

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：83301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591591

研究課題名(和文) 微小変化型ネフローゼ症候群における再発頻度やステロイド剤抵抗性の予測

研究課題名(英文) Prediction of the relapse frequency and/or the steroid resistance in minimal change nephrotic syndrome

研究代表者

太田 和秀(Ohta, Kazuhide)

独立行政法人国立病院機構(金沢医療センター臨床研究部)・その他部局等・医師

研究者番号：20283129

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)：小児ネフローゼ症候群における再発頻度やステロイド剤反応性をT細胞抗原受容体(TCR)構造の多様性から予測因子の検討を行った。CD8陽性T細胞のV<sub>H</sub>領域のレパートワ解析とCDR3領域のスペクトラタイピング解析(波形解析)より得られた Complexity Score(CS)による評価では、CS<5.0の多様性が失われている症例において、より難治である事が予測された。この結果を基に、病初期から免疫抑制剤を使用する新たな臨床試験プロトコルを作製し始動する予定である。なお、TCR構造の多様性が失われているクローン解析も行ったが、病因を示唆するような共通なクローンは確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：I examined the prediction factor for the relapse frequency and steroid reactivity in pediatric patients with nephrotic syndrome from the T-cell receptor (TCR) diversity. In evaluation by Complexity Score (CS) obtained from the both analysis of the V<sub>H</sub> repertoire and the CDR3 size spectra typing in CD8+ T-cell, I have predicted that a case whose CS was less than 5.0 points was intractable more. Based on this result, we produced a new protocol the clinical trial using the immunosuppressive agents from the early phase of this illness. We are going to start the new clinical trial in future. In addition, although clonal analysis in which the diversity of TCR structure is lost was also enforced, we were not able to discover a same clone that suggests a cause of the nephrotic syndrome.

研究分野：医歯薬学 内科系臨床医学 小児科学(小児腎・泌尿器科学)

キーワード：ネフローゼ症候群 T細胞抗原受容体 構造の多様性 予後の予測因子 免疫抑制剤

# 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

## 1. 研究開始当初の背景

小児期ネフローゼ症候群の多くは、微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) である。この MCNS の中には、頻回再発型、ステロイド剤依存型といった難治な病型が存在し、ステロイド剤による副作用が大きな問題となっている。これらの病型は、ステロイド剤による治療が開始されたうえで、その反応性から判断されることが多く、よって難治例と判断され他の治療を加えようとした時には、既に多量のステロイド剤が投与されておりステロイド剤による副作用が強く出てしまっている症例が多く予後をさらに悪化させる一因となっている。こういう事態を回避するために、病初期から再発頻度やステロイド剤反応性を予測する事が出来れば理想と考えた。

## 2. 研究の目的

小児期ネフローゼ症候群患者における再発頻度やステロイド反応性を病初期から予測できる因子に関して検討することを目的とする。これまでの我々の既存患者における検討では、頻回再発例やステロイド依存（および抵抗）例では、T細胞の中でも CD8<sup>+</sup>T細胞における T細胞抗原受容体 (TCR) 構造の多様性が失われている事が判明した。よって、新規患者において同様な検討を行い、この T細胞抗原受容体 (TCR) 構造の多様性を評価することで再発頻度やステロイド反応性を病初期から予測することが出来るかどうかを前方視的に検討してゆく。さらに、この結果を用いた新たな治療プロトコルの作製に関しても検討してゆく。

## 3. 研究の方法

- (1) Flow cytometry による TCR の Vβ 領域のレパートリー解析。CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞において解析する。
- (2) Gene scan による TCR の各 Vβ 領域に対応する CDR3 領域のスペクトラタイピング (波形解析)。同じく、CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞において解析する。

## 4. 研究成果

- (1) 非頻回再発例 (NFR) では CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞ともに Vβレパートリーの分布異常は軽度であった。これに比して、頻回再発例 (FR)、ステロイド依存例 (SD) では CD8<sup>+</sup>T細胞においていくつかの Vβに正常+2SD以上の異常な増加を示すレパートリー分布が認められていた。しかし、この傾向は CD4<sup>+</sup>T細胞では顕著ではなかった。なお、異常に増えているクローンは多種多様であり MCNS に特異的に増えて

いるクローンは存在しないようだった。なお、この解析法の利点は、視覚的に判断できる事にあるが、欠点は客観的に数値化して評価法の一つとして用いるのが困難であることであった。

