

令和元年5月24日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K09257

研究課題名(和文) 日本における抗PLA2R抗体関連膜性腎症の実態と病態機序の解明

研究課題名(英文) Study on the clinical and pathological features of PLA2R-related membranous nephropathy in Japan

研究代表者

秋山 真一 (Akiyama, Shin'ichi)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号：20500010

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：一次性膜性腎症の新しい疾患概念であるPLA2R関連膜性腎症について日本人患者における臨床実態と病態機序の解明に取り組んだ。日本人患者の臨床実態に合わせてPLA2R抗体の測定法の最適化を行った。腎生検時のPLA2R抗体測定は、PLA2R関連膜性腎症の鑑別に有用なだけでなく、予後の推定にも有用なことが示された。喫煙歴のあるPLA2R抗体陽性患者は完全寛解が遅れることが示された。腎生検時PLA2R抗体濃度が50 RU/ml以上の患者は腎予後が有意に悪くなることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次性膜性腎症は、成人ネフローゼ症候群の主要疾患のひとつであり、本邦では予後は必ずしも良好ではなく、診療には高度な専門的技術が必要であった。本研究の成果は、PLA2R関連膜性腎症の鑑別と予後推定に極めて有用な手段とエビデンスを提供し、診療技術のアップデートを促すものである。

研究成果の概要(英文)：We studied on the clinical reality and pathophysiology of PLA2R-associated membranous nephropathy, a new concept of primary membranous nephropathy, in Japanese patients. We optimized the method of measuring PLA2R antibody according to the clinical situation of Japanese patients. The PLA2R antibody measurement at the time of renal biopsy was shown not only useful for differentiation of PLA2R-related membranous nephropathy but also useful for predicting prognosis. PLA2R antibody-positive patients who have a history of smoking have been shown to delay complete remission. Patients with a PLA2R antibody concentration of 50 RU/ml or more at the time of renal biopsy were shown to have a significantly worse renal prognosis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：PLA2R 膜性腎症 ネフローゼ症候群 臨床

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗 PLA2R 抗体に関する臨床研究の動向

特発性膜性腎症 (iMN, idiopathic membranous nephropathy) は、成人ネフローゼ症候群の約 20% を占め、そのうち 12% が難治性で予後は必ずしも良好とは言えない。2009 年に Beck らによって糸球体ポドサイト上の Phospholipase A2 receptor (PLA2R) が *in situ* で自己抗体と免疫複合体を形成し、ポドサイト障害を起こし、ネフローゼ症候群をきたす可能性が報告された。抗 PLA2R 抗体は、iMN 患者特異的に存在し、各国におけるその陽性率は 52% (ドイツ) ~ 98% (中国) と人種・地域で異なっているが、抗 PLA2R 抗体の特徴は各国で近似している。すなわち、抗 PLA2R 抗体は PLA2R の N 末端領域にある立体エピトープを認識しており、主要サブクラスは IgG4 であり、その血中濃度は尿蛋白量と正相関しながら先んじて変動し、抗 PLA2R 抗体陽性患者は陰性患者よりも寛解に至る期間が長期化することが明らかにされている。また、抗 PLA2R 抗体陽性患者のポドサイト上において PLA2R の発現が亢進することも報告されている。最近、Beck らは抗 PLA2R 抗体を有するタイプの iMN を“PLA2R 関連膜性腎症”と定義して、それ以外の iMN と区別することを提唱している。一方、本研究代表者は、日本においても抗 PLA2R 抗体は iMN 患者特異的に存在し、その陽性率は 53% であることやネフローゼ症候群 iMN 患者で陽性率は 61% に上昇するものの、日本人患者では抗 PLA2R 抗体濃度は尿蛋白量と強く相関しないことを明らかにした。併せて、主要サブクラスは IgG4 であること、PLA2R の N 末端領域の立体エピトープを認識していることの一部を明らかにした。さらに、研究代表者らと研究協力者の横山は、日本人でも抗 PLA2R 抗体陽性 iMN 患者でポドサイトの PLA2R 発現が亢進し、陰性患者に比べて寛解に至る期間が長期化することを明らかにした。

