

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591196

研究課題名（和文） 小児特発性ネフローゼ症候群における新規バイオマーカーの確立

研究課題名（英文） Novel biomarkers for childhood idiopathic nephrotic syndrome

研究代表者 伊藤 秀一 (ITO SHUICHI)

(独) 国立成育医療研究センター 器官病態系内科 腎臓・リウマチ・膠原病科 医長

研究者番号：20336572

### 研究成果の概要（和文）：

小児特発性ネフローゼ症候群の原因は不明である。私達は本症で T・B リンパ球間の共刺激分子（CD26, CD28, CD80/CD86, CTLA-4, CD69, CD26, CD40, CD40ligand）の発現を調べた。治療前初発患者は、治療後寛解時やコントロールに比べ、T リンパ球上の CD40 ligand とその結合分子の B 細胞の CD40 が著増していた。また、CD40 シグナル下流のリン酸化 JNK も治療前患者の発現は強く、治療後は健常人レベルに回復した。しかし、それらの発現細胞の多寡は、再発頻度、ステロイド反応性などと相関しなかった。また、活性化 T 細胞に発現する CD30 の可溶性分子も初発時が高かった。これら CD40, CD40 ligand, 可溶性 CD30 等は疾患活動性マーカーとなる可能性がある。

### 研究成果の概要（英文）：

Idiopathic nephrotic syndrome is one of the commonest kidney diseases in children. However, its etiology is not elucidated yet. We have evaluated the expression of co-stimulatory molecules on T and B lymphocytes (CD26, CD28, CD80/CD86, CTLA-4, CD69, CD26) by flow cytometry in 11 children with idiopathic nephrotic syndrome. In the result, CD40 ligand expressed on CD4 positive T lymphocyte and CD40 molecule expressed on CD19 positive B lymphocyte are significantly increased at primary onset comparing to at remission and in control children. In addition, western blot analysis revealed that phosphorylated-junk (p-junk), which is in downstream of CD40 signal, is only expressed in patients in active nephrotic phase. These findings suggest that T and B lymphocytes through CD40 and CD40 ligand could play some important role in pathogenesis of nephrotic syndrome. In addition, serum level of soluble CD30 is also significantly increased at primary onset comparing to at remission and in control children. CD30 is also expressed on activated T lymphocyte. Although further investigation is necessary, this finding also suggests mutual activation between T and B lymphocytes. CD40, CD40 ligand and soluble CD30 may be a good candidate of biomarker of nephritic syndrome.

### 交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2012年度 | 500,000   | 150,000   | 650,000   |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：7212

キーワード：ネフローゼ症候群、小児、リンパ球、CD40、CD40 ligand、バイオマーカー

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群は腎臓の糸球体内で蛋白が血液から尿に漏出し、その結果低蛋白血症と全身性の浮腫を来す疾患である。わが国では、1年間に約1000-1300人が新規発症小児例として報告されている。その多くは光学顕微鏡所見で炎症や免疫複合体の沈着のない微小変化群である

本症は病因不明であるが、ステロイド薬や免疫抑制薬の有効性から、リンパ球における異常な免疫反応が病態に深く関係すると推測されてきた。本症への治療薬の作用機序は、その病態を推測するうえで、様々な示唆を与える。例えば、シクロスポリンAはCD4ヘルパーTリンパ球に特異的に働き、インターロイキン2の産生抑制作用をもつため、本症の病態へのTリンパ球の深い関与を示唆する。また、当施設にて医師主導型臨床治験を実施している抗CD20抗体であるリツキシマブは、Bリンパ球を特異的に枯渇させ、本症の病態へのBリンパ球の深い関与を示唆する。これらの事実は、本症におけるTリンパ球、Bリンパ球の双方の病態への関与とT・Bリンパ球間の細胞間相互刺激作用の存在を推測させるものである。

病因が未解明なため、本症において、疾患活動性の評価、再発と寛解の予測、薬剤反応性の予測を可能とするバイオマーカーは大変に重要であるが、いまだその発見には至っていない。

### 2. 研究の目的

しかし、本症の病因について免疫学的に調べられた報告は、再発時や急性期におけるサイトカイン（IL-2、血清可溶性IL-2受容体、IL-13、IL-18、IL-13、TNF $\alpha$ 等）の血清中での増加や、可溶性CD23や可溶性CD25の血液中での増加等の僅かな報告があるのみであり限定的である。とりわけ、本症におけるT・Bリンパ球の細胞間相互作用や共活性化についての研究報告はこれまではない。

