+Lac1*2	24.5	26.8
tetraantennary+Lac2*2	8.4	10.0
tetraantennary+Lac3*2	3.8	1.3

*1: triantennary+Lac1を含む。

*2: ラクトサミンの繰返し構造数を示す。

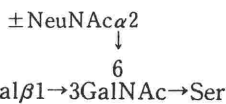


図3 EPOCHのO-グリコシド型糖鎖の構造(文献4)

表3 EPOCHとuEPOの糖組成比較(文献4)(mol/molタンパク質)

糖	EPOCH	uEPO
Fuc	2.8	2.9
Man	8.3	9.2
Gal	14.4	12.9
GlcNAc	15.9	16.3
GalNAc	1.8	0.9
NeuNAc	12.3*1	10.4*1
	13.1*2	—
	8.4*3	—

*1: 過ヨウ素酸-レゾルシノール法⁷⁾

*2: GC法, *3: HPLC法

3. 物理化学的および生物学的性質

ヒト由来 EPO 遺伝子 cDNA⁵⁾ を組み込んだ人工プラスミドベクターをチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)を用いて量産可能となったEPOCHの物理化学的ならびに生物学的性質をまとめてみる。

1) 物理学的性質

EPOCHは円偏光二色性スペクトルを有し、約53%の α -ヘリックスを含み、安定した高次構造を持つタンパク質であると考えられ、uEP(再性不良性貧血の尿から得られた⁶⁾) SDS-PAGE(SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)によると、EPOCHとuEPOはいずれも分子量マーカー3000と4300の間に幅広い単一バンドを示す。等電点電気泳動においては、EPOCHはpI 2.80~4.55の範囲にバンドが認められ、uEPOも同じ範囲にあるが、マイクロヘテロジェニティはEPOCHの方がわずかに小さい⁷⁾。

EPOCHの分子量は、化学分析法では約29000、ゲル濾過クロマトグラフ法(CPC法)では約72000、ゲル濾過クロマトグラフ低角度レーザー光散乱法(GPC-LALLS法)では約28000、超遠心分離分析法では約30000である。EPOCHの流体力学的定数に関しては、沈降係数3.12S、偏比重0.702 ml/g、拡散係数 $8.61 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{sec}$ 、摩擦比1.230である。EPOCHの溶液中の凝集挙動は、酸性領域では巨大分子量を有する凝集物を、中〜アルカリ性領域ではダイマーおよびオリゴマーを生成する。さらに、低イオン強度ではダイマーおよびオリゴマーを生成し、高イオン強度では分子量の大きい凝集物を生成する⁷⁾。

2) 生物学的性質

EPOCH, uEPOおよびヒト尿由来のWHOのbioassay用国際エリスロポエチン標準品(WHO 2nd IRP)の3者は、多血マウスにおける⁵⁹Fe取り込み活性、正常マウスにおける末梢血網状赤血球増加作用ならびにマウス骨髓細胞培養系を用いた⁵⁹Fe取り込み活性などのbioassayにおいて平行する用量反応曲線を示している。また、多血マウス法により測定したEPOCH(25ロット)の平均力価と、同様に測定uEPO(2ロット)の力価は同等の活性を呈している⁸⁾。

4. 一般薬理作用

127 $\mu\text{g}/\text{kg}$ までの静脈内投与による結果をみると、マウスおよびウサギによる検討では、中枢神経系への EPOCH の影響はみられず、またイヌを用いた実験で、呼吸・循環系に対する作用は認められない。EPOCH の 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ までの静脈内投によるモルモットでの検討で、自律神経系および平滑筋に対する影響は認められない。消化器系、泌尿・生殖系に及ぼす影響もみられない⁹⁾。

