

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2013～2015

課題番号：25305028

研究課題名(和文) アジア太平洋地域における膜性腎症の実態調査研究

研究課題名(英文) Research on membranous nephropathy in Asia Pacific region

研究代表者

丸山 彰一 (Maruyama, Shoichi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10362253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：特発性膜性腎症の特性を明らかにするために、日本とアジア太平洋地域の各国の患者の診療実態を調査した。本邦の特発性膜性腎症患者および二次性膜性腎症患者における血中のPLA2R抗体の陽性率は、各々53%および0%であった。これは、韓国、中国の陽性率と比較しても低値であった。遺伝子多型解析では、PLA2R1のrs4664308は既報の結果と同様に有意差が認められたが、HLA-DQA1のrs2187668では関連が認められなかった。PLA2R抗体の生成機序には人種間差以外に地域間差が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the characteristic of the idiopathic membranous nephropathy (iMN), I investigated the situation of the iMN patients in Japan and in countries of the Asia-Pacific region. The positive rate of PLA2R antibodies was 53% in patients with iMN and 0% in patients with secondary MN. The rate in Japan was lower than that in Korea or China. The genetic polymorphism analysis revealed a significant association in rs4664308 of PLA2R1 in iMN patients, but no relationship was observed in rs2187668 of HLA-DQA1. It is possible that the regional difference as well as genetic difference may contribute the mechanism of the PLA2R antibody generation in the iMN patients.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：膜性腎症 PLA2R 遺伝子型 ネフローゼ症候群 アジア

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本における膜性腎症の実態

膜性腎症(MN: membranous nephropathy)は、成人の一次性ネフローゼ症候群の25%を占める疾患である。申請者が代表を務める厚生労働省班研究「難治性腎疾患に関する調査研究」において「日本ネフローゼ症候群コホート研究(J-NSCS)」が進行中である。この調査によると、わが国の特発性MN(iMN)は2年以内に70%が完全寛解する。海外の結果と比較しても治療反応性は良好である。しかし、一部の症例では腎機能低下、感染症による死亡などもみられる。また、わが国の長期予後調査では、予後は必ずしも良好とは言えないことが明らかになっている(Shiiki, 2004, Kidney Int)。iMN研究は腎疾患研究の中でも最重要課題のひとつと位置づけられる。

(2) 責任抗原および抗体に関する研究動向

2009年にBeckらはphospholipase A2受容体(PLA2R)がiMNにおける責任抗原であると報告した(Beck, 2009, NEJM)。その後、世界各国から抗PLA2R抗体の報告が相次いだ。これまでのところ、抗PLA2R抗体はiMNに特異的であり、iMNにおける陽性率は概ね60~80%と報告されている。申請者らは、PLA2R抗原の大量精製に成功しており、抗体の有無を確実に検出する系の確立に成功している。申請者らの検討では、日本人のiMN患者での陽性率は約50%程度であった。PLA2R抗体の関与は人種・地域で異なる可能性が高いと考えられる。

(3) 膜性腎症における遺伝子解析研究の動向

iMN患者のGenome wide association studyによりPLA2RおよびHLA-DQA1のsingle nucleolar polymorphism(SNP)が白人において疾患の発症と関連することが報告されている(Stanescu, 2011, NEJM)(図4)。一方、韓国、台湾の研究では、白人とは異なるPLA2RのSNPが疾患と関連することが報告されている(Liu, 2010, J Biomed Sci., Kim, 2011, Nephron Clin Pract)。PLA2Rが主たる原因遺伝子であること

が明らかになる一方でHLA-DQA1に関しては報告が乏しい。

2. 研究の目的

我が国におけるiMNの実態が遺伝的背景によるものか、環境因子によるものか、あるいは診療に関わる社会基盤によるものか、海外との比較を通して明らかにする必要があると考えた。そのためには、APSNに加盟しているアジア太平洋地域においてiMNの実態を明らかにすることが有用である。本研究は、以下のことを目的とした。

