

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16892

研究課題名(和文)小児ネフローゼ症候群とHLA class IIに関する病態解明研究

研究課題名(英文)Study to clarify the pathophysiology of childhood nephrotic syndrome and HLA class II

研究代表者

堀之内 智子(Horinouchi, Tomoko)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：30754593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小児のネフローゼ症候群の多くはステロイド投与により寛解が得られるステロイド感受性ネフローゼ症候群(SSNS)である。小児SSNSには免疫に関係するHLA class IIや腎糸球体のネフリンをコードするNPHS1が関係していることが明らかになっている。HLA class IIは急性炎症などの免疫学的な刺激の存在下では異所性発現することが知られている。本研究では小児SSNS発症にこのHLA class IIの異所性発現が関わっている可能性に着目し、ネフリンを抗原として提示をしやすいHLA class IIの同定を行った。また、ネフリン/HLA class IIの複合体に反応する自己抗体の探索も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児ネフローゼ症候群において、日本人や欧米人において報告されているHLA class IIのRisk alleleによりコードされるHLA-DR分子はProtective alleleによりコードされるHLA-DR分子に比較し、ネフリンを抗原として提示しやすい傾向があることが明らかになった。また、ネフリンやHLA class IIの複合体に対する自己抗体が存在する可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Many patients with childhood idiopathic nephrotic syndrome are steroid-sensitive (SSNS). Several genome-wide association studies have shown that HLA class II, which is related to immunity, and NPHS1, which encodes nephrin in glomeruli, are involved in pediatric SSNS. HLA class II genes are associated with susceptibility to many kinds of autoimmune diseases, one of the mechanisms being misfolded protein/HLA class II complexes, which is aberrantly transported to the cell surface in the affected tissues inducing immune responses. In this study, we investigated the relationship between each HLA allele and nephrin based on the hypothesis that nephrin protein/HLA class II complexes might be involved in the development of SSNS. We also searched for autoantibodies that respond to the nephrin complex (neo-self).

研究分野：小児腎臓病学

キーワード：小児ネフローゼ症候群 ステロイド感受性ネフローゼ症候群 自己抗体 HLA class II ネフリン NPHS1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児特発性ネフローゼ症候群 (INS) は、我が国で年間 1000 人程度新規発症し、小児慢性腎疾患のなかで最も頻度が高い指定難病である。小児 INS の 80 ~ 90% はステロイド投与により寛解を得られるステロイド感受性ネフローゼ症候群 (SSNS) であるが、その約 50% は頻回の再発を認め、ステロイドや免疫抑制薬による持続的な治療を要する。また、成人期に移行する難治例も存在し、その場合 QOL の著しい低下を認める。SSNS 発症や再発に、インフルエンザなどの感染や虫刺症がきっかけになることはしばしば経験され、SSNS は何らかの免疫学的な刺激を受けて発症する多因子疾患であることが疑われてきたがその本質は未だ不明である。そのような中で申請者らは、本邦の小児 SSNS 患者を対象としたゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行い、HLA class II risk/protective allele の存在 (J Am Soc Nephrol, 2018) と、腎系球体スリット膜の重要構成因子であるネフリンをコードする NPHS1 が疾患感受性遺伝子であることを明らかとした (論文投稿中)。HLA class II は従来、B 細胞やマクロファージ・樹状細胞などの抗原提示細胞に発現していると考えられてきたが、急性炎症などの免疫学的な刺激の存在下では各臓器に異所性発現することが知られている。大阪大学の荒瀬らは異所性発現した HLA class II 分子とミスフォールド蛋白質との複合体 (ネオ・セルフ) が自己免疫性疾患の発症に関与することを明らかにしてきた (Proc Natl Acad Sci U S A, 2014)。また、HLA class II に会合したミスフォールド蛋白質を標的分子とした自己抗体探索を行うことで、それまで同定されていなかった抗リン脂質抗体症候群における自己抗体の同定に成功している (Blood, 2015)。NPHS1 遺伝子の異常は先天性ネフローゼ症候群を引き起こすことは既に知られており、ネフリンの障害によって蛋白尿が引き起こされることは自明である。申請者らは、小児 SSNS 発症にこの HLA class II の異所性発現が関わっている可能性に着目し、HLA class II allele がネフリンを提示する細胞・マウスの各実験系を用いて、HLA class II allele が疾患発症を引き起こすメカニズムを解明するという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は HLA class II allele がネフリンを提示する細胞・マウスの各実験系を用いて小児 SSNS の病態を解明し、自己抗体の発見や、根本治療開発の足掛かりとすることである。

3. 研究の方法

1) 各 HLA allele とネフリンの cDNA を細胞にトランスフェクションし、細胞表面へ抗原提示を行うその強さを比較する。

現在分かっている HLA DR/DQ の各 risk/protective allele に関して、それぞれネフリンとともにトランスフェクションし、ネオ・セルフ複合体の細胞表面への発現の強さを比較する。

