

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15988

研究課題名(和文) 可溶性ウロキナーゼ受容体を指標とするネフローゼ症候群の新たな診断・治療指針の確立

研究課題名(英文) Soluble urokinase receptor; a new diagnostic and therapeutic biomarker for nephrotic syndrome

研究代表者

藤本 圭司 (FUJIMOTO, Keiji)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30460364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、原発性ネフローゼ症候群(NS)において免疫抑制療法開始2カ月間の血清可溶性ウロキナーゼ受容体(soluble urokinase receptor; s-suPAR)変化量および免疫抑制療法開始2か月後のs-suPAR(s-suPAR2M)レベルが難治性NSの鑑別診断および末期腎不全のサロゲートマーカーである血清Cr1.5倍化までの期間の予測において有用であることを明らかにした。さらに、時間依存性ROC解析結果から、2年～8年後までの血清Cr1.5倍化を抑制するためには、s-suPAR2Mのレベルを概ね3000pg/mL以下にコントロールすることが望ましいと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性NSの腎予後予測は治療開始後6か月時点における治療反応性で判定しているのが現状であり、初期治療段階における非侵襲的腎予後予測マーカーは確立していない。本研究結果は、血清suPARを用いて初期治療段階でNS治療反応性が悪く末期腎不全に至る可能性の高い患者を鑑別可能であることを示している。血清suPARを指標としてハイリスク患者を早期診断することで適切な治療介入を迅速に開始することが可能となり、腎予後の改善が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we observed that serum soluble urokinase receptor (s-suPAR) level changes during the first 2 months of immunosuppressive therapy, similar to those observed in the 2 months after the start of immunosuppressive therapy (s-suPAR2M), are useful indicators in primary nephrotic syndrome (NS) in differentially diagnosing refractory NS and predicting the time of 50 % serum creatinine (Cr) level increase, a surrogate marker for end-stage renal failure. Furthermore, the results of the time-dependent ROC analysis suggest that it is desirable to maintain s-suPAR2M levels at a maximum of approximately 3000 pg/mL to suppress the 50 % serum Cr level increase occurring 2 - 8 years later.

研究分野：ネフローゼ症候群

キーワード：可溶性ウロキナーゼ受容体 原発性ネフローゼ症候群 ポドサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ウロキナーゼ受容体(urokinase receptor: uPAR)は、細胞膜と glycosylphosphatidylinositol (GPI)アンカーによって結合した分子であり、腎では糸球体上皮細胞と尿細管上皮細胞に発現し、細胞の可動性などに関与している。2008年に Reiser のグループは糸球体上皮細胞表面に発現している uPAR が 3 インテグリンのシグナル伝達経路を介して糸球体上皮細胞障害を惹起していることを示した【Nat Med 2008; 14: 55-63.】。さらに、同グループは、GPI アンカーが切断されることにより血中に遊離される可溶性ウロキナーゼ受容体(soluble urokinase receptor: suPAR)が巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)患者血中で上昇しており、suPAR が糸球体上皮細胞 3 インテグリンと結合してこれを活性化することにより蛋白尿および FSGS 様病変が生じることを示し、suPAR が FSGS 発症に関与する液性因子であると結論づけた。しかし、suPAR の FSGS 以外の原発性 NS の病態への関与や尿中 suPAR による尿細管上皮細胞 3 インテグリン活性化を介した蛋白尿および腎機能障害惹起の機序は報告されていない。また、原発性 NS の初期治療段階において NS の治療反応性および腎予後を予測できる非侵襲的バイオマーカーは確立されていない。

2. 研究の目的

(1) 原発性 NS の初期治療段階の血清および尿 suPAR を含む臨床パラメータを用いて原発性 NS の治療反応性および腎予後予測を早期に行うことが可能であるか検討する。

(2) 原発性 NS の短期的病勢(尿蛋白量)と血清および尿 suPAR の関連性、尿細管傷害(尿 L-FABP)と血清および尿 suPAR の関連性を明らかにする。

(3) 原発性 NS の腎組織における尿細管上皮 3 インテグリン活性化の有無、NS 組織型の違いによる発現強度の差異を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 原発性 NS の初期治療段階の血清および尿 suPAR を含む臨床パラメータを用いた原発性 NS の治療反応性および腎予後予測の疫学的検討

2006年1月～2017年12月に当院に入院し、免疫抑制療法を施行した原発性ネフローゼ症候群(NS)36症例を対象として以下の検討を行った。suPAR測定にはネフローゼ研究で汎用されているELISAキット Quantikine Human suPAR Immunoassay (R&D Systems)を使用した。

治療反応性予測

現在、本邦においては免疫抑制療法開始6か月後に尿蛋白量が1g/日未満を達成できない症例を難治性NSと定義している。初期治療における血清および尿 suPAR を含む臨床パラメータを説明変数、難治性NSであるか否かをアウトカムとした単変量ロジスティック回帰分析を行った(主解析)。主解析において有意であった臨床パラメータに関して、ROC 曲線解析法を用いて難治性NSの診断能(AUC-ROCおよびカットオフ値とその感度・特異度)を評価した。

腎予後予測

初期治療における血清および尿 suPAR を含む臨床パラメータを説明変数、血清 Cr1.5 倍化までの期間をアウトカムとした単変量 Cox 比例ハザード回帰分析を行った(主解析)。主解析において有意であった臨床パラメータに関して、時間依存性 ROC 解析法を用いて治療開始後2年、3年、6年、8年の各時点までの血清 Cr1.5 倍化に対する診断能(AUC-ROC・カットオフ値とその感度・特異度)を評価した。

(2) 原発性 NS の短期的病勢(尿蛋白量)と血清および尿 suPAR の関連性、尿細管傷害と尿 suPAR の関連性についての疫学的検討

(1)と同じ原発性NS患者(n=36)を対象に以下の検討を行った。

尿蛋白量と血清 suPAR レベルの相関性の検討:

横断的検討: 免疫抑制療法前の baseline 値を用い、尿蛋白量を目的変数とし、血清 suPAR、Selectivity Index、eGFR を説明変数とした重回帰分析を行った。

縦断的検討: 免疫抑制療法開始後2カ月間の変化量を用い、尿蛋白変化量を目的変数とし、血清 suPAR 変化量、Selectivity Index、eGFR 変化量を説明変数とした重回帰分析を行った。

尿蛋白量と尿 suPAR レベルの相関性の検討:

横断的検討: 免疫抑制療法前の baseline 値を用い、尿蛋白量を目的変数とし、尿 suPAR、Selectivity Index、eGFR を説明変数とした重回帰分析を行った。

縦断的検討: 免疫抑制療法開始後2カ月間の変化量を用い、尿蛋白変化量を目的変数とし、尿 suPAR 変化量、Selectivity Index、eGFR 変化量を説明変数とした重回帰分析を行った。

尿 suPAR レベルと尿-L-FABP レベルとの相関性の検討: 免疫抑制療法前の baseline 値を用いた横断的検討および免疫抑制療法開始後2カ月間の変化量を用いた縦断的検討を行った。

(3) 原発性 NS の腎組織における尿細管上皮 3 インテグリン活性化の有無、NS 組織型の違いによる発現強度の差異の検討

腎生検組織凍結切片を用い、間接蛍光抗体法で腎組織の活性化 3 インテグリンを染色し、腎組織における尿細管上皮 3 インテグリン活性化の有無、NS 組織型の違いによる発現強度の差異を検討した。間接蛍光抗体法の 1 次抗体は活性化型 3 インテグリン分子には結合するが不活性化型 3 インテグリン分子には結合しないマウス IgG1 抗ヒト AP-5 モノクローナル抗体(GEN-PROBE 社)を、2 次抗体は FITC 標識ヤギ抗マウス IgG-F(ab')₂ 抗体(コスモバイオ)を用いた。

4. 研究成果

(1) 原発性 NS の初期治療段階の血清および尿 suPAR を含む臨床パラメータを用いた原発性 NS の治療反応性および腎予後予測の疫学的検討

治療反応性予測

単変量ロジスティック回帰分析(主解析)においては、免疫抑制療法開始後 2 ヶ月間の血清 suPAR の変化量[suPAR(2M)]、免疫抑制療法開始 2 ヶ月後の血清 suPAR[suPAR(2M)]、尿蛋白量[UP(2M)]ならびに尿 L-FABP[u-L-FABP(2M)]が、難治性 NS の有意な予測因子として同定された(表 -1)。4 つの臨床パラメータはいずれも難治性 NS を予測する能力が高く(表 -2) 免疫抑制療法を 2 ヶ月間施行しても約 3000pg/mL 以上の血清 suPAR レベルが持続していた場合に難治性 NS と診断できると考えられた。

初期治療中の臨床パラメータによる難治性 NS の予測 (表 -1)

難治性 NS 予測因子候補	オッズ比 [95%信頼区間]	P 値
s-suPAR(2M) (per 500 pg/mL)	2.40 [1.15 - 5.03]	0.020
s-suPAR(2M) (per 500 pg/mL)	1.44 [1.01 - 2.04]	0.041
UP(2M) (per 1.0 g/gCr)	7.87 [2.02 - 30.73]	0.003
u-L-FABP(2M) (per 1.0 μg/gCr)	1.14 [1.01 - 1.29]	0.038

診断能評価 (表 -2)

	難治性 NS (= 治療開始 6 か月後の不完全寛解 型達成) 予測
s-suPAR(2M)	AUC-ROC : 0.84 Cut-off 値 : 65.6 pg/mL [感度 : 0.76、特異度 : 0.76]
s-suPAR(2M)	AUC-ROC : 0.85 Cut-off 値 : 3219.2 pg/mL [感度 : 0.79、特異度 : 0.79]
UP(2M)	AUC-ROC : 0.98 Cut-off 値 : 1.0 g/gCr [感度 : 0.97、特異度 : 0.97]
u-L-FABP(2M)	AUC-ROC : 0.78 Cut-off 値 : 4.7 μg/gCr [感度 : 0.62、特異度 : 0.62]

腎予後予測

単変量 Cox 比例ハザード回帰分析においては、免疫抑制療法開始後 2 ヶ月間の血清 suPAR の変化量[suPAR(2M)]、免疫抑制療法開始 2 ヶ月後の血清 suPAR[suPAR(2M)]、尿蛋白量[UP(2M)]ならびに尿 L-FABP[u-L-FABP(2M)]が、血清 Cr1.5 倍化までの期間の有意な予測因子として同定された(表 -1)。4 つの臨床パラメータはいずれも 2~8 年後の血清 Cr1.5 倍化を予測する能力が高く(表 -2) 免疫抑制療法を 2 ヶ月間施行しても概ね 3000pg/mL 以上の血清 suPAR レベルが持続していた場合に血清 Cr1.5 倍化が生じると考えられた。

初期治療中の臨床パラメータによる血清 Cr1.5 倍化までの期間の予測 (表 -1)

腎予後予測因子候補	ハザード比 [95%信頼区間]	P 値
s-suPAR(2M) (per 500 pg/mL)	1.36 [1.09 - 1.69]	0.006
s-suPAR(2M) (per 500 pg/mL)	1.13 [1.03 - 1.23]	0.015
UP(2M) (per 1.0 g/gCr)	2.94 [1.43 - 6.03]	0.003
u-L-FABP(2M) (per 1.0 μg/gCr)	1.14 [1.04 - 1.26]	0.006

診断能評価（時間依存性 ROC 曲線解析法）(表 -2)

	2年後までの血清 Cr1.5 倍化予測	3年後までの血清 Cr1.5 倍化予測	6年後までの血清 Cr1.5 倍化予測	8年後までの血清 Cr1.5 倍化予測
s-suPAR(2M)	AUC-ROC : 0.83 Cut-off 値 : 686.6 [感度 : 1.00 特異度 : 0.82]	AUC-ROC : 0.76 Cut-off 値 : 225.6 [感度 : 0.97 特異度 : 0.74]	AUC-ROC : 0.89 Cut-off 値 : 225.6 [感度 : 0.92 特異度 : 0.80]	AUC-ROC : 0.92 Cut-off 値 : 3.4 [感度 : 0.95 特異度 : 0.79]
s-suPAR(2M)	AUC-ROC : 0.86 Cut-off 値 : 4222.1 [感度 : 1.00 特異度 : 0.86]	AUC-ROC : 0.72 Cut-off 値 : 2836.4 [感度 : 0.97 特異度 : 0.59]	AUC-ROC : 0.82 Cut-off 値 : 3978.2 [感度 : 0.83 特異度 : 0.89]	AUC-ROC : 0.86 Cut-off 値 : 3501.5 [感度 : 0.88 特異度 : 0.92]
UP(2M)	AUC-ROC : 1.00 Cut-off 値 : 3.9 [感度 : 1.00 特異度 : 1.00]	AUC-ROC : 0.89 Cut-off 値 : 0.9 [感度 : 0.97 特異度 : 0.79]	AUC-ROC : 0.89 Cut-off 値 : 0.4 [感度 : 0.92 特異度 : 0.80]	AUC-ROC : 0.93 Cut-off 値 : 0.4 [感度 : 0.93 特異度 : 0.86]
u-L-FABP(2M)	AUC-ROC : 1.00 Cut-off 値 : 27.0 [感度 : 1.00 特異度 : 1.00]	AUC-ROC : 0.96 Cut-off 値 : 11.3 [感度 : 0.97 特異度 : 0.91]	AUC-ROC : 0.86 Cut-off 値 : 4.8 [感度 : 0.97 特異度 : 0.68]	AUC-ROC : 0.93 Cut-off 値 : 10.0 [感度 : 0.93 特異度 : 1.00]

