

令和 2 年 4 月 26 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09715

研究課題名(和文) 抗PLA2R抗体とPLA2R高発現ポドサイト細胞株を用いた膜性腎症病態解明

研究課題名(英文) Investigation on the pathogenesis of membranous nephropathy using anti-PLA2R antibodies and stable podocyte cell line expressing PLA2R

研究代表者

勝又 康弘 (Katsumata, Yasuhiro)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60349719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、特発性膜性腎症の病態における、膜型ホスホリパーゼA2受容体(PLA2R)および抗PLA2R抗体の役割について、ヒトポドサイト細胞株を用いて明らかにすることを目的とした。主な成果として、PLA2Rの安定形質発現ヒトポドサイト細胞株の作製した。特発性膜性腎症の病態研究において高いインパクトがあると考えられる。また、PLA2Rの安定形質発現株を作製し、同細胞を用いたウェスタンブロットとCell ELISAを開発し、日本人特発性膜性腎症においても、約50%の陽性率があること、また病勢評価や治療反応性予測に資するバイオマーカーであることなどを論文報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の主な成果は、PLA2Rの安定形質発現ヒトポドサイト細胞株の作製である。PLA2Rの安定形質発現ヒトポドサイト細胞株については、国内外において従来報告がなく、特発性膜性腎症の病態研究においても高いインパクトがあると考えられる。今後は、このPLA2Rの安定形質発現ヒトポドサイト細胞株を用いて、様々な基礎的研究が行われることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to clarify the roles of anti-M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) and anti-PLA2R antibodies in the pathogenesis of idiopathic membranous nephropathy. We successfully developed the human podocyte cell line stably expressing PLA2R. This would have a high impact on the studies of pathogenesis of membranous nephropathy. We also investigated the clinical usefulness of anti-PLA2R antibodies in patients with membranous nephropathy and compare the three quantification methods. We publish a report on this study.

研究分野：自己免疫疾患

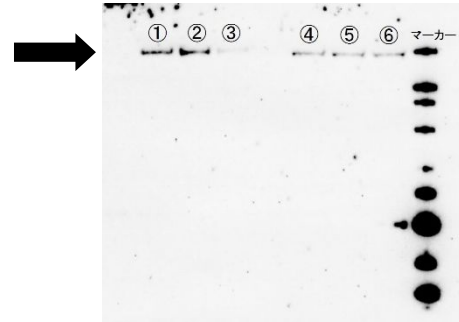
キーワード：膜性腎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膜性腎症は成人のネフローゼ症候群の一定数(3~8割)を占めるとされ、その病態としては、腎臓の糸球体基底膜の上皮直下に顆粒状に広く分布する免疫複合体が特徴であり、この免疫複合体の形成・沈着に伴う一連の免疫の異常が主たる機序と想定されている。特発性膜性腎症の特異的な抗原や自己抗体は長らく不明であったが、2009年、成人の特発性膜性腎症において、70%の血清中に、膜型ホスホリパーゼA2受容体(PLA2R)に対する抗体(抗PLA2R抗体)が存在すること、PLA2Rが正常糸球体ポドサイトや膜性腎症例の糸球体に沈着した免疫複合体に存在することが報告された。本研究代表者は、平成26-28年度の科研費基盤研究において、HEK293細胞を用いてPLA2Rの安定形質発現株を作製し(従来報告は一過性発現細胞のみ)、同細胞を用いたウェスタンブロットとCell ELISAを独自開発した。一方、抗PLA2R抗体は、単なるバイオマーカーではなく、病態に関わっている可能性が高いと考えられていたが、具体的な機序は不明であった。

上述の背景をもとに、本研究代表者は、ヒトポドサイト細胞株(長期間にわたって、体外で維持され、一定の安定した性質をもつに至った細胞)を用いて、*in vitro*の病態研究を行うことを計画した。通常のヒトポドサイト細胞株においては、蛋白レベルでは、PLA2Rは恒常的発現をしていないことが、予備的検討で確認されたため(遺伝子レベルでは、あり)、一過性強発現を試みたところ、右図ウェスタンブロットのように、確認できた(は180 kDa [PLA2R]のバンド、と はそれぞれ異なるヒトポドサイト細胞株で、各細胞株のライセート量9、12、15 μ l)。



2. 研究の目的

上述の背景およびこれまでの研究結果をもとに、本研究代表者は、本研究では、特発性膜性腎症の病態における、PLA2Rおよび抗PLA2R抗体の役割について、ヒトポドサイト細胞株を用いて明らかにすることを目的とした。

具体的な研究項目は、以下のように計画した。(1) PLA2Rの安定形質発現ヒトポドサイト細胞株の作製、(2) 抗PLA2R抗体陽性患者血清中の同抗体の、細胞株上に発現しているPLA2Rへの特異的結合の検証、(3) 患者血清中の抗PLA2R抗体のポドサイト細胞株への結合による、ポドサイト細胞株の形態的・機能的変化の評価、(4) PLA2Rのポドサイトに対する生理的作用の観察と、患者血清中の抗PLA2R抗体による拮抗阻害作用の評価、また、(5) 別の経路として、抗PLA2R抗体の好中球に対する結合、好中球機能の活性化、neutrophil extracellular traps (NETs)形成の有無などの評価、である。

3. 研究の方法

(1) 安定形質発現株作製の第1段階として、まず、フルレングスのヒトPLA2R遺伝子情報を合成した遺伝子をベクターに挿入し、次に、発現ベクターをヒトポドサイト細胞株にトランスフェクションし(Lipofectamine® 3000 Reagent)、目的遺伝子の発現をRT-PCRで確認した。トランスフェクション後の細胞を、抗生剤を含む培地中で、約3か月間継代培養した。