ウサギに対する 127 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の7日間の投与において、血小板凝集、コラーゲン、アラキドン酸および ADP 凝集に対して影響を与えず、また凝固時間の軽度の延長を示すが、凝固系の有意の亢進は認められない。ウサギに対する 2~27 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (7, 14日間) の静脈内投与によりヘマトクリット(Ht) および血液粘度の上昇を示すが、赤血球変形能には変化がみられない⁹⁾。

5. 血液レオロジー

1) 正常ラットに対する効果

EPOCH をラットに6週間毎日投与すると、血液粘度 (μ_B) は Ht の増加に依存して上昇するが、赤血球変形能は変化せず、連銭 (rouleau) 形成の速度が低下する¹⁰⁾。また EPOCH の投与によって、平均赤血球容積 (MCV) は増大し、赤血球数の増加をみるが、平均赤血球内ヘモグロビン (Hb) 量 (MCH) は変化しない。すなわち MCV の増大に対応して平均赤血球 Hb 濃度 (MCHC) が低下し、容積が大きく Hb 濃度が低い赤血球が EPOCH 投与により産生される¹¹⁾。さらに、Ht は EPOCH 投与において用量依存性に増加し、それに伴い μ_B も上昇する (図4)。

2) 透析患者の血液レオロジー

維持透析患者の Ht は著しく低下し、貧血が認められるが、EPOCH 投与により Ht の増加が認められる¹²⁾。著者の成績を示すと、EPOCH 投与前は $20.3 \pm 2.4\%$ であったが、週3回、1回 3000 U の投与で12週行くと、 $31.1 \pm 4.5\%$ に増加している。血液粘度 (μ_B) は $1.9 \pm 0.2 \text{ cp}$ から $2.6 \pm 0.5 \text{ cp}$ と有意の上昇を示し、血漿粘度 (μ_P) は不変であるが、健常者の μ_P に比べると高値である (図5)。したがって流動特性のよい指標である μ_B/μ_P をみると、治療前は著しく低値

(1.25 ± 0.11) であり、治療後は 1.67 ± 0.36 と有意に上昇するが、健常者 (2.72) に比べるとなお低値である¹³⁾。また酸素輸送率 (F_{O_2}) について、 F_{O_2} -Ht 曲線¹⁴⁾ をみると、治療前は48.6%であり、治療後は84.2%と著しい改善を示しているが、なお健常例 ($\text{F}_{\text{O}_2}=100\%$) より低値である。

6. 血行動態

EPOCH 投与後、Ht や Hb の上昇に伴い心拍出量の減少がみられ (図6)、貧血の代償機序としてみられる高心拍出量状態が改善される¹⁵⁾。心臓に対しては減負荷をもたらし、心機能は正常化する¹⁶⁾。心拍数の変化はみられないので、心拍出量の低下は stroke volume の減少によるものであり¹³⁾、心臓にとっては減負荷となる。しかし、約半数の例に血圧上昇 (平均血圧 mBP) がみられ、末梢血管抵抗 (SVR) の上昇を認める (図7)。有意な血圧上昇を伴わずに高心拍出量状態を改善するという報告¹⁷⁾ もあるが、Ht 増加に伴う血液粘度上昇が血圧上昇の誘因となりうることは否めない事実である。血流 (\dot{Q}) が定常流であるとみなせば、Poiseuille の法則が適用され、 $\dot{Q} = \pi D^4 \Delta P / 32 \mu_B l$ で示され、末梢血管抵抗 (SVR) は $\text{SVR} = \Delta P / \dot{Q} = (32l / \pi) \times (\mu_B / D^4)$ で示される。すなわち血管の長さ l を一定とすれば、 $\text{SVR} = k (\mu_B / D^4)$ となり、SVR は血管径と血液粘度の関数で示される。EPOCH に血管収縮作用がないと

