

令和 2 年 5 月 19 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：17K10158

研究課題名(和文)先天性腎尿路異常に合併する膜性腎症の臨床病理学的検討及び原因抗原の探索

研究課題名(英文)Clinicopathologic approach to pediatric membranous nephropathy associated with congenital anomaly of kidney and urinary tract and the antigenic target

研究代表者

金子 直人 (Kaneko, Naoto)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90791955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膜性腎症は、糸球体基底膜上皮下に免疫複合体が沈着し補体の活性化により惹起される疾患である。近年成人の特発性膜性腎症の原因抗原が発見され、特異的な治療に向けた臨床的応用が進んでいるが、小児では未だ原因抗原は同定されていない。
本研究では小児膜性腎症の原因抗原を探索するために、小児腎領域において重要な疾患である先天性腎尿路異常に合併した膜性腎症、および特発性膜性腎症の症例を主な対象とした。多施設の協力を得て血清サンプルを収集し、プロテインアレイを用いた網羅的な解析を行ったところ、小児特有の新規抗原候補を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の膜性腎症は大半が多量の蛋白尿を呈するネフローゼ症候群で発症するが、特異的な治療法はまだないのが現状である。成人に比べて腎予後は比較的良好とされているが、腎機能が低下した例の報告もある。
小児膜性腎症において特有の病因自己抗原を同定することにより、病態解明だけでなく正確な診断が可能となり、抗体価による病勢モニタリングや特異的な治療の開発につなげるといった意義を有する。

研究成果の概要(英文)：Membranous nephropathy (MN) is an autoimmune kidney disease and manifests histologically by subepithelial immune deposits at the glomerular basement membrane in the kidney containing IgGs. The discovery in the past decade of the antigens as the primary target in adult MN has dramatically altered both the diagnostic and therapeutic approach. However, those antigens have not been identified in pediatric MN.

To identify major antigenic target in pediatric MN, we examined serum samples of children with MN associated with congenital anomalies of the kidney and urinary tract and those with idiopathic MN from multiple institutions. We performed comprehensive analysis using protein array analysis and identified novel candidates of antigen which is specific to pediatric MN.

研究分野：小児腎臓

キーワード：小児膜性腎症 先天性腎尿路異常 原因抗原

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、糸球体基底膜上皮下に免疫グロブリン G(IgG)や補体等から成る免疫複合体が沈着し補体の活性化により惹起される疾患である。成人の特発性膜性腎症はネフローゼ症候群の中で二番目に頻度が高く、20年間の観察では腎生存率は59%であり、臨床的な重要性の高い疾患である(エビデンスに基づくネフローゼ症候群診療ガイドライン 2014)。

今世紀に入り成人の特発性膜性腎症の原因抗原として、M-type phospholipase A2 receptor(PLA2R) (Beck LH Jr et al, N Engl J Med 2009)が報告され、成人の膜性腎症の陽性率は70%(本邦では50%)に及ぶとされる。近年ではTHSD7Aという別の抗原も同定されPLA2R以外の自己抗原として知られるようになった(Tomas NM et al. N Engl J Med. 2014;371:2277-2287)。これらは膜性腎症の新しい診断法や治療への応用につながる画期的な知見である(Beck LH. J Am Soc Nephrol 2017)。

小児の膜性腎症は大半が多量の蛋白尿を呈するネフローゼ症候群で発症する。小児期での発症頻度は低く、成人に比べて腎予後は比較的良好とされているが、治療への反応が乏しい難治性症例や腎機能が低下する例も存在する。小児特有の抗原は未だ発見されていないため特異的治療法は存在しない。

我々は、小児および成人の特発性膜性腎症で糸球体に沈着するIgGサブクラスを検討したところ、小児ではIgG1・IgG3優位型であり成人とは異なる病因の関与が示唆された。この傾向は、小児の末期腎不全に至る原疾患として最多である先天性腎尿路異常(congenital anomalies of the kidney and urinary tract; CAKUT)に合併した膜性腎症症例においても確認された(秋岡ら. 発達腎研究会誌 2009)。さらに、小児特発性膜性腎症においてPLA2Rなど既知の膜性腎症抗原の陽性率を検討したところ、PLA2R陽性率は5.9%であり、成人に比べて非常に低かった。特に、10歳以下発症の膜性腎症20例ではPLA2R陽性者は0名であり、小児の膜性腎症の発症機序が成人と異なることが明らかになった(Kanda S et al, Pediatr Nephrol. 2017)。

