

表題

小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群の病態に
影響を与える外的・内的要因の検討
—発症の季節変動と、病勢関連因子の同定—

論文の区分 論文博士

著者名 小高淳

所属 自治医科大学 小児科学講座

2017年10月12日 申請の学位論文

紹介教員

職名・氏名 准教授・金井 孝裕

目次

	頁
I. 背景	4
II. 研究 1 小児 ISSNS の病態に影響を与える外的要因の検討	
—発症の季節性変動—	
(1) 背景	8
(2) 方法	9
(3) 結果	12
(i) 発症の季節性変動	
(ii、iii) アレルギー性疾患の合併率	
(iv) 季節毎の血清 IgE 値	
(4) 考察	15
III. 研究 2 小児 ISSNS の病態に影響を与える内的要因の検討	
—病勢関連因子の同定—	
背景	18
(研究 2-1) 小児 ISSNS の病勢にかかわる内的要因の候補因子の 精製・同定	
(1)方法	

① 候補ペプチドイオンの精製と同定	24
② SELDI-TOF MS 法	27
(2)結果	30
(研究 2-2) 小児 ISSNS とその他のネフローゼ症候群との血清 Apolipoprotein C1 値の比較検討	
(1)背景	37
(2)方法	37
(3)結果	40
考察	41
IV. 結論	44
V. 参考文献	45

I. 背景

ネフローゼ症候群は、高度蛋白尿と、低蛋白血症（表 1）を必須条件とし、これに伴って、浮腫・高脂血症を呈することが多い疾患群である¹⁻²。

	高度蛋白尿	低アルブミン血症
成人	3.5g/日以上	3.0 g/dL 以下
小児	夜間蓄尿で 40 mg/h/m ² 以上、あるいは起床第一尿で尿蛋白クレアチニン比 2.0 g/gCr 以上	2.5 g/dL 以下

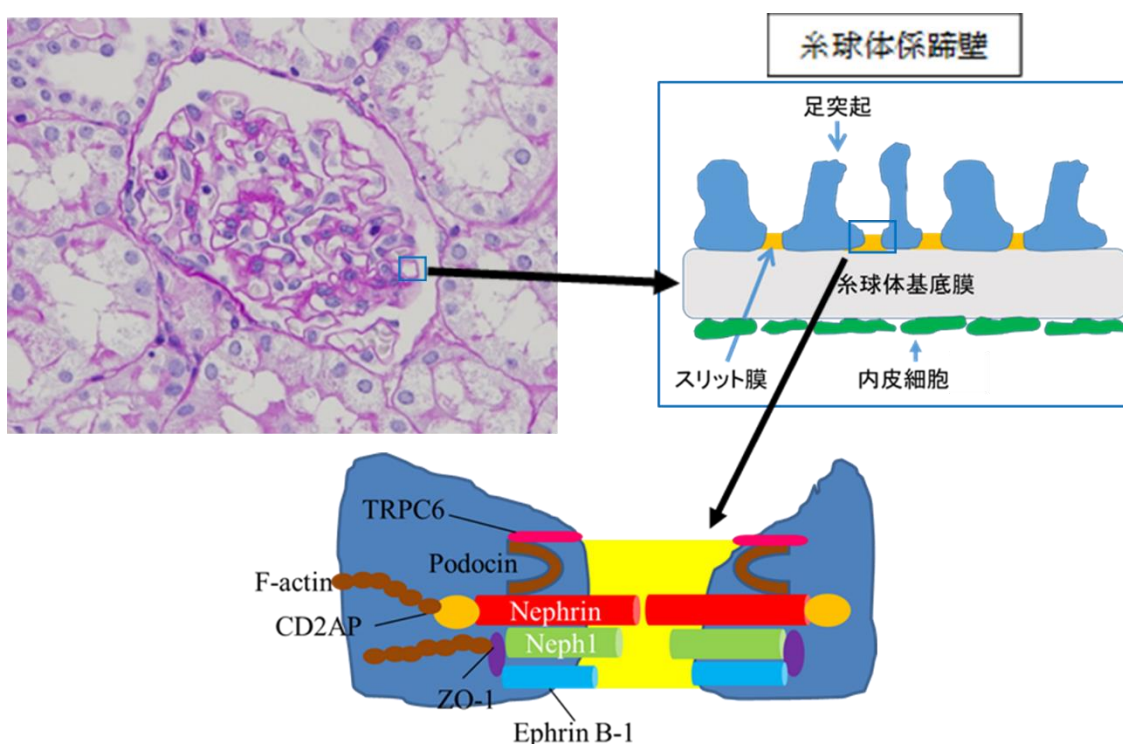
（表 1）ネフローゼ症候群の診断基準

ネフローゼ症候群は、病理組織学的にいくつかに分けられる。病理組織学的違いから、治療法に違いがあるため、成人患者では、治療開始前に腎生検を行い、その病理組織型を明らかにするのが一般的である。一方、小児患者では、特発性ネフローゼ症候群の 90%以上はステロイド治療に反応すること、また、特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群の組織型は約 80%が微小変化型（MCNS）であることが明らかになっており¹、小児特発性ステロイド感受性ネフローゼ症候群（ISSNS）では、治療開始前の病理診断を必須としない。つまり、小児 ISSNS は腎生検を行わなくとも、ステロイドへの感受性で病理型を推定することができる。

小児 ISSNS の死亡率は、ステロイド治療導入前では 35%であったが、ステロイド治療導入により約 3%まで低下した^{3,4}。このように、小児 ISSNS に対するステロイド治療の貢献は大きいものである。一方で、小児 ISSNS 罹患児では、ステロイドによる副作用は看過できないものである。なぜなら、小児 ISSNS 罹患児の 80%は、ステロイドの減量や中止に伴い本症を再発し、さらにその半数の罹患児は本症を頻回に再発する¹。また、本症の好発年齢は 2~6 歳であり⁵、幼少期からの長期間のステロイド治療は、成長障害や中心性肥満、骨粗鬆症等の続発症を引き起こし、健やかな成長・発達を妨げている。しかし、本症の原因は特定されておらず、根治療法はいまだ存在せず、本症の治療はステロイドに依存している。そして、本邦における、本症の年間小児発症数は、1300 人とされており¹、小児医療において、重要な課題として残る疾患である。このため、本症の病態解明に寄与する知見を得て、発症予防および新たな治療薬の開発につなげることは非常に重要である。

腎糸球体における濾過障壁として最も重要な構造は上皮細胞の足突起とスリット膜である (図 1)。スリット膜は足突起間に形成される細胞間接着装置で、これを構成する Nephritin や Podocin といった種々の蛋白質の異常により、足突起やスリット膜構造に変化が生じ、遺伝性のネフローゼ症候群を発症することが分かっている⁶。一方で、小児 ISSNS ではこれら構造蛋白に関連する遺伝的

背景は明らかではないが、小児 ISSNS の病理組織型としても最も多い MCNS でも、足突起の癒合とスリット膜の消失を認める。小児 ISSNS におけるこのような構造変化は、糸球体上皮細胞へ何らかの液性因子や組織因子による刺激が加わり引き起こされていると考えられている⁶。



(図 1) 糸球体濾過障壁

小児 ISSNS において糸球体上皮細胞の足突起やスリット膜にこのような病的な構造変化を引き起こし、大量の蛋白尿を惹起する要因を特定する目的で、研究 1 で外的要因として発症の季節性変動の有無を、研究 2 で内的要因として液

性因子の検索を行った。これらの要因を特定することで、小児 ISSNS の病態形成解明の手がかりとなる知見が得られることが期待される。

II. 研究1 小児 ISSNS の病態に影響を与える外的要因の検討

－発症の季節性変動－

(1) 背景

小児 ISSNS 罹患児にアレルギー性疾患の合併が多いことは日常診療でも経験する。実際、一般小児人口に比べて、アレルギー性鼻炎や気管支喘息の罹患率が、小児 ISSNS 罹患児では3倍、アトピー性皮膚炎の罹患率は10倍であると報告されている⁷⁻⁹。しかし、これらアレルギー性疾患の発症・増悪と関連の深い季節要因と、ISSNS 発症との関係に関する報告は少ない¹⁰⁻¹¹。このため、小児 ISSNS 発症数の季節変動、および小児 ISSNS 罹患児の季節毎のアレルギー性疾患合併率を検討する目的で、当科、および、栃木県内の中核病院小児科通院中の小児 ISSNS 患者を対象として、各季節における、小児 ISSNS の初発患者数を調査することで、小児 ISSNS の病態に影響を与える外的要因について検討した。

(2) 方法

本研究は、自治医科大学臨床研究等倫理委員会の承認を得て行った。調査期間は2005年1月1日から2011年12月31日とした。対象は、当科および栃木県内の3つの病院小児科に通院中の小児ISSNS患者で、その初発時点を後方視的に調査した。小児ISSNSの診断基準は、下記の通りとした。つまり、①ネフローゼ症候群を引き起こす基礎疾患がなく、②国際小児腎臓病研究班の小児特発性ネフローゼ症候群診断基準（尿蛋白量が 40 mg/h/m^2 を超え、かつ血清Alb値 2.5 g/dL 未満）を満たし、③プレドニゾン（PSL） 2 mg/kg/日 内服による治療開始後4週間以内に尿蛋白が陰性化したもの、である。また、④血清補体値の低下や、尿沈渣で多数の赤血球、細胞性円柱を示す腎炎型のネフローゼ症候群を疑わせるもの、⑤再発後ステロイド抵抗性になったもの、は除外した。

調査表（表2）を用いて、初発診断時の月、アレルギー性疾患（ISSNS発症前に、アトピー性皮膚炎、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、気管支喘息と医師から診断されたことがあるもの）の合併または既往、小児ISSNSに対するステロイド治療前の血清IgE値を診療録から後方視的に確認し、患者情報を得た。このデータから、対象者の（i）季節別発症数、（ii）アレルギー性疾患の合併率、（iii）季節毎のアレルギー性疾患の合併率、（iv）季節毎の発症時治療前の血清IgE値に区分けした。なお、発症時の定義は、ネフローゼ症候群に基づ

く症状や異常検査所見（浮腫、蛋白尿、低アルブミン血症）を医療機関で指摘された時点とした。

症例No	発症年/月	アレルギー歴	年齢	性別	IgE値 (IU/ml)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

（表 2）調査票

対象患者は 52 名で、うち男性が 36 名、女性が 16 名、年齢中央値は 5 歳で、範囲は 1-14 歳であった。構成の性別比、年齢中央値は、これまでの小児 ISSNS の疫学調査と一致していた²。統計処理には、（i）は χ^2 適合度の検定、（ii）は一般幼児におけるアレルギー性疾患の合併率¹²との比較を χ^2 独立性の検定を用い、（iii）の季節間比較には Fisher の直接確率検定を用いて、（iv）の季節間比較に関しては Mann-Whitney U 検定を用いて、統計学的有意差を解析した。 $P <$

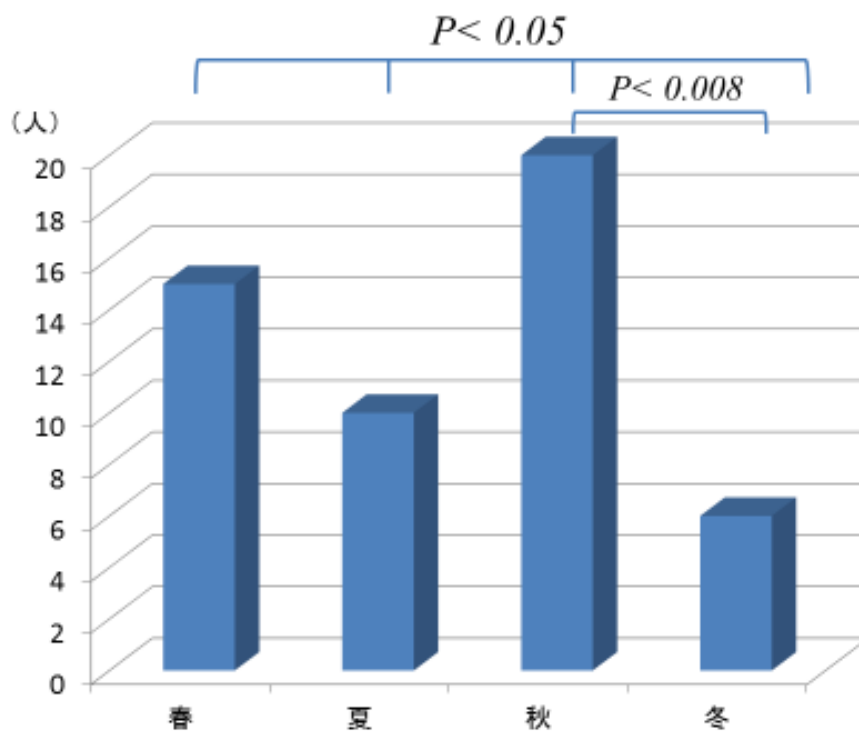
0.05 を有意差ありとしたが、発症数の季節間比較においては Bonferroni 補正を行い、 $P < 0.008$ を有意差ありとした。

季節の定義は春を 3-5 月、夏を 6-8 月、秋を 9-11 月、冬を 12-2 月とした。

また、副腎皮質ステロイド治療開始前に血清 IgE 値を酵素免疫測定法で測定し、年齢相当の基準範囲を超えたものを高値として定義した¹²。

(3) 結果

(i) 小児 ISSNS 群の季節別発症数の内訳は、春 15 人 (28.8%)、夏 10 人 (19.2%)、秋 21 人 (40.4%)、冬 6 人 (11.6%) であり、 $P < 0.05$ と季節間で有意な差があった (図 2)。個別の季節間の比較では、秋と冬の発症数に有意差があった ($P < 0.008$)。



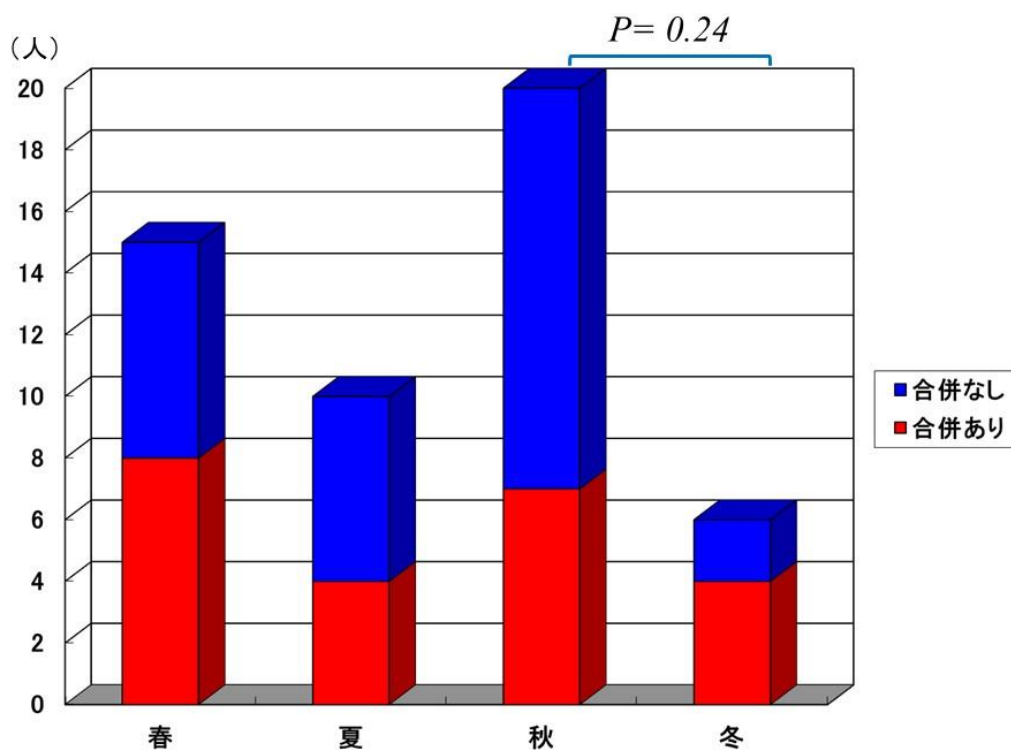
(図 2) 小児 ISSNS 季節別発症数

(ii、iii) アレルギー性疾患の合併は 24/52 人 (46.2%) にあった。小児 ISSNS 児におけるアレルギー性疾患の合併率は、ISSNS の好発年齢である一般幼児の

アレルギー性疾患の合併率(36.7%)と比較し有意差はみられなかった($P=0.16$)。

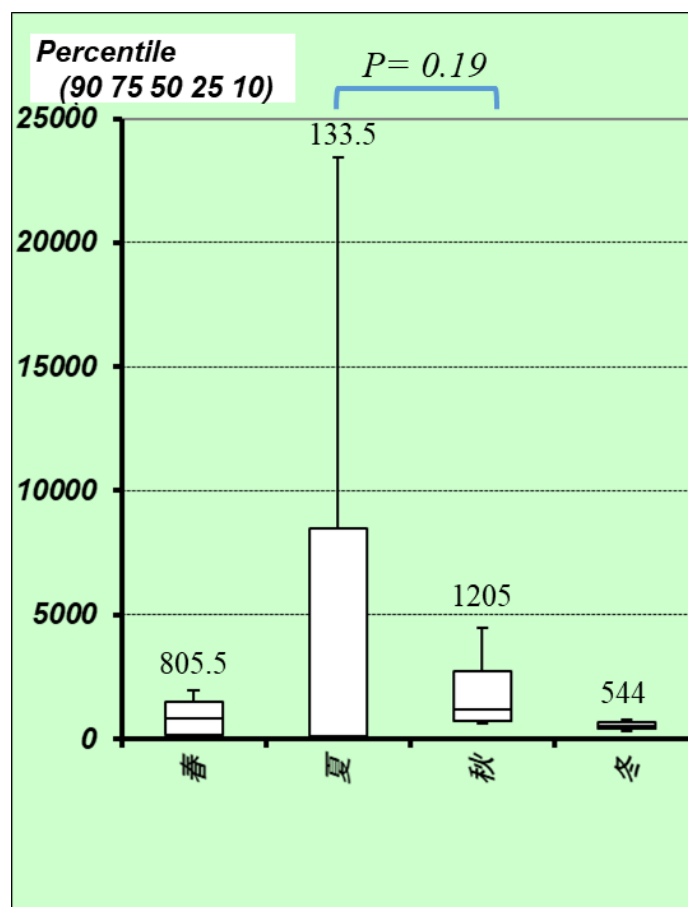
次に、季節ごとの小児ISSNS罹患児のアレルギー性疾患の合併数を示す(図3)。

季節毎のアレルギー性疾患の合併率に関しては、アレルギー性疾患合併率の最も高い冬(66.7%)と、アレルギー疾患合併率の最も低い秋(38.1%)の間で、有意差はなかった($P=0.24$)。



(図3) 季節毎のアレルギー性疾患合併数

(iv) 血清 IgE 値は、52 人中 19 人で測定されており、このうちアレルギー性疾患を合併しているのは 9 人 (47.4%)、中央値は 740 U/mL で、小児期の血清 IgE 基準値と比較して著明に高値であった¹³。季節毎の患児群における、それぞれの中央値 (範囲) は、春 805.5 U/mL (157-2393)、夏 133.5 U/mL (13-33364)、秋 1205 U/mL (500-6283)、冬 544 U/mL (256-832) であった (図 4)。最も高値である秋と、最も低値である夏において、血清 IgE の中央値を比較したが、統計学的有意差は見られなかった ($P=0.19$)。



(図 4) 季節毎の血清 IgE 中央値

(4) 考察

当科と栃木県内の3つの病院小児科において、小児ISSNS群の初発時の季節別発症数を検討した結果、有意差があり、秋に多く、冬に少ないという変動がみられた。

既報において、大阪およびその周辺地域の小児ISSNS発症数の季節変動に関する検討では、その発症頻度は統計学的に有意に冬に低く、春に高いという結果を報告している¹⁰。さらに、日本の単一の医療施設を対象とした疫学研究であるが、小児ISSNS症例の発症数の季節変動に関して、秋に多く、冬に少なかったとする報告がある¹¹。今回の研究とこれらの報告例との共通点は、冬に最も少なく、春あるいは秋に多い傾向があるという点である。

春や秋は、花粉症や気管支喘息などのアレルギー性疾患の発症あるいは増悪期にあたる¹⁴⁻¹⁵。小児ISSNSにおけるアレルギー性疾患の合併に関する報告は多く、その関連性は以前から指摘されているが⁷⁻⁹、今回の疫学調査では、小児ISSNS罹患児のアレルギー性疾患の合併率（46.2%）は一般幼児における合併率（36.7%）と比較し有意差はみられなかった¹³。これに関しては、今回の研究が後方視的な検討に基づくもので、診療録の記載漏れや、アレルギー性疾患の合併が見落とされていた症例が含まれていた可能性もある。このことは、血清IgEが高値を示した15例のうち、アレルギー性疾患と診断された既往がない例が約

50%（7例）含まれていたという結果からも示唆される。血清 IgE 値は、測定した 19 症例の 79%（15 名）で高値を示しており、これは、従来から小児 ISSNS の病態との関連が指摘されている Th2 優位の免疫状態を支持し、アトピー型のアレルギー性疾患との関連性を示唆するものであった¹⁶⁻¹⁷。さらに、小児 ISSNS 発症例における季節毎の血清 IgE 値を比較したが、有意差はなく、発症例における血清 IgE 値は季節に関係なく高値であった。このことは、小児 ISSNS の発症には季節変動があるものの、季節に関わらずその病態には血清 IgE が関与している可能性を示している。今後は患者各個人の血清 IgE 値の推移を季節毎に評価し、寛解状態と再発時の値の比較を行って、その関連性をさらに検討していく必要がある。

研究 1 で、小児 ISSNS の発症に気管支喘息や花粉症と同様の季節変動が存在するという結果を得た。また、小児 ISSNS 患者の血清 IgE 値は基準値に比べ高値を示す割合が高く、小児 ISSNS に何らかの免疫学的機序が関与している可能性を示唆している。小児 ISSNS において免疫学的機序の関与を示唆する根拠として、①ステロイドの他、シクロスポリン A、シクロフォスファミド、ミゾリビン、ミコフェノール酸モフェチル、リツキシマブといった免疫抑制薬で病勢が改善すること、②T 細胞機能を抑制する麻疹ウイルス感染で自然寛解例が報告されていること¹⁸、③ ISSNS 患児に T 細胞プロファイルの変化や機能異常

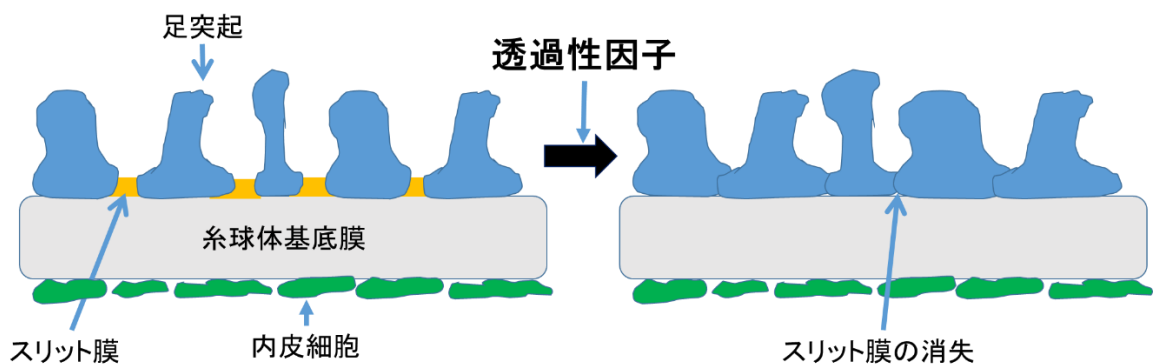
が報告されていること^{16,19-21}、が挙げられる。小児 ISSNS の本態が、糸球体濾過障壁の透過性の亢進により、大量の蛋白質が尿中に漏出することであることを考慮すれば、免疫学的異常を背景とした何らかの液性因子が糸球体濾過障壁の透過性に影響を及ぼしていることが疑われる。次の研究 2 では、その液性因子の探索を行った。

III. 研究2 小児 ISSNS の病態に影響を与える内的要因の検討

—病勢関連因子の同定—

背景

小児 ISSNS の本態は、糸球体濾過障壁の透過性の亢進により、大量の蛋白質が尿中に漏出することである。本症の原因として患者血清中に存在し、糸球体に作用する透過性因子（病因蛋白質）の存在が推定されており、これにより、糸球体の濾過障壁に変化が生じ、大量の蛋白尿が誘導されると考えられている（図5）。



（図5）透過性因子による糸球体濾過障壁の構造変化（MCNS）

実際、本症罹患児の腎臓を移植されたレシピエントが本症を呈さなかったこと、本症罹患児の末梢血リンパ球の培養上清をラットの腹腔内へ投与すると蛋白尿が誘導されたこと、等の報告からも、この糸球体透過性因子の存在は支持

されている²²⁻²⁵。しかし、この因子はいまだ同定されておらず、これまで、候補因子として、T細胞から分泌されている何らかの **Lymphokine** や、プロテアーゼである **Hemopexin** が報告されているが、最終確定していない²⁶。

このような背景から、我々は小児 **ISSNS** の病態に影響を与えうる内的要因を検索する目的で、プロテオミクス法を用い、小児 **ISSNS** の血清中蛋白質量変化の網羅的解析を行った。分解処理能に優れたプロテオミクス法を用いての小児 **ISSNS** の血中透過性因子を探索する研究はこれまでも存在するが、ネフローゼ症候群による二次的な変化を除外できていない²⁷⁻²⁸。このため、我々はネフローゼ症候群に伴う血中蛋白質の二次的変化要因を除外するため、対照群として **ISSNS** 以外のネフローゼ症候群の症例を設定し（表 3）、小児 **ISSNS** の急性期に特異的に上昇している蛋白質を分析した。

対象は当科で治療を行った小児 **ISSNS** 罹患の 33 名（**Group A**）で、**Group A** 群の共通のクライテリアは、1) **ISSNS** の診断基準（研究 1 と同一の基準）を満たすこと、2) 尿蛋白の選択指数が 0.1 未満であること、3) 研究参加前 1 週間に感染症罹患歴がないこと、4) 研究参加前 6 か月間は免疫抑制薬の使用経験がないことである。**Group A** 群をさらに次の 3 つの **Phase** に分けた。ステロイド治療導入前の **ISSNS** ネフローゼ期の患児 33 名（**Phase A1**）、ステロイド療法中（プレドニゾロン 2mg/kg/日、最大 60mg/日）寛解期の **ISSNS** 患児 33 名

(Phase A2)、ステロイド療法終了後寛解期 ISSNS 患児 12 名 (Phase A3)。

Phase A3 の患児がより少ないのは 33 名中 21 名がステロイド依存性となり、ステロイド療法が中止できなかつたためである。対照群とした Group B は正常尿所見の 15 名の児童からなり、Group C は ISSNS 以外のネフローゼ症候群に罹患中の患児 8 名からなる (Alport 症候群 1 名、ループス腎炎 1 名、紫斑病性腎炎 1 名、溶血性尿毒症症候群 1 名、IgA 腎症 1 名、非 IgA 腎症 1 名、膜性増殖性糸球体腎炎 type I が 2 名)。

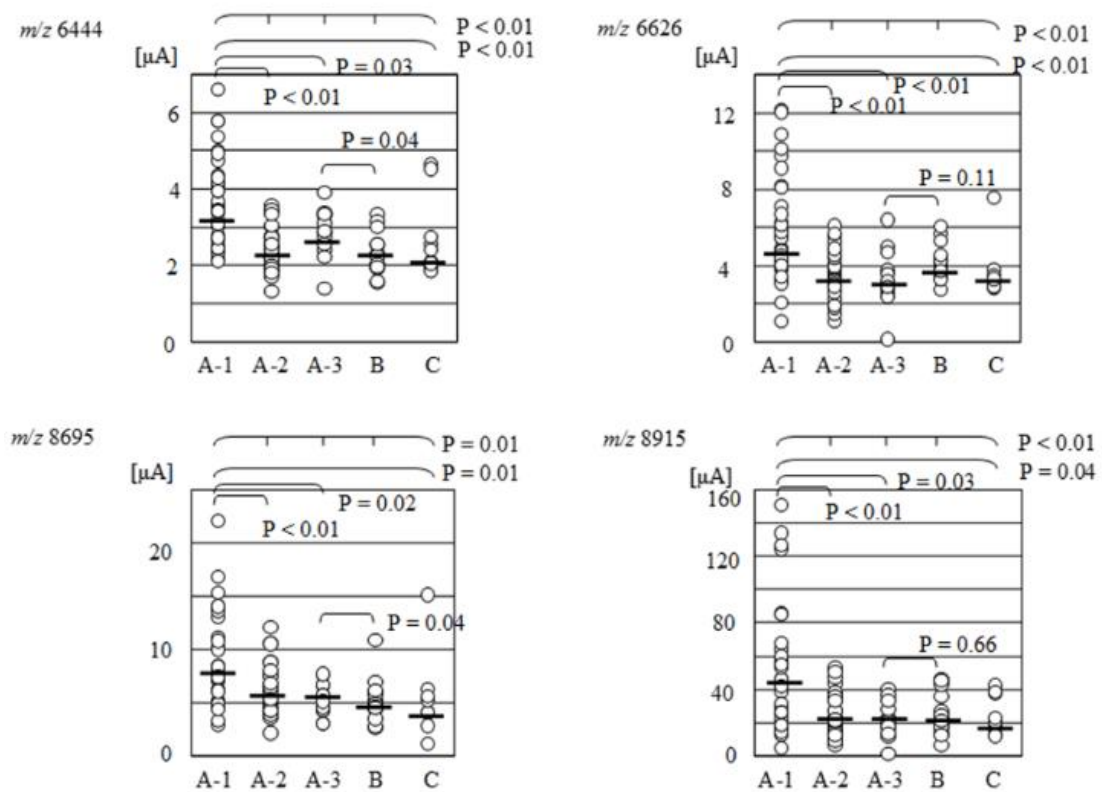
グループ	基準	数	男: 女	年齢中央 値 (範囲)	尿蛋白/尿Cr 平均値 (g/gCr)	血清Alb 平均値 (g/dL)	T. chol平均値 (mg/dL)
Group A Phase A1	ネフローゼ急性期 (ステロイド治療前)	33	21:12	7 (1-15)	8.3±7.5	2.5±1.1	319±145
Group A Phase A2	ステロイド治療下 寛解期	33	21:12	7 (1-15)		2.8±0.9	328±113
Group A Phase A3	ステロイド治療終了後寛 解期	12	8:4	6.5 (2-13)		4.0±0.4	155±20
Group B	尿所見正常群	15	7:8	5 (1-13)		4.6±0.2	176±3
Group C	ISSNS以外のネフローゼ 症候群急性期(治療前)	8	3:5	10 (4-14)	5.2±3.2	2.6±0.5	211±59

Cr、クレアチニン ; Alb、アルブミン ; T.chol、総コレステロール

(表 3) 対象とコントロールのプロファイル

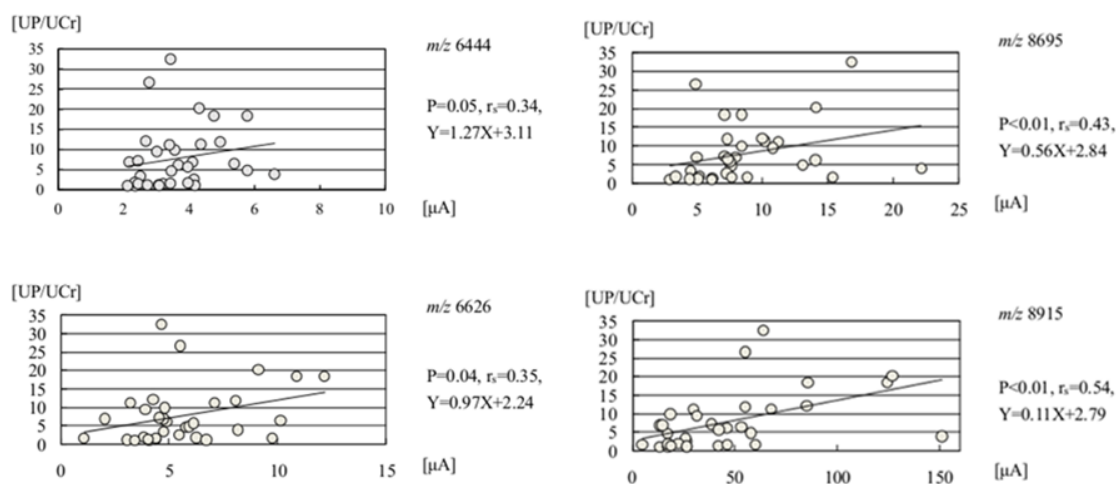
プロテオミクス法として、表面増強レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析法 (SELDI-TOF MS 法) を用いた。β2 ミクログロブリンの質量電荷比 (m/z) が 11117 であり、それ以上の分子量の物質は 2D-PAGE 法で比較的容

易に検出可能であること²⁹、また、SELDI-TOF MS 法は 20kDa 未満の低分子量領域の蛋白のプロファイリングに最も効果的であること³⁰、から、 m/z 2000-10000 の範囲で解析を行った。この結果、Phase A1 で特異的に上昇している 4 つのペプチドイオンを特定した²⁹ (図 6)。



(図 6) Phase A1 で特異的に上昇していたペプチドイオン

これらの候補ペプチドイオンのうち、 m/z 6626、8695、8915 に関しては、各ピークインテンシティとそれに対応する尿サンプルの尿蛋白/Cr 値との間に有意な相関がみられた (図 7) (それぞれ、 $P=0.04$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.01$)。

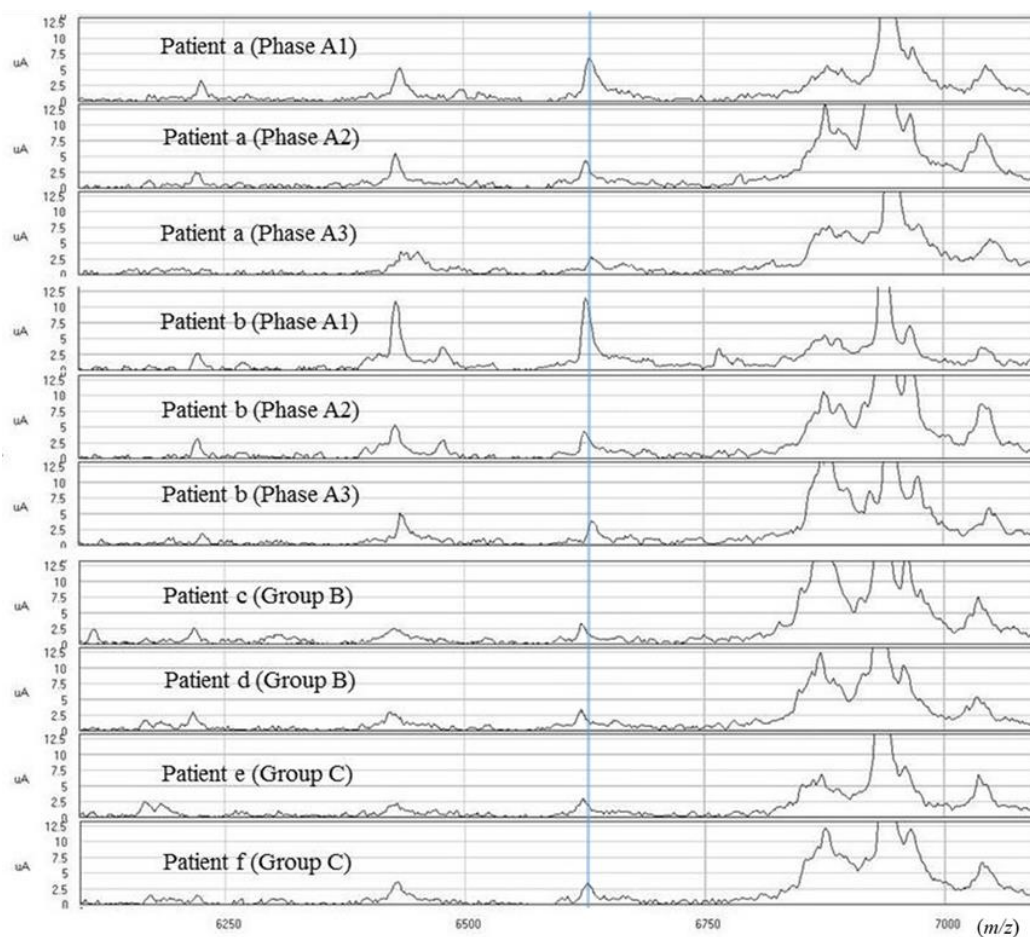


Up 尿中蛋白量 (mg/dL)、Ucr 尿中クレアチニン量 (mg/dL)

(図 7) ピークインテンシティと尿蛋白/Cr 値との相関図

このうちの 1 つ、 m/z 8695 は Apolipoprotein A2 (Apo A2) であることを既に同定しており、Apo A2 による IFN- γ 産生の抑制を介した小児 ISSNS の病態形成への関与の可能性を報告した²⁹。今回、さらに、候補となる残りの 3 つのペプチドのうち、各対照群と比較した際の P 値が全て <0.01 と最も低値で、尿蛋白/尿 Cr 値と正の相関を示したペプチドイオンである、 m/z 6626 の精製同定を

行うこととした。 m/z 6626 の SELDI-TOF MS 法解析によるピークを図 8 に示す。

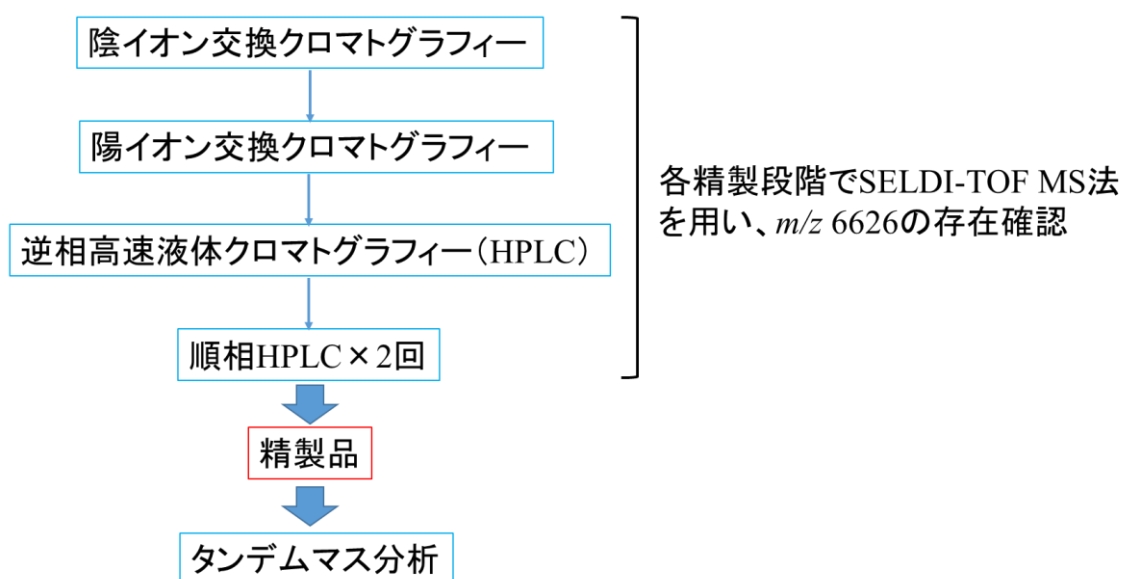


(図 8) m/z 6626 を示すピーク

(研究 2-1) 小児 ISSNS の病勢にかかわる内的要因の候補因子の精製・同定

(1) 方法

本研究で行った、 m/z 6626 の精製・同定過程の概略を図 9 に示す。



(図 9) 精製・同定過程の概略

① 候補ペプチドイオンの精製と同定

I. イオン交換クロマトグラフィー（陰イオン交換カラム）による分画

候補ペプチドイオン (m/z 6626) の由来蛋白質を同定するために、以下の方法により精製作業を行った。

ヒト血清サンプル 100 μ L を、50 mM Tris buffer (pH 9.0) と 0.1% オクチルグルコ

シド(OG) (洗浄液) で 5 倍に希釈し、陰イオン交換カラム (Q Sepharose Fast Flow; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いたイオン交換クロマトグラフィーに供した。カラムに pH 値の異なるバッファー (洗浄液、50 mM Phosphate buffer (pH 7)+OG、50 mM Phosphate buffer (pH 6)+OG、50 mM Acetate buffer (pH 5)+OG、50 mM Acetate buffer (pH 4)+OG、50 mM Citrate buffer (pH 3)+OG、33.3% IsoProOH/16.7%ACN/0.1%TFA (有機溶媒)) を順次加え、溶出物質を分画した。これらを Q10 ProteinChip® (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA、強陰イオン交換チップ)を用いて SELDI-TOFMS で解析し、どの画分に目的とするペプチドイオン (m/z 6626) が存在するかを確認した。

II. イオン交換クロマトグラフィー (陽イオン交換カラム) による分画

陰イオン交換カラムを用いて得られた精製画分を 10%酢酸溶液で pH4.0 に調整した。これを陽イオン交換カラム(CM Sepharose Fast Flow; GE Healthcare, Little Chalfont, UK)を用いたイオン交換クロマトグラフィーに供した。カラムに NaCl 濃度の異なる各バッファー (10% Acetate buffer (pH 4.0)、0.1 M NaCl in 50 mM Acetate buffer (pH 4)+OG、0.2 M NaCl in 50 mM Acetate buffer (pH 4)+OG、0.3 M NaCl in 50 mM Acetate buffer (pH 4)+OG、0.5 M NaCl in 50 mM Acetate buffer (pH 4)+OG、1.0 M NaCl in 50 mM Acetate buffer (pH 4)+OG、有機溶媒+OG) を順次

加え、溶出物質を分画した。各画分を NP20 ProteinChip® (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA、順相チップ) を用いた SELDI-TOF MS で分析し、どの画分に目的とするペプチドイオンが存在するかを確認した。

III. 逆相 HPLC による精製

陽イオン交換カラムを用いて得られた精製画分を逆相 HPLC カラム (2 × 100 mm columns, TSK-GEL Super ODS; TOSOH, Tokyo, Japan) に注入し、逆相 HPLC (移動相 (溶媒 A) 0.1% トリフルオロ酢酸、(溶媒 B) 90% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸、グラジエント 0-30% (5 分)-70%B (40 分)、流速 200 μL/min、検出 UV 210 nm) で分離精製を行った。各画分を NP20 ProteinChip®を用いた SELDI-TOF MS にて分析し、どの画分に目的とするペプチドイオンが存在するかを確認した。

IV. 順相 HPLC による精製

逆相 HPLC で得られた画分を順相 HPLC カラム (2 × 150 mm columns, TSK-GEL Amide-80; TOSOH, Tokyo, Japan) に注入し、順相 HPLC (移動相 (溶媒 A) 0.1% トリフルオロ酢酸、(溶媒 B) 90% アセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸、グラジエント 100%-90% (5 分) -70%B (40 分)、流速 200 μL/min、検出 UV 210

nm) で分離精製を行った。各画分を NP20 ProteinChip[®]を用いて SELDI-TOF MS にか、どの画分に目的とするペプチドイオンが存在するかを確認した。

V. ペプチドイオンの同定

以上の方法で精製した、順相 HPLC の画分をタンデムマス分析に供した。質量分析装置として Q-ToF Ultima API (Waters Micromass, UK)、イオン化方式として Nanoflow-LC ESI in positive mode を用いた。タンデムマス分析で得られたイオンデータを Mascot Search[®] (Matrix Science Ltd., London, UK)にてデータベース検索を実施した。データベースは NCBI nr を用い、生物種は “All” を採用して検索を実施した。閾値 (56) を越えたスコアを示すタンパク質を同定タンパク質とした。

② SELDI-TOF MS 法による、*m/z* 6626 の存在確認

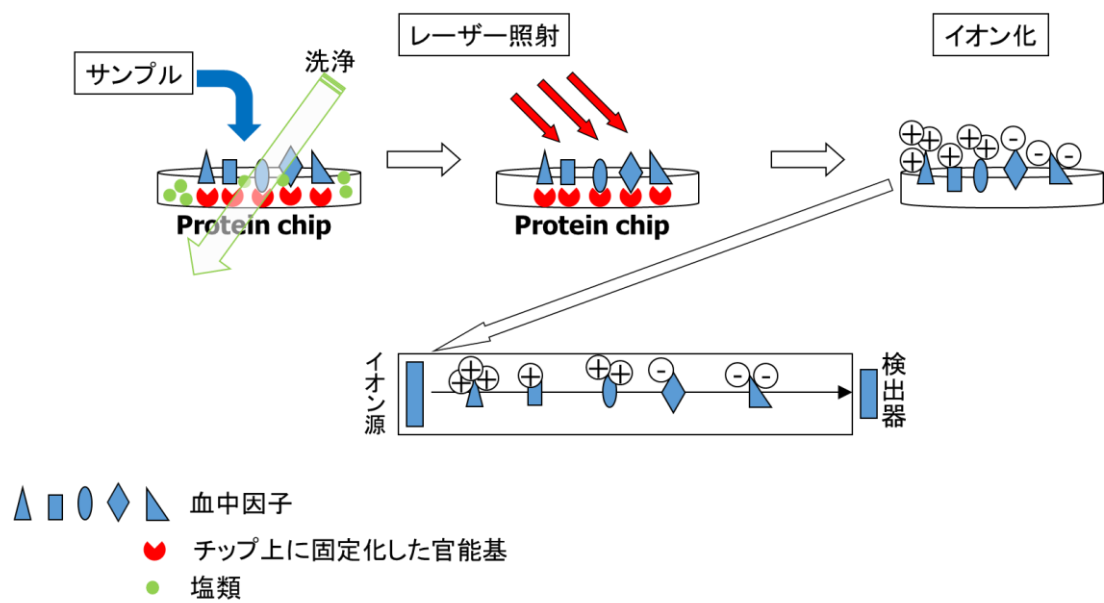
クロマトグラフィーによる精製過程において、SELDI-TOF MS による、目的ペプチドイオン (*m/z* 6626) の存在確認を行った。

I. Q10 ProteinChip[®] (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA、強陰イオン交換チップ) には、結合洗浄バッファーとして 50mM Tris-HCl (pH 9)を、マトリックスとして 50%飽和シナピン酸を用いた。Q10 ProteinChip を平衡化 (結合洗浄バッファーを 5 μ L 添加し、5 分間振盪した後、超純水で洗浄する作業を計 3 回) した後、各精製画分を結合洗浄バッファーで 5 倍希釈

し、Q10 ProteinChip に 5 μ L 添加後、30 分間インキュベーションした。続いて、結合洗浄バッファーを用いて洗浄し (5 μ L、5 分間、計 3 回)、余計な塩分や、ProteinChip に結合していない蛋白、ペプチドを除去した。この後、ProteinChip にマトリックス添加を 1 μ L 添加後、表面を乾燥固定した。

II. NP20 ProteinChip® (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA、順相チップ) には、マトリックスとして 50%飽和シナピン酸を用いた。各精製画分を 50%飽和シナピン酸で 10 倍希釈し、1 μ L 添加後、ProteinChip 表面を乾燥固定した。続いて、マトリックスを 1 μ L 添加し、ProteinChip 表面を乾燥固定した。

以上の手順で作成したチップの測定解析は ProteinChip SELDI system (model PCS 4000; Bio-Rad、測定範囲 m/z 0-200000 (Focus mass = m/z 7000)、Laser Intensity 3000) と ProteinChip Data Manager Software (Bio-Rad)を用いて行った。SELDI-TOF MS system の測定原理を図 10 に示す³⁰。作成したチップ上に窒素レーザー (337nm) を照射し、結合捕捉されている物質をイオン化する。それぞれのペプチドイオンの質量/電荷比 (m/z) の違いから生じる飛行時間の差を利用して質量分析を行う。

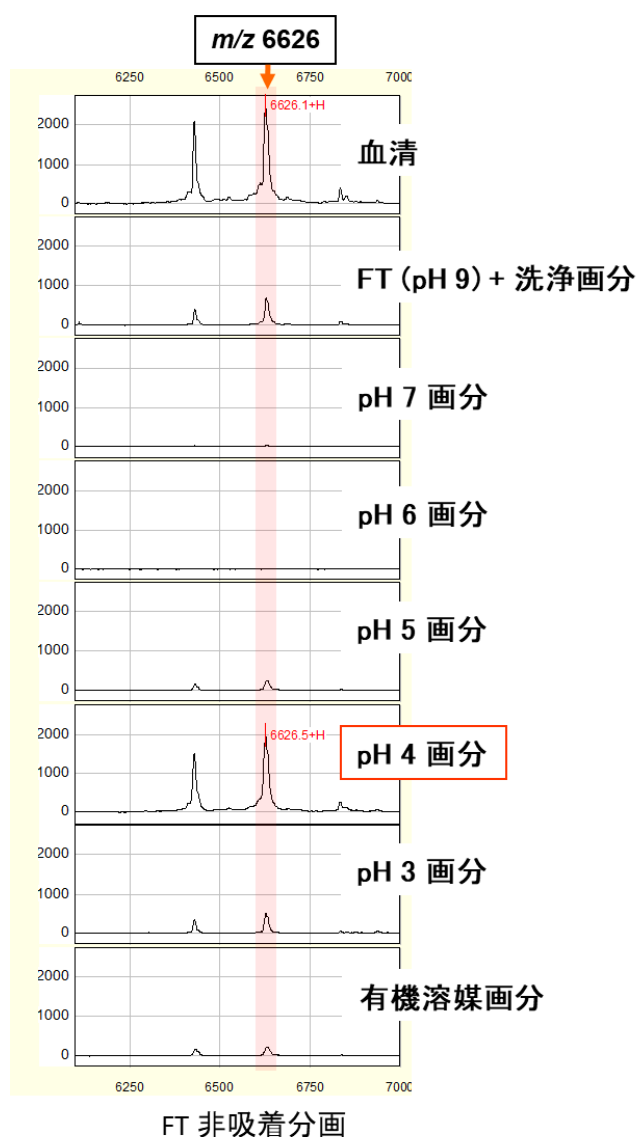


(図 10) SELDI-TOF MS 法

(2) 結果

I. イオン交換クロマトグラフィー（陰イオン交換カラム）による分画

蛋白の等電点の違いを利用し、異なる pH 値のバッファーを用いて得られた各溶出画分を SELDI-TOF MS にかけての結果、目的とするペプチドイオン (m/z 6626) は 50 mM Acetate buffer (pH 4.0)+OG で溶出した画分に最も含まれていた (図 11)。

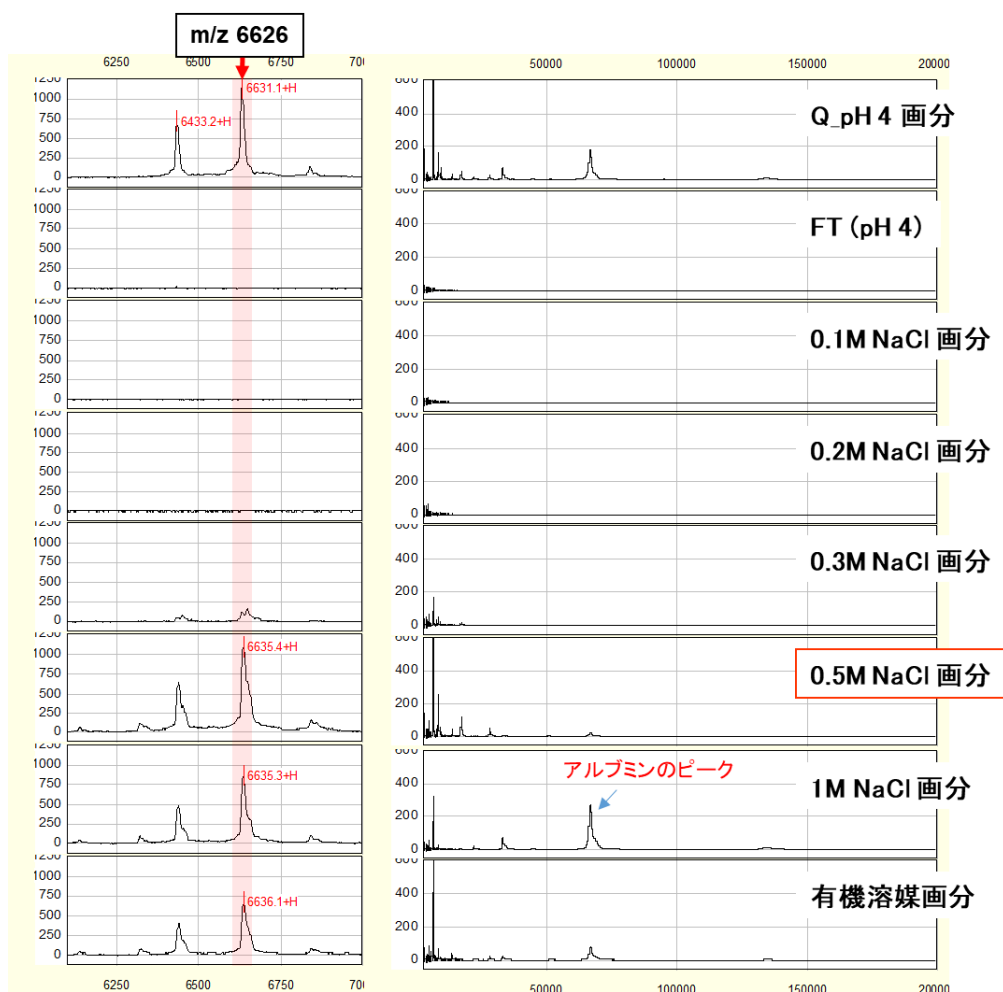


(図 11) 陰イオン交換カラムによる分離と SELDI-TOF MS による解析結果

同画分を、引き続き陽イオン交換カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーに供した。

II. イオン交換クロマトグラフィー（陽イオン交換カラム）による分画

蛋白のイオン強度の違いを利用し、異なる NaCl 濃度のバッファーを用いて得られた各溶出画分を SELDI-TOF MS にかけての結果、目的とするペプチドイオン (m/z 6626) は、0.5M-1M NaCl の溶出画分に目的ピークを確認した (図 12)。

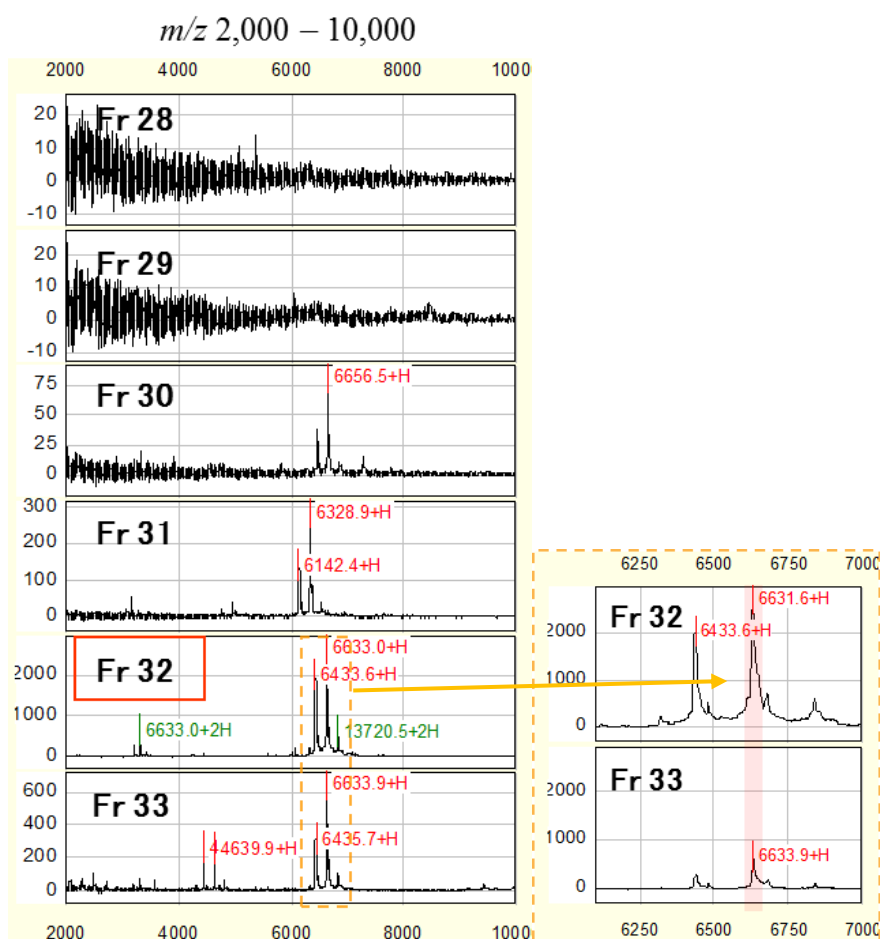


(図 12) 陽イオン交換カラムによる分離と SELDI-TOF MS による解析結果

さらに精製を進めるため、0.5-1.0M NaCl 溶出画分のうち、アルブミン含量の低い 0.5M NaCl 画分を引き続き、逆相 HPLC に供した。

III. 逆相 HPLC による精製

アセトニトリル濃度勾配にて溶出した各画分を SELDI-TOF MS にて分析した結果を図 13 に示す。

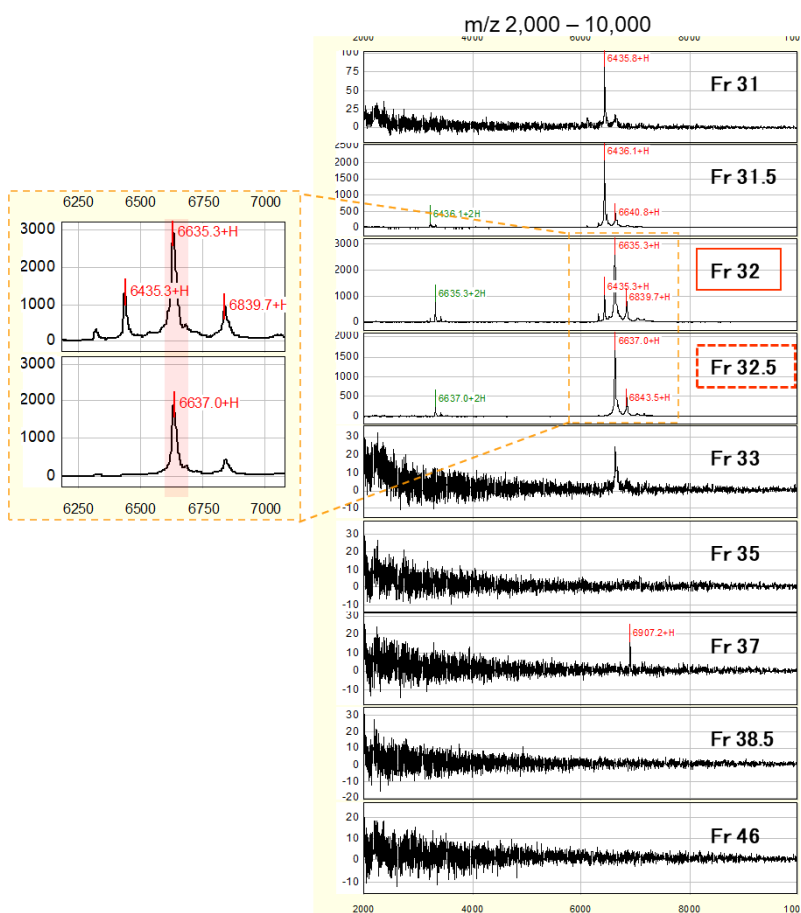


(図 13) 逆相 HPLC による分離と SELDI-TOF MS による解析結果

目的とするペプチドイオン (m/z 6626) のピークを主に Fr 32 に確認することができた。同画分には、 m/z 6433.6 のピークが含まれていたことから、続いて順相 HPLC で更なる精製を行った。

IV. 順相 HPLC による精製

逆相 HPLC の Fr 32 を順相 HPLC に供し、得られた各画分を SELDI-TOF MS で分析した結果を図 14 に示す。

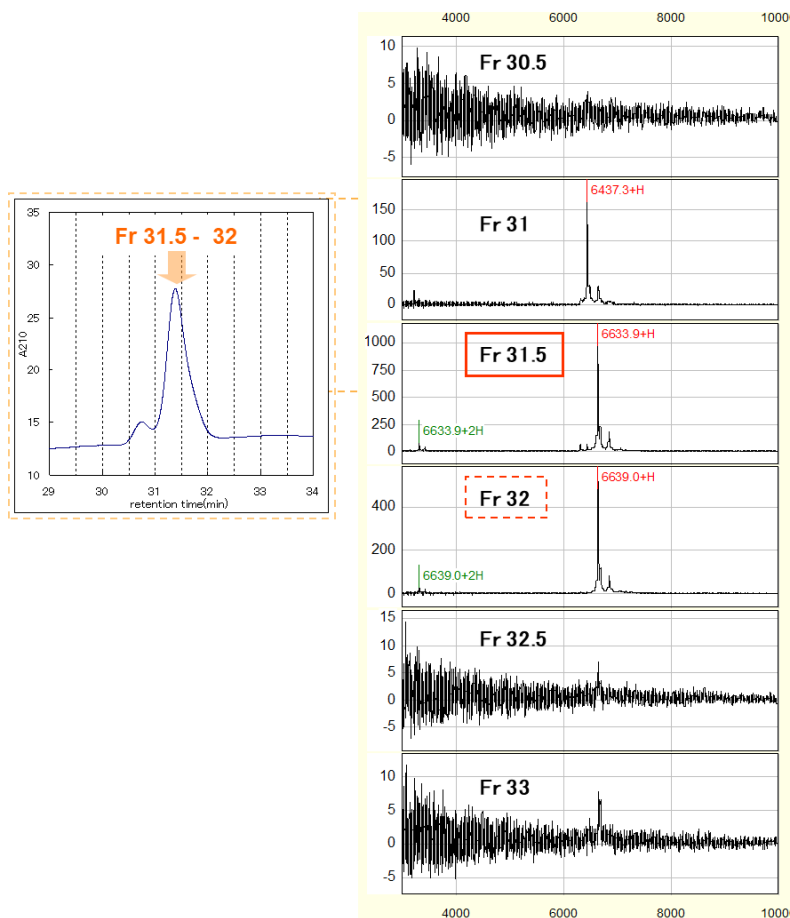


(図 14) 順相 HPLC による分離と SELDI-TOF MS による解析結果

目的とするペプチドイオン (m/z 6626) のピークは、Fr 32-32.5 に確認することができた。Fr 32 には、 m/z 6435.3 と m/z 6839.7 のピークが含まれていたため、2 回目の順相 HPLC で Fr 32 の精製を行った。

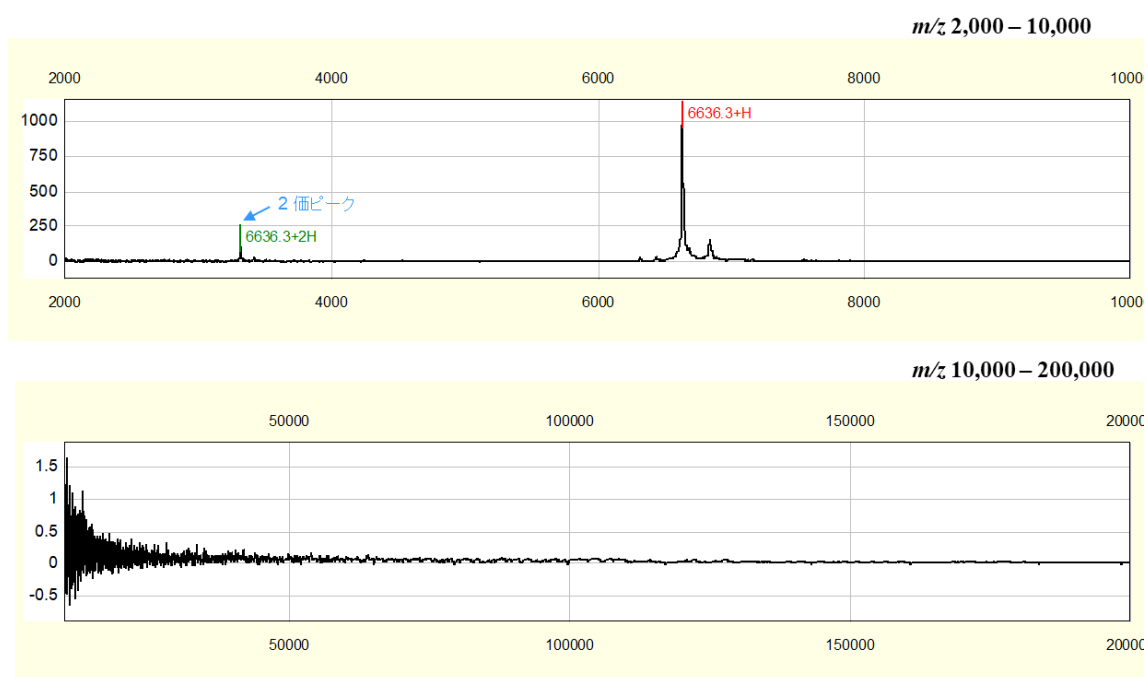
V. 2 回目の順相 HPLC による精製

1 回目と同様の方法で 2 回目の順相 HPLC を実施した。これにより得られた画分を SELDI-TOF MS にて解析し、得られた結果を図 15 に示す。



(図 15) 2 回目の順相 HPLC による分離と SELDI-TOF MS による解析結果

目的とするペプチドイオン (m/z 6626) のピークは、Fr 31.5-32 で確認することができた。このうち、 m/z 6626 のピーク強度は Fr 31.5 でより高値であったことから、1 回目の順相 HPLC の Fr 32.5 と 2 回目の順相 HPLC の Fr 31.5 を合わせたものを精製品とした。精製品の SELDI-TOF MS による純度検定結果を図 16 に示す。



(図 16) 精製品の SELDI-TOF MS による解析結果

m/z 2000~100000 の範囲で単一のピークを示した。この結果から、目的ピークを単一成分として分離精製することができたと判断し、本精製品をタンデムマス分析同定用サンプルとした。

VI. ペプチドイオンの同定

閾値 (56) を越えたスコアを示すタンパク質を同定タンパク質とした。この結果、407 の高スコアでヒト Apolipoprotein C1 (Apo C1) がヒットした。閾値を超える候補はこれのみであり、 m/z 6626 を Apo C1 であると同定した。

(研究 2 - 2) 小児 ISSNS とその他のネフローゼ症候群との血清 ApoC1 値の比較検討

(1) 背景

研究 2 - 1 で、小児 ISSNS 急性期の血中蛋白を網羅的に検索した結果、Apo C1 の発現強度が特異的に上昇していることを明らかにした。一方で、実際の基準範囲や二次性ネフローゼ症候群の急性期と比較してどの程度上昇しているのかを確認する必要があると考え、研究 2 - 2 では、小児 ISSNS 急性期の血中 Apo C1 濃度を測定し、その基準範囲や ISSNS 以外のネフローゼ症候群の急性期との比較を行った。

(2) 方法

① 対象とコントロール

血中 Apo C1 値は、先行研究の際に採取した血清のうち、残りがある症例を対象に測定した。その内訳は、Phase A1 の 11 名、Group C の 7 名であった (表 4)。これらの 2 つのグループは年齢や性別比で有意差は見られなかった (それぞれ、 $P=0.97$ 、 $P=0.78$)。また、この 2 グループ間で尿蛋白/尿 Cr 値や血清 Alb 値、総コレステロール値に有意差はなかった (それぞれ、 $P=0.99$ 、 $P=0.21$ 、 $P=0.33$)。

グループ	基準	数	男：女	年齢中央値 (範囲)	尿蛋白/尿Cr 平均値 (g/gCr)
Phase A1	ネフローゼ症候群急性期 (治療前)	11	7:4	7 (1-13)	10.7
Group C	ISSNS以外のネフローゼ 症候群急性期(治療前)	7	4:3	10 (4-15)	10.6

(表 4) 対象のプロファイル

② 測定方法

Human Apolