

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06930

研究課題名（和文）腎生検検体を用いたapoE関連腎症の同定

研究課題名（英文）Identification of apoE-related glomerulopathy using renal biopsy specimens.

研究代表者

長濱 清隆（Nagahama, Kiyotaka）

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：00336538

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、過去の腎生検検体を用いてapoEの沈着を検討し、新たなapoE関連腎症を同定することを目的とした。3年間の研究で、apoE遺伝子の塩基配列決定方法を確立し、関連施設の既報のapoE腎症症例で方法の有効性を確認した。杏林大学医学部付属病院の過去30年分の腎生検検体から免疫複合体以外の沈着物が疑われる症例を抽出し、apoE遺伝子の配列を検討したが、新たなapoE関連腎症は同定されなかった。しかし、確立した解析方法を用いることで、今後より多くの症例を集積し、短期間でapoE遺伝子の解析を進めることが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腎生検パラフィン切片からapoE遺伝子の塩基配列を決定する方法を確立し、その有効性を実証した。この方法により、多数の症例から短期間でapoE関連腎症の原因となる遺伝子変異を同定することが可能となった。希少疾患であるapoE関連腎症の実態解明と新規症例の発見に貢献し、早期診断・治療による予後改善に寄与することが期待される。さらに、本研究で確立した手法は、他の遺伝性腎疾患の研究にも応用可能であり、腎臓病の病態解明と新たな治療法の開発に広く貢献し得る。このように、本研究は希少疾患の解明と腎臓病研究の発展に寄与する学術的・社会的意義を有している。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to identify novel cases of apoE-related nephropathy by examining apoE deposition in past renal biopsy specimens. Over the three-year research period, methods for determining the nucleotide sequences of the apoE gene were established, and their effectiveness was confirmed using previously reported cases of apoE nephropathy from other institutions. Renal biopsy specimens from the past 30 years at Kyorin University Hospital were screened for cases with suspected deposits other than immune complexes, and the apoE gene sequences were examined; however, no new cases of apoE-related nephropathy were identified. Nevertheless, the established analytical methods enable the accumulation of a larger number of cases and rapid analysis of the apoE gene in the future. The research holds academic and social significance in contributing to the elucidation of rare diseases and the advancement of kidney disease research.

研究分野：糸球体腎炎

キーワード：apoE 糸球体腎炎 遺伝子解析 脂質異常症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脂質異常症は遺伝性要因や肥満、ネフローゼ症候群といった種々の疾患で生じる。同時に、脂質異常により慢性腎臓病が進行することが知られているが、脂質異常と腎障害との因果関係に関する明確な証拠を提供した研究はほとんどない。唯一、**apoE** は脂質代謝異常と腎障害とを直接結びつける例外的な因子である。

APOE 遺伝子産物である **apoE** は **299** アミノ酸からなり、分子量は約 **34 kDa** である。**ApoE** は脂質代謝の重要な因子で、主に肝臓やマクロファージで産生される。**VLDL**、**IDL**、**HDL** の構成成分の **1** つであり、中性脂肪やコレステロールの運搬に深く関与する。主要な **3** つのアイソフォームがあり、それぞれ **3** つの対立遺伝子 **e2**、**e3**、**e4** の遺伝子産物から成っている (**apoE2**、**apoE**、**apoE4**)。これらアイソフォームでは **112** 番目と **158** 番目のアミノ酸残基に違いがあり、**apoE2** では **112/158** 番目の組み合わせが **Cys/Cys**、**apoE3** では **Cys/Arg**、**apoE4** では **Arg/Arg** で、両親由来の **2** つの対立遺伝子の組み合わせにより、**6** つの表現型がある (**E2/2**、**E3/2**、**E3/3**、**E4/2**、**E4/3**、**E4/4**)。アイソフォームによるアミノ酸の違いは、リポ蛋白受容体への結合能の他、リポ蛋白のサイズおよび濃度に強い影響を与え、脂質代謝に大きく関与することが知られている (**Pathology 51: 165–176, 2019**)。

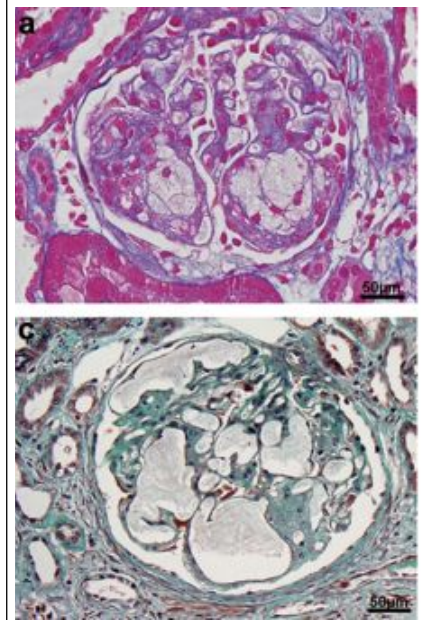
ApoE の遺伝子型や遺伝子変異が関連する糸球体病変(以下 **apoE** 関連腎症)として、**1972** 年に **III** 型高脂血症関連腎症が、**1989** 年に **lipoprotein glomerulopathy** が報告された。それぞれ、糸球体糸球体内腔が拡張し泡沫細胞あるいは層状の脂質が充満する特徴的な所見を示す(図 1)。前者は **apoE** の稀な表現型である **E2/E2** に由来する **III** 型高脂血症を主たる原因とし、後者は **apoE** の遺伝子異常により生ずる。

2018 年、われわれは膜性腎症に類似した **apoE** 関連腎症を同定し、世界に先駆けて報告した (**Case Rep Nephrol Dial. 2018 Mar 20;8(1):45-55**) (図 3)。われわれが報告した膜性腎症型の **apoE** 関連腎症では、顕微鏡上、糸球体内に泡沫細胞の浸潤は明らかでなく、**PAM** 染色標本にて **spike** 形成や虫食い像が確認される。電顕では糸球基底膜のほかメサンギウム領域に **dense deposit** が確認され、免疫電顕では同部に一致して **apoE** が沈着していた。一方、免疫複合体が関与する通常の膜性腎症と異なり、蛍光抗体法(以下 **IF**)では、**IgG** や **C3** の糸球壁への顆粒状沈着が確認できなかったことから、**apoE** により糸球体構造が変化し、障害されたものと考えられた。興味深いことに、われわれが報告した症例の **apoE** 表現型は、**E2/E2** であったが **III** 型高脂血症はきたしていない。しかしながら、**apoE-Toyonaka**

と呼ばれるヒンジ領域の遺伝子変異 (**Ser197Cys**) を有しており、このヒンジ部の異常により **III** 型高脂血症を呈することなく、糸球体病変のみを発症したものと考慮された。以上から、**IF** 陰性にも関わらずこれまで膜性腎症と診断されていた症例の中に **apoE** 関連腎症が含まれている可能性が推察される。加えて、膜性腎症で

図 1. ApoE関連腎症の組織像

(上) III型高脂血症関連腎症。糸球体内腔に泡沫細胞が充満する。(下) Lipoprotein glomerulopathy。糸球体内腔に脂質が充満する。



なくとも糸球体に **dense deposit** が存在し、かつ **IF** 陰性である症例は **apoE** 関連腎症である可能性が考えられる。

III 型高脂血症関連腎症および **lipoprotein glomerulopathy** はいずれも特異的な糸球体病変を呈するため、光顕像から **apoE** の関与を疑うことは困難ではないと思われる。一方、膜性腎症に類似した **apoE** 関連腎症は、多くの症例で正確な診断に至っていない可能性が高い。事実、われわれが論文報告した症例は、**2** 回目の腎生検で **apoE** 関連膜性腎症との診断を得たが、初回生検から **8** 年経過しており、その間是非典型的な治療抵抗性の膜性腎症としてフォローされていた。しかも、高脂血症は指摘されていなかった。顕著な高脂血症、あるいは家族歴がない限り、**apoE** の測定に至る症例はほとんどないものと思われる。

腎生検検体を用いた **apoE** 沈着の有無の確認は、**apoE** 関連腎症を診断するために簡便で極めて有用な方法である。

2. 研究の目的

本研究計画では、杏林大学病院および関連病院の過去の腎生検検体を用いて、免疫染色等により **apoE** の沈着の有無について検討し、後方視的に **apoE** 関連腎症を同定する。**ApoE** の沈着が見られた症例について、臨床データや治療法、予後についての情報を併せて検討し、**apoE** 関連腎症の臨床病理学的な特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

まず、**ApoE** の遺伝子解析について検討を行った。当初は既報の論文を参考に、**real-time PCR** を使用して **apoE** のハプロタイプを決定する予定であったが、遺伝子変異の詳細を確定するために **Sanger sequence** を用いて **apoE** のほぼ全長を決定する方法へと変更した。

以下の表に記す **3** セットの **primer** を使用することで、パラフィン切片から抽出した核酸を用いて、**apoE** の **exon** ほぼ全長の配列を決定することに成功した。

	Forward	Reverse
#1	ACCTGCGCAAGCTGCGTA	TCGCATGGCTGCAGGCTT
#2	TCTGGCTCATCCCATCTCG	TGCCCATCTCCTCCATCC
#3	ACCCTGACCCACCTTGAAC	CTGGACCTGGGGAGGTATAG

一方、**apoE** 関連腎症の候補症例を見出すべく、杏林大学病院にて、**2010** 年から **2020** 年の間に施行された腎生検検体を用いて、**apoE** の免疫染色を行った。適切な症例が見出せなかったため、**1990** 年から **2009** 年の間に施行された症例について追加で検討を行ったが、やはり候補症例を見出すことはできなかった。

そこで、関連病院にて **apoE** 関連腎症として報告されたいいた症例を取り寄せ、**apoE** の免疫染色および遺伝子配列の決定を行い、倫理委員会に許可を得た上で、開発した方法の妥当性を検討することとした。