(2) 原発性 NS の短期的病勢（尿蛋白量）と血清および尿 suPAR の関連性、尿細管傷害と尿 suPAR の関連性についての疫学的検討

尿蛋白量と血清 suPAR レベルの相関性の検討：
横断的解析（単変量・多変量）、縦断的解析（単変量・多変量）ともに尿蛋白量と血清 suPAR レベルとの間に有意な相関は認めなかった。

尿蛋白量と尿 suPAR レベルの相関性の検討：
横断的検討（単変量解析）では、baseline の尿蛋白量と尿 suPAR レベルに有意な相関を認めた ($r=0.499$, $P=0.002$)。また、表 に示すように交絡因子 (eGFR および Selectivity Index) による影響を考慮した多変量解析による横断的検討においても baseline の尿蛋白量と尿 suPAR レベルに有意な相関を認めた。

縦断的検討（単変量解析）では、治療開始後 2 カ月間の尿蛋白変化量と尿 suPAR レベル変化量に有意な相関を認めた ($r=0.410$, $P=0.013$)。また、表 に示すように交絡因子（治療開始後 2 カ月間の eGFR 変化量および baseline の Selectivity Index）による影響を考慮した多変量解析による縦断的検討においても治療開始後 2 カ月間の尿蛋白変化量と尿 suPAR レベル変化量に有意な相関を認めた。

重回帰分析による横断的検討（表 ）

目的変数：UP (0M)

変数名		SE()	std	t 値	P 値
尿 suPAR(0M)	0.001	0.001	0.448	2.700	0.012
eGFR(0M)	-0.027	0.046	-0.116	0.589	0.600
S.I.	0.503	10.557	0.009	0.048	0.962

UP(0M), baseline の尿蛋白量; 尿 suPAR(0M), baseline の尿 suPAR; eGFR(0M), baseline の eGFR; S.I., baseline の Selectivity Index

重回帰分析による縦断的検討 (表)

目的変数: UP (2M)

変数名		SE()	std	t 値	P 値
尿 suPAR(2M)	0.001	0.001	0.358	2.193	0.036
尿 eGFR(2M)	-0.075	0.063	-0.197	1.189	0.243
S.I.	-1.500	9.485	0.025	0.158	0.876

UP(2M), 治療開始後 2 カ月間の尿蛋白変化量; 尿 suPAR(2M), 治療開始後 2 カ月間の尿 suPAR 変化量; 尿 eGFR(2M), 治療開始後 2 カ月間の eGFR 変化量; S.I., baseline の Selectivity Index

尿 suPAR レベルと尿-L-FABP レベルとの相関性の検討:

横断的検討 (単変量解析) では、baseline の尿 suPAR レベルと尿-L-FABP レベルに有意な相関を認めた ($r = 0.522$, $P=0.001$)。さらに、縦断的解析 (単変量解析) においても治療開始後 2 カ月間の尿 suPAR レベル変化量と尿-L-FABP レベル変化量に有意な相関を認めた ($r=0.395$, $P=0.017$)。

(3) 原発性 NS の腎組織における尿細管上皮 3 インテグリン活性化の有無、NS 組織型の違いによる発現強度の差異の検討

正常腎組織においては、活性型 3 インテグリンは近位尿細管刷子縁に局在し染色強度は弱かった。FSGS 腎組織においても活性型 3 インテグリンは主に近位尿細管刷子縁に局在していたが、その染色強度は強かった。その他の原発性ネフローゼ症候群でも活性型 3 インテグリンは主に近位尿細管刷子縁に局在し、膜性腎症 (MN) では FSGS と同程度に染色強度は強く、微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) では中等度の染色強度であった (表)。一方、正常腎組織、原発性ネフローゼ症候群腎組織ともに糸球体係蹄には 3 インテグリンは染色されなかった。

表 .

