

令和元年6月19日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19626

研究課題名（和文）小児特発性ネフローゼ症候群患者の制御性T細胞機能にApo C1が与える影響の検討

研究課題名（英文）The effect of apolipoprotein C1 for regulatory T-cell function in pediatric idiopathic nephrotic syndrome

研究代表者

小高 淳 (Jun, Odaka)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70382885

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：当初の研究課題に関しては、その研究課程で培養リンパ球細胞が十分に得られないという問題が生じ、評価に値する結果が得られなかった。このため、本研究と同様、小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群（ISSNS）の病態とhelper T-cellプロファイルの変化との関連を探るために検討していた研究を同時に進めることとし、これに関して結果が得られたので報告する。
リツキシマブ治療により有意に再発が抑制できた小児ISSNS患児の治療前後でのhelper T-cellのプロファイルを比較検討した。その結果、Th1/Th2比の有意な上昇とhelper T-cellの活性化の抑制が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究結果は、従来から推定されている小児ISSNSの病態とT細胞との関連性を裏付けるものである。小児ISSNSは再発の頻度が多い疾患であり、ステロイド治療が長期に及ぶことも多く、成長障害等の続発症を引き起こし健やかな成長・発達を妨げる恐れがある。一方で、本症の原因は特定されておらず、根治療法はいまだ存在しない。今回の研究結果の様に小児ISSNSの病態解明に関する知見を集積し、発症および再発の予防法の開発につなげていくことは非常に重要である。

研究成果の概要（英文）：Regarding the original research subject, in the process of lymphocyte culture, we had a problem that cultured cells could not be obtained enough, and the result was difficult to evaluate. Therefore, as with the purpose of this study, we decided to proceed with study of the relationship between the pathogenesis of pediatric idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome (ISSNS) and the changes in helper T-cell profile. The helper T-cell profiles of pediatric ISSNS children were compared before and after rituximab (RTX) treatment. The relapse frequency and prednisolone dose decreased significantly after RTX therapy. RTX therapy for pediatric patients with ISSNS promoted the shift towards the Th1 phenotype and suppressed helper T-cell activation.

研究分野：小児腎臓

キーワード：小児特発性ネフローゼ症候群 リツキシマブ T細胞

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

1. 研究開始当初の背景

我々は先の研究で、小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群 (ISSNS) の急性期患者血清において、アポリポタン C1 (Apo C1)、A2 (Apo A2) が特異的に上昇していることを確認した。小児 ISSNS における、アポリポタンの上昇や低下に関する報告はこれまでもみられるが、低蛋白血症に伴う二次的な変化であるとの認識から、いずれも病因との関係には言及していない。

我々の研究では二次性のネフローゼ症候群との比較も行っており、小児 ISSNS 患者で血清 Apo C1、Apo A2 値が有意に上昇していた。このことから、Apo C1、Apo A2 値の上昇はネフローゼ症候群による二次的な変化ではなく、小児 ISSNS の病態に関連したものである可能性が考えられた。

従来から、小児 ISSNS の病態には T リンパ球の機能異常との関連が推定されており、Apo C1、Apo A2 がこれに何らかの影響を及ぼしていないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、従来から小児 ISSNS の病態形成への関与が強く推定されているリンパ球機能に与える、Apo C1、Apo A2 の影響に関して検証を行い、小児 ISSNS の病態形成の解明に寄与することを目的とした。

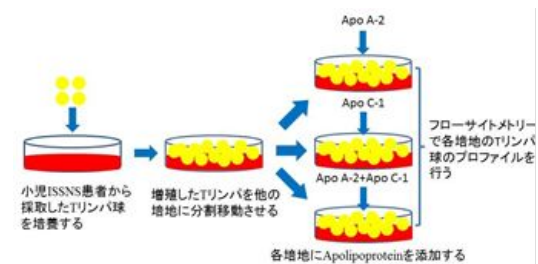
3. 研究の方法

小児 ISSNS 患者の寛解期に採取したリンパ球に、Apo C-1、Apo A2 を作用させ T リンパ球のプロファイルの変化の有無をフローサイトメトリー法で確認する (Th1、Th2、Th17、Treg)。

プロファイルに変化を生じたリンパ球の培養上清をマウスに投与し、大量の蛋白尿が誘導されるかを確認する。

また、その標的傷害組織部位を、マウス系球体を用いて電子顕微鏡にて確認する。

これに並行して、小児 ISSNS 患者の寛解期とネフローゼ期のリンパ球培養上清のプロテオミクスを行い、ネフローゼ期に有意に上昇しているマスペプチドを同定する。



4. 研究成果

(結果)

小児 ISSNS 患児から採取したリンパ球の培養を行っていたが、培養結果が安定せず、リンパ球のプロファイルを行うに足るリンパ球数を採取できなかった。このため、培養途中に Apo C1、Apo A2 を添加するのではなく、培養前にこれらを作用させて培養過程を減らし、その安定性を図ったが、やはり十分なリンパ球を採取できなかった。

(考察)

結果が得られない状況を考慮して、同様に小児 ISSNS の病態解明の一環として我々が並行して実施していた、頻回再発型ネフローゼ症候群患児に対するリツキシマブ治療前後での T リンパ球のプロファイル変化に関する研究を進めていくこととした。