(1) PLA2R 抗体陽性率比較

我が国と各国のPLA2R抗体陽性率を明らかにし、比較することで、本邦のiMNの臨床的特徴を解明する。

(2) 遺伝的特徴の解明

iMN患者の遺伝子多型解析を実施し、アジア太平洋地域の各国、あるいは欧米の報告と比較検討する。

(3) 診療実態調査と国際貢献

本研究を通じてAPSN加盟国のiMN診療実態を明らかにし、iMN診療の向上にわが国が主導的な役割を果たし国際貢献する。

3. 研究の方法

(1) PLA2R 抗体陽性率比較

本邦における膜性腎症患者のPLA2R抗体陽性率を明らかにするために、研究代表者が所属する名古屋大学の腎生検患者コホートを用いて血中のPLA2R陽性率を調査した。具体的には、腎生検による病理診断および臨床情報に基づいて確定診断された未治療の特発性膜性腎症患者100名および二次性膜性腎症患者31名から腎生検時に採取した血液に含まれるPLA2R抗体をウエスタンブロット法により解析した。ウエスタンブロット法では、抗原としてヒト糸球体ライセートを、一次抗体として段階希釈した患者血清を、二次抗体としてHRP標識抗ヒトIgGマウスモノクローナル抗体をそれぞれ使用し、PLA2Rの分子量

(約 180kDa) の位置に出現するバンドで PLA2R 抗体の有無を判定した。

下表には、解析対象にした特発性膜性腎症患者および二次性膜性腎症患者の腎生検時の臨床背景を示した。特発性膜性腎症および二次性膜性腎症の群間に有意な差異は認められなかった。二次性膜性腎症の一次因子の構成は、免疫関連疾患 (35.5%)、悪性新生物 (19.4%)、薬剤 (19.4%)、感染症 (6.4%) およびその他 (19.4%) であった。

Table 1 Characteristics of patients with idiopathic and secondary membranous nephropathy

	IMN (n = 100)	SMN (n = 31)
Male, n (%)	63 (63)	20 (65)
Age at diagnosis (years)	67 ± 9	61 ± 12
Urinary protein (g/day)	4.1 (2.6–6.4)	4.9 (1.8–6.6)
Urinary protein ≥3.5 g/day, n (%)	59 (59)	19 (61)
Serum albumin (g/dL)	2.4 ± 0.7	2.5 ± 0.9
Serum albumin ≤3 g/dL, n (%)	81 (81)	21 (68)
Both urinary protein ≥3.5 g/day and serum albumin ≤3 g/dL, n (%)	54 (54)	17 (55)
Serum total protein (g/dL)	5.2 ± 0.8	5.8 ± 1.1
Serum creatinine (μM)	72.1 (61.9–88.4)	64.5 (54.8–84.0)
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	65.5 (54.3–77.8)	72.0 (58.0–97.0)
Serum IgG (mg/dL)	727 (563–1038)	1182 (767–1721)
Total cholesterol (mM)	7.6 (6.2–9.4)	6.1 (5.1–8.5)
Recognized underlying membranous nephropathy inducible disease		
Immune-associated disease [n (%)]	0 (0)	11 (35.5)
Neoplasia [n (%)]	0 (0)	6 (19.4)
Drugs [n (%)]	0 (0)	6 (19.4)
Infections [n (%)]	0 (0)	2 (6.4)
Other [n (%)]	0 (0)	6 (19.4)

The data are expressed as the number (%), mean ± SD or median (interquartile range)

iMN idiopathic membranous nephropathy, sMN secondary membranous nephropathy, eGFR estimated glomerular filtration rate

(2) iMN 患者における遺伝子多型解析

本邦において腎生検および臨床所見から iMN と診断された患者 96 例から血液を採取し、DNA を抽出した。精製された DNA は国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門に輸送し解析を行った。

患者：腎生検により特発性膜性腎症と診断した 96 例 (昭和大学 16 例、新潟大学 56 例、名古屋大学 21 例)。うち、男性 63 名 (66%)、診断時年齢中央値 58.5 歳

対照：HapMap database Genotyping

Sanger sequence :

PLA2R1: rs4664308

HLA-DQA1: rs2187668

次世代シーケンサー :

HLA-DQA1 を含むゲノム領域をターゲットリシーケンスし、網羅的に一塩基多型・変異 (SNV) を検出。

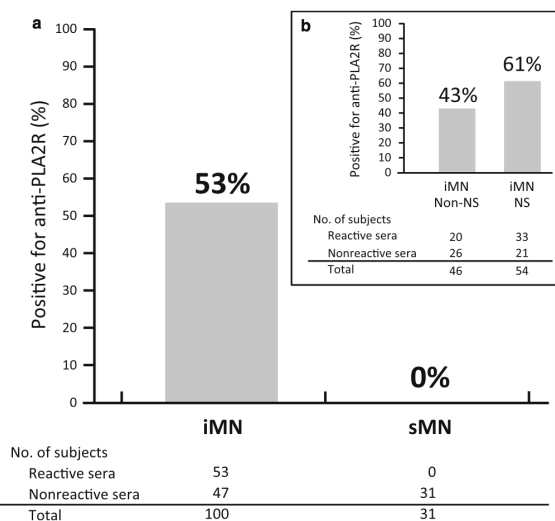
(3) アジア各国の診療実態調査と国際比較

学会あるいは研究会等の機会にアジア各国の腎臓内科専門医と協議する場を設ける。診療実態を比較検討し、アジア太平洋地域において実現可能な iMN の実態調査の計画を立案する。さらに iMN 診療の向上を図るために実施すべき施策について検討する。

