

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17700

研究課題名（和文）抗メガリン自己抗体を用いたCKD患者のrapid progressionの予測

研究課題名（英文）Prediction of rapid progression of CKD by detecting anti-megalin autoantibodies

研究代表者

蒲澤 秀門 (Kabasawa, Hideyuki)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：20794639

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：主にメガリンを自己抗原とする抗刷子縁抗体病は近年新たに報告された自己免疫性腎疾患で、比較的急速に腎機能が低下し末期腎不全に至る可能性が示唆されているが、有病率や病態については不明な点が多い。今回、抗刷子縁抗体病についての実態調査（診断）を行うための方法として、患者血清を用いた全長型メガリンに対するウエスタンブロットで半定量的に抗メガリン抗体を同定する測定系を確立し、臨床的に抗刷子縁抗体病が疑われる患者について自己抗体の有無を検討した。また、抗メガリン自己抗体の定量化を行うELISA構築の準備として、新たにヒトメガリン発現ベクターをHEK293細胞へ導入し、ヒトメガリン安定発現細胞株を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗刷子縁抗体病は世界で20例程度の報告であり、本邦からの報告はなく、現時点では稀な疾患と考えられている。稀であると考えられる一因として、実態把握の調査が行われていないこととともに、診断を確定する簡便な方法が確立されていないことも上げられる。本研究で行われた診断方法の確立に向けての検討によって、今後潜在的な患者の存在が明らかとなる可能性や病因解明の一助にもなる可能性があり学術的意義が大きい。さらに、治療法が確立されれば、将来的な腎代替療法患者を減らす可能性があるとも考えられ、社会的な意義も大きい研究である。

研究成果の概要（英文）：Anti-brush border antibody disease is a recently reported autoimmune renal disease targeting mainly megalin. It is characterized by a rapid decline in renal functions, leading to end-stage renal failure. However, its prevalence and pathogenesis remain unclear. In this study, we semiquantitatively identified anti-megalin antibodies by western blotting against full-length megalin in patient serum. In addition, we examined individuals clinically suspected of having anti-brush border antibody disease for the presence of autoantibodies. In preparation for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of anti-megalin autoantibodies, a human megalin expression vector was introduced into HEK293 cells to establish a stable human megalin-expressing cell line.

研究分野：腎臓内科

キーワード：抗刷子縁抗体病 慢性腎臓病 メガリン

1. 研究開始当初の背景

我が国では約 1,330 万人の CKD 患者が存在する。CKD が進行し末期腎不全に至れば、透析療法や腎移植が必要となる。我が国の慢性透析患者数は 2016 年末で約 33 万人と増加し続けているが、透析療法に年間約 2 兆円の医療費が投入されており、透析導入患者数を減少させることは医療経済的にも重要な課題である。最近の疫学調査では、大部分の CKD 患者の腎機能低下速度は緩徐であるが、一部に進行の早い集団がいるとされ (Coresh J et al. JAMA, 2014) KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) 診療基準でも、年間 5mL/分/1.73m² 以上糸球体濾過量 (GFR) が低下する場合を rapid progression と定義している (KDIGO CKD Work Group. Kidney Int. Suppl, 2013)。また rapid progression は末期腎不全のリスクになるだけでなく、心血管イベントや総死亡との関連も指摘されている (Matsushita K et al. J Am Soc Nephrol, 2009)。しかし、その詳細な病態や有効な介入方法に関しては不明な点が多く、透析療法導入予防の目的から、そして生命予後や医療経済的な観点からも対策が急務である。メガリンは LDL 受容体ファミリーに属し、特に腎、それも近位尿細管細胞に高発現するエンドサイトーシス受容体である。これまで申請者は、新潟大学大学院医歯学総合研究科の斎藤亮彦教授らとメガリンに関する基礎的・臨床的研究に携わってきた。最近米国から、メガリンに対する自己抗体を有し、週から月の単位で急速に腎機能が低下する急性腎障害 (AKI) をきたす新たな自己免疫性腎疾患である抗刷子縁抗体病 (anti-brush border antibody disease, ABBA disease) が報告された (Larsen CP et al. J Am Soc Nephrol, 2018)。我が国ではまだその報告はないが、米国の症例は、高齢者に多く、糖尿病等の基礎疾患を有することが報告されている。

メガリンは近位尿細管腔側膜に発現する分子であり、仮に血中に抗メガリン自己抗体が出現しても、十分量の抗体が糸球体を濾過してメガリンに反応しない限りは病態が起こらないことが予想される。しかし CKD や加齢において、腎臓ではネフロン数の減少が起こり、残存ネフロンでは代償的に潜在的な糸球体過剰濾過が起きる。また、高血圧、糖尿病などが加わることで、さらに糸球体過剰濾過が進行する (Gomez LA et al. Nephrol Dial Transplant, 2017)。