(研究) 小児特発性ネフローゼ症候群患児の T 細胞分画に対しリツキシマブが与える影響の検討

1 背景

従来から、小児特発性ネフローゼ症候群の病態形成に T リンパ球の関与が示唆されている。その一方で、最近、B 細胞に発現する CD20 抗原のモノクローナル抗体であるリツキシマブ (RTX) が、小児頻回再発型ステロイド依存性ネフローゼ症候群に対する新たな治療薬として承認された。しかしながら、RTX がどのような機序を介し小児 INS の再発を抑制しているかは不明なままである。このため、本研究では、RTX 療法前後で ISSNS 患児の T リンパ球のプロファイルに何らかの変化が生じるのかを確認し、小児 ISSNS の再発をどのように抑制しているか、その機序を考察する。これによりいまだ不明である小児 ISSNS の病態の解明に関わる知見を得たいと考えた。

2 研究の目的

RTX 療法前後で ISSNS 患児の T リンパ球のプロファイルに何らかの変化が生じるのかを確認し、小児 ISSNS の再発をどのように抑制しているか、その機序を考察する。これにより、いまだ不明である小児 ISSNS の病態の解明に関わる知見を得たいと考えた。

3 研究の方法

(対象) 小児 ISSNS 患児のうち、難治性頻回再発型・ステロイド依存性ネフローゼ症候群の定義を満たし、副腎皮質ステロイド薬と免疫抑制薬を併用して寛解状態にあるもの。

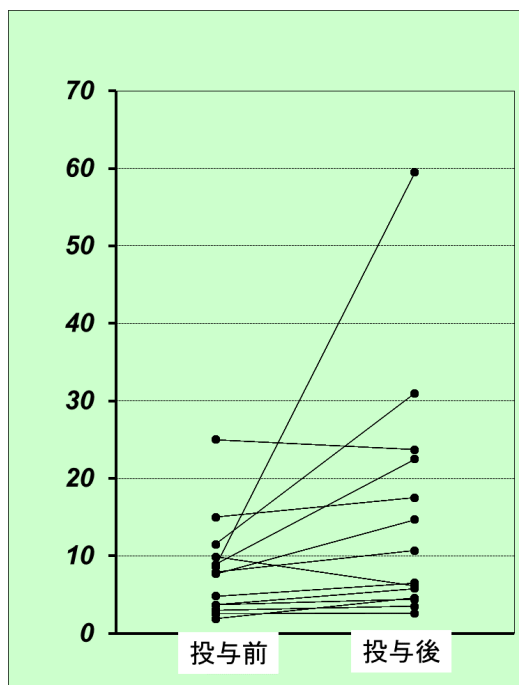
(CD4 陽性 T 細胞のプロファイリング) RTX 療法前後の CD4 陽性 T リンパ球のプロファイル (Th1、Th2、Treg) の変化を観察するため、Th1、Th2 のプロファイリング法として CD4、IFN- と IL4 を、Treg のプロファイリング法として CD4、CD25 および FOXP3 を抗原に用

いたマルチカラーフローサイトメトリーを用いた。

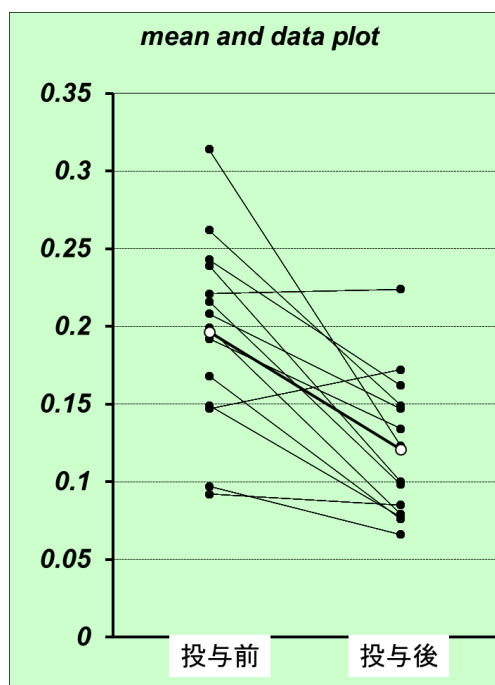
4 研究成果

(結果)

RTX は、Th1、Th2 のバランスを変化させ、Th1/Th2 比を有意に上昇させた (P< 0.05 図 1)。また、Th1、Th2 への活性化を抑制していることも確認された (P< 0.05 図 2)。一方で、RTX 治療前後で Treg の割合には有意な変化は生じなかった。



(図 1) Th1/Th2 比



(図 2) Th0 + Th1 + Th2

(考察)

小児 ISSNS の患児では、ネフローゼ期には Th2 優位で、寛解すると Th1 優位の状態になることが報告されている (Kanai T et al. Clin Exp Nephrol. 2010)。今回の研究で RTX 治療後に Th1 優位となっており、この変化が小児 ISSNS の寛解維持を寄与している可能性がある。

また、今回の結果で、RTX 治療により Th1、Th2 への活性化が抑制されており、RTX による B 細胞系の抑制が Th 細胞活性化の抑制をもたらしている可能性が考えられた。

以上の結果から、RTX 療法が小児 ISSNS 再発を抑制する機序として、B 細胞系の抑制を介した Th 細胞のプロファイルの変化や、活性化の抑制が推定される。

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

小高 淳、金井孝裕、伊東岳峰、斎藤貴志、青柳 順、別井広幸、山形崇倫 リツキシマブ療法による特発性ネフローゼ症候群患児の T 細胞プロファイル変化の検討 第 121 回日本小児科学会学術集会 2018 年 4 月 福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔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：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。