

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461242

研究課題名(和文) 抗PLA2R抗体の新規定量法の開発と日本人膜性腎症における臨床的有用性の検討

研究課題名(英文) Clinical usefulness of anti-M-type phospholipase-A-receptor antibodies in patients with membranous nephropathy and the comparison of three quantification methods

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、特発性膜性腎症のバイオマーカーとして、抗ホスホリパーゼA2受容体(PLA2R)抗体の新規定量法を開発し、臨床的有用性を明らかにすることを目的とした。PLA2Rの安定形質発現株を作製し、それをを用いたウェスタンブロットを行い、抗PLA2R抗体を検出した。陽性率は52%であった。PLA2R安定発現細胞を用いたCell ELISAを新規構築した。研究開始後に市販されたELISAキットを購入してその有用性を検証した。尿蛋白量は抗体価と中等度に相関していた。免疫抑制療法の医師判断と抗PLA2R抗体価陽性は有意に関連していた。免疫抑制療法後、抗PLA2R抗体価は有意に低下した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish methods to measure anti-M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) antibodies, specific markers of primary membranous nephropathy (MN), and assess their clinical usefulness. We developed a western blot assay and a cell-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Anti-PLA2R antibodies were detected in 52% of the patients with biopsy-proven primary MN using the western blot. The levels of proteinuria correlated with the anti-PLA2R antibody titers measured by the three methods. Anti-PLA2R antibodies were significantly associated with physicians' decisions on immunosuppressive treatment. The titers of anti-PLA2R antibodies declined significantly following treatment. These results suggest the usefulness of anti-PLA2R antibody as a diagnostic, prognostic, and surrogate biomarker in primary MN. The three methods proved to be reliable, but their performances differ.

研究分野：臨床免疫学

キーワード：内科 免疫学 腎臓学

1. 研究開始当初の背景

(1) 膜性腎症は基底膜上皮下の免疫複合体沈着を特徴とする腎症であり、成人のネフローゼ症候群の 3~8 割を占めるとされる。ネフローゼ症候群や糸球体腎炎は、病型により治療方針が異なるが、膜性腎症を含め、その診断や鑑別には侵襲的な腎生検が必須である。しかし、安静が保てない全身不良患者や高齢者では腎生検は困難である。加えて、膜性腎症に対しては薬物治療として免疫抑制療法を行うことがあるが、治療効果に対する免疫学的指標として確立したものがなかった。臨床現場では、血液・尿検査による簡便なバイオマーカーが求められていた。

(2) 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 受容体に対する抗体 (抗 PLA2R 抗体) が存在することが報告された。さらに、膜型ホスホリパーゼ A2 受容体が正常糸球体ポドサイトや膜性腎症例の腎糸球体に沈着した免疫複合体に存在することも併せて報告した。また、二次性膜性腎症では、同抗体は 1 例も認められなかった。その後、海外では同様の報告が相次いでいたが、日本人患者での報告は、名古屋大学腎臓内科の研究室より学会報告がなされているのみで、かつ、抗 PLA2R 抗体陽性率は、44%と海外の報告 (60-80%) に比べて低めであった。

(3) 従来の PLA2R を HEK293T 細胞に一過性に強制発現させる手法では、蛋白質の発現は短期間に限られ (従って細胞の用時調整が必要)、発現量も安定せず、外来遺伝子が導入されるのは一部の細胞に限られるため、アッセイとしての安定性や定量性に問題があった。また、いずれの手法も抗体価はせいぜい希釈度による半定量法しかできなかった。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題の申請時における当初の研究目的は、抗 PLA2R 抗体の測定法として、汎用性、簡便性、定量性に優れた、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay, 酵素結合免疫吸着法)を開発すること、開発した ELISA および従来法を用いて、日本人の成人の特発性膜性腎症における血清抗 PLA2R 抗体の特徴の解析をすることであった。

