

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 19 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860890

研究課題名(和文)重症紫斑病性腎炎(HSPN)に対するシクロスポリンの有効性とその機序に関する検討

研究課題名(英文)Study of the efficacy and mechanism of cyclosporine for Henoch-Schonlein purpura nephritis (HSPN)

研究代表者

木全 貴久(KIMATA, Takahisa)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：90593517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：紫斑病性腎炎(HSPN)の多くは予後良好であるが、2-3%に末期腎不全に到る。重症例に対しては、ステロイドパルス療法、カクテル療法、血漿交換がおこなわれているが、これらの治療にも効果がない難治例が存在する。このような難治例にシクロスポリンA(CsA)の有効性が報告されているが、その機序は不明である。「HSPNに対するCsAの作用機序は、ポドサイトへの直接作用である」ことを証明するために検討を行った。ポドサイト関連分子であるシナプトポディンは、CsA投与後と有意に増加した( $p=0.0163$ )。今回の結果からHSPNに対するCsAの作用機序としてポドサイトの修復に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Though the treatment for severe Henoch-Schonlein purpura nephritis (HSPN) is not established, limited experience with cyclosporin A (CsA) shows reduction of proteinuria. However, the mechanism of anti-proteinuric effect of CsA in HSPN remains unknown. We wonder whether CsA directly acts on podocytes via non-immunological effect and exerts anti-proteinuric effect in severe HSPN. To explore the mechanism of action of CsA, we evaluated urinary levels of mRNA of synaptopodin and podocin using quantitative RT-polymerase chain reaction and compared them before and after CsA administration. Administration of CsA significantly increased urinary mRNA of synaptopodin and podocin. We postulate that CsA exerts anti-proteinuric effect via action on podocytes via non-immunological mechanism in HSPN.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：シクロスポリン IgA血管炎 紫斑病性腎炎 ポドサイト ポドカリキシン シナプトポディン 小児  
 ネフローゼ症候群

## 1. 研究開始当初の背景

### 研究の学術的背景

IgA 血管炎 (Henoch-Schönlein 紫斑病) は、小児に多く、両下腿を中心に、やや隆起した紫斑がみられ、関節痛、腹痛を呈する全身性の血管炎である。予後を規定するものは腎炎 (Henoch-Schönlein purpura nephritis : HSPN) であり、小児の二次性糸球体腎炎の中では最多である。2 ~ 3% が腎不全に至ると考えられている一方で、腎炎を発症しても自然治癒傾向があること、重症度にばらつきが大きいこと、病初期の臨床像や組織像から長期予後を予測するのが困難であることから腎生検のタイミングや治療の有効性の評価が難しい疾患である。重症例に対しては、ステロイドパルス療法、カクテル療法、血漿交換がおこなわれているが、これらの治療にも効果がない症例が存在する。このような難治例に対して、2003 年以降、シクロスポリン (CsA) が有用性の報告が散見される。しかし、HSPN に対する CsA の作用機序は未だ不明である。

CsA は、カルシニューリン阻害薬に分類される免疫抑制薬であり、その作用機序として、CsA がヘルパー T 細胞内のシクロフィリンと結合し複合体を形成し、その複合体がカルシニューリンと結合することによってその活性化を抑制、その結果活性化 T 細胞核因子 (nuclear factor of activated T cell : NF-AT) の核内移行が妨げられインターロイキン 2 などのサイトカインの産生が抑制されることが明らかにされている。さらに近年、podocyte への直接作用も注目されている。podocyte に存在するカルシニューリンを阻害してアクチン結合タンパク質 synaptopodin を安定化させ (podocyte における synaptopodin の脱リン酸化の阻害を通じて、synaptopodin の分解を抑制する) その結果として蛋白尿が抑制されるという podocyte への直接的な効果を有することが示されている。(Faul, C, et al. Nat Med. 2008.) HSPN では、急性管外性病変と尿中 podocyte との関連性が認められている。(Hara M, et al, Am J Nephrol, 1998)

## 2. 研究の目的

今回の研究で重症 HSPN に対する CsA の有効性を示すだけでなく、血管炎が主体である HSPN は、リンパ球の異常活性化が主体と考えられているネフ

ローゼ症候群とは異なり、重症 HSPN に対する CsA の作用機序は、リンパ球に対する免疫抑制機序ではなく、podocyte に存在するカルシニューリンを阻害してアクチン結合タンパク質 synaptopodin を安定化させ、その結果として蛋白尿が抑制されるという podocyte への直接的作用であることを明らかにし、重症 HSPN に対するより適切な CsA 治療を確立することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 重症 HSPN に対する CsA 治療の有効性の検討