4. 研究成果

apoE のハプロタイプを含め、**apoE Exon** 領域のほぼ全長を同定することが可能となった。特筆すべき点は、**3** セットの **primer** を使用しているが、**PCR** の条件は同一であるため、**1** 回の **PCR** で塩基配列の決定を行うことができる点にある。

関連病院から取り寄せた **apoE** 腎症の症例について、まずは免疫組織科学を施行した。結果、糸球体糸膜内腔を主体に、多量の **apoE** が蓄積していることを明らかにした (図 2)。

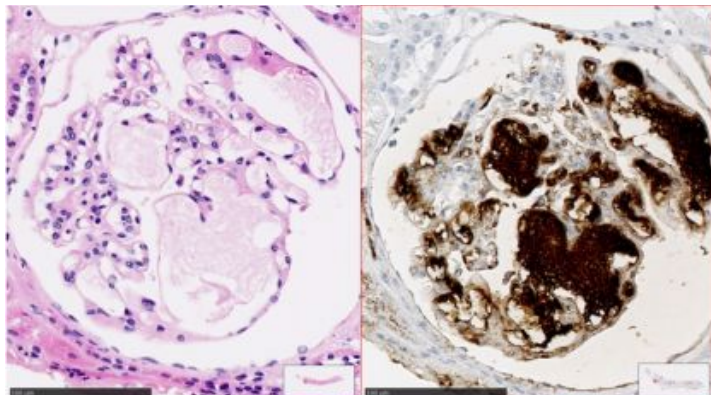
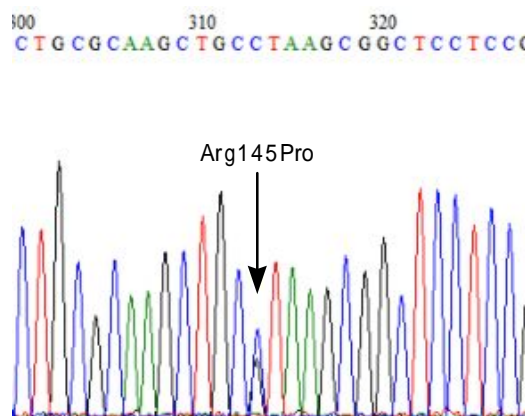


図2. ApoE変異に関連した糸球体病変

HE染色では、糸膜内に淡好酸性物質が充満し、内腔の拡張を伴う(左)。抗apoE抗体に対する免疫組織化学では、淡好酸性物質にほぼ一致するように陽性像が見られる。

続いて、同じパラフィンブロックから腎生検切片を薄切し、鋳型となる核酸を抽出した後、上記 3 セットの **primer** を用いて **PCR** を施行し、**Sanger sequence** にて **apoE** の塩基配列を決定した。結果、右の図に示すとおり、**apoE sendai** の変異を証明することができ、本研究計画で開発した方法の有効性を明らかにすることができた。今後は、複数の施設と連携して、症例の発見、蓄積にさらに努める予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirose Go, Uchida Takahiro, Kojima Aki, Sugisaki Kentaro, Yamada Muneharu, Nagase Yoshihiro, Takaki Takashi, Nagahama Kiyotaka, Oda Takashi	4. 巻 8
2. 論文標題 Membranous Nephropathy With Monoclonal IgM Lambda Deposits in a Patient With IgM Monoclonal Gammopathy: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	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) 10.3389/fmed.2021.608741	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 Morimoto Nobuhisa, Nagahama Kiyotaka, Oyama Sakino, Tsuura Yukio, Fukutomi Toshiyuki, Terai Ayumi, Tanabe Madoka, Otani Megumi, Shioji Shingo, Hirasawa Suguru, Aki Shota, Aoyagi Makoto, Tanaka Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Immunotactoid glomerulonephritis in a patient with cold agglutinins: causal association or mere coincidence?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 515 ~ 522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-021-00600-2	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 Morimoto Nobuhisa, Nagahama Kiyotaka, Mori Takayasu, Fujimaru Takuya, Tsuura Yukio, Terai Ayumi, Tanabe Madoka, Otani Megumi, Shioji Shingo, Hirasawa Suguru, Aki Shota, Aoyagi Makoto, Sohara Eisei, Uchida Shinichi, Tanaka Hiroyuki	4. 巻 145
2. 論文標題 A Novel LMX1B Variant Identified in a Patient Presenting with Severe Renal Involvement and Thin Glomerular Basement Membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nephron	6. 最初と最後の頁 776 ~ 782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000518423	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 Morimoto Nobuhisa, Nagahama Kiyotaka, Tsuura Yukio, Terai Ayumi, Tanabe Madoka, Otani Megumi, Shioji Shingo, Hirasawa Suguru, Aki Shota, Aoyagi Makoto, Tanaka Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Membranous nephropathy in a patient with pulmonary tuberculosis infection and lung adenocarcinoma: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 CEN Case Reports	6. 最初と最後の頁 126 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13730-021-00641-7	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
研究 分 担 者	福富 俊之 (Fukutomi Toshiyuki) (30439187)	杏林大学・医学部・助教 (32610)	

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
---------	---------