3. 研究の方法

(1) PLA2R の安定形質発現株 (HEK293T 細胞) を作製する。

(2) 成人の特発性膜性腎症患者血清をサンプルとして、PLA2R 安定発現細胞を用いたウェスタンブロットを行い、抗 PLA2R 抗体を検出する。

(3) PLA2R 安定発現細胞を用いた Cell ELISA を新規構築し、抗 PLA2R 抗体価を定量

測定し、従来法 (ウェスタンブロット) と比較し、臨床的有用性を検証する。

(4) 研究開始後に発売された、抗 PLA2R 抗体の市販 ELISA キットの有用性を検証する。

(5) 日本人特発性膜性腎症患者における抗 PLA2R 抗体の陽性率、抗体価の経時的推移などを検討する。

(6) PCR (polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応) およびウェスタンブロットにて、ヒトポドサイトのセルラインにおける PLA2R の発現の有無を検討する。

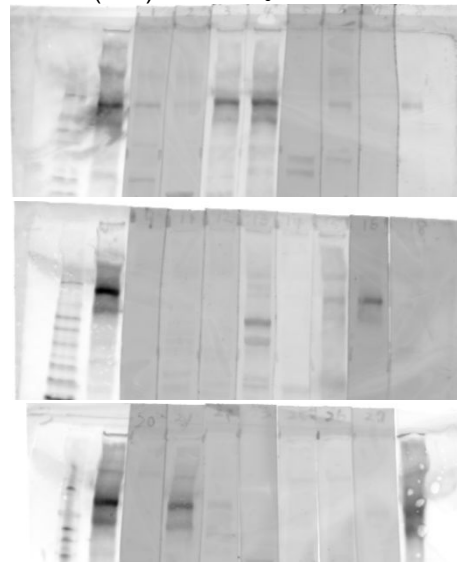
(7) ヒトポドサイトのセルラインに DNA トランスフェクションにより、PLA2R を一過性発現する。

(8) ヒトポドサイトのセルラインを用いて、安定形質発現株を作製する。具体的には、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、目的遺伝子の発現を RT-PCR で確認する。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。

(9) 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 を合成する。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する。また、フローサイトメトリー解析にて、目的蛋白 (=ヒト PLA2R) の発現を確認する。

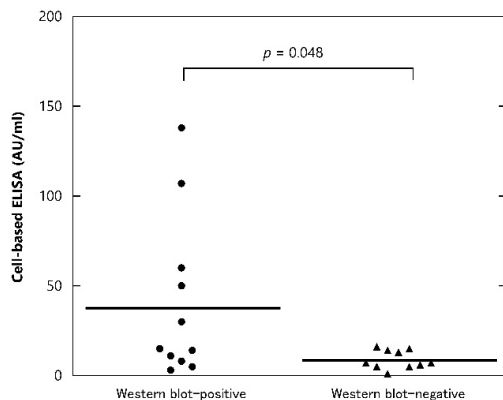
4. 研究成果

(1) PLA2R の安定形質発現株 (HEK293T 細胞) を作製し、それを用いたウェスタンブロットを行い、抗 PLA2R 抗体を検出した。陽性率は 12/23 (52%) であった。