(2) 抗 PLA2R 抗体の測定技術に関する研究動向

これまでにウエスタンブロット法、ELISA 法、Cell-based assay 法、Multiplex beads assay 法などが開発され、一部は市販品も登場しているが、抗原となるリコンビナント PLA2R の調製・保存が難しいことから、いずれの測定法にも性能やコストに一長一短があり世界標準の測定法というものは未だ確立されていない。一方、本研究代表者は、これまでに高感度な抗 PLA2R 抗体検出用ウエスタンブロット法や ELISA 法の開発をはじめ、リコンビナント PLA2R の立体構造を保護する高分子を見出したことで常温乾燥保存が可能な抗 PLA2R 抗体簡易診断チップの開発に成功し、抗 PLA2R 抗体測定の高精度化と低コスト化に貢献してきた。さらに、細胞毒性を持つために高発現株の樹立が難しいリコンビナント PLA2R を大量生産することにも成功し、iMN 患者由来の抗体と同様に PLA2R の立体エピトープを認識する抗 hPLA2R モノクローナルマウス抗体を作成することにも成功している。

(3) 抗 PLA2R 関連膜性腎症の病態解析の研究動向

PLA2R 関連膜性腎症の病態形成機序における抗 PLA2R 抗体の役割については殆ど明らかにされていない。培養ポドサイトやトランスジェニックマウスを用いた検討が世界中でなされており、本研究代表者らもヒト PLA2R をマウス Nephrin プロモーターで糸球体ポドサイト特異的に発現させたマウスの構築に成功している。

2. 研究の目的

日本における PLA2R 関連膜性腎症の臨床実態と病態機序を解明するために、本研究では、PLA2R 抗体測定法の技術的検討、PLA2R 抗体測定の臨床研究、およびモデル生物を用いた基礎研究を目的とする。

3. 研究の方法

(1) PLA2R 抗体測定系の高性能化および測定診断プロトコルの最適化

独自に調製したリコンビナント hPLA2R タンパク質および抗 hPLA2R マウスモノクローナル抗体を用いた ELISA を構築するとともに、独自開発した簡易診断チップや従来のウエスタンブロット法、さらには、最近販売が開始された市販 ELISA キットおよび Cell-based assay chip を用いた性能比較試験を行い、PLA2R 抗体の測定診断プロトコルの最適化を行った。

(2) 日本での本疾患の臨床実態を明らかにするための臨床研究

一次性膜性腎症の病理診断が付いた日本人患者の腎生検時血漿検体中の PLA2R 抗体を測定し、日本人患者における PLA2R 抗体の陽性率を精査するとともに、臨床的病勢や予後に及ぼす腎生検時 PLA2R 抗体濃度について解析を行った。また、一部のドメインを欠損させた変異型 PLA2R タンパク質を用いて患者 PLA2R 抗体のエピトープ解析を行った。さらに、腎生検の施行を迷う重度の糖尿病等を合併したネフローゼ症候群患者を対象にして血液中の PLA2R 抗体検査を行い、隠れ膜性腎症の探索を試行した。

(3) 病態メカニズムを解明するための *in vitro*・*in vivo* 基礎研究

培養ヒトポドサイトに抗 hPLA2R 抗体を加える *in vitro* 実験、および、本研究協力者である松阪が構築したマウス Nephrin プロモーターにより hPLA2R cDNA をマウスポドサイト特異的に発現させたトランスジェニックマウスを用いて膜性腎症モデルマウスの構築に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) PLA2R 抗体測定系の高性能化および測定診断プロトコルの最適化

高感度な PLA2R 抗体測定用 ELISA や簡易診断チップの独自開発に成功し、性能およびコストの両面で十分に実用できるものであったが、知財権利の問題から実用化を断念せざるを得なかった。よって、市販 ELISA キットを用いて日本人患者向けの測定プロトコルの最適化に計画変更した。その結果、日本人患者の PLA2R 抗体濃度は欧米患者よりも低い傾向があることが明らかとなり、キットの推奨カットオフ値では偽陰性が大量に生じた為、日本人患者用に最適化したカットオフ値を再設定できた。

