

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19623

研究課題名(和文) 小児難治性ネフローゼに対するリツキシマブの作用機序の解明

研究課題名(英文) The B cell independent mechanism of Rituximab in Pediatric-Onset Intractable Nephrotic Syndrome.

研究代表者

渡邊 祥二郎 (Watanabe, Shojiro)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80597196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では小児難治性ネフローゼ症候群(NS)においてSMPDL3bの尿中排泄が疾患活動期に特異的に低下していることを世界で初めて明らかにした。さらにリツキシマブ(RTX)投与によりB細胞が枯渇しているにもかかわらず再発を繰り返す「リツキシマブ抵抗性」を示す患者では寛解期においてもSMPDL3bの尿中排泄が低下していることが判明した。一方ループス腎炎、IgA腎症においてはSMPDL3bの排泄は保たれていた。以上からSMPDL3bがNS疾患活動期に特異的に低下していること、RTXがSMPDL3b依存性に効果を発揮していることが示唆され、NSにおけるRTX反応性予測マーカー開発の足がかりが得られた。

研究成果の概要(英文)：To examine the role of SMPDL3b in the pathogenesis of NS, we examined urinary excretion of SMPDL3b by using dot blotting. Urinary excretion of SMPDL3b in patients with heavy proteinuric NS was significantly decreased compared to that in patients in remission, those with IgA nephropathy/vasculitis, and controls. These findings suggest that changes in SMPDL3b expression on the podocyte probably occur in pediatric-onset NS. Among them, RTX may work on podocyte in SMPDL3b-dependent manner, suggesting that low expressions of SMPDL3b in urine and glomerular immunoreactivity even in remission resulted in the RTX-resistance. Although detailed mechanism of downregulation of SMPDL3b expression remains to be elucidated, SMPDL3b is, at least in part, involved in the pathogenesis of pediatric-onset NS. In addition, measurement of urinary excretion of SMPDL3b could be a possible invasive biomarker to predict reactivity to rituximab therapy in pediatric onset nephrotic syndrome.

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：ネフローゼ症候群 SMPDL3b リツキシマブ

1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群は糸球体上皮細胞 podocyte の機能障害により細胞骨格の異常をきたし、足突起の消失、apoptosis が起こることで尿蛋白が持続する。従来より T 細胞の機能異常が指摘されており、治療としてステロイドおよびシクロスポリン、ミゾリピン等の免疫抑制剤が用いられている。一方、ステロイド薬依存性や抵抗性の経過をとる難治性ネフローゼ患者も少なくなく、長期間にわたるステロイド治療は、成長障害、肥満、易感染性などの全身的な副作用が大きな課題として残されている。さらに難治性ネフローゼ症候群の代表疾患である巣状糸球体硬化症 (FSGS) では腎移植後の再発も約 3 割で認められる。以上から、より詳細な病因解明に加えて、現行よりも副作用が少なく、かつ有用である新たな治療戦略の構築が強く望まれている。

難治性ネフローゼ症候群 (頻回再発型・ステロイド依存性ネフローゼ症候群) に対し、抗 CD20 抗体製剤であるリツキシマブ (RTX) が 2014 年 10 月より小児難治性ネフローゼ症候群 (ステロイド依存性・頻回再発型ネフローゼ症候群) に対し保険収載となった。

元来、抗 CD20 抗体 RTX は CD20 陽性の B 細胞を枯渇させることにより、B 細胞による抗体産生および T 細胞とのクロストークを抑制し、もって B 細胞、T 細胞による腎糸球体細胞への病的影響を減ずるとされていた。しかし、難治性ネフローゼ症候群では、組織学的に B 細胞の糸球体への直接浸潤が見られないにもかかわらず RTX 投与直後から尿蛋白の減少効果が見られる例があること、末梢血中の CD20 陽性細胞数が回復後も RTX の効果が持続する例があること、さらに RTX 投与により B 細胞が枯渇しているにもかかわらず再発を繰り返す「リツキシマブ抵抗性」を示す群の存在などから RTX の CD20 陽性細胞の枯渇効果以外に糸球体への直接効果が想定されている。2011 年に Fornoni らの報告により podocyte 細胞膜の sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3b (SMPDL3b) へ RTX が結合し、FSGS 患者血清による培養 podocyte の細胞骨格の変性を防ぐ効果が示された。さらに、FSGS 患者の podocyte において SMPDL3b の発現が低下していること、培養 podocyte において RTX は SMPDL3b の発現増強効果があることが示されている。その他にもヒト CD20 非発現で B 細胞非依存性のネフローゼモデルであるラットアドリアマイシン腎症モデルにおいて SMPDL-3b を介する RTX の直接効果を示した報告もある (Yamagata ら)。さらに B 細胞非依存性の放射線障害による腎症モデルにおいても SMPDL-3b の発現が減少しており病態に関与している可能性が報告されている (Ahmad ら)。以上から、RTX が SMPDL3b を介して直接 podocyte の細胞骨格安定化、さらには尿蛋白減少効果をもた

らすことが示唆されている。

しかし、FSGS 以外の小児ネフローゼ症候群において、SMPDL3b の発現が変化しているのかどうかは不明である。また、個々の頻回再発型・ステロイド依存性小児ネフローゼ症候群患者では、組織学的に同じ微小変化群であるにもかかわらず、RTX に対する治療反応性 (寛解期間の持続効果、ステロイド減量効果) はさまざまであり、その要因も不明である。さらに、ネフローゼ症候群以外の IgA 腎症、ループス腎炎等における SMPDL3b の発現の変化とその意義については知見が得られていない。

2. 研究の目的

小児難治性ネフローゼ症候群に対するリツキシマブの作用機序の解明を行う。

糸球体上皮細胞上の sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3b (SMPDL-3b) 分子の発現と

小児難治性ネフローゼ症候群に対するリツキシマブによる治療反応性の関係性を明らかにする。

以上から、難治性ネフローゼ症候群における SMPDL3b 分子の病的意義を明らかにし、治療反応性を推察する新たなバイオマーカーの開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

1) 免疫染色:

蛍光抗体法にて糸球体 podocyte 上の SMPDL3b の発現を示した。

患者腎生検凍結切片に対し SMPDL3b と podocyte 特異的蛋白である podocin の二重染色を行った。

RTX を組織切片に添加し、抗ヒト IgG-FITC にて蛍光抗体法で組織上の結合を示した。

2) Dotblotting:

小児ネフローゼ症候群患者 (n=51, うち寛解期 39 例、再発期 12 例) 尿中 SMPDL3b の測定を dotblot 法にて行った。比較対象として尿蛋白陽性の IgA 腎症/血管炎患者 (n=19)、ループス腎炎患者 (n=9) および及び健常コントロール (n=9) の尿を用いた。

尿検体は採取後速やかに遠心し上清を凍結保存したものをを用いた。リコンビナント蛋白 SMPDL-3b を濃度を変えてプロットし検量線とした。さらに各尿検体中のクレアチニンを測定し尿中 SMPDL-3b/クレアチニン比を算出し定量的に測定した。

4. 研究成果

1) 組織切片を用いた蛍光抗体法にて SMPDL-3b は Podocin と同じ局在を示した。

2) 組織切片を用いた蛍光抗体法にて RTX は直接腎系球体に結合していた。

3) 組織切片を用いた蛍光抗体法にて、ネフローゼ症候群寛解期には SMPDL-3b の発現が Nutcracker 症候群症例と比べても同程度保たれていた。

4) 組織切片を用いた蛍光抗体法にて、RTX 投与により B 細胞が枯渇中にも再発を繰り返す「リツキシマブ抵抗性」ネフローゼ症候群患者では、寛解期にもかかわらず発現が低下していた。