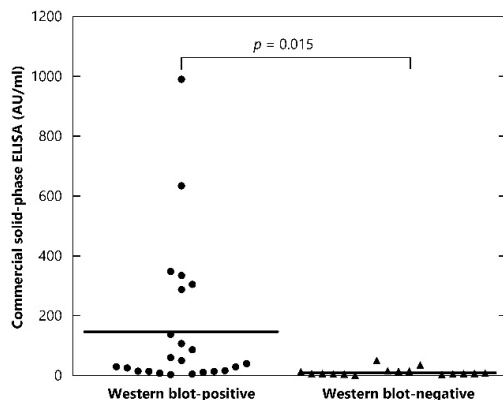


(2) PLA2R 安定発現細胞を用いた Cell ELISA

を新規構築し、抗 PLA2R 抗体価を定量測定し、ウェスタンブロット陽性サンプル群は、陰性群に比べて、Cell ELISA で測定された抗体価が有意に高かった。



(3) 当初計画としては、昆虫細胞・バキュロウイルスまたは哺乳動物細胞を用いた遺伝子組換え PLA2R 蛋白の作製とそれを抗原とした ELISA の新規構築を予定していた。しかし、同様の ELISA キットが市販されたため、独自開発は中断することにし、同市販キットを購入してその有用性を検証した。ウェスタンブロット陽性サンプル群は、研究開始後に発売された、抗 PLA2R 抗体の市販 ELISA キットで測定された抗体価が有意に高かった。



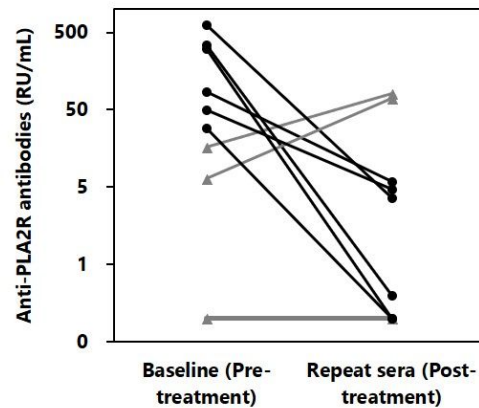
(4) ウェスタンブロットのバンド信号強度、Cell ELISA の抗体価、市販 ELISA キットの抗体価は、互いに相関していた ($r = 0.84-0.94$)。特発性膜性腎症における陽性診断は、3 者において、中等度一致していた ($\kappa = 0.32-0.65$)。全身性エリテマトーデス患者で膜性腎症の患者血清は、いずれの方法でも全検体陰性であった。

(5) 尿蛋白量は、ウェスタンブロットのバンド信号強度、Cell ELISA の抗体価、市販 ELISA キットの抗体価と、中等度に相関していた ($r = 0.39-0.47$)。

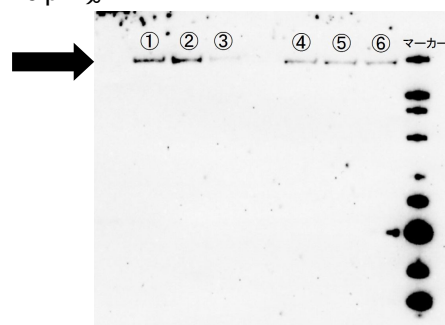
(6) すべての測定症例において、抗 PLA2R 抗体価の値を知らずに治療方針が決定されていたが、免疫抑制療法を行うかどうかの担

当医決定方針と、抗 PLA2R 抗体価陽性は、有意に関連していた ($p < 0.01$)。

(7) 免疫抑制療法が行われた症例 () において、抗 PLA2R 抗体価は有意に低下した ($p = 0.03$)。一方、免疫抑制療法が行われなかった 3 例 () 中 2 例において、抗体価は上昇した。



(8) 当初計画の ELISA の独自開発が中断したので、必要経費が大幅に減少した。そのため、ポドサイトのセルラインを用いて、抗 PLA2R 抗体の病原性についても検討する方針とした。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、下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、 は「AB8/13」細胞株、 は「BLAK」細胞株の各ライセート量 9、12、15 μ l)。



(9) 安定した実験系を構築するためには、安定形質発現の構築が望ましいため、ポドサイトのセルラインに PLA2R を恒常的に強発現させて病態研究をする方針とし、作製した。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、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、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。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。今後の展望としては、作製した PLA2R 安定形質発現ヒトポドサイト細胞株を用いて、患者血清中抗 PLA2R 抗体の病原性について検討する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Hidenaga Kawasumi, Yasuhiro Katsumata, Akira Nishino, Shinya Hirahara, Yasushi Kawaguchi, Masataka Kuwana, Hisashi Yamanaka, Association of Serum Soluble CD163 with Polymyositis and Dermatomyositis, Especially in Anti-MDA5 Antibody-positive Cases, The Journal of Rheumatology, 査読有、2018、doi: 10.3899/jrheum.170997