私たちは本症において、T・Bリンパ球間の相互活性化指標である共刺激分子に注目し、フローサイトメトリー法でその発現を調べた。本研究では、CD40 ligandおよびその他のTリンパ球とBリンパ球の共刺激分子（CD26、CD28、CD80/CD86、CTLA-4、CD69、CD26等）の発現を本症の再発時、寛解時、さらには薬物投与前後に測定し、これらの共刺激分子の病態への関与を調べ、これらの中からバイオマーカー

として利用できる分子を探索する。

### 3. 研究の方法

#### ①対象患者

2009.5~2010.6 に初診で当センターを受診した、初発ステロイド感受性ネフローゼ患者11名（男児8、女児3）。年齢は11カ月-14歳。コントロールは、正常健常児、微小血尿、体位性蛋白尿の児18名。インフォームドコンセントと可能な年齢ではアセントを取得し検査を実施した。ネフローゼ患者は、初発時治療前と寛解時の血液を採取した。

#### ②フローサイトメトリー法によるリンパ球上の共刺激分子の解析

PBMCを分離しリンパ球分画のみをgatingし、Flow Cytometry法でリンパ球上の共刺激因子（表面マーカー）を測定した。解析項目はCD4、CD3、HLA-DR、CD26、CD28、CD40 ligand、CD8 & CD3、HLA-DR、CD26、CD28、CD40 ligand、CD19 & CD16、CD23、CD40。

#### ③ウエスタンブロット法によるCD40シグナル下流のp-JUNの発現測定

ネフローゼ症候群患者の末梢血からPBMCを分離し、治療前と治療による寛解後の、リン酸化したJNKであるp-JNKの発現レベルをウエスタンブロット法にて検討した。

#### ④可溶性CD30分子測定

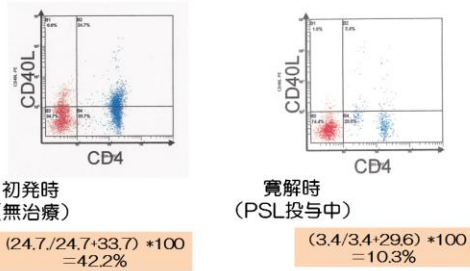
Human soluble CD30 BMS 240INST (bender Med Systems)を使用。治療前、寛解時、コントロール患者血清 25 $\mu$ Lを用いて、可溶性CD30分子を測定した。

### 4. 研究成果

#### ① フローサイトメトリー法によるリンパ球上の共刺激分子の解析

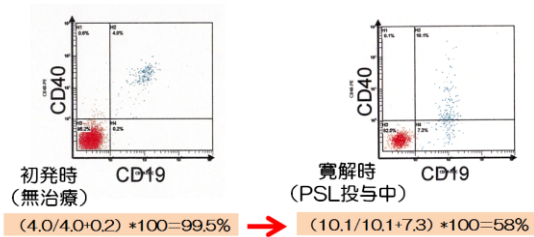
小児特発性ネフローゼ症候群の初発時と寛解時において、11名の患者のTおよびBリンパ球上での各種共刺激分子（CD40、CD40ligand(CD40L)、CD28、CD80/CD86、CTLA-4、CD69、CD26等）の発現を調べた。その結果、Tリンパ球上のCD40LとBリンパ球上のCD40分子のみが疾患活動性に相関することを確認した。

CD4陽性T細胞における  
CD40Ligandの発現変化 (典型例)



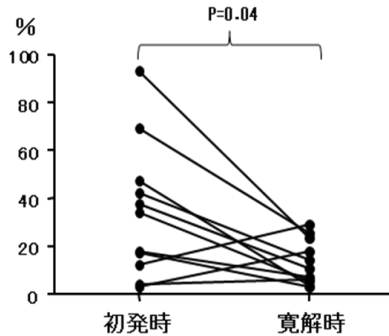
CD4+CD40L+細胞は、ステロイド治療による寛解後に減少を認めた

CD19陽性細胞 (B細胞) における、  
CD40の発現変化 (典型例)