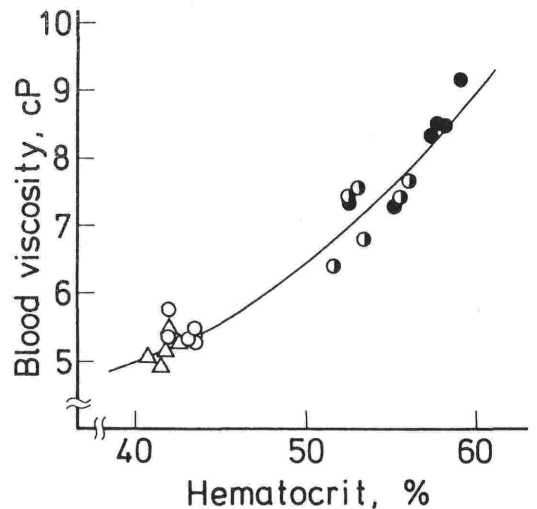


図4 Ht と血液粘度の関係 (文献10)
25°C, ずり速度 150 sec^{-1} で測定, △ 対照群,
◆ EPO 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ● EPO 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

すれば、SVR 増大は血液粘度上昇によると考えられる。治療前の末梢血管抵抗 $SVR_1 = k(\mu_{B1}/D_1^4)$ に対する治療後の末梢血管抵抗 $SVR_2 = k(\mu_{B2}/D_2^4)$ の比 $SVR_2/SVR_1 = (\mu_{B2}/\mu_{B1}) \times (D_1/D_2)^4$ を viscosity component (μ_{B2}/μ_{B1}) と vascular component ($(D_1/D_2)^4$) に分けてみると、 μ_{B2} は μ_{B1} の1.4倍であるのに対し、 D_1/D_2 は1.02倍に過ぎず、平均血圧 mBP が 20 mmHg 以上の上昇を呈する群についてみると、viscosity component は約1.7倍にも達している。EPOCH 投与に伴う高血圧に対して、血液粘度の上昇は重要な因子で

ないという安易な考え方¹⁷⁾もあるが、Ht 増加の危険性に注目し、EPOCH 治療に対して警告を提言している刮目に値する報告¹⁸⁾もある。

7. 血液ガスと酸素輸送

SaO₂, PaO₂ および pH はいずれもほぼ不変であるが、CaO₂ と Hb はEPOCH 治療後に有意の上昇が認められる。酸素輸送量 (VO₂) として、 $VO_2 = Q \cdot CaO_2$ を求めると、Hb や CaO₂ ほど著しい増大を示さない。その理由は、CaO₂は著しい増大を示しても、貧血の代償機転として認められ

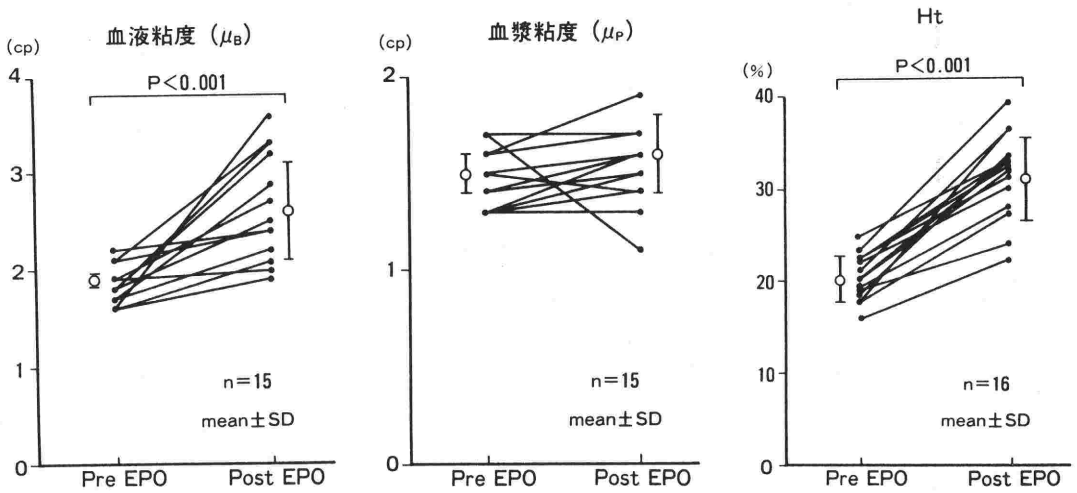


図5 EPOCH 治療による血液粘度 (μ_B), 血漿粘度 (μ_S), ヘマトクリット (Ht) の変化: Ht の増大に伴い μ_B は有意の上昇を示しているが、 μ_S は不変である。