2) 患者血清を用いて HLA とネフリンの複合体 (ネオ・セルフ) に反応する自己抗体がないか探索する。

1) で得られた細胞実験系を用いて、さらに患者血清を反応させることで、その血清中の抗体を検出する。また、探索的に患者尿などを使用することも考慮する。自己抗体が検出された場合は、それらを精製・質量分析等を行うことで、実際の構造を同定する。

3) マウスの各 MHC class II とネフリンの cDNA を細胞にトランスフェクションし、より細胞表面へ抗原提示しやすい MHC class II allele を同定する。

HLA class II の異所性発現によるネフローゼ発症に関するマウスモデル作成のため、マウスのネフリンを提示しやすいマウスの MHC class II allele を同定することで、疾患感受性アリルを同定する。

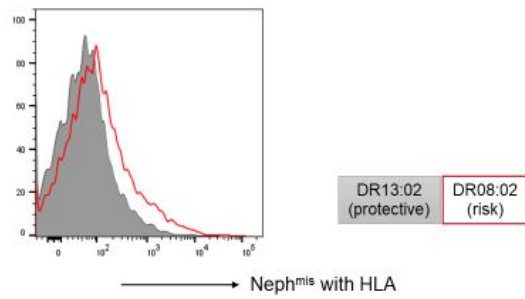
4) 3) によって同定された疾患感受性アリルを有するマウスの腹腔内にリポポリサッカライド刺激などを加え、IFN γ などを誘導することで、疾患を誘導し、疾患モデルマウスの作成を行う。

上記に加えて、血中・尿中の HLA class II 検出し、それらを精製・結合している分子を同定することで、抗原を明らかにする。

4. 研究成果

1) 各 HLA allele とネフリンの cDNA を細胞にトランスフェクションし、細胞表面へ抗原提示を行うその強さを比較したところ、risk allele によりコードされる HLA-DR 分子の方が protective allele によりコードされる HLA-DR 分子より抗原提示しやすいことが明らかとなった。

Flow cytometry



- 2) 患者血清を用いてネフリンや HLA とネフリンの複合体（ネオ・セルフ）に反応する自己抗体がないか探索したところ、反応する何らかの自己抗体の存在が示唆された。
- 3) マウスの各 MHC class II とネフリンの cDNA を細胞にトランスフェクションし、より細胞表面へ抗原提示しやすい MHC class II allele を同定した。現在更なる研究を遂行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 3件）

1. 著者名 Horinouchi T, Nozu K, Iijima K.	4. 巻 N/A
2. 論文標題 An updated view at the pathogenesis of steroid-sensitive nephrotic syndrome.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatr Nephrol.	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00467-021-05401-4.	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 -

1. 著者名 Okada E, Morisada N, Horinouchi T, Fujii H, Tsuji T, Miura M, Katori H, Kitagawa M, Morozumi K, Toriyama T, Nakamura Y, Nishikomori R, Nagai S, Kondo A, Aoto Y, Ishiko S, Rossanti R, Sakakibara N, Nagano C, Yamamura T, Ishimori S, Usui J, Yamagata K, Iijima K, Imasawa T, Nozu K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Cite Share Detecting MUC1 Variants in Patients Clinicopathologically Diagnosed With Having Autosomal Dominant Tubulointerstitial Kidney Disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney Int Rep.	6. 最初と最後の頁 857-866
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ekir.2021.12.037.	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 -

1. 著者名 Jia Xiaoyuan, Yamamura Tomohiko, Horinouchi Tomoko, Katsushi Tokunaga, Kazumoto Iijima et al.	4. 巻 98
2. 論文標題 Common risk variants in NPHS1 and TNFSF15 are associated with childhood steroid-sensitive nephrotic syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 1308 ~ 1322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2020.05.029	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 堀之内 智子, 野津 寛大, 長野 智那, 飯島 一誠
2. 発表標題 16.小児から成人へのシームレスなネフローゼ診療 単一遺伝子異常と小児および成人におけるネフローゼ症候群
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoko Horinouchi, China Nagano, Tomohiko Yamamura, Masako Kohyama, Kandai Nozu, Kazumoto Iijima, Hisashi Arase
2. 発表標題 Novel nephrin protein/HLA classII complexes: A new mechanism of steroid sensitive nephrotic syndrome
3. 学会等名 第55回日本小児腎臓病学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko Horinouchi, Sadayuki Nagai, Atsushi Kondo, Yuya Aoto, Shinya Ishiko, Rini Rossanti, Nana Sakakibara, China Nagano, Tomohiko Yamamura, Takeshi Ninchoji, Kandai Nozu, Kazumoto Iijima
2. 発表標題 Novel nephrin protein/HLA class II complexes: A new mechanism of steroid sensitive nephrotic syndrome
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney week 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------