以上より、小児膜性腎症患者において新規の抗原が存在するという仮説が得られた。

2. 研究の目的

小児膜性腎症において特有の病因自己抗原を同定する。また、CAKUTに合併する膜性腎症の臨床的特徴を明らかにし、成人特発性膜性腎症・小児特発性膜性腎症との違いを解明する。病態解明だけでなく正確な診断が可能となり、抗体価による病勢モニタリングや特異的な治療の開発につながるといった意義を有する。

3. 研究の方法

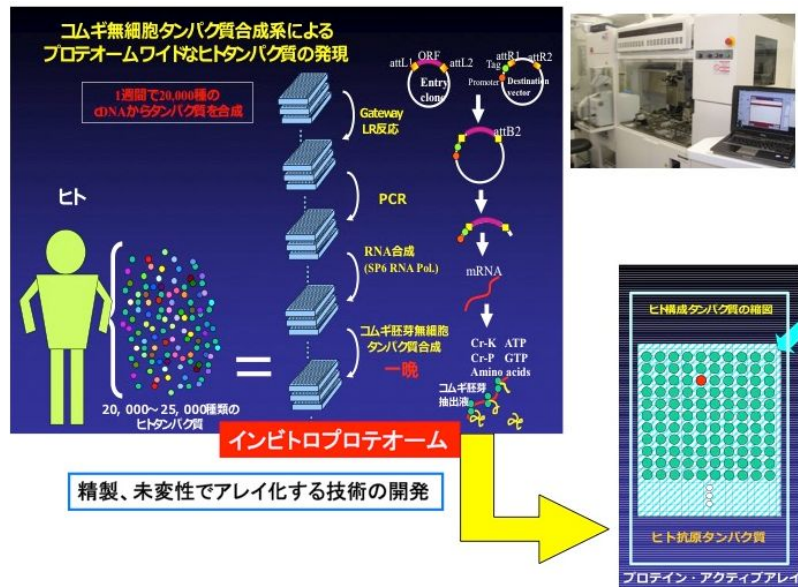
小児腎疾患を診療している複数の施設と協力し、膜性腎症を合併したCAKUT症例、小児特発性膜性腎症の症例を集積し、臨床像の検討および血清サンプルを収集し、各グループの血清を用いて自己抗体の同定を試みた。

このために、五島らが構築したヒト蛋白質発現リソース(HUPEX) (Goshima et al. Nature Methods, 2008)を基盤としたプロテインアレイを用いた。ヒトインビトロプロテオームからの未変性ヒト蛋白質がアレイ化された手法であり、これまでに多くの疾患での自己抗体のプロファイリングに成功している(Kasahara et al. Nature Comm. 2014, Matsuyama, K Cell Sci. 2011, Takeda et al. J Proteome Res, 2010)。

具体的には患者血清200ulを300倍に希釈し、1アレイ当たり14000スポットの蛋白質を搭載したアレイに反応させ、特異的なスポットを検出する。当該アレイには内部標準に加え、同一のスポットが2点ずつ配置されているために、患者とコントロール間、患者間あるいは同一患者においても経時的な複数のサンプル間での定量的な変化を見出すことができる。

