

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10165

研究課題名(和文) 難治性ネフローゼ症候群におけるB細胞の関与

研究課題名(英文) Involvement B cells in refractory nephrotic syndrome

研究代表者

小松 誠和 (Komatsu, Nobukazu)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：50343687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小児難治性ネフローゼ症候群患者の治療においてリツキシマブを投与すると抗体を産生する役割を担うと言われるB細胞が末梢血からいなくなる。併せてB細胞の分化は一旦リセットされ新たなB細胞が構築されることとなる。本研究においてB細胞が再構築される際に形成される抗体の設計図(BCRレパトア)が偏っていると再発のリスクが高いことが示唆された。また、それに先立ち、再発においてT細胞におけるTCRレパトアの偏りも再発に関連することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児難治性ネフローゼ症候群、特に微小変化型ネフローゼ症候群においては腎組織への抗体の沈着が認められないことから、B細胞の関与について不明な点が多い。本研究においてBCRレパトア、TCRレパトアの偏りがネフローゼ症候群の再発と関連することが示唆された。

小児難治性ネフローゼ症候群の実臨床における治療において、治療の期間及び寛解の目安としてBCRレパトアやTCRレパトアが利用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：B cell depletion had seen in refractory nephrotic syndrome patients treated with rituximab(RTX). In addition, B cell differentiation had reset and rebuild their B cell receptor repertoire after RTX treatment. During B cell rebuilding, poor BCR repertoire indicated high risk for relapse of nephrotic syndrome. And poor TCR repertoire had seen before the change BCR repertoire.

研究分野：腎臓免疫

キーワード：ネフローゼ症候群 B細胞 リツキシマブ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群とは、タンパク質が尿中に大量に漏れ出てしまい、血液中のタンパク質の濃度が低下し、尿の量が減り、身体がむくむ病気である。小児の発症するネフローゼ症候群は、小児 10 万人あたり 5~6 人の頻度であり、その大半は、ステロイド剤による治療によく反応し、平均 1 週間程度で尿中タンパク質は陰性になり寛解する。しかしながら、ステロイド剤の減量や中止に伴い再発する難治性ステロイド依存性ネフローゼ症候群 (SDNS) が多く、副作用の多いステロイド剤を長期投与することが大きな問題となっている。近年では、B 細胞を特異的に排除するリツキシマブ (RTX) の投与によりステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の寛解が得られると報告され (Iijima ら、The Lancet 2014)、ネフローゼ症候群の病因に B 細胞の機能異常、あるいは T 細胞と B 細胞の情報伝達の異常が関連することが示唆されている。

RTX はヒト CD20 分子を抗原とするマウス ヒトキメラ抗体である。CD20 分子は B 細胞特異的な表面分子であり、プレ B 細胞、未成熟 B 細胞、成熟 B 細胞、活性化 B 細胞と分化する過程において発現を認めるが、形質細胞に分化するとその発現は失われる。RTX はプレ B 細胞から活性化 B 細胞までの分化段階の B 細胞が除去されることから、B 細胞リンパ腫などの B 細胞に異常をきたす疾患を対象に利用されてきた。近年では全身性エリテマトーデスや関節リウマチなども RTX が試用され、認容性と有効性が報告されている (Wendler ら、Arthritis Res. Ther. 2014、Nelson ら、Nature Rev Drug Discovery 2010)。また、RTX 投与により自己抗体産生 B 細胞はその後認められないことから、RTX は B 細胞を除去するのみならず、B 細胞の分化機能をリセットする働きをもつと考えられる (Kurosaki ら、J Clin Invest. 2008)。B 細胞の主な機能は、免疫グロブリン (抗体) を産生することや T 細胞活性化を通じて免疫反応亢進に関与することが知られている。その一方、インターロイキン 10 (IL-10) を産生することにより免疫抑制作用を有する調節性 B 細胞も近年見出されており、自己免疫疾患、アレルギー疾患、感染症、移植片対宿主病 (GVHD) 等の免疫関連疾患のみならず、がん免疫、肥満及び動脈硬化の抑制にも関与している可能性が示唆されている (Mauri ら、Annu Rev Immunol. 2012、Nishimura ら、Cell Metabol. 2013)。このように、B 細胞も T 細胞と同様に様々な疾患において免疫機能の亢進と抑制の働きを示すが、ネフローゼ症候群における B 細胞の役割は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

ヒト CD20 抗原に対するマウス-ヒトキメラ型モノクローナル抗体であるリツキシマブ (RTX) が難治性ステロイド依存性ネフローゼ症候群 (SDNS) に有効であることから SDNS の発症に B 細胞が関与することが示唆されている。しかしながら B 細胞がどのように SDNS 発症へ関与するかという疑問は未だ解明されていない。本研究では、B 細胞の免疫フェノタイプ解析、B 細胞受容体 (BCR) レパトア解析、マイクロアレイ解析などを中心に、SDNS 発症における B 細胞の役割について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1. RTX 治療を行う SDNS 患者末梢血の免疫フェノタイプについて経時的解析を実施した。

小児 SDNS 患者を対象として、RTX 治療に伴い経時的に末梢血を採血した。採血後、末梢血は比重遠心分離法により単核球画分 (PBMC) を分離・保存した。残りの PBMC は蛍光標識した抗 CD20 抗体、抗 CD43 抗体、抗 CD10 抗体、抗 CD19 抗体などで染色し、フローサイトメーターを用いて B 細胞の免疫フェノタイプを解析した。ナイーブ B 細胞やメモリー B 細胞など免疫機能亢進に寄与する細胞集団や、抑制的に作用する調節性 B 細胞集団について臨床経過との関連性を踏まえて解析を実施した。