5) 組織切片を用いた蛍光抗体法にて、IgA 腎症/血管炎、ループス腎炎患者ではコントロール、ネフローゼ症候群患者に比べて発現が増強していた。

6) 尿中 SMPDL-3b の測定においてネフローゼ症候群患者では寛解期に比べて再発期には有意に尿中排泄が低下しており、寛解期には健常コントロールと同程度の排泄が見られた。

7) 尿中 SMPDL-3b の測定において「リツキシマブ抵抗性」ネフローゼ症候群症例においては寛解期の尿検体中であっても、尿中 SMPDL-3b 排泄は低下していた。

8) 尿蛋白陽性の IgA 腎症/血管炎およびループス腎炎においては尿中 SMPDL-3b の排泄は健常コントロールと比べて有意に増加していた。

以上の結果より

系球体での発現および尿中 SMPDL-3b 排泄はネフローゼ症候群再発期で特異的に低下している。

RTX は系球体上の SMPDL-3b 依存性に効果を示す可能性がある、

IgA 腎症/血管炎、ループス腎炎など目サンギウムに炎症が生じる病態では SMPDL-3b の発現と尿中排泄が増加している可能性があることが判明した。

これらのことから podocyte 上の SMPDL-3b はネフローゼ症候群の病態に関与しており、尿中排泄量はその発現状態を反映し、非侵襲的な疾患活動性およびリツキシマブ反応性の指標となりうるということがわかった。今後リツキシマブ投与対象となる患者選択において大きな意義があるだけでなく、疾患の病態解明の足がかりとなる可能性があると考えられた。なぜ難治性ネフローゼ症候群で podocyte

上の SMPDL-3b の発現が低下するか、リツキシマブ投与によりその発現が回復するのか、にさらに podocyte における SMPDL-3b の生理的役割については未解決であり今後の課題である。

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1件)

1. Watanabe S, Tsugawa K, Tsuruga K, Imaizumi T, Tanaka H. Urinary excretion of SMPDL-3b in children with intractable nephrotic syndrome. *Pediatr Int.* 2017; **59** (10):1112-1115. doi: 10.1111/ped.13355. (査読あり)

(学会発表)(計5件)

1. Shojiro Watanabe, Tomomi Aizawa, Koji Tsugawa, Kazushi Tsuruga, Etsuro Ito, Hiroshi Tanaka. URINARY EXCRETION AND GLOMERULAR EXPRESSION OF SPHINGOMYELINASE PHOSPHODIESTERASE ACID-LIKE 3B IN PEDIATRIC-ONSET NEPHROTIC SYNDROME. 第55回ヨーロッパ腎臓病学会・透析移植学会(コペンハーゲン, 2018年)
2. 渡辺 祥二郎, 相澤 知美, 津川 浩二, 敦賀 和志, 今泉 忠淳, 田中 完. 小児難治性ネフローゼ症候群における尿中 SMPDL3b 発現の検討. 第61回日本腎臓学会学術集会(2018年)
3. Shojiro Watanabe, Koji Tsugawa, Tomomi Aizawa, Kazushi Tsuruga, Etsuro Ito, Hiroshi Tanaka. Urinary and glomerular expressions of SMPDL3b in pediatric-onset intractable nephrotic syndrome. 第13回アジア小児腎臓病学会(クアラルンプール, 2017年)
4. Shojiro Watanabe, Kouji Tsugawa, Kazushi Tsuruga, Hiroshi Tanaka. Urinary and glomerular expressions of SMPDL3b in pediatric onset intractable nephrotic syndrome. 第52回日本小児腎臓病学会学術集会(2017年)
5. 渡辺 祥二郎, 津川 浩二, 敦賀 和志, 田中 完. 小児難治性ネフローゼ症候群での Sphingomyelin Phosphodiesterase

Acid Like 3B (SMPDL3b)の発現に関する
検討.
第 60 回日本腎臓学会学術集会(2017 年)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 祥二郎 (WATANABE Shojiro)
弘前大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80597196

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()