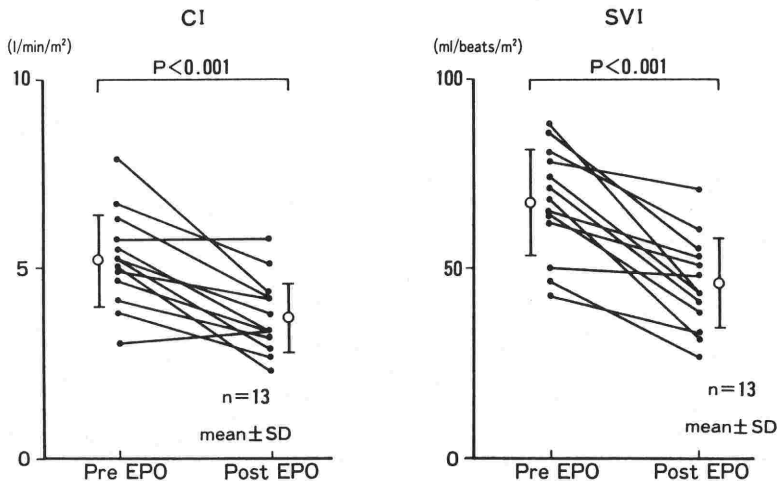


図6 EPOCH 治療による心係数 (CI) と一回拍出係数の変化: CI と SVI いずれも有意の減少を認める。

た高心拍出量状態が、Ht 上昇に伴い改善し、心拍出量が減少するためである (図8)。

8. Exercise Capacity

自転車エルゴメータ ramp 負荷による心肺運動負荷を行い、 $\dot{V}O_2$, O_2 pulse, 血圧 (SBP, DBP) および HR に関して、安静時, warm up 時, AT 時, peak 時の4点において測定し, CI と SVI などの血行動態は安静時と warm up 時の2点で測定し, 運動能力 (exercise capacity) を評価した

結果¹³⁾をみると, O_2 pulse と HR はいずれの時点でも有意の変化はみられないが, AT 値と AT に至る時間は有意の改善がみられる. CI と SVI は EPOCH 治療により安静時および運動時とも減少を示すが, 高心拍出量状態の改善, AT の改善とともに, 患者の自覚的運動能力は明かな改善¹⁹⁾を認めている. しかし, 患者自身の無理はしないという日常の気持が反映するためか, 最大運動能力の改善は明白ではない.

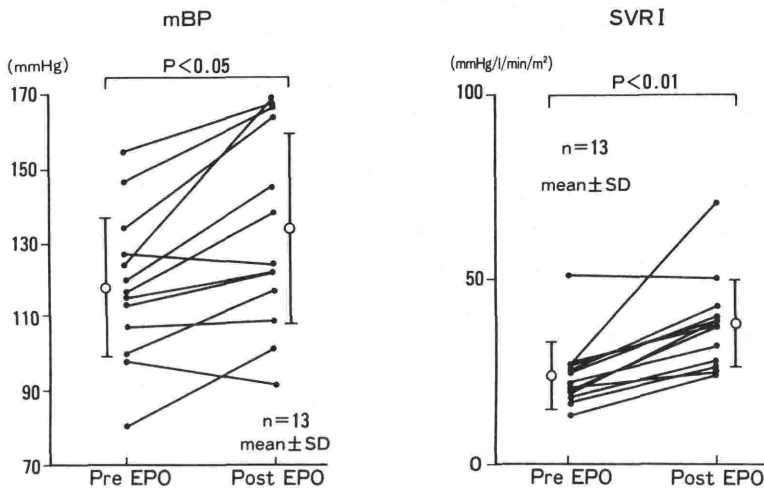


図7 EPOCH 治療による平均血圧 (mBP) と末梢血管抵抗係数 (SVRI) の変化: mBP と SVRI (mBP/CI) はいずれも有意の上昇を示す。