2. RTX 治療を行う SDNS 患者末梢血中 B 細胞の BCR レパトアについて RTX 治療前後の解析を実施した。

BCR は B 細胞の細胞表面に発現する分子で、免疫グロブリン (抗体) としても知られている。個々の B 細胞は遺伝子再編成により異なる BCR 遺伝子をコードしており、個人や環境によりそのレパトア (BCR レパトア) は異なっている。RTX 治療を行う SDNS 患者の治療前後の BCR レパトアを解析することで、B 細胞のクローナリティーの変化について RTX 治療前後の相違を比較した。

3. RTX 治療を行う SDNS 患者末梢血中 B 細胞の遺伝子発現やタンパク質発現について経時的解析を実施する。

タンパク質 (特にサイトカイン) 産生について変化をマルチプレックス法により測定した。先に得られている免疫フェノタイプの変化に伴い、免疫系を亢進する因子・抑制する因子の挙動がそれと一致・関連するかを検討した。

4. 研究成果

ヒト CD20 抗原に対するマウス - ヒトキメラ型モノクローナル抗体であるリツキシマブ (RTX) が難治性ステロイド依存性ネフローゼ症候群 (SDNS) に有効であることから SDNS の発症に B 細胞が関与することが示唆されている。しかしながら B 細胞がどのように SDNS 発症へ関与するかという疑問は未だ解明されていない。本研究では RTX 治療を行う SDNS 患者末梢血中 B 細胞の免疫フェノタイプ解析、B 細胞受容体 (BCR) レパトア解析、マイクロアレイ解析などを通して、SDNS 発症における B 細胞の役割について明らかにすることを目的とした。

RTX 治療を行う小児 SDNS 患者について 65 名の免疫フェノタイプの継時的解析を行った。多くの患者において RTX 投与後速やかに末梢血中の CD20 陽性細胞が消失し、RTX 初回投与後約 20 - 30 週後から CD20 陽性 B 細胞の再構築を認める症例が多く観察された。また、一般に B 細胞分化初期に発現が知られている CD10 分子の発現を認める症例も見出された。

B 細胞受容体すなわち抗体の多様性と関連する BCR レパトア解析については全症例実施することが困難であったため典型的な臨床経過を示す患者においてのみ実施した。RTX 治療直前の B 細胞と RTX 治療後に再構築された B 細胞の BCR レパトアについて比較検討した結果、RTX 治療前後において BCR レパトアに大きな差異が見られるものと、見られないものがあった。

RTX 治療を行う SDNS 患者末梢血 B 細胞について調節性 B 細胞の関与を検討するため B 細胞が産生する IL-10 についても検討を行なったが有意な発現を認めなかった。また、血漿中のタンパク質 (サイトカイン) 発現についても有意な変動は認めなかった。

上記の実験結果を臨床情報と併せて解析してみた。まず小児 SDNS 患者に RTX を投与すると速やかに B 細胞の消失が認められ、20-30 週後から CD20 陽性 B 細胞の再構築を認める。再発する患者の多くは B 細胞が再構築される時期において再発している。小児 SDNS 患者末梢血の BCR レパトアは RTX 投与前、多様に乏しい様子を示した。B 細胞の再構築時の BCR レパトアを見ると、再発をきたした患者においては BCR レパトアの多様性が変わらず乏しい様子を示した。一方、再発せず快方に向かった患者においては RTX 投与前に比して BCR レパトアの多様に改善傾向が見られた。これらの結果より小児 SDNS においては BCR レパトアの多様性が発祥に何らかの役割を果たしていることが推測された。

本研究期間内に長期に寛解状態を維持していた患者が再発をきたしたため、その BCR レパトア解析を行うことができた。B 細胞の再構築時に改善傾向が認められていた BCR レパトアは再発した直後も維持されていることがわかった。T 細胞の TCR レパトアが RTX 治療後に変化するという外部の報告もあることから BCR レパトアに加えてこの患者が再発した直後の TCR レパトアを解析した。その結果、寛解状態にある時点の TCR レパトアより再発時のレパトアは多様に乏しい状況にあった。

さらに RTX 治療後から同等の期間再発していない別の患者について TCR レパトアを解析した。その患者においては TCR レパトアの多様性は維持されている傾向にあった。

以上の結果から RTX の投与により末梢血中の B 細胞が消失し B 細胞が再構築されるが、BCR レパトアの多様性が正常に形成されない場合は再発するリスクが高いと考えられた。また、TCR レパトア解析の結果から B 細胞の BCR レパトア変化に先立ち、TCR レパトアに変化が認められる可能性が示唆された。特にこれまでに微小変化型 NS 患者において抗体が腎組織に沈着していることは言われていないが、BCR の形成異常そして TCR の形成異常が発症と何らかの関連性を持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 倉田悟子、田中征治、日吉祐介、荒木潤一郎、江崎拓也、財津亜友子、小松誠和、久野敏	4. 巻 33
2. 論文標題 ネフローゼ症候群に対するリツキシマブ投与後の遅発性好中球減少における骨髓所見と末梢血CD20細胞の検討	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 小児腎臓病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 51-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.3165/jjpn.cr.2019.0160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中征治
2. 発表標題 難治性ネフローゼにおける RTX 投与後の B 細胞の再構成の検討
3. 学会等名 第53回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中征治ほか
2. 発表標題 難治性ネフローゼ症候群（NS）に対するリツキシマブ（RTX）の臨床効果とB細胞受容体（BCR）レパトアの関連性
3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 財津亜友子ほか
2. 発表標題 小児特発性ネフローゼ症候群（INS）における成人期再発と移行医療の関係
3. 学会等名 第54回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

久留米大学医学部免疫学講座腎臓免疫
<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/immun/komatsu.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 征治 (Tanaka Seiji) (20389282)	久留米大学・医学部・講師 (37104)	