- (2) 各臨床型における CDR3 サイズ分析解析では、正常コントロールでは、すべての CD8<sup>+</sup>T細胞の Vβにおいてガウス分布を呈し、CS 平均値は 5.27 と高値で多様性は失われていなかった。非頻回再発例でも、ほとんどの Vβが正常ガウス分布を呈して CS 平均値は 5.32 で正常コントロールとほぼ同等に高い値であった。これに対し、頻回再発例およびステロイド剤依存例ではオリゴクローナルもしくはモノクローナルな分布を呈する Vβが多数存在し、頻回再発例では CS 平均値 4.92、ステロイド剤依存例では CS 平均値 4.38 と低値で多様性が失われていた。
- (3) すべての症例の CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞の CS 平均値をプロットしてみた。その結果、CD4<sup>+</sup>T細胞における各群の CS の平均値は、正常コントロール群 5.14±0.01、非頻回再発群 5.26±0.21、頻回再発例/ステロイド剤依存群 5.13±0.31 であり有意差は認められなかった。一方、CD8<sup>+</sup>T細胞における各群の CS の平均値は、正常コントロール群 5.25±0.15、非頻回再発群 5.42±0.33、頻回再発例/ステロイド剤依存群 4.90±0.44 であり、正常コントロール群や非頻回再発群と頻回再発例/ステロイド剤依存群とにおいて統計的有意差が認められた。
- (4) 頻回再発例とステロイド剤依存例での CD8<sup>+</sup>T細胞の CS 値は、半数の例で正常下限値 (コントロール群の-2SD 値 (CS=5.0)) 以下であった。この結果を用いると、MCNS 症例の CD8<sup>+</sup>T細胞における平均 CS が 5.0 以下の場合、鋭敏度 56%、特異度 77%で頻回再発またはステロイド剤依存型の経過をとるのではないかと予測できる可能性があった。なお、ステロイド剤依存例に限って言えば、CD8<sup>+</sup>T細胞の平均 CS が 5.0 以下の場合に鋭敏度、特異度ともに 100%近い確率で予測できる可能性も示唆された。
- (5) 臨床経過と各評価結果においては、TCR Vβレパートリー解析は、臨床症状の改善度に応じて変化しており、ステロイド感受性の指標として、経過を追って参考としてゆくことが出来ると考えられた。
- (6) 予後不良な頻回再発型やステロイド剤依存例では、TCR Vβレパートリー分布の解析においては、T細胞でのいくつかの Vβレパートリーに著大な増加を示すクローンが認められた。また、CDR3 サイズ解析ではオリゴクローナルもしくはモノクローナルな分布を呈する Vβが

多数存在し、TCR 構造の多様性が失われていた。以上のような傾向は、CD8<sup>+</sup>T 細胞で特に強く認められた。このような各患者毎に異常に増加しているクローンが存在していたが、本疾患の病因に結びつくような特徴的なクローンは検出することは出来なかった。

- (7) TCR 構造の多様性をスコア化した結果から、予後不良な頻回再発型もしくはステロイド剤依存型をある程度の確率で予測することも可能であると思われた。そこで、この予測を用いて病初期からステロイド剤以外の免疫抑制剤も加えるような新たな治療法を考えた。新規ネフローゼ症候群患者を、非頻回再発型予想群 (CS  $\geq$  5.0)、頻回再発およびステロイド剤依存性予想群 (CS < 5.0) に分け、そのうえで、後者の頻回再発およびステロイド剤依存性予想群を、ステロイド剤単独群と免疫抑制剤併用群に任意に分けて前方視的臨床研究を行なう。現在、計画案を作製したので、今後は“倫理委員会”に提出し実際に施行してゆく予定である。

以上の内容の多くは、特に下記論文（主な発表論文の(9)）にまとめられている。

- **Ohta K, Shimizu M**, Yokoyama T, Nishio S, Ueno K, Seno A, Yachie A. Evaluation of T-Cell Receptor Diversity in Pediatric Patients with Minimal Change Nephrotic Syndrome Clin Nephrol 77(4): 296-304, 2012 <http://www.dustri.com/nc/article-response-page.html?artId=9311>

## 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 17 件)

- (1) Fujieda M, Morita T, Naruse K, Hayashi Y, Ishihara M, Yokoyama T, Toma T, **Ohta K**, Wakiguchi H. Effect of pravastatin on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. Hum Exp Toxicol. 30 (7): 603-615, 2011 DOI: 10.1177/09603271110376551.
- (2) Maeda A, **Ohta K**, Ohta K, Nakayama Y, Hashida Y, Toma T, Saito T, Maruhashi K, Yachie A. Effects of antithrombin III treatment in vascular injury model of mice. Pediatr Int. 53 (5): 747-753, 2011 DOI: 10.1111/j.1442-200X.2011.03350.x.
- (3) **Ohta K**, Yokoyama T, **Shimizu M**, Mizuno K, Sakazume S, Fujiki T, Saikawa S, Yachie A. Diffusion-weighted MRI of exercise-induced acute renal failure (ALPE) Pediatr Nephrol 26 (8): 1321-1324, 2011 DOI: 10.1007/s00467-011-1869-y.
- (4) Yokoyama T, Sugimoto N, Taniguchi K, Komoto S, Yunoo T, **Ohta K**, Hashimoto H, Seno A, Ashida A, Fujieda M, Nishio S, Ueno K, **Shimizu M**, Yachie A. Molecular and immunohistochemical detection of rotavirus in urinary sediment cells of children with rotavirus gastroenteritis Clin Microbiol Infect. 17(8): 1190-1193, 2011 DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03522.x.
- (5) Yokoyama T, **Shimizu M**, **Ohta K**, Yunoo T, Okajima M, Wada T, Toma T, Koizumi S, Yachie A. Urinary heme oxygenase-1 as a sensitive indicator of tubulointerstitial inflammatory damage in various renal diseases. Am J Nephrol 33(5): 414-20, 2011 DOI: 10.1159/000327020.
- (6) **Shimizu M**, Nishio S, Ueno K, Yokoyama T, Sakai S, Nagaoki S, Sugimoto N, **Ohta K**, Miyamoto M, Yachie A. Isolated congenital megacystis without intestinal obstruction: a mild variant of chronic intestinal pseudoobstruction syndrome? J Pediatr Surg 46(11):e29-32, 2011 DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2011.08.012.

- (7) Ashida A, Fujieda M, **Ohta K**, Nakakura H, Matsumura H, Morita T, Igarashi T, Tamai H  
Clinical characteristics of obstructive uropathy associated with rotavirus gastroenteritis in Japan  
*Clin Nephrol* 77(1): 49-54, 2012  
<http://www.dustri.com/index.php?id=98&artId=9286>
- (8) **Shimizu M**, Nikolov NP, Ueno K, **Ohta K**, Siegel RM, Yachie A, Candotti F.  
Development of IgA nephropathy-like glomerulonephritis associated with Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency.  
*Clin Immunol* 142 (2): 160-166, 2012  
DOI: 10.1016/j.clim.2011.10.001.
- (9) **Ohta K**, **Shimizu M**, Yokoyama T, Nishio S, Ueno K, Seno A, Yachie A.  
Evaluation of T-Cell Receptor Diversity in Pediatric Patients with Minimal Change Nephrotic Syndrome  
*Clin Nephrol* 77(4): 296-304, 2012  
<http://www.dustri.com/nc/article-response-page.html?artId=9311>
- (10) **Shimizu M**, Yokoyama T, Sakashita N, Sato A, Ueno K, Akita C, **Ohta K**, Kitano Hatanaka E, Kitamura H, Saikawa Y, Yachie A  
Thomsen-Friedenreich antigen exposure as a cause of *Streptococcus pyogenes*-associated hemolytic-uremic syndrome  
*Clin Nephrol* 78 (4): 328-331, 2012  
<http://www.dustri.com/nc/article-response-page.html?artId=8957>
- (11) **Shimizu M**, Kuroda M, Sakashita N, Konishi M, Kaneda H, Igarashi N, Yamahana J, Taneichi H, Kanegane H, Ito M, Saito S, **Ohta K**, Taniguchi T, Furuichi K, Wada T, Nakagawa M, Yokoyama H, Yachie A  
Cytokine profiles of patients with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111-induced hemolytic-uremic syndrome  
*Cytokine* 60 (3): 694-700, 2012  
DOI: 10.1016/j.cyto.2012.07.038.
- (12) Karasawa R, Fujieda F, **Ohta K**, Yudoh K  
Validation of a New Biomarker in Patients with Kawasaki Disease Identified by Proteomics  
*J Data Mining Genomics Proteomics* 4 (1): 1000124, 2012  
DOI: 10.4172/2153-0602.1000124
- (13) **Shimizu M**, Yokoyama T, Ishikawa S, Ueno K, **Ohta K**, Yachie A  
A distinct lymphocyte distribution in relapse after rituximab for steroid-dependent nephrotic syndrome  
*CEN Case Rep* 2:1-5, 2013  
DOI: 10.1007/s13730-012-0028-z
- (14) Wada T, Kanegane H, **Ohta K**, Katoh F, Imamura T, Nakazawa Y, Miyashita R, Hara J, Hamamoto K, Yang X, Filipovich AH, Marsh RA, Yachie A.  
Sustained elevation of serum interleukin-18 and its association with hemophagocytic lymphohistiocytosis in XIAP deficiency.  
*Cytokine*. 65 (1) : 74-78, 2014  
DOI: 10.1016/j.cyto.2013.09.007.
- (15) **Shimizu M**, Ishikawa S, Yachi Y, Muraoka M, Tasaki Y, Iwasaki H, Kuroda M, **Ohta K**, Yachie A.  
Tolvaptan therapy for massive edema in a patient with nephrotic syndrome.  
*Pediatr Nephrol*. 29 (5); 915-917, 2014  
DOI: 10.1007/s00467-013-2687-1.
- (16) Nakajima Y, Meijer J, Dobritzsch D, Ito T, Meinsma R, Abeling NGGM, Roelofsen J, Zoetekouw L, Watanabe Y, Lee T, Mitsubuchi H, Yoneyama A, **Ohta K**, Kuhara T, Eto K, Saito K, Clinical, van Kuilenburg ABP  
Biochemical and Molecular analysis in 13 Japanese patients with a  $\beta$ -Ureidopropionase deficiency demonstrating a high prevalence of the p.977G>A (p.R326Q) mutation in the Japanese population  
*J Inherit Metab Dis*. 37 (5); 801-812, 2014  
DOI: 10.1007/s10545-014-9682-y.
- (17) Yokoyama T, Sugimoto N, Kato E, **Ohta K**, Ishikawa S, Ueno K, **Shimizu M**, Yachie A  
Rotavirus gastroenteritis-associated urinary ammonium acid urate crystals  
*Pediatrics International* 57 (1); 158-160, 2015  
DOI: 10.1111/ped.12405.
- [学会発表] (計 7 件)
- ① **Ohta K**, Yokoyama T, **Shimizu M**, Koba Y, Tone T, Mizuno K, Sakazume S, Fujiki Tm, Saikawa Y, Yachie A.  
Diffusion-weighted MRI of exercise-induced acute renal failure (ALPE)  
The 11th Asian Congress of Pediatric