【対象】HSPN 症例に、腎生検を行い国際小児腎臓病研究班分類 (ISKDC) 分類 grade 以上の症例に CsA を投与する。

【方法】ステロイド治療無効例に CsA 治療を追加した症例 (4 例) とステロイドを用いず CsA 単独治療を行った (5 例) についてそれぞれ、治療期間、ステロイド投与例とステロイド非投与例の比較、CsA 投与後、蛋白尿、血尿および低蛋白血症の経過を評価する。また、有害事象を調査する。

### (2) ポドサイトに対する CsA の作用機序の検討

【対象】ステロイドを投与せず CsA 単独で治療を行った症例を対象とし、CsA 投与前後で、尿中シナプトポディンのメッセンジャー RNA の発現量を測定した。

【方法】尿検体は CsA 投与前後 1 週間の早朝尿を使用した。早朝尿 (50ml) を遠心し pellet を得、RNAeasy MiniKit を用いて RNA を抽出した。逆転写し cDNA を得た後に podocin と synaptopodin の primer を用いて Real-Time PCR (RT-PCR) を行った。RT-PCR の結果は比較 ct 法を用いて相対定量として評価した。CsA 投与前後の mRNA 量の統計学的検討は Mann-Whitney U test を使用した。

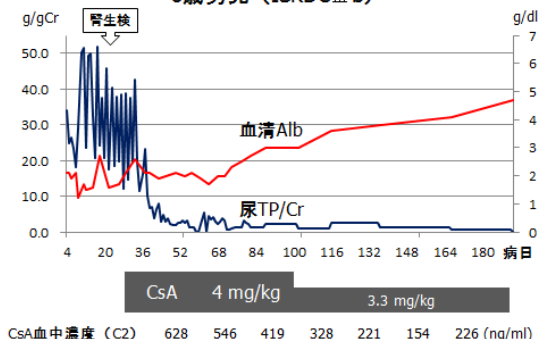
## 4. 研究成果

### (1) 重症 HSPN に対する CsA 治療の有効性の検討

図 1 に CsA 治療を行った典型症例の経過を示す。症例は、8 歳の男児で、腎炎型のネフローゼ症候群の診断で、近医から転院となり、10 病日に腎生検を行い、腎生検の結果 ISKDC 分類で III b 型と診断した。尿蛋白/Cr は 30-50g/gCr と高値であり、第 24 病日から、血中濃度が投与後 2 時間値を、500 ng/ml 前後になるように、CsA の投与を開始し、開始 16

日目の40病日から、10 g/gCrを下回るようになり、72病日（投与49日目）に1g以下となり、約6カ月で陰性化した。現在、CsA 中止後7か月が経過し、再発なく腎機能も正常で経過している。

図1：CsA治療（ステロイド非投与例）の典型的経過  
8歳男児（ISKDCⅢb）



【結果：ステロイド治療無効例にCsA治療を行った症例とCsA単独治療を行った症例の比較】

HSPN に対してステロイド投与されていたが効果に乏しくCsAを行った4例（ステロイド投与群）と、ステロイドを投与せずCsAで治療した5例（ステロイド非投与群）に分け比較検討した。表1に患者背景を示す。

表1：患者背景

	ステロイド投与群 (4例)	ステロイド非投与群 (5例)
CsA前治療	カクテル療法:1例 ウロキナーゼMP療法:3例 ACEI/ARB:4例	ACEI:3例 ARB:1例 抗血小板薬:1例
年齢中央値	7.5歳 (5-13歳)	8歳 (4-9歳)
男:女	2:2	3:2
ISKDC分類	Ⅲa:3例 Ⅲb:1例 (ネフローゼ症候群:3/4例)	Ⅲa:2例 Ⅲb:2例 Ⅴ:1例 (ネフローゼ症候群:4/5例)
尿蛋白/Cr最高値 (中央値)	10.3 g/gCr (1.7-13.1)	16.1 g/gCr (1.5-62.7)

数値：中央値（最小-最大）

ステロイド投与群は、CsA投与前にカクテル療法1例、ウロキナーゼステロイドパルス療法を3例に行っていた。両群ともにCsA投与前に、アンジオテンシン変換酵素阻害薬あるいは、アンジオテンシン受容体拮抗薬を投与されていた。両群間に年齢や性別に有意差はなかった。ISKDC分類は、ステロイド投与群（a:3例、b:1例）、ステロイド非投与群（a:2例、b:2例、Ⅴ:1例）で、ネフローゼ症候群を来した症例は、ステロイド投与群が4例中3例、ステロイド非投与群が5例中4例であった。尿タンパクの最高値に有意差はなかった。

CsA治療後の経過の比較を表2に示す。

表2：CsA投与後の経過

	ステロイド投与群 (4例)	ステロイド非投与群 (5例)
腎炎発症後CsA開始までの期間（か月）	3.5 (3-16)	1.2 (0.7-21)
CsA投与後蛋白陰性化までの期間（か月）	4.7 (0.4-12)	5.8 (5.6-14.7)
総治療期間（腎炎治療開始後蛋白陰性化まで）（か月）	8.2 (7.5-16.4)	6.2 (3.5-14.7)
CsA投与量 (mg/kg/day)	2.8 (2.5-4.0)	3.0 (3.0-4.0)
CsAの有害事象	多毛:4例 歯肉増殖:1例 貧血:1例	多毛:3例 貧血:1例 歯肉増殖:2例 貧血:1例 高血圧:1例(CsA中止)

数値：中央値（最小-最大）

CsA投与後の両群における腎炎発症後からCsA投与開始までの期間は、ステロイド投与群が中央値で3.5か月、ステロイド非投与群が1.2か月であった。CsA投与後から蛋白尿陰性化までの期間は両群間で差はなかったが、総治療期間（腎炎治療開始後から尿蛋白陰性化まで）は、ステロイド非投与群の方が、ステロイド投与群よりも中央値で2か月かった。CsAの投与量には、両群で有意差はなかった。有害事象としては、ステロイド投与群で多毛、歯肉増殖、及び貧血を認め、ステロイド非投与群ではこれらに加え高血圧を1例認めた。貧血に関しては、鉄剤の投与で速やかに改善したが、高血圧を認めた1例ではCsAの投与を中止し、ウロキナーゼステロイドパルス療法を行い寛解した。

### 【考察と結論】

報告されている重症HSPNの治療法とCsA治療法を比較すると、CsA治療を行った自験例では観察期間は4.9年であるが、カクテル療法やウロキナーゼステロイドパルス療法の治療法と比較し、寛解率は89%と治療効果は良好であった。

CsAによる重大な副作用として腎障害がある。腎障害のリスク因子として、CsAの総投与量が4.9g/kg以上、総投与期間として2-3年以上が報告されている。今回行ったHSPNに対するCsA治療は、前述のリスク因子を満たすことなく治療終了した。したがって、HSPNに対する、CsA治療は、少量かつ短期間で約90%が寛解し、中止後も再発もなく、第一選択治療となりうると考えられた。

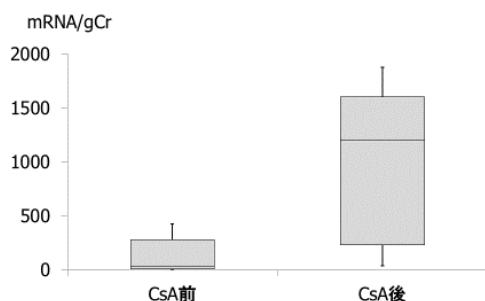
### (2) ポドサイトに対するCsAの作用機序の検討

#### 【結果】

Podocin mRNAはCsA投与前 [中央値: 33.9 (6.4-428.0) mRNA/gCr 以下同様] と比較してCsA投与後 [1202.3 (37.8-1879.8)] と有意に増加した (p=0.0472)。synaptopodin mRNAもCsA

投与前 [104.8 (58.0-351.1)]と比較してCsA投与後 [739.8 (347.2-4596.6)]と有意に増加した (p=0.0163)。(図2)

図2：HSPNにおけるCsA投与後のsynaptopodinのmRNA



#### 【考察と結論】

ポドサイト関連分子であるシナプトポディンのメッセンジャーRNAの発現量は、ポドサイト数と正の相関を認めると報告されており、HSPN症例においてCsAはポドサイトに直接作用していることが示唆された。

以上の結果から、重症HSPNに対するCsA治療は、第一選択になりうると思われる。また、HSPNに対するCsAの抗タンパク尿効果は、ポドサイトに直接作用している可能性が示唆された。

#### 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)

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 山内 壮作, 木全 貴久, 駿田 竹紫, 木野 仁郎, 北尾 哲也, 辻 章志, 金子 一成. 重症紫斑病性腎炎に対する経口シクロスポリン治療の有用性. 第119回日本小児科学会学術集会、札幌、ロイトン札幌 2016.5.13
- (2) 木野 仁郎, 木全 貴久, 赤川 翔平, 北尾 哲也, 山内 壮作, 辻 章志, 金子 一成. ステロイドを使用せず、シクロスポリンで加療した重症紫斑病性腎炎の一例. 第45回日本腎臓学会西部学術集会、金沢、金沢歌劇座 2015.10.23
- (3) 辻 章志, 木全 貴久, 神田 枝理子, 木野 仁郎, 加藤 正吾, 北尾 哲也, 山内 壮作, 金子 一成. 紫斑病性腎炎に対するシクロスポリンの作用機序 ポドサイト関連分子の尿中 mRNA による検討. 第49回日本小児腎臓病学会学術集会、秋田、秋田ビューホテル 2014.6.6

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

木全 貴久 (KIMATA, Takahisa)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：0090593517