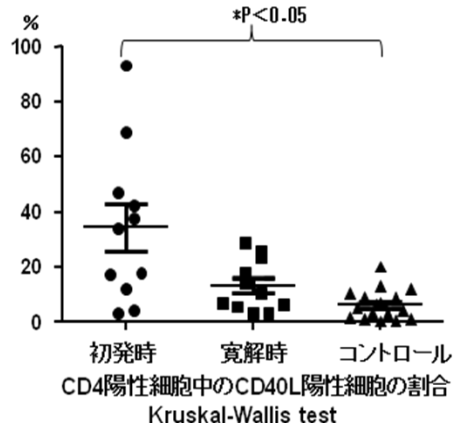
CD19+CD40+細胞の頻度 (CD19+CD40+細胞/CD19+全陽性細胞) はステロイド投与後で減少を認める

治療開始前の初発時においては、CD4 陽性 T リンパ球上の CD40L の発現率は平均 33.4% であったが、ステロイド薬使用下の寛解時は 13.3% に有意に減少した (P<0.05)。

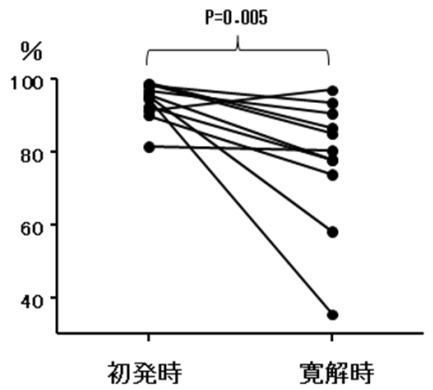


CD4陽性細胞中のCD40L陽性細胞の割合  
Wilcoxon signed rank test

またコントロール群ではその発現率は 6.4% であり前二者と比較して有意に低値であった (P<0.05)。

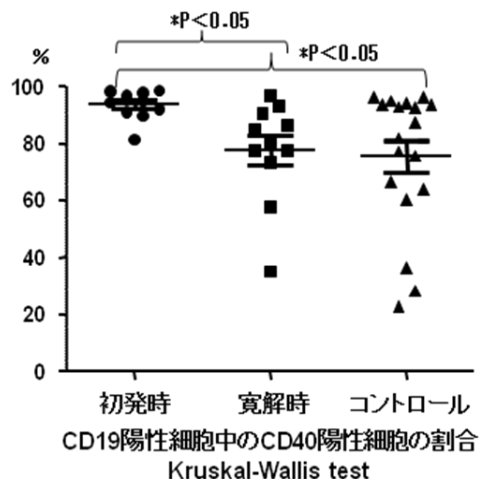


一方、CD40L の受容体である CD40 については、治療開始前の初発時においては、CD19 陽性 B 細胞上の CD40 の発現率は 93.9% であったが、ステロイド薬使用下の寛解時は 79.0% に有意に減少した (P<0.05)。



CD19陽性細胞中のCD40陽性細胞の割合  
Wilcoxon signed rank test

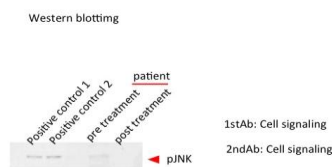
一方、コントロール群との比較では、CD40 の発現率は寛解時と比較して有意差はなかった (P<0.001)。



これらの事実は CD40L および CD40 が本症の疾患活動性を反映するのみでなく、それらを標的とした新規治療法の開発につながることを示唆している。

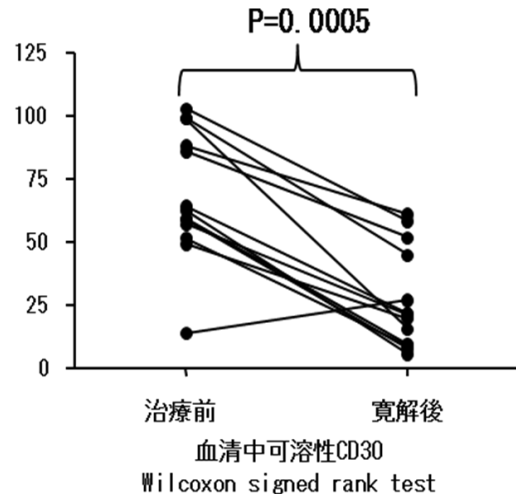
## ② ウェスタンブロット法による CD40 シグナル下流の p-JUN の発現測定

