

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17728

研究課題名（和文）単クローン性免疫グロブリン惹起性腎障害の新規疾患概念：臨床病理像と発症機序

研究課題名（英文）A novel disease concept of monoclonal immunoglobulin-induced renal injury: clinicopathologic picture and pathogenesis

研究代表者

奈良 瑞穂 (Nara, Mizuho)

秋田大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90769944

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：結晶性円柱腎症患者尿から型M蛋白を精製し、N末端アミノ酸配列を同定した後、骨髓血からcDNAを調整しこのM蛋白の完全長cDNAをクローニングした。更に尿から精製した型M蛋白を結晶化し、X線構造解析を行った。本腎症でのM蛋白の最初の立体構造解析例である。また、尿中に多量の型M蛋白を認めながら腎障害の軽度な骨髄腫患者尿からM蛋白を精製し、N末端アミノ酸配列を同定し骨髓血からcDNAを調整し、このM蛋白の完全長cDNAをクローニングした。尿から精製した型M蛋白の至適結晶化条件を検討した。また、型LCDD患者1例の尿から型M蛋白を精製し、疎水性の高い特徴があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題と関連する腎症の臨床病理学的解析を進め、更に、種々の病型を呈した患者尿からM蛋白を精製し、構造解析に進展があった。M蛋白の構造特性と病理病型との関連性を明らかにすることは、非侵襲的な診断法の開発に繋がり、創造性の高い研究であった。高齢者医療で特に重要な血液・腎疾患分野で、診断と治療の向上に貢献をはかることは、MGRSは高齢者に多いことから、高齢者医療への波及効果も大きい。これらの稀な疾患の検討は、臨床病理学的な観点の解析からも、各疾患群の特徴や腎予後なども明らかになりつつある。

研究成果の概要（英文）：After purification of λ -type M protein from urine of patients with crystalline columnar nephropathy and identification of the N-terminal amino acid sequence, cDNA was prepared from bone marrow blood and the full-length cDNA of this M protein was cloned. The λ -type M protein purified from urine was crystallized and analyzed by X-ray structure analysis. M-protein was purified from the urine of a myeloma patient with a large amount of λ -type M-protein in the urine but mild renal impairment, the N-terminal amino acid sequence was identified, cDNA was prepared from bone marrow blood, and the full-length cDNA of this M-protein was cloned. We also purified λ -type M protein from the urine of one patient with λ -type LCDD and found it to have a highly hydrophobic feature.

研究分野：腎臓

キーワード：単クローン性免疫グロブリン 腎疾患 臨床病理像 構造解析

1. 研究開始当初の背景

高齢者に多い多発性骨髄腫 (multiple myeloma : MM) と類縁疾患では、異常な形質細胞クローンから単クローン性免疫グロブリン (M 蛋白) が産生される。腎臓は M 蛋白の主要な標的臓器であり、M 蛋白に起因する腎障害は、患者の予後に大きな影響を及ぼす。最近、MM の前段階で良性と考えられてきた「monoclonal gammopathy of undetermined significance: MGUS」の経過中に、腎障害を呈した症例をまとめた疾患概念として、「monoclonal gammopathy of renal significance: MGRS」の呼称が提唱された。MGRS の診断アルゴリズムは整理されたばかりであるが、その病理像は多彩であり、臨床像も含めた全体像の把握が今後の重要課題である。

2. 研究の目的

本研究では、MGRS 症例の臨床病理像の全体像の把握と、M 蛋白の構造特性と病理病型との関連性の検討を行う。国内外でほとんど例のない独自のコホートを基盤とすることから、学術的独自性がある。

3. 研究の方法

・症例ごとに、検査成績の経時的変化、治療内容、合併症の有無、予後などについて、関連病院の担当医に調査を依頼する。調査結果を集積し、各 MGRS の病型による臨床像の特徴をまとめ上記の結果を総合的に解析し、各 MGRS 病型の頻度や、臨床病理像の特徴を明らかにする。また、各種の検査指標・病理指標となるデータ、治療内容、合併症などによる予後への影響について、統計学的な検討を加えた。尿が保存されている症例では、本学理工学研究科の協力を得て、尿から M 蛋白を精製し、アミノ酸配列を同定する。分子量や等電点など、物理化学的な分析も加えた。