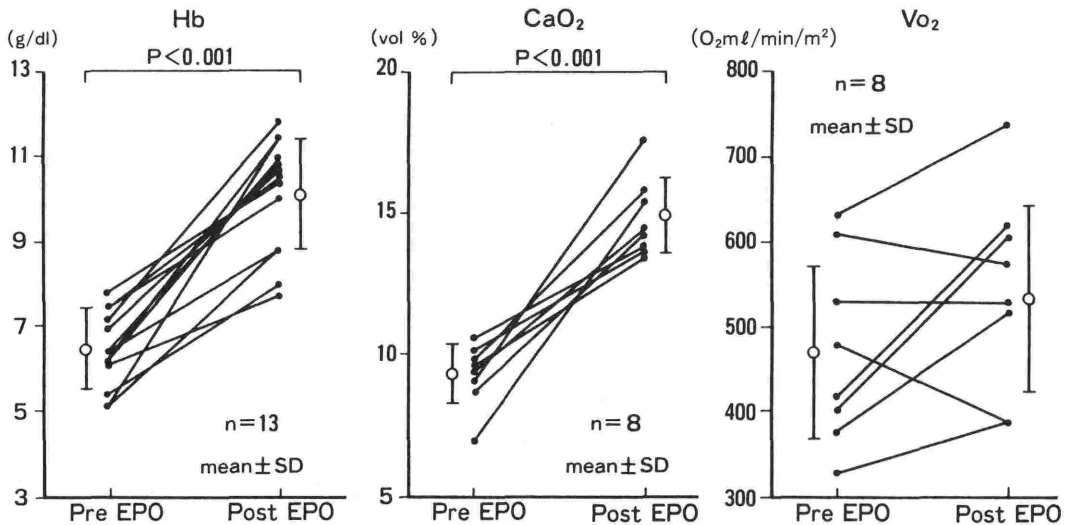


図8 EPOCH 治療によるヘモグロビン濃度 (Hb) と酸素含量 (CaO_2) および酸素輸送量 ($\dot{V}O_2$) の変化: Hb と CaO_2 は有意の上昇を示している. Vo_2 は上昇傾向を呈するが有意ではない。

9. 結 語

遺伝子組換え erythropoietin (EPOCH) による治療効果として、最も明らかなことは、Ht 上昇による貧血の改善、貧血の代償機序である高心拍出量状態の改善、AT を中心とする exercise capacity の改善などである。しかし、血液粘度の上昇、血小板凝集能の異常¹²⁾、血液凝固能の亢進²⁰⁾、高血漿粘度などにみられる血液レオロジー的異常は、EPOCH 治療患者に対して、治療抵抗性の高血圧、脳血管障害、血栓・塞栓症、およびシャント部の閉塞などの副作用や合併症をもたらす危険性がある²⁰⁾ ので、血液レオロジー的検索を含めた長期にわたる詳細な follow up²¹⁾²²⁾ が肝要である。

文 献

- 1) Gregory, C. J.: Erythropoietin sensitivity as a differentiation marker in the hemopoietic system, studies of three erythropoietic colony responses in culture. *J. Cell. Physiol.* **89**:289-302, 1976.
- 2) 武田明子, 川口 勉, 永井広史ほか: 遺伝子組換えヒトエリスロポエチン構造—そのたん白質部分の構造と組成—. *臨床医薬* **2(suppl 2)**:5-11, 1990.
- 3) Goldwasser, E., Kung, C. K. H., Elison, J.: On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. *J. Biol. Chem.* **249**:4202-4206, 1974.
- 4) 古原二葉, 佐々木弘, 大枝匡義ほか: 遺伝子組換えヒトエリスロポエチンの構造—その2. 糖鎖の構造と組成—. *臨床医薬* **6(Suppl 2)**:12-20, 1990.
- 5) Erslev, A.: Humoral regulation of red cell production. *Blood* **8**:349-357, 1953.
- 6) Miyake, T., Kung, C. K. H., Goldwasser, E.: Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **252**:5558-5564, 1977.
- 7) 遠藤義之, 武田明子, 古原二葉ほか: 遺伝子組換えヒトエリスロポエチンの物理化学的性質. *臨床医薬* **6(Suppl 2)**:21-27, 1990.
- 8) 河村明典, 山本 要, 落合宏典ほか: 遺伝子組換えヒトエリスロポエチン EPOCH の生物学的性質. *臨床医薬* **6(Suppl 2)**:28-32, 1990.
- 9) 浅野 忠, 石塚宣彦, 上条猛ほか: EPOCH の一般薬理作用. *臨床医薬* **6(Suppl 2)**:553-557, 1990.
- 10) Maeda, N., Kon K., Tateishi, N., et al.: Rheological properties of erythrocytes in recombinant human erythropoietin-administered normal rat. *Brit. J. Haemat.* **73**:105-111, 1989.
- 11) 前田信治, 昆 和典, 清家雅彦ほか: Recombinant erythropoietin と血液レオロジー. *愛媛医学* **8**:1-6, 1989.
- 12) 土肥まゆみ, 谷口興一: 人工透析患者の血液レオロジー異常. *病態整理* **8**:1006-1011, 1989.
- 13) 谷口興一, 伊東春樹, 土肥まゆみほか: 維持透析患者の血行動態・血液レオロジー・運動能力に対するエリスロポエチンの治療効果 (投稿中).
- 14) 谷口興一: 血液レオロジー因子と O₂ 輸送. *脈管学* **25**:517-520, 1985.
- 15) 栗原 怜, 加藤仁志, 河辺満彦ほか: 血液透析患者に対する recombinant human erythropoietin (r-HuEPO) 治療の循環動態に及ぼす影響. *透析会誌* **22**:733-736, 1989.
- 16) London, G. M., Zins, B., Pannier, B., et al.: Vascular changes in hemodialysis patients in response to recombinant human erythropoietin. *Kidney Int.* **36**:878-882, 1989.
- 17) Canaud, B., Donadieu, P., Polito, C., et al.: Erythropoietin-associated hypertension: What role for blood viscosity changes? *Nephron* **51**:430-431, 1989.
- 18) Shinerberger, J. H., Miller, J. H., Gardner, P. W.: Erythropoietin Alert: Risks of high hematocrit hemodialysis. *Am. Soc. Artif. Organs.* **34**:179-184, 1988.
- 19) 筒井牧子, 鈴木正司, 高橋幸雄ほか: エリスロポエチン投与による腎性貧血の改善とそれに伴う運動能力および心機能の評価. *臨床透析* **5**:121-129, 1989.
- 20) 松井則明: 血液透析. *日本臨床* **44**:1211-1217, 1986.
- 21) 平沢由平, 平嶋邦猛, 荒川正昭ほか: 腎性貧血に対する Recombinant Human Erythropoietin (EPOCH) の長期投与による臨床的検討. *腎と透析* **28**:127-139, 1990.
- 22) Macdougall, I. C., Lewis, N. P., Saunders, M. J., et al.: Long-term cardiorespiratory effects of amelioration of renal anaemia by erythropoietin. *Lancet* **3**:489-493, 1990.