4. 研究成果

(1) 本邦の iMN 患者における PLA2R 抗体

本邦の特発性膜性腎症患者および二次性膜性腎症患者における血中の PLA2R 抗体の陽性率は、各々 53% および 0% であった (下図)。



特発性膜性腎症患者ではネフローゼ症候群の有無で PLA2R 陽性率は異なり、ネフローゼ症候群有り群の PLA2R 抗体陽性率は 61% および無し分では 43% だった。このように、日本人患者でも海外症例と同様に PLA2R 抗体は特発性膜性腎症患者特異的に認められ、非ネフローゼ症候群患者よりもネフローゼ症候群

患者の方が陽性率は高くなる傾向を認めた。

特発性膜性腎症患者について PLA2R 抗体の有無別に臨床背景を比較すると、PLA2R 抗体陽性群では陰性群に比べて、血清アルブミン 3g/dl 以下患者の割合が有意に多かったが、これ以外に有意な差異は認められなかった。(下表)

Table 2 Comparison of the patient's characteristics between anti-PLA2R antibody positive and negative patients with idiopathic membranous nephropathy

Anti-PLA2R antibody	Negative (n = 47)	Positive (n = 53)	P value
Male, n (%)	31 (66)	32 (60)	0.56
Age at diagnosis (years)	68 ± 9	67 ± 9	0.48
Urinary protein (g/day)	3.7 (2.4–5.8)	4.6 (2.9–8.6)	0.06
Urinary protein ≥3.5 g/day, n (%)	24 (51)	35 (66)	0.13
Serum albumin (g/dL)	2.5 ± 0.9	2.3 ± 0.5	0.21
Serum albumin ≤3 g/dL, n (%)	32 (68)	49 (92)	0.02
Both urinary protein ≥3.5 g/day and serum albumin ≤3 g/dL, n (%)	21 (45)	33 (62)	0.08
Serum total protein (g/dL)	5.4 ± 0.9	5.1 ± 0.7	0.06
Serum creatinine (μM)	70.7 (61.0–91.9)	73.4 (61.9–86.2)	0.74
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	66.0 (50.0–78.0)	65.0 (56.0–76.5)	0.69
Serum IgG (mg/dL)	791 (594–1062)	668 (536–982)	0.33
Serum total cholesterol (mM)	7.5 (6.1–9.9)	7.6 (6.4–9.2)	0.90

The data are expressed as the number (%), mean ± SD or median (interquartile range). eGFR (mL/min/1.73 m²) = 194 × Serum creatinine (mg/dL)^{-1.094} × Age^{-0.287} × 0.739 (if female)

Anti-PLA2R anti-phospholipase A2 receptor autoantibody, iMN idiopathic membranous nephropathy, eGFR estimated glomerular filtration rate

本邦における PLA2R 抗体陽性率(53%)は、海外コホートでの陽性率と比べて低い値だった。これまでに報告された中国、オランダ、韓国、アメリカ、ドイツにおける PLA2R 抗体陽性率は、それぞれ 98%、78%、69%、70%および 52%で、本邦の PLA2R 陽性率はドイツと同等で、他のいずれの国よりも低い値だった。特に、中国と韓国の PLA2R 陽性率が著しく高かったことから、PLA2R 抗体の生成機序や特発性膜性腎症の病態形成機序には人種間差以外に地域間差が存在する可能性が示唆された。

(2) iMN 患者における遺伝子多型解析

PLA2R1のrs4664308は既報の結果と同様に有意差が認められた。

rs4664308 (PLA2R1 intron 1)

	French study	Dutch study	British study	This study
Odds ratio (95% CI)	1.87 (1.20–2.92)	2.27 (1.73–2.97)	2.10 (1.67–2.64)	2.38 (1.59–3.55)
MAF(%)				
Patients	23.3	26.0	25.3	22.4
Controls	36.3	44.4	41.6	40.7*
P value	5.1 × 10 ⁻³	1.0 × 10 ⁻⁹	2.1 × 10 ⁻¹⁰	1.8 × 10 ⁻⁵

*HapMap JPT

一方、HLA-DQA1のrs2187668では関連が認め

rs2187668

	French study	Dutch study	British study	This study
Odds ratio (95% CI)	4.48 (2.68–7.50)	3.76 (2.92–4.86)	5.33 (4.04–7.02)	1.2 (0.32–4.55)
MAF(%)				
Patients	31.3	37	41.9	2.7
Controls	9.2	13.5	11.9	2.3*
P value	1.8 × 10 ⁻⁹	5.6 × 10 ⁻²⁷	5.2 × 10 ⁻³⁶	0.7849

*HapMap JPT

- 日本人集団を用いたcase-control studyで既報のrs2187668に有意差は認められなかった

られなかった。

HLA-DQA1のターゲットリシーケンスでは、罹患者に1346個もの変異が認められ、既存のデータベースにないVariantが73か所も認められた。同定されたSNVのうちHapMapのJPTのデータを比較可能なものが10ヶ所あった。

シーケンシングで検出された新規変異

Region	Number of SNVs	Number of novel SNVs (1000 genome and dbSNP)
exonic	80	2
intronic	510	30
UTR3	111	2
UTR5	5	0
upstream	417	32
downstream	223	7
total	1,346	73

罹患者92サンプルで1,346のSNVが認められ、そのうち73は新規変異であった。これら新規変異のうち、6カ所は92サンプルで10%以上の頻度を有していた。

Chr	Start	Func	Gene	Freq
6	32600787	intergenic	HLA-DQA1(dist=4396)	20.7%
6	32601270	intergenic	HLA-DQA1(dist=3913)	17.4%
6	32601902	intergenic	HLA-DQA1(dist=3281)	17.4%
6	32601968	intergenic	HLA-DQA1(dist=3215)	14.7%
6	32606584	intronic	HLA-DQA1	21.2%
6	32609236	exonic	HLA-DQA1	10.9%

iMN発症 PLA2R1 リスクアレルは日本人集団にも認められたが、これに加えて、新規リスクアレルが HLA-DQA1 近傍にも存在する可能性が示唆された。今後 HLA-DQA1 のターゲットリシーケンスから網羅的に同定した多型・変異における関連解析を進めていくことが今後の課題である。

(3) アジア各国と国際比較

2013年から2015年にかけて、韓国ソウル

大学の金教授と複数回協議を行った。韓国における iMN の診断方法や治療方針は日本のものと大きな差はないが、PLA2R 抗体の陽性率には大きな差がある（韓国からの複数の報告で PLA2R 抗体陽性率は 70 ~ 80%）ことを確認した。教授が有する韓国の National CKD cohort の中から iMN を抽出し解析することが今後の課題である。

2013 年、中山大学の余学清 Yu Xueqing 教授（中国腎臓学会会長）と協議した。Yu 教授が主宰する CKD コホートの中には膜性腎症も含まれている。ネフローゼの SNP について解析するための情報交換ならびに日本の iMN 患者の SNP と比較検討することに同意を得ることができた。

2015 年、インドネシア腎臓学会会長の Dahrmeizer bahar 教授と協議した。インドネシアにおいては、多くの地域で iMN の診断が不十分であることが確認された。今後、我が国の支援でネフローゼ患者の血清で PLA2R 抗体を測定するかについて協議した。

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 4 件)

すべて査読有

1. Akiyama S, Akiyama M, Imai E, Ozaki T, Matsuo S, Maruyama S. Prevalence of anti-phospholipase A2 receptor antibodies in Japanese patients with membranous nephropathy. Clin Exp Nephrol. 19(4): 653-60.2015
2. Hayashi N, Akiyama S, Okuyama H, Matsui Y, Adachi H, Yamaya H, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Yokoyama H. Clinicopathological characteristics of M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) -related membranous nephropathy in Japanese. Clin Exp Nephrol. 19(5): 797-803.2014
3. Yokoyama H, Sugiyama H, Narita, Saito T, Yamagata K, Nishio S, Fujimoto S, Mori N, Yuzawa Y, Okuda S, Maruyama S, Sato H, Ueda Y, Makino H, Matsuo S. Outcomes of primary nephrotic syndrome in elderly Japanese:

retrospective analysis of the Japan Renal Biopsy Registry (J-RBR). Clin Exp Nephrol. 19(3): 469-505.2014

4. Yamaguchi M, Ando M, Yamamoto R, Akiyama S, Kato S, Katsuno T, Kosugi T, Sato W, Tsuboi N, Yasuda Y, Mizuno M, Ito Y, Matsuo S, Maruyama S. Patient age and the prognosis of idiopathic membranous nephropathy. PLoS One. 9(10): e110376.2014