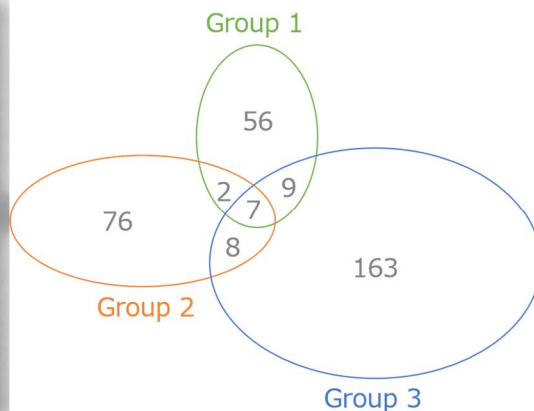
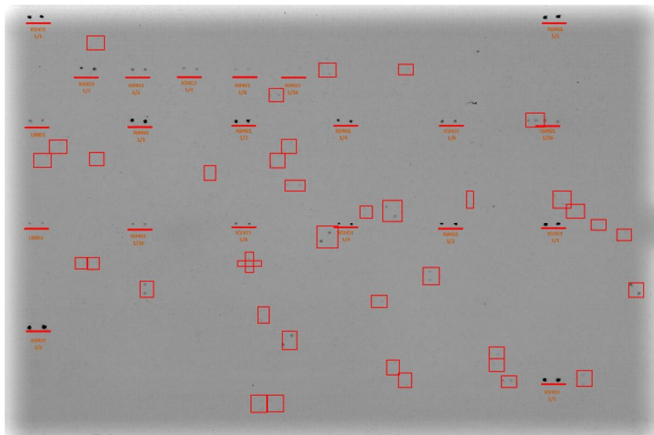
4. 研究成果

集積した各症例の特徴から、以下の4つのグループ； 特発性膜性腎症-IgG4優位：3例、特発性膜性腎症-IgG3優位：4例、CAKUT合併膜性腎症：4例、コントロール(非膜性腎症症例)、に分類した。各グループの血清を用い、プロテインアレイに反応させ解析した。



例としてグループ (IgG3 優位群)の蛋白質アレイの結果を示す【図1】。
 陽性コントロール(下線部)に定量的に反応が見られる条件で、それぞれの群に特徴的な抗原抗体反応(二つの同じ抗原に対する抗体の存在を四角でマーク)が存在することが明らかになった。