- Nephrology  
Fukuoka, Japan, June, 2-4, 2011
- ② Yokoyama-T, Sugimoto-N, Taniguchi-K, Komoto-A, **Ohta-K**, Nishio-S, Ueno-K, **Shimizu-M**, Yachie-A  
Direct infection and functional impairing of renal epithelial cells by rotavirus gastroenteritis.  
The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology  
Fukuoka, Japan, June, 2-4, 2011
- ③ Sakashita-N, **Shimizu-M**, Yokoyama-T, Ueno-K, **Ohta-K**, Yachie-A  
Thomsen-Friedenreich antigen exposure as a cause of group A beta-hemolytic streptococcus associated hemolytic uremic syndrome  
The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology  
Fukuoka, Japan, June, 2-4, 2011
- ④ **Shimizu-M**, Nishio-S, Ueno-K, Yokoyama-T, **Ohta-K**, Miyamoto-M, Yachie-A  
Congenital megacystis without microcolon and intestinal hypoperistalsis: variant of Megacystis Microcolon Intestinal Hypoperistalsis Syndrome  
The 11th Asian Congress of Pediatric Nephrology  
Fukuoka, Japan, June, 2-4, 2011
- ⑤ Karasawa-R, Fujieda-M, **Ohta-K**, Tamaki-M, Yudoh-K  
Targets antigens and pathogenicity of anti-endothelial cell antibodies in Kawasaki disease  
The 10<sup>th</sup> International Kawasaki Disease Symposium  
Kyoto, Japan, Feb, 7-10, 2012
- ⑥ A. Yachie, T. Yokoyama, **M. Shimizu, K. Ohta**, T. Toma, T. Wada, N. Radhakrishnan, A.Sachdeva, S.P. Yadav  
Heme oxygenase-1 deficiency: A novel autoinflammatory disease associated with systemic inflammation associated tissue injury and endothelial dysfunction.  
15th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, Florence, Italy, Oct, 3-9, 2012
- ⑦ **Ohta K**, Fujiki T, Ymamiya M, Inoue N, Senda Y, Sakazume S, Ueno K, Yokoyama T, **Shimizu M**, Yachie A  
Normal Values for Pediatric Urinary Biochemistry  
The 16<sup>th</sup> Congress of the International Pediatric Nephrology Association, Shanghai, China, Aug. 30 – Sep. 2, 2013
- [図書] (計 2 件)
- (1) 腎尿細管/間質性疾患：腎性糖尿  
**太田和秀**  
50 の典型例で学ぶ小児の腎泌尿器疾患：  
金子一成編、  
診断と治療社 p168-172、6, 2011
- (2) 尿路疾患（泌尿器科関連疾患）：尿路結石  
**太田和秀**  
小児腎臓病学：日本小児腎臓病学会編、  
診断と治療社 p 361-365 , 2012

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

**太田 和秀 (OHTA KAZUHIDE)**

独立行政法人国立病院機構

(金沢医療センター 臨床研究部)

その他の部局等 医師

研究者番号：20283129

### (2) 研究分担者

**清水 正樹 (SHIMIZU MASAKI)**

金沢大学 医薬保健領域 医学部 小児科助教

研究者番号：10401902