4. 研究成果

骨髄腫の円柱腎症は、急性腎障害 (AKI) を伴う骨髄腫患者に見られる支配的な尿細管間質性病変である。円柱は、BJP の CDR3 領域が、ヘンレ遠位ループの尿細管上皮細胞で作られる Tamm-Horsfall 糖タンパク質 (THP) (別名 : Uromodulin) の特定部位と結合し、遠位ネフロンに形成される。骨髄腫の円柱は通常、破碎された脆い外観を示し、周囲の細胞の炎症反応を伴い、AKI や進行性の腎不全を引き起こす。一方、AKI を発症した MM 患者において、Ig LC 結晶性ギブス腎症はほとんど報告されていない。我々の知る限り、2000 年以降に報告された MM 関連 IgLC 結晶性鑄型腎症は、臨床情報が得られる 9 例のみであった。1 例は病因となる BJP の一次構造が明らかになったが、この例では X 線結晶学による BJP の三次元構造解析はできなかった。我々は MM に合併した Ig LC 結晶性円柱腎症の病因となる BJP の一次構造と三次元構造と臨床病理学的特徴について検討した。対象症例の腎臓の光学顕微鏡像では、近位尿細管上皮細胞は

細胞内空胞と蛋白再吸収顆粒を有し (Figure 1b)、電子顕微鏡では、近位尿細管および糸球体には電子密度の高い沈着物や結晶は観察されなかった。遠位尿細管内腔は、棒状と菱形の両方の形状を持つ多数の結晶鑄塊によって頻りに占拠されており結晶は Masson's trichrome 染色 (Figure 1d) で fuschinophilic、hematoxylin and eosin 染色 (Figure 1e) で eosinophilic であったが、periodic acid Schiff 染色では淡く、Amyloid 染色は陰性であった。免疫蛍光法および免疫組織化学的研究では IgG、IgA、IgM、LC、LC、C3、C1q の糸球体染色を認めず遠位尿細管内腔の結晶と近位尿細管の再吸収顆粒は抗ヒト LC 抗体で染色されたが (Figure 1g)、抗ヒト LC 抗体では染色されなかった (Figure 1h)、抗ヒト THP 抗体はヘンレ輪 (THP の産生部位) の上皮細胞の細胞質を染色したが、遠位尿細管内腔の結晶は抗体で染色されなかった (Figure 1i)。

次に BJP- AK の生化学的および構造的性質の特性評価を行った。結果、結晶化した BJP- AK の構造は Figure 2、Figure 3 に示したように、BJP- AK の最も相同性の高い生殖細胞系遺伝子の VL および JL セグメントは、それぞれ Humlv318S13 および J35,S14 であった。BJP- AK の VL および JL セグメントには、9 つの変異があった。そのうち CDR1 または CDR3 領域に存在するアミノ酸は 4 つであった。G22E と D94N、V96Q はそれぞれ表面電荷と疎水性を変化させることができる。さらに、T20A と Y85F は、CDR1 または CDR3 領域の周囲の疎水性にも影響を与えることができると考える。

また、PISA (Protein Interface, Surfaces, and Assemblies) サーバーを用いて、ホモ二量体構造の界面を解析したところ、モノマー間の界面相互作用は特異的で、結晶充填によるアーチファクトではない可能性が示された。PISA 解析の結果、VL/VL および CL/CL 界面は疎水性が高く、各鎖で平均 1613 \AA^2 の溶媒アクセス可能な表面が埋まっていた。体細胞変異残基である Y85F は、疎水性界面に位置していた。Tyr85 がフェニルアラニンに置換されたことで、二量体界面の疎水性が高まったと考えられる。さらに、二量体界面には、単量体間の距離が $<3.6 \text{ \AA}$ (PISA の基準による) の水素結合が 15 個存在していた (Figure 3b と c)。両モノマーの VL ドメインの Tyr34, Gln36, Gln87 と CL ドメインの Glu161, Thr162, Thr164, Ser166, Gln168, Ser169, Ser176, Tyr178 が接触領域で水素結合を形成していることが確認された。

MM 関連 Ig LC 結晶性ギブス腎症は、最近の結晶性腎症の分類において、尿細管性結晶性腎症 (2 型) に分類されたが、この腎症は、骨髄腫円柱腎症のまれな変種であり、進行が速く予後不良、LC 優位、近位および遠位の尿細管内腔での結晶性円柱形成が特徴である。新時代の MM の早期診断と化学療法は、予後を改善する可能性がある。結晶性鑄型形成のメカニズムを解明するためには、病因となる BJP の構造特性データのさらなる蓄積が必要である。

(Kidney Int Rep.2020 Jul 3;5(9):1595-1602.)