Sayumi Baba, Yasuhiro Katsumata, Yuko Okamoto, Yasushi Kawaguchi, Masanori Hanaoka, Hidenaga Kawasumi, Hisashi Yamanaka, Reliability of the SF-36 in Japanese patients with systemic lupus erythematosus and its associations with disease activity and damage: a two-consecutive year prospective study, Lupus, 査読有、Vol.27, No.3, 2018, pp.407 - 416、doi: 10.1177/0961203317725586

Yuko Okamoto, Yasuhiro Katsumata, Sayumi Baba, Yasushi Kawaguchi, Takahisa Gono, Masanori Hanaoka, Hidenaga Kawasumi, Hisashi Yamanaka, Validation of the Japanese version of the Systemic Lupus Activity Questionnaire that includes physician-based assessments in a large observational cohort, Lupus, 査読有、Vol.25, No.5, 2016, pp.486 - 495、doi: 10.1177/0961203315617844

Katsuji Nishimura, Masako Omori, Yasuhiro Katsumata, Eri Sato, Masayoshi Harigai, Yasushi Kawaguchi, Hisashi Yamanaka, Jun Ishigooka, Validation of the Psychological distress in corticosteroid-naive patients with systemic lupus erythematosus: A prospective cross-sectional study, Lupus, 査読有、Vol.25, No.5, 2016, pp.463 - 471、doi: 10.1177/0961203315615223

Yasuhiro Katsumata, Yasushi Kawaguchi, Hisashi Yamanaka, Interstitial Lung

Disease with ANCA-associated Vasculitis., Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med, 査読有、Vol.9, Suppl 1, 2015, pp.51 - 56、doi: 10.4137/CCRP.M.S23314

Katsuji Nishimura, Masako Omori, Yasuhiro Katsumata, Eri Sato, Takahisa Gono, Yasushi Kawaguchi, Masayoshi Harigai, Masaru Mimura, Hisashi Yamanaka and Jun Ishigooka, Neurocognitive impairment in corticosteroid-naive patients with active systemic lupus erythematosus: a prospective study, The Journal of Rheumatology, 査読有、Vol.42, No.3, 2015, pp.441 - 448、doi: 10.3899/jrheum.140659

[学会発表](計3件)

Yasuhiro Katsumata, Yuko Okamoto, Manabu Kawamoto, Masanori Hanaoka, Rina Moriyama, Yasushi Kawaguchi, Hisashi Yamanaka Clinical usefulness of anti-M-type phospholipase-A-receptor antibodies in patients with membranous nephropathy and comparisons of three quantification methods 日本リウマチ学会総会 2017年

Rina Moriyama, Yasuhiro Katsumata, Yuko Okamoto, Yasushi Kawaguchi, Hisashi Yamanaka Clinical Usefulness of Quantitative Measurement of Anti-M-type Phospholipase A2 Receptor Antibodies in Patients with Membranous Nephropathy and Comparisons of Three Quantitative Methods LUPUS 2017年

Yasuhiro Katsumata, Yuko Okamoto, Takahito Moriyama, Manabu Kawamoto, Hirotaka Kaneko, Yasushi Kawaguchi, Takahisa Gono, Masanori Hanaoka, Tomoaki Higuchi, Hidenaga Kawasumi, Keiko Uchida, Kosaku Nitta, Hisashi Yamanaka Development of Cell-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Quantification of Anti-M-type phospholipase-A-receptor antibodies and Validation of its Clinical Usefulness in Patients with Membranous Nephropathy ACR/ARHP Annual Meeting 2014年

6. 研究組織

(1)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