CD40 シグナルは①B 細胞の活性化 ②クラススイッチ ③体細胞突然変異などに関わる重要なシグナルである。また、B 細胞上に異所性 CD40L を発現し得るトランスジェニックマウスにおいて、過剰な CD40 シグナルによって自己免疫疾患の一つである全身性エリテマトーデス様の病態を発症することが報告され、CD40 への過剰シグナルは免疫の異常に作用する可能性がある。ネフローゼ症候群患者における過剰な CD40 シグナルによる B 細胞の活性化や過剰な CD40L シグナルによる T 細胞の活性化が病態発現に影響していることが予想される。CD40 シグナルの増加は CD40 シグナル下流に存在する JNK のリン酸化 (p-JNK) を増加させる。そこで、ネフローゼ症候群患者の末梢血から PBMC を分離し、治療前と治療後の p-JNK の発現レベルをウェスタンブロット法にて検討した。その結果、治療後と比較して治療前の患者検体では p-JNK の発現は強く、治療後は健常人と同レベルの発現に戻っていることが示された。これは、発現増強した CD40, CD40L はそれぞれ相互作用し、シグナル増強を生むことで病態発現に何らかの役割を果たしていることが考えられる。今後、異常 CD40 シグナルとネフローゼ症候群の直接的な関連について分子生物学的手法を用いて解明する予定である。

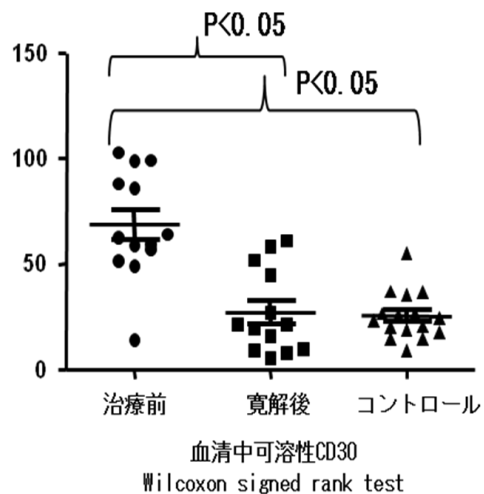


## ③ 可溶性 CD30 分子測定

リンパ球上の共刺激分子である可溶性 CD30 (sCD30) のバイオマーカーとしての有用性を検証した。その結果、血漿中 sCD30 はネフローゼ症候群の初発時およびステロイド投与後の寛解時は (n=13)、それぞれ  $68.7 \pm 25.4 \text{ ng/ml}$ 、 $27.2 \pm 19.9 \text{ ng/ml}$  ( $P=0.0005$ ) であり明らかな有意差を認めた



また、正常コントロール (n=16) では、 $25.4 \pm 11.3 \text{ ng/ml}$  であり、それぞれネフローゼ初発時と有意差を認め ( $P<0.05$ )、sCD30 が本症の疾患活動期にのみ上昇することが判明した。この発見はこれまで報告のないものであり、CD40 分子同様に、T および B リンパ球の相互活性化が本症の病態に関与する事実を示すものである。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 61 件)

1. Ito S, Kemei K, Ogura M, Udagawa T, Fujinaga S, Saito M, Sako M, Iijima K: Survey of rituximab treatment for childhood-onset refractory nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 査読有, 2013 ; 28 : 257-64 , doi:10.1007/s00467-012-2319-1
2. Ito S. Disease Course in Childhood Steroid Sensitive Nephrotic Syndrome