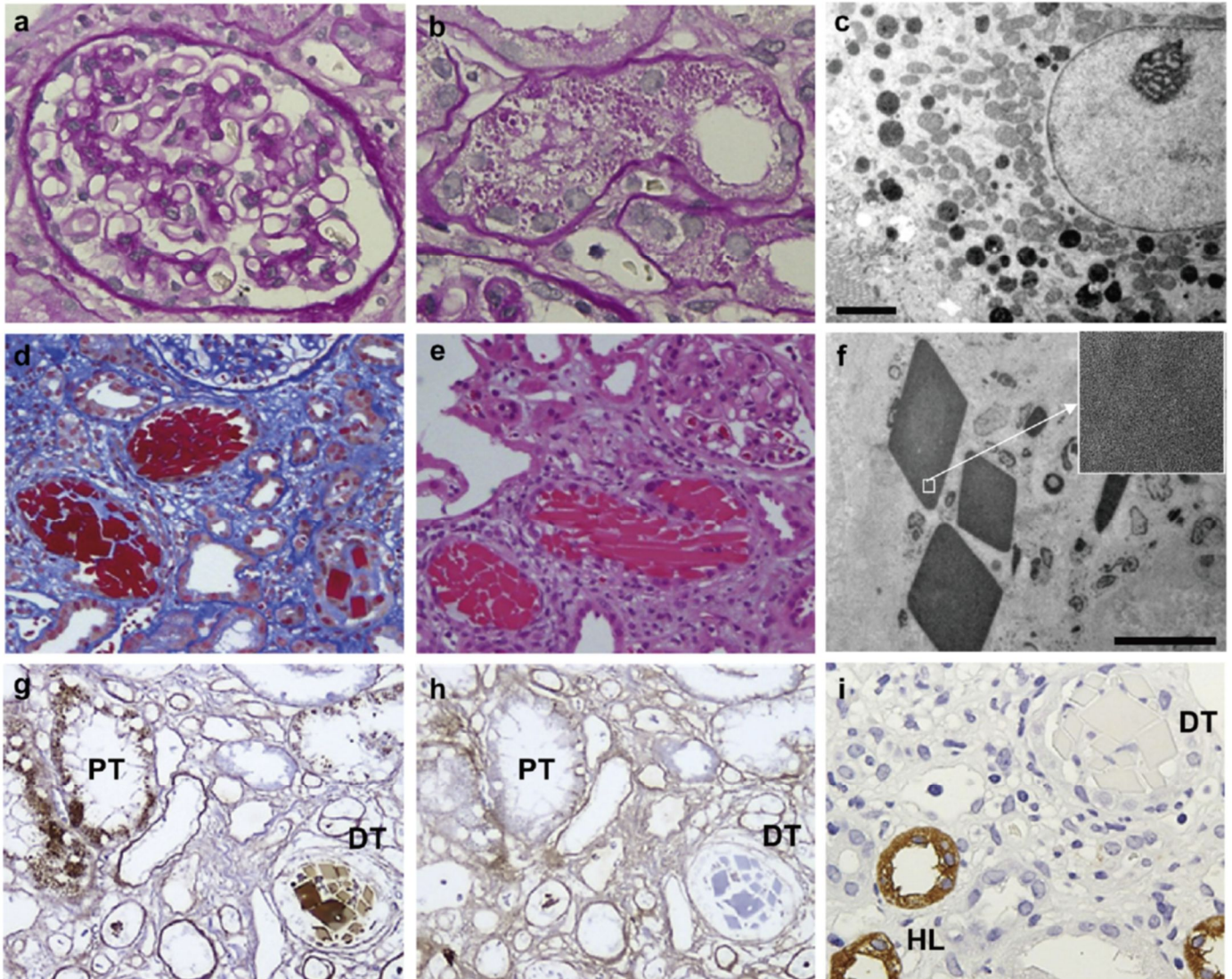


Figure 1. Kidney biopsy findings. (a) In the functioning glomeruli, mild mesangial proliferation and epithelial cell swelling were seen on light microscopy (periodic acid–Schiff staining, original magnification $\times 400$). (b) In the proximal tubular epithelial cells, vacuolization and protein reabsorption granules were seen on light microscopy (periodic acid–Schiff staining, original magnification $\times 400$). (c) In the proximal tubular epithelial cells, electron-dense deposits or crystals were not observed on electron microscopy (uranyl acetate and lead citrate staining, original magnification $\times 3000$). Bar = 2 μm . (d) In the distal tubular lumens, casts containing numerous rod-shaped or rhomboid crystals were seen. These casts were fuschinophilic on Masson's trichrome stain (original magnification $\times 200$). (e) Casts in the distal tubular lumens were eosinophilic on hematoxylin and eosin staining (original magnification $\times 200$). (f) Substructural organization was not observed in crystals on electron microscopy (uranyl acetate and lead citrate staining, original magnification $\times 12,000$). Bar = 2 μm . (g) Crystals in the distal tubular lumens (DT) and reabsorption granules in the proximal tubular epithelial cells (PTs) were stained with an anti- λ light chain antibody (original magnification $\times 200$). (h) Crystals in the DT and reabsorption granules in the PT were not stained with an anti- κ light chain antibody (original magnification $\times 200$). (i) An anti-THP antibody stained epithelial cells in the Henle's loops (HL) but not crystals in the DT (original magnification $\times 400$).

BJP-λ AK	Y V L T Q P P S V S V A P G K T A R I A C E G N N I G S K S V H W Y Q Q K P G	39
IGLV3S2	S Y V L T Q P P S V S V A P G K T A R I T C G G N N I G S K S V H W Y Q Q K P G	40
V2-14	S Y V L T Q P P S V S V A P G Q T A R I T C G G N N I G S K S V H W Y Q Q K P G	40
Humlv318	S Y V L T Q P P S V S V A P G K T A R I T C G G N N I G S K S V H W Y Q Q K P G	40

	CDR2	
BJP-λ AK	Q A P V L V V Y D D S D R P S G I P D R F S G S N S G N T A A L T I S R V E A G	79
IGLV3S2	Q A P V L V I Y Y D S D R P S G I P E R F S G S N S G N T A T L T I S R V E A G	80
V2-14	Q A P V L V V Y D D S D R P S G I P E R F S G S N S G N T A T L T I S R V E A G	80
Humlv318	Q A P V L V V Y D D S D R P S G I P E R F S G S N S G N T A T L T I S R V E A G	80

	CDR3	V _L -J _L junction	
BJP-λ AK	D E A D Y F C Q V W D S N S N H Q V F G G G T K V T V L		107
IGLV3S2	D E A D Y Y C Q V W D S S S D H		96
V2-14	D E A D Y Y C Q V W D S S S D H		96
Humlv318	D E A D Y Y C Q V W D S S S D H		96
Jλ3		V V F G G G T K L T V L	

Figure 2. Primary structure of the variable (V_L) and joining (J_L) regions in BJP-λ AK aligned with highly homologous germline gene V_L segments of IGLV subgroup 3 (A)⁵ (IGLV3S2,^{S11} V2-14,^{S12} and Humlv318^{S13}) and J_L segment of IGLJ3 (Jλ3^{5,S14}), using the Clustal Omega program.^{S10} Mutated residues in IGLV subgroup 3 (A)⁵ are indicated in bold and underlined when possibly indicating a significant physicochemical change. Different residues among IGLV subgroup 3 (A)⁵ are also indicated in bold. CDR, complementarity-determining region.