【図1】グループ プロテインアレイ解析結果 【図2】各グループにおける陽性抗原数



これらの解析により小児膜性腎症患者のグループ (IgG4 優位群)で 56 個、グループ (IgG3 優位群)で 76 個、グループ (CAKUT 合併群)で 163 個の特異的自己抗原候補、及びすべての群に共通の 7 つの自己抗原を同定した【図2】。なお、この中には成人の膜性腎症で明らかになっている抗原は含まれておらず、既知の原因抗原によるものではないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 服部元史	4. 巻 60
2. 論文標題 先天性腎尿路異常と移行医療	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本腎臓学会誌	6. 最初と最後の頁 986-991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 大原信一郎、三浦健一郎、秋岡祐子、吉田雅樹、金子直人、藪内智朗、苗代有鈴、多田憲正、宮井貴之、 神田祥一郎、菅原典子、石塚喜世伸、近本裕子、川崎幸彦、服部元史	4. 巻 122
2. 論文標題 小児期発症常染色体優性多発性嚢胞腎における早期診断と腎容積測定の臨床的意義	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本小児科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 638-643
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hattori M, Mieno M, Shishido S, Aikawa A, Ushigome H, Oshima S, Takahashi K, Hasegawa	4. 巻 102
2. 論文標題 Outcomes of pediatric ABO-incompatible living kidney transplantations from 2002 to 2015: An analysis of the Japanese Kidney Transplant Registry.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 1934-1942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/TP.0000000000002259.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 三浦健一郎、服部元史	4. 巻 81増
2. 論文標題 小児の治療指針 嚢胞性腎疾患	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 小児科診療	6. 最初と最後の頁 784-786
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 金子直人、三浦健一郎、服部元史	4. 巻 84巻増刊号
2. 論文標題 巣状分節性糸球体硬化症	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Keiichi Takizawa, Kenichiro Miura, Naoto Kaneko, Tomoo Yabuuchi, Kiyonobu Ishizuka, Shoichiro Kanda, Yutaka Harita, Yuko Akioka, Shigeru Horita, Sekiko Taneda, Kazuho Honda, Motoshi Hattori	4. 巻 -
2. 論文標題 Renal hypoplasia can be the cause of membranous nephropathy-like lesions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 金子直人、三浦健一郎、橋本多恵子、藪内智朗、石塚喜世伸、秋岡祐子、張田豊、佐藤秀則、山本俊至、服部元史
2. 発表標題 網羅的データ(臨床所見 + 病理所見 + エキソーム解析による遺伝子異常)に基づいた腎移植を受けたFSGS患者の病因分類の試み
3. 学会等名 第53回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 滝澤慶一、三浦健一郎、金子直人、藪内智朗、石塚喜世伸、近本裕子、秋岡祐子、神田祥一郎、張田豊、服部元史
2. 発表標題 低形成腎に合併した膜性腎症の組織学的特徴
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子直人、三浦健一郎、谷口洋平、長澤武、久富隆太郎、伴英樹、白井陽子、藪内智朗、高木陽子、石塚喜世伸、橋本多恵子、佐藤秀則、張田豊、山本俊至、秋岡祐子、服部元史
2. 発表標題 移植後FSGS再発の高リスク児への予防的血漿交換 + リツキシマブの試み
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子直人、三浦健一郎、飯田貴也、谷口洋平、長澤武、伴英樹、白井陽子、高木陽子、藪内智朗、石塚喜世伸、秋岡祐子、服部元史
2. 発表標題 難治性ステロイド依存性ネフローゼ症候群に対するLDLアフェレシスの効果
3. 学会等名 第31回腎と脂質研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子直人、三浦健一郎、橋本多恵子、藪内智朗、石塚喜世伸、張田豊、佐藤秀則、山本俊至、服部元史
2. 発表標題 腎移植を受けた小児FSGS患者の病因分類および再発リスク評価
3. 学会等名 第52回日本臨床腎移植学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 滝澤慶一、富井祐治、宮部瑠美、笹田洋平、金子直人、藪内智朗、佐藤泰征、石塚喜世伸、橋本多恵子、近本裕子、秋岡祐子、堀田茂、張田豊、三浦健一郎、服部元史
2. 発表標題 低形成腎に合併した膜性腎症の検討
3. 学会等名 第52回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoto Kaneko, Ken-ichiro Miura, Yuji Tomii, Keiichi Takizawa, Rumi Miyabe, Yohei Sasada, Tomoo Yabuuchi, Yasuyuki Sato, Taeko Hashimoto, Kiyonobu Ishizuka, Hiroko Chikamoto, Yuko Akioka, Motoshi Hattori
2. 発表標題 Prophylactic pretransplantation plasmapheresis combined with rituximab for pediatric recipients with primary focal segmental glomerulosclerosis to prevent post-transplant recurrence
3. 学会等名 11th International Society for Apheresis (ISFA) Congress (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoto Kaneko, Ken-ichiro Miura, Yohei Taniguchi, Takeshi Nagasawa, Ryutaro Hisatomi, Hideki Ban, Yoko Shirai, Tomoo Yabuuchi, Yoko Takagi, Kiyonobu Ishizuka, Hiroko Chikamoto, Yuko Akioka and Motoshi Hattori
2. 発表標題 Infectious Complications in Pediatric Kidney Transplant Recipients Treated with Rituximab: A Single-center Study
3. 学会等名 ISN Frontiers meetings (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 三浦健一郎	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2192
3. 書名 今日の治療指針60巻 (総編集 福井次矢、高木誠、小室一成)	

1. 著者名 服部元史	4. 発行年 2018年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 408
3. 書名 これまでがわかる。これからがわかる。透析療法最前線 (監修: 中元秀友 編集: 小川智也 小林威仁 塚本功 友利浩司 亀崎崇和)	

〔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
研究分担者	張田 豊 (Harita Yutaka) (10451866)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	
研究分担者	服部 元史 (Hattori Motoshi) (50192274)	東京女子医科大学・医学部・教授 (32653)	
研究分担者	神田 祥一郎 (Kanda Shoichiro) (60632651)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	五島 直樹 (Goshima Naoki) (70215482)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究 チーム長 (82626)	
研究分担者	三浦 健一郎 (Miura Kenichiro) (70408483)	東京女子医科大学・医学部・講師 (32653)	
研究分担者	秋岡 祐子 (Akioka Yuko) (90212422)	東京女子医科大学・医学部・非常勤講師 (32653)	
研究分担者	柴垣 芳夫 (Shibagaki Yoshio) (90235565)	北里大学・薬学部・講師 (32607)	