(2) 日本での本疾患の臨床実態を明らかにするための臨床研究

日本人一次性膜性腎症患者における PLA2R 抗体の陽性率は約 50%であった。この陽性率は報告のある何れの諸外国のものより低い値であった(図1)。腎生検の施行を迷う重度糖尿病合併ネフローゼ症候群患者 3 名に対して PLA2R 抗体測定を行ったところ、1 名の患者で PLA2R 抗体が検出され、PLA2R 関連膜性腎症であることが判明した。その後、腎生検を施行したところ一次性膜性腎症の病理像が得られた。この結果は、PLA2R 抗体の測定が腎生検と同等かそれ以上に有用な情報を得られることを示した。PLA2R 抗体のエピトープ解析では、C 末端側のエピトープに対する PLA2R 抗体を有する患者は腎生検時において約 50%を占めていた。このことはエピトープスプレディングなどの病態機序の一端を示していると考えられた。

腎生検時の PLA2R 抗体濃度と予後との解析の結果、腎生検時に PLA2R 抗体が陽性で、かつ、喫煙履歴を有する患者は完全寛解までの時間が延長することが解った(図2)。さらに、腎生検時の PLA2R 抗体は濃度依存的に腎予後を規定しており、腎生検時 PLA2R 抗体が 50 RU/ml 以上の患者では腎予後が有意に悪化することが解った(図3)。これらの結果から、腎生検時における PLA2R 抗体測定は、一次性膜性腎症の鑑別だけでなく、予後の推定にも役立つことを示した。

(3) 病態メカニズムを解明するための *in vitro*・*in vivo* 基礎研究

培養ポドサイトに抗 hPLA2R 抗体を添加して *in vitro* 膜性腎症モデルの構築を試みたが、培養ポドサイトの発育不全は誘導できるものの免疫複合体の形成などの確認はできなかった。より一層の技術的進歩が必要なが示された。一方、ポドサイト特異的 hPLA2R 発現トランスジェニックマウスでは、継代中に hPLA2R の発現現象が認められ、飼育委託先での不慮の感染事故などにより、本研究期間中に膜性腎症モデルの再現は実現できなかった。

以上、本研究により、本邦においても PLA2R 関連膜性腎症の臨床実態と病態機序の一端を明らかにすることができ、PLA2R 抗体の測定が臨床的に極めて大きな意義をもつことを示した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

1. Katsuno T, Masuda T, Saito S, Kato N, Ishimoto T, Kato S, Kosugi T, Tsuboi N, Kitamura H, Tsuzuki T, Ito Y, Maruyama S, Therapeutic efficacy of rituximab for the management of adult-onset steroid-dependent nephrotic syndrome: a retrospective study. Clin Exp Nephrol., 査読あり, 2019 Feb;23(2):207-214. doi:

Prevalence of PLA2R- and THSD7A-associated MN

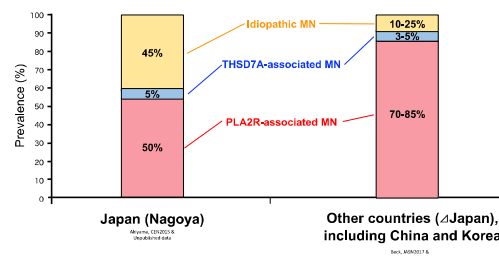
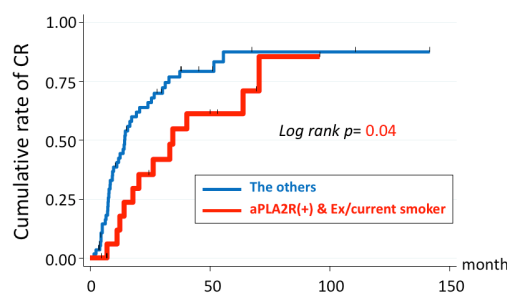
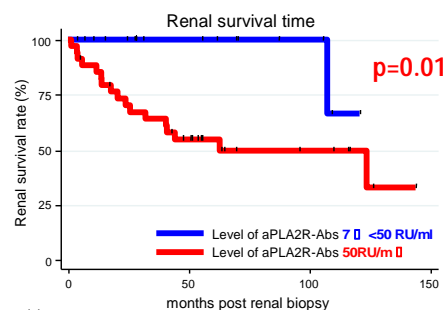