(2) 樹立した安定発現細胞および宿主細胞からtotal RNAを抽出し、cDNAを合成した。PCRを行い、アガロースゲル電気泳動により増幅産物を確認した。また、フローサイトメトリー解析にて、目的蛋白(=ヒトPLA2R)の発現を確認した。

(3) (1)(2)で作製した、PLA2Rを恒常的に強発現させたヒトポドサイト安定形質発現株の解析を進めた。しかし、目的蛋白(=ヒトPLA2R)の発現が十分ではなく、解析が滞った。

(4) そのため、2つ目のヒトポドサイトのセルラインを用いて、かつ、1つ目のヒトポドサイトのセルラインから若干手法も変えて、新たな安定形質発現株病態研究を進めた。具体的には、安定形質発現株作製の第1段階として、まず、フルレングスのヒトPLA2R遺伝子情報を合成した遺伝子をベクターに挿入し、発現ベクターをヒトポドサイト細胞株にトランスフェクションし(TransIT-X2® Dynamic Delivery System)、リアルタイムPCRにより一過性の発現を確認した。

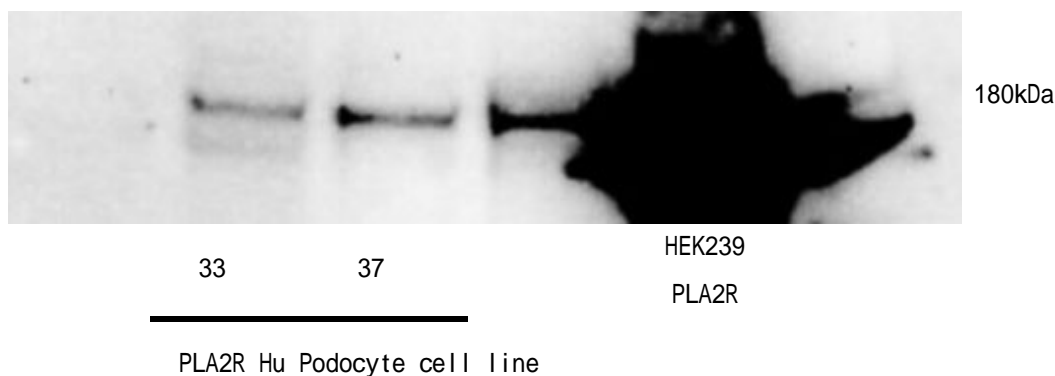
(5) 並行して、トランスフェクション後の細胞を、抗生剤を含む培地中で、継代培養し、安定発現細胞を樹立することを目指したが、プール細胞の調製段階で、遺伝子導入24~48時間後で、細胞がほぼ死滅してしまった。PLA2R1遺伝子は細胞周期の制御に関わる遺伝子で、細胞によっては高発現させることで細胞増殖が抑制されることが報告されており、遺伝子の機能も細胞死の原因の1つではないかと考えられた。

(6) この段階で、2つ目のヒトポドサイトのセルラインを用いた実験については断念し、ひとまず、それまでの成果を論文化した(Immunol Med. 2020;43:47)。

4. 研究成果

本研究課題の主な成果は、PLA2Rの安定形質発現ヒトポドサイト細胞株の作製である。PLA2Rの安定形質発現ヒトポドサイト細胞株については、国内外において従来報告がなく、特発性膜性腎症の病態研究においても高いインパクトがあると考えられる。今後は、このPLA2Rの安定形質

発現ヒトポドサイト細胞株を用いて、様々な基礎的研究が行われることが期待される。



また、本研究代表者は、PLA2R の安定形質発現株を作製し、同細胞を用いたウェスタンブロットと Cell ELISA を開発し、日本人特発性膜性腎症においても、約 50% の陽性率があること、また病勢評価や治療反応性予測に資するバイオマーカーであることなどを論文報告した。

Table 3. Comparisons of measurement methods about associations between anti-PLA2R antibodies and clinical characteristics among patients with primary MN.

	Western blot	Cell-based ELISA	Commercial solid-phase ELISA
Clinical characteristics	Pearson's correlation coefficients (<i>r</i>) (95% confidence interval)		
Urine protein	0.42 (0.01 to 0.71)	0.47 (0.07 to 0.74)	0.39 (−0.03 to 0.69)
Serum albumin	−0.28 (−0.62 to 0.15)	−0.29 (−0.63 to 0.13)	−0.30 (−0.63 to 0.13)
Serum creatinine	0.34 (−0.09 to 0.66)	0.26 (−0.17 to 0.61)	0.21 (−0.22 to 0.57)
Creatinine clearance	−0.32 (−0.64 to 0.11)	−0.20 (−0.57 to 0.23)	−0.35 (−0.67 to 0.07)
	<i>p</i> values determined by Welch's <i>t</i> -test (anti-PLA2R positive vs. negative)		
Urine protein	.48	.039	.048
Serum albumin	.19	.02	<.01
Serum creatinine	.68	.16	.41
Creatinine clearance	.64	.09	.35

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; MN: membranous nephropathy; PLA2R: M-type phospholipase A2 receptor.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Katsumata Yasuhiro, Okamoto Yuko, Moriyama Takahito, Moriyama Rina, Kawamoto Manabu, Hanaoka Masanori, Uchida Keiko, Nitta Kosaku, Harigai Masayoshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Clinical usefulness of anti-M-type phospholipase-A-receptor antibodies in patients with membranous nephropathy and the comparison of three quantification methods	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 47～56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/25785826.2019.1710079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----