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Shoichi Maruyama. Nephrotic Syndrome Registration and Treatment in Japan. Training Program of County Hospitals 2015. (Yinchuan City, China) 2015/7/9
2. Shin'ichi Akiyama, Enyu Imai, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama. Prevalence of anti-phospholipase A2 receptor antibodies in Japanese patients with membranous nephropathy. World Congress of Nephrology 2015. (Cape Town, South Africa) 2015/3/15
3. Yoshinari Yasuda, Mayumi Kamiya, Yohei Maeshima, , Tadao Akizawa, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama. Low Awareness and Comprehension of Chronic Kidney Disease Among Japanese Health-Check Subjects. Kidney Week 2014. (Philadelphia, USA) 2014/11/15
4. Shoichi Maruyama, Ryohei Yamamoto, Hitoshi Yokoyama, Seiichi Matsuo, Enyu Imai. Japan Nephrotic Syndrome Cohort Study (JNSCS): A nationwide Prospective Cohort Study of Primary Nephrotic Syndrome in Japan. The Sun Yat-sen International Forum on Clinivakl Research and Translational. (Guangzhou, China)2014/5/23
5. Shin'ichi Akiyama, Enyu Imai, Seiichi Matsuo, Shoichi Maruyama. Molecular Characteristics of Anti-PLA2R IgG in Japanese Patients with Idiopathic Membranous Nephropathy. Kidney Week 2013. (Atlanta, USA) 2013/11/7
6. Ryohei Yamamoto, Shoichi Maruyama, Hitoshi Yokoyama, Seiichi Matsuo, Enyu Imai. Resistance to Immunosuppressive Therapy in Patients with Primary Nephrotic Syndrome: Japan Nephrotic Syndrome Cohort Study (JNSCS). Kidney Week 2013. (Atlanta, USA) 2013/11/7
7. Reiko Muto, Eri Ito, Shinichi Akiyama, Takenori Ozaki, Sawako Kato, Waichi Sato, Shoichi Maruyama, Seiichi Matsuo. ANTI-PHOSPHOLIPASE A2 RECEPTOR ANTIBODIES FOR MEMBRANOUS

NEPHROPATHY WITH NEPHROTIC SYNDROME
IN JAPAN. The World Congress of
Nephrology 2013.(Hong Kong, China)
2013/6/2

8. Shin'ichi Akiyama, Takenori Ozaki,
Hitoshi Yokoyama, Enyu Imai, Seiichi
Matsuo, Shoichi Maruyama. PREVALENCE
OF AUTOANTIBODY AGAINST PLA2R IN
PATIENTS WITH MEMBRANOUS NEPHROPATHY
IN JAPAN. The World Congress of
Nephrology 2013.(Hong Kong, China)
2013/6/1
9. Shoichi Maruyama, Ryohei Yamamoto,
Hitoshi Yokoyama, Yoshitaka Isaka,
Kosaku Nitta, Eri Muso, Shunya Uchida,
Kunio Morozumi, Seiichi Matsuo, Enyu
Imai. RESISTANCE TO IMMUNOSUPPRESSIVE
THERAPY IN PRIMARY NEPHROTIC
SYNDROME: JAPAN NEPHROTIC SYNDROME
COHORT STUDY (JNSCS). The World
Congress of Nephrology 2013.(Hong
Kong, China) 2013/6/1

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 彰一 (MARUYAMA, Shoichi)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：10362253

(2)研究分担者

松尾 清一 (MATSUO, Seiichi)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号：70190410
平成 25 年度～平成 26 年度

湯澤 由紀夫 (YUZAWA, Yukio)
藤田保健衛生大学・医学部・教授
研究者番号：00191479

井ノ上 逸郎 (INOUE, Itsuro)
国立遺伝学研究所・総合遺伝研究系・教授
研究者番号：00192500

山本 陵平 (YAMAMOTO, Ryohei)
大阪大学・保健センター・講師
研究者番号：00533853

秋山 真一 (AKIYAMA, Shin'ichi)
名古屋大学・医学系研究科・特任講師
研究者番号：20500010

横山 仁 (YOKOYAMA, Hitoshi)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：50191531

坪井 直毅 (TSUBOI, Naotake)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：50566958

佐藤 和一 (SATO, Waichi)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90508920
平成 25 年度～平成 26 年度

勝野 敬之 (KATSUNO, Takayuki)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：60642337
平成 27 年度