- Is it Changeable. *Ind J pediatr* 査読有, 2012; 49; 868-9
3. Iijima K, Someya T, Ito S, Nozu K, Nakanishi K, Matsuoaka K, Ohashi H, Nagata M, Kamei K, Sasaki S. Focal segmental glomerulosclerosis in patients with complete deletion of one WT1 allele. *Pediatrics* 査読有, 2012 ; 129 : e1621-5 doi:10.1542/peds.2011-1323.
  4. Ishikura K, Yoshikawa N, Nakazato H, Sasaki S, Iijima K, Nakanishi K, Matsuyama T, Ito S, Yata N, Ando T, Honda M; for the Japanese Study Group of Renal Disease in Children. Two-Year Follow-Up of a Prospective Clinical Trial of Cyclosporine for Frequently Relapsing Nephrotic Syndrome in Children. *Clin J Am Soc Nephrol* 査読有, 2012 ; 7 : 1576-1583 doi:10.2215/CJN.00110112
  5. Sato M, Ito S, Ogura M, Kamei K, Miyairi I, Miyata I, Higuchi M, Matsuoaka K : Atyoical Pneumocystis jiroveci pneumonia with multiple nodular granulomas after rituximab for refractory nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 査読有, 2013 ;28:145-149 doi:10.1007/s0467-012-2286-6
  6. Ito S, Kamei K, Ogura M, SatoM, Fujimaru T, Ishikawa T, Udagawa T, Iijima K : Maintenance therapy with MMF after rituximab in pediatric patients with steroid-dependent nephrotic syndrome . *Pediatr Nephrol*. 査読有, 2011 ; 26 : 1823-1828
  7. Ito S, Ikeda H, harada T, Kamei K, Takahashi E : Cyclophosphamide followed by Mizoribine as maintenance therapy against refractory steroid dependent nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 査読有, 2011 ; 26 : 1921-2
  8. Machida H, Ito S, Hirose T, Takeshita F, Oshiro H, Nakamura T, Mori M, Inayama Y, Yan K, Kobayashi N, Yokota S : Expression of Toll-like receptor 9 in renal podocytes in childhood-onset active and inactive lupus nephritis . *Nephrol Dial Transplant*. 査読有, 2010;25:2530-2537
  9. Ito S, Tsutsumi A, Harada T, Inaba A, Fujinaga S, Kamei K : Long-term remission of nephritic syndrome with etanercept for concomitant juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Nephrol*.

査読有, 2010 ; 25 : 2175-2177

10. Fujinaga S, Hirano D, Nishizaki N, Kamei K, Ito S, Ohtomo Y, Shimizu T, Kaneko K : Single infusion of rituximab for persistent steroid-dependent minimal-change nephritic syndrome after long-term cyclosporine. *Pediatr Nephrol*. 査読有, 2010 ; 25 : 539-544

[学会発表] (計 25 件)

1. 伊藤秀一 : 分子標的療法がもたらす腎臓疾患治療の未来. 第 47 回日本小児腎臓病学会学術集会, 東京, 2012. 6. 30
2. Ito S, Udagawa T, Ogura M, Mayumi S, Kamei K, Iijima K : Efficacy of Maintenance Therapy with Mycophenolate Mofetil after Rituximab for Steroid-Dependent Nephrotic Syndrome. Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Reserch Joint Meeting, Denver, USA 2011. 5. 2 ,
3. Ito S : Treatment for Refractory Nephrotic Syndrome; Other Immunosuppressive Drugs. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, 福岡, 2011. 6. 2.
4. Ito S, Kamei K, Udagawa T, Ogura M, Fujimaru T, Ishikawa T, Sato M, Fujinaga S, Iijima K : National survey of rituximab treatment for childhood idiopathic nephritic syndrome. The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology, 福岡, 2011. 6. 2.
5. 伊藤秀一, 堤 晶子, 野田俊輔, 宇田川智宏 小椋雅夫, 亀井宏一 ネフローゼ症候群における T 細胞, B 細胞間の共刺激分子の発現と病態との関連性について. 第 45 回小児腎臓病学会学術集会, 大阪, 2010. 7. 2

[図書] (計 2 件)

1. 伊藤秀一, メディカルトリビューン, こどもの腎炎・ネフローゼ. 編集 伊藤秀一, 監修 五十嵐 隆 : 2012 ; 202
2. 伊藤秀一, 中山書店, 小児科臨床ピクシス 22 小児のネフローゼと腎炎 専門編集 伊藤秀一, 監修 五十嵐 隆 : 2010 ; 222

[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

本研究に関与するものはなし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 秀一 (ITO SHUICHI)

(独) 国立成育医療研究センター・器官病態系内科部 腎臓・リウマチ・膠原病科・医長

研究者番号：20336572

(2) 研究分担者

今留 謙一 (IMAGOME KENICHI)

(独) 国立成育医療研究センター・母児感染研究部感染防御研究室・室長

研究者番号：70304780

阿部 淳 (ABE JUN)

(独) 国立成育医療研究センター・免疫アレルギー研究部免疫療法研究室・室長

研究者番号：40281688