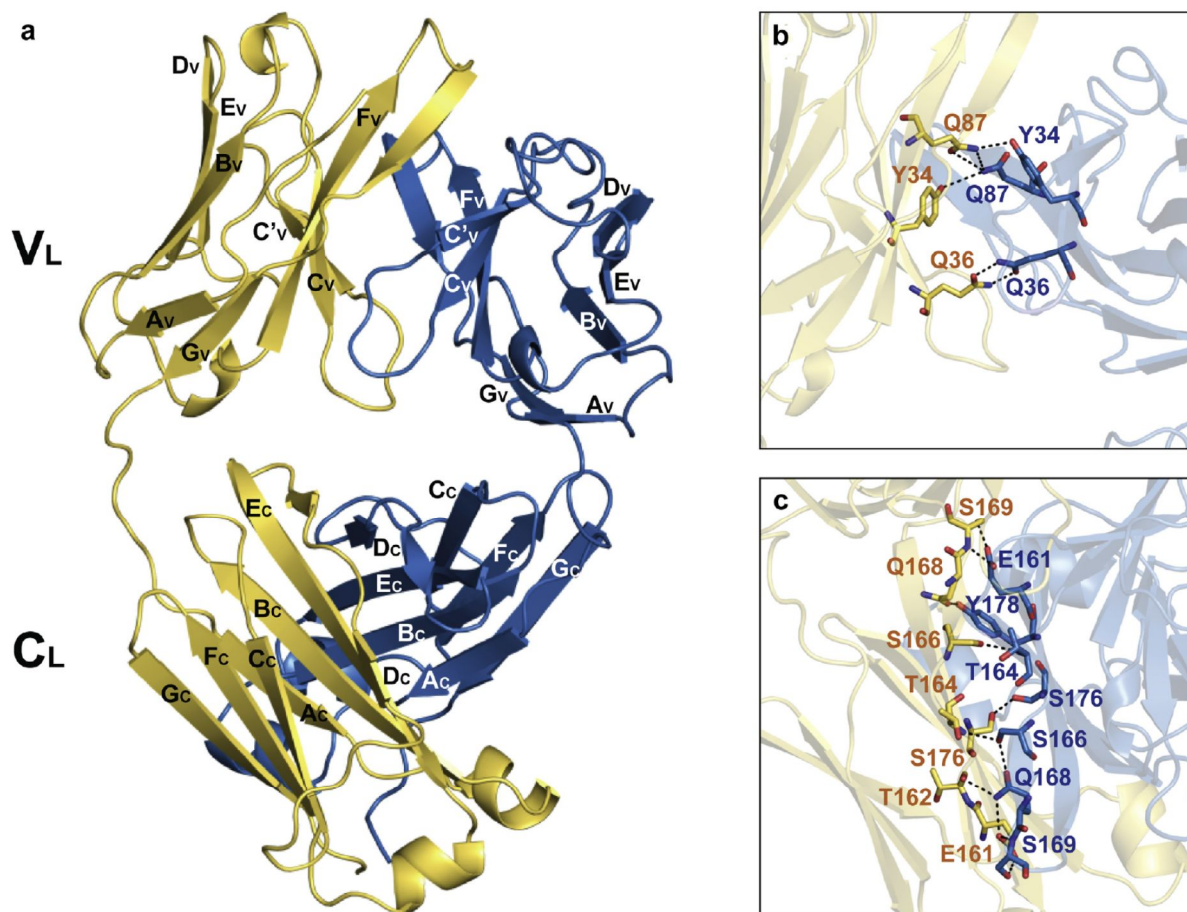


Figure 3. Crystal structure of Bence-Jones protein λ (BJP-λ AK). (a) The overall structure of a BJP-λ AK homodimer (Protein Data Bank code: 6L98). The 2 light chain molecules are colored in yellow (molecule A) and blue (molecule B). The β-strands that form the domains are marked with capital letters. Detailed views of the homodimer interface of (b) the V_L domain and (c) the C_L domain stabilized by hydrogen bonds. Hydrogen bonds are shown as black dashed lines. C_L, light chain constant domain; V_L, light chain variable domain.

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 Matsumura Hirotoshi, Furukawa Yusuke, Nakagaki Takashi, Furutani Chikako, Osanai Sayaka, Noguchi Keiichi, Odaka Masafumi, Yohda Masafumi, Ohtani Hiroshi, Michishita Yoshihiro, Kawabata Yoshinari, Kitabayashi Atsushi, Ikeda Sho, Nara Mizuho, Komatsuda Atsushi, Takahashi Naoto, Wakui Hideki	4. 巻 5
2. 論文標題 Multiple Myeloma-Associated Ig Light Chain Crystalline Cast Nephropathy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International Reports	6. 最初と最後の頁 1595 ~ 1602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ekir.2020.06.026	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奈良瑞穂
2. 発表標題 単クローン性免疫グロブリン惹起性腎障害の新規疾患概念
3. 学会等名 秋田県腎不全研究会
4. 発表年 2019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
---------	---------