前述の Larsen らの報告では、抗メガリン自己抗体によって発症する抗刷子縁抗体病は稀とされているが、実は AKI を発症しない無症状の抗体保有者は広く存在している可能性がある。本検討では、CKD のような潜在的な糸球体過剰濾過がある場合、血中に出現した抗メガリン自己抗体が糸球体を濾過して近位尿細管に到達し、メガリンと結合することで、尿細管・間質障害を惹起し、比較的急速に腎機能が増悪する rapid progression を引き起こしているのではないかと問い (仮説) について検証を進める

2. 研究の目的

当初本研究では抗メガリン自己抗体が CKD の rapid progression に関連するとの仮説のもと、抗メガリン自己抗体価測定用の ELISA の構築を行い、CKD 患者における抗メガリン自己抗体の保有率・抗体価の検証を検証するとともに、抗メガリン自己抗体保有が CKD の rapid progression に関係するかの前向き検討を行う予定であった。当初は抗刷子縁抗体病と診断される患者から血清を採取し、その血清から同定された自己抗体を陽性コントロールとして、CKD 患者での抗体陽性率を検討する予定であった。しかし、当院の腎生検施行患

者で抗刷子縁抗体病と診断される(された)患者を同定することができなかった。そこで当院とその関連施設から広く、同疾患と考えられる患者をリクルートし、その血清中に自己抗体が存在するかを検出する試験を計画した。また最近、キュビリンやアムニオンレスといったメガリン以外の近位尿細管機能分子が抗刷子縁抗体病の抗原になる可能性があることが報告されたことから (Morelle J et al. Kidney Int, 2022) 自己抗体がメガリン以外の機能分子である可能性についても検討を行うこととした。

3. 研究の方法

抗メガリン自己抗体が関連していると考えられる抗刷子縁抗体病(抗メガリン/LRP2 抗体腎症) についての実態調査を行う目的で「抗メガリン/LRP2 抗体腎症(仮称)」診断のための抗メガリン/LRP2 自己抗体の測定と有病率の検討」として研究計画書を倫理審査委員会に提出し承認を得た(承認番号 2018-0315)。尿細管間質性腎炎や、臨床的に抗刷子縁抗体病が疑われる患者を、新潟大学医歯学総合病院とその関連施設からリクルートしたが、疑い症例が少ないことが判明したため、全国の施設から血清を提供いただき解析が出来るように環境調整を行った。患者血清を用いた全長型メガリンに対するウエスタンブロットで半定量的に抗メガリン抗体の同定を行った。

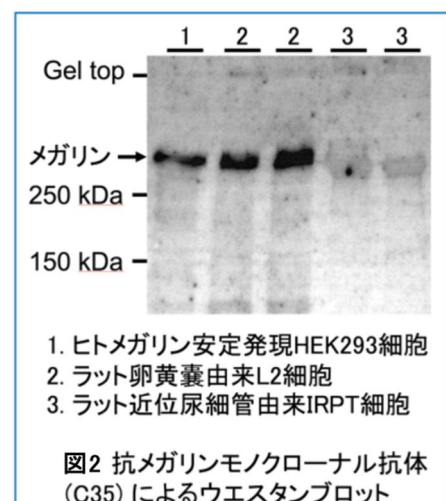
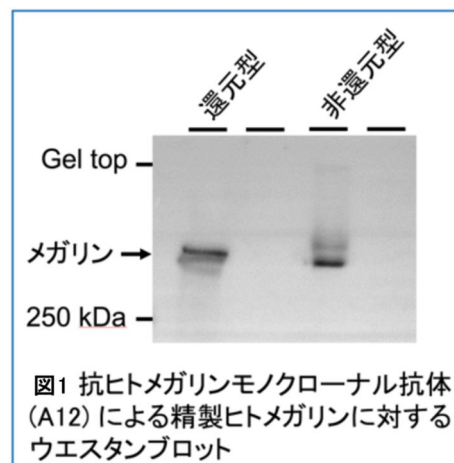
4. 研究成果

・抗メガリン自己抗体測定系の確立

抗刷子縁抗体病についての実態調査を行うためのスクリーニングとして、尿細管間質性腎炎や、臨床的に抗刷子縁抗体病が疑われる患者をリクルートした。患者血清を用いた全長型メガリンに対するウエスタンブロットで半定量的に抗メガリン抗体を同定する測定系を確立し(図 1)、実際に同定されるかの検討を行った。試験期間内に抗刷子縁抗体病が疑われる患者 20 症例分の抗メガリン自己抗体の検討を行ったが、陽性率が期待通りではないことが問題であった。最近メガリン以外の近位尿細管機能分子が抗刷子縁抗体病の抗原になる可能性があることが報告されたことから、患者血清を用いてヒト正常組織に対する抗原性を持ち合わせるかを確認するスクリーニング系の構築も併せて行った。

・抗メガリン自己抗体の ELISA キットの構築

抗メガリン自己抗体の定量化を目的として ELISA の構築を行う準備を行った。そこで新たに LRP2 発現ベクターを HEK293 細胞へ導入し、細胞株を樹立した(図 2)。今後自己抗体の同定が確立した際は定量化の ELISA キットの構築も検討する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------