	Staining intensity (positive cases/all cases)			
	FSGS	MCNS	MN	Normal control
	n=3	n=2	n=1	n=5
GCW	0, 0, 0 (0%)	0, 0 (0%)	0 (0%)	0, 0, 0, 0, 0 (0%)
Capsular epithelium	2, 2, 0 (66.7%)	0, 2 (50.0%)	0 (0%)	1, 1, 1, 0, 1 (80%)
Mesangium	0, 0, 0 (0%)	0, 0 (0%)	0 (0%)	0, 0, 0, 0, 0 (0%)
Tubules	4, 4, 4 (100.0%)	2, 3 (100.0%)	4 (100.0%)	1, 1, 2, 2, 1 (100.0%)
Interstitial cells	0, 0, 0 (0%)	0, 0 (0%)	0 (0%)	0, 0, 0, 0, 0 (0%)

Staining intensity: 0, absent; 1, very weak; 2, weak; 3, moderate; 4, strong. GCW, glomerular capillary wall.

研究成果のまとめ: (1) 免疫抑制療法開始 2 ヶ月後の血清 suPAR レベルを約 3000pg/mL 以下に制御することが原発性 NS の治療反応性および腎機能予後改善につながる可能性が示された。この 3000pg/mL という値は先行研究においてポドサイト 3 インテグリンを活性化させると報告されている血清 suPAR レベルと一致している。(2) 尿 suPAR は原発性 NS の短期的病勢および尿細管傷害を反映していることが示唆されたが、治療反応性および腎機能予後を予測するマーカーとしては血清 suPAR のほうが優れていた。(3) 尿 suPAR が近位尿細管上皮細胞 3 インテグリン活性化を介する尿細管傷害を惹起し、原発性 NS の病勢増悪・腎機能低下の一因となっている可能性が示されたが、さらなる検証が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 藤本圭司、横山仁	4. 巻 85
2. 論文標題 【治療のエビデンスとその構築】ステロイド抵抗性/巣状分節性糸球体硬化症－成人	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 838 - 842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujimoto Keiji, Kagaya Yu, Kumano Syo, Fujii Ai, Tsuruyama Yuko, Matsuura Toshikazu, Yamazaki Keita, Nomura Kanae, Okada Keiichiro, Okino Kazuaki, Adachi Hiroki, Furuichi Kengo, Yokoyama Hitoshi	4. 巻 95
2. 論文標題 Retrospective single-arm cohort study of steroid-dependent minimal change nephrotic syndrome treated with very low-dose rituximab	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Nephrology	6. 最初と最後の頁 29 ~ 36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5414/CN110245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤本圭司、山之内啓貴、松田雄斗、中尾真一郎、楠野優衣、矢部友久、藤井愛、加賀谷侑、熊野奨、山崎恵大、野村佳苗、岡田圭一郎、沖野一晃、足立浩樹、古市賢吾、横山仁
2. 発表標題 原発性ネフローゼ症候群の非侵襲的腎予後予測マーカーの探索的検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤本圭司、野村和利、白川智彦、楠野優衣、藤井愛、熊野奨、加賀谷侑、鶴山祐子、山崎恵大、松浦寿一、岡田圭一郎、沖野一晃、足立浩樹、古市賢吾、横山仁
2. 発表標題 治療依存性微小変化型ネフローゼ症候群に対する低用量リツキシマブ療法の検討
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本圭司、鶴山祐子、宮竹敦彦、野村佳苗、岡田圭一郎、沖野一晃、向井清孝、大串勇気、足立浩樹、横山仁
2. 発表標題 治療依存性微小変化型ネフローゼ症候群（MCNS）に対する低用量リツキシマブ療法の検討
3. 学会等名 第116回日本内科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本圭司、宮竹敦彦、野村佳苗、岡田圭一郎、沖野一晃、向井清孝、大串勇気、林憲史、足立浩樹、横山仁
2. 発表標題 成人治療依存性微小変化型ネフローゼ症候群に対する低用量リツキシマブ療法の検討
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本圭司、原口貴敏、熊野奨、加賀谷侑、鶴山祐子、中山佳苗、岡田圭一郎、向井清孝、大串勇気、林憲史、足立浩樹、山谷秀喜、横山仁
2. 発表標題 ステロイド依存性微小変化型ネフローゼ症候群に対する低用量リツキシマブ療法の検討
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------