図1. 日本人一次性膜性腎症患者の PLA2R 抗体の陽性率は世界で最も低い。



Patient number without CR	0	50	100	150
The others	58	6	2	0
aPLA2R(+) & Ex/current smoker	20	6	0	0

図2. 腎生検時に PLA2R 抗体陽性かつ喫煙歴をもつ患者は完全寛解が遅い。



Number at risk	0	50	100	150
7 ≤ <50RU/ml	18	9	4	0
50RU/ml ≤	35	16	6	0

図3. 腎生検時の PLA2R 抗体が 50RU/ml 以上の患者は腎予後が悪い。

- 10.1007/s10157-018-1630-y.
2. Matsumoto A, Matsui I, Namba T, Sakaguchi Y, Mizuno H, Shirayama Y, Shimada K, Hashimoto N, Doi Y, Yamaguchi S, Kubota K, Oka T, Mori D, Akiyama S, Hamano T, Mizui M, Takabatake Y, Kaneko T, Isaka Y, VEGF-A links angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia (ALHE) to THSD7A membranous nephropathy: A report of 2 cases. *Am J Kidney Dis.*, 査読あり, 2018 Dec 13. pii: S0272-6386(18)31090-4. doi:10.1053/j.ajkd.2018.10.009.
 3. Yamamoto R, Imai E, Maruyama S, Yokoyama H, Sugiyama H, Nitta K, Tsukamoto T, Uchida S, Takeda A, Sato T, Wada T, Hayashi H, Akai Y, Fukunaga M, Tsuruya K, Masutani K, Konta T, Shoji T, Hiramatsu T, Isaka Y, 他(計58名) Regional variations in immunosuppressive therapy in patients with primary nephrotic syndrome: the Japan nephrotic syndrome cohort study. *Clin Exp Nephrol.*, 査読あり, 2018 Dec;22(6):1266-1280. doi: 10.1007/s10157-018-1579-x.
 4. Hashimoto Y, Ogata H, Yamasaki R, Sasaguri T, Ko S, Yamashita K, Xu Z, Matsushita T, Tateishi T, Akiyama S, Maruyama S, Yamamoto A, Kira JI, Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with concurrent membranous nephropathy: An Anti-paranode and Podocyte Protein Antibody Study and Literature Survey. *Front. Neurol.*, 査読あり, 2018 Nov 27;9:997. doi: 10.3389/fneur.2018.00997.
 5. Yamaguchi M, Ando M, Katsuno T, Tsuboi N, Maruyama S, Urinary protein and renal prognosis in idiopathic membranous nephropathy: a multicenter retrospective cohort study in Japan. *Ren Fail.*, 査読あり, 2018 Nov;40(1):435-441. doi: 10.1080/0886022X.2018.1487864.
 6. Arai H, Toda N, Kamimatsuse R, Nishioka K, Endo S, Akiyama S, Maruyama S, Matsubara T, Yokoi H, Yanagita M, A Refractory Case of Secondary Membranous Nephropathy Concurrent with IgG4-related Tubulointerstitial Nephritis. *Intern Med.*, 査読あり, 2018 Oct 1;57(19):2873-2877. doi: 10.2169/internalmedicine.0836-18.
 7. Katsuno T, Ozaki T, Kim H, Kato N, Suzuki Y, Akiyama S, Ishimoto T, Kosugi T, Tsuboi N, Ito Y, Maruyama S, Single-dose Rituximab Therapy for Refractory Idiopathic Membranous Nephropathy: A Single-center Experience. *Intern Med.*, 査読あり, 2017;56(13):1679-1686. doi: 10.2169/internalmedicine.56.7908.
 8. Saito T, Iwano M, Matsumoto K, Mitarai T, Yokoyama H, Yorioka N, Nishi S, Yoshimura A, Sato H, Ogahara S, Sasatomi Y, Kataoka Y, Ueda S, Koyama A, Maruyama S, Nangaku M, Imai E, Matsuo S, Tomino Y, Refractory Nephrotic Syndrome Study Group. Mizoribine therapy combined with steroids and mizoribine blood concentration monitoring for idiopathic membranous nephropathy with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin Exp Nephrol.*, 査読あり, 2017 Dec;21(6):961-970. doi: 10.1007/s10157-016-1340-2.
 9. Imaizumi T, Nakatochi M, Akiyama S, Yamaguchi M, Kurosawa H, Hirayama Y, Katsuno T, Tsuboi N, Hara M, Maruyama S, Urinary Podocalyxin as a Biomarker to Diagnose Membranous Nephropathy. *PLoS One.*, 査読あり, 2016 Sep 26;11(9):e0163507. doi: 10.1371/journal.pone.0163507.
 10. Kubota K, Hoshino J, Ueno T, Mise K, Hazue R, Sekine A, Yabuuchi J, Yamanouchi M, Suwabe T, Kikuchi K, Sumida K, Hayami N, Sawa N, Takaichi K, Fujii T, Ohashi K, Akiyama S, Maruyama S, Ubara Y, Phospholipase A2 Receptor-Positive Idiopathic Membranous Glomerulonephritis with Onset at 95 Years: Case Report. *Case Rep Nephrol Dial.*, 査読あり, 2016 May 24;6(2):76-82. doi: 10.1159/000446019.

[学会発表](計23件)

1. Shin'ichi Akiyama, Asaka Hachiya, Shoichi Maruyama, Optimization of the Cutoff Value for a Commercial Anti-PLA2R ELISA to Diagnose PLA2R-Associated Membranous Nephropathy in Japanese Patients., *Kidney Week 2018 (国際学会)*, 2018.
2. Asaka Hachiya, Shin'ichi Akiyama, Shoichi Maruyama, Levels of Anti-PLA2R Antibodies Predictive of Renal Prognosis in Japanese Patients with PLA2R-Associated Primary Membranous Nephropathy., *Kidney Week 2018 (国際学会)*, 2018.
3. Shoichi Maruyama, Hitoshi Yokoyama, Hitoshi Sugiyama, Naotake Tsuboi, Hiroshi Sato, Ichiei Narita, Incidence and age distribution of kidney diseases in Japan from the ten-year data of Japan Renal Biopsy Registry (J-RBR)., *The 16th Asia Pacific Congress of Nephrology & 2018 Annual Congress of Chinese Society of Nephrology (国際学会)*, 2018.
4. Mitsuhiro Ichioka, Keita P. Mori, Shunsuke Kawamura, Makiko Kondo, Shin'ichi Akiyama, Shoichi Maruyama, Motoko Yanagita, The effectiveness and limitation of serum anti-PLA2R antibody titer in refractory idiopathic membranous nephropathy: A case report., *ISN Frontiers Meetings 2018 (国際学会)*, 2018.

5. Takayuki Katsuno, Takaya Ozeki, Asaka Hachiya, Noritoshi Kato, Takuji Ishimoto, Sawako Kato, Tomoki Kosugi, Naotake Tsuboi, Masashi Mizuno, Yasuhiko Ito, Shoichi Maruyama, Investigation on the benefits of mycophenolate mofetil and therapeutic drug monitoring in the treatment of Japanese patients with lupus nephritis, ISN Frontiers Meetings 2018 (国際学会), 2018.
6. Takaya Ozeki, Shoichi Maruyama, Takehiko Kawaguchi, Toshiyuki Imasawa, Hiroshi Kitamura, Moritoshi Kadomura, Ritsuko Katafuchi, Kazumasa Oka, Hiroshi Sato, Cross sectional study on clinical manifestations of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS) in Japan from the data of Japan-Renal Biopsy Registry (J-RBR), ISN Frontiers Meetings 2018 (国際学会), 2018.
7. Takaya Ozeki, Takayuki Katsuno, Sawako Kato, Yoshinari Yasuda, Tomoki Kosugi, Naotake Tsuboi, Shoichi Maruyama, The effectiveness of short-term steroid regimen for adult steroid sensitive nephrotic syndrome, ISN Frontiers Meetings 2018 (国際学会), 2018.
8. Takaya Ozeki, Masahiko Ando, Makoto Yamaguchi, Takayuki Katsuno, Sawako Kato, Yoshinari Yasuda, Tomoki Kosugi, Naotake Tsuboi, Shoichi Maruyama, Treatment patterns and steroid dose for adult minimal change disease relapses: A retrospective cohort study, ISN Frontiers Meetings 2018 (国際学会), 2018.
9. 秋山真一, Antigens of Membranous Nephropathy in Japanese patients, 第61回日本腎臓学会(招待講演), 2018.
10. 蜂矢朝香, 秋山真一, 丸山彰一, PLA2R抗体価著明高値が10年以上持続している一次性膜性腎症の1例, 第48回日本腎臓学会東部学術大会, 2018.
11. 丸山彰一, 秋山真一, 石本卓嗣, 難治性腎疾患と分子標的薬(リツキサンなど), 第61回日本腎臓学会学術総会サテライトシンポジウム(招待講演), 2018.
12. 丸山彰一, 横山仁, 旭浩一, 岡田浩一, 成田一衛, 「難治性腎障害に関する調査研究」報告, 第61回日本腎臓学会学術総会(招待講演), 2018.
13. 蜂矢朝香, 秋山真一, 丸山彰一, 日本人一次性膜性腎症の新規診療技術開発: 診断時 PLA2R抗体濃度による腎予後予測, 第61回日本腎臓学会学術総会, 2018.
14. Asaka Hachiya, Shin'ichi Akiyama, Shoichi Maruyama, Initial States of Circulating Anti-Phospholipase A2 Receptor Antibody and Cigarette Smoking Predict a Clinical Outcome in Japanese Patients with Idiopathic Membranous Nephropathy, 50th Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会), 2017.
15. 秋山真一, 蜂矢朝香, 丸山彰一, 自己抗体の経時的モニタリングは特発性膜性腎症の治療反応性および予後推定の迅速評価を可能にする, 第60回日本腎臓学会学術総会, 2017.
16. 蜂矢朝香, 秋山真一, 山口真, 丸山彰一, 特発性膜性腎症において診断時の PLA2R抗体陽性と喫煙経験は予後不良因子である, 第60回日本腎臓学会学術総会, 2017.
17. 秋山真一, 丸山彰一, PLA2R抗体および THSD7A抗体の測定意義, 第47回日本腎臓学会東部学術大会, 2017.
18. 市岡光洋, 森慶太, 秋山真一, 丸山彰一, 柳田素子, 複数回の血清 PLA2R抗体価測定が治療方針決定に有用であった長期経過の特発性膜性腎症の一例, 第47回日本腎臓学会西部学術大会, 2017.
19. Shin'ichi Akiyama, Shoichi Maruyama, Prevalence of Circulating Anti-THSD7A Autoantibody in Patients with Membranous Nephropathy in Japan., 49th Annual Meeting of the American Society of Nephrology (国際学会), 2016.
20. 丸山彰一, 秋山真一, 坪井直毅, 臨床講演(Disease of the year): 難病指定としての一次性ネフローゼ症候群の臨床診断とその特徴, 第59回日本腎臓学会学術総会(招待講演), 2016.
21. 秋山真一, 丸山彰一, 日本人膜性腎症患者における血中抗 THSD7A抗体の陽性率および臨床的特徴, 第59回日本腎臓学会学術総会, 2016.
22. 山本 陵平, 横山 仁, 今井 圓裕, 丸山 彰一, 猪阪 善隆, 膜性腎症の治療: JNSCS 研究から見てくるもの, 第59回日本腎臓学会学術総会, 2016.
23. 丸山彰一, 尾関貴哉, 松尾清一, 成人ネフローゼ症候群に対する短期ステロイド投与の治療成績, 第46回日本腎臓学会東部学術大会, 2016.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：丸山 彰一

ローマ字氏名：Maruyama, Shoichi

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：10362253

(2)研究協力者

研究協力者氏名：横山 仁

ローマ字氏名：Yokoyama, Hitoshi

研究協力者氏名：松阪 泰二

ローマ字氏名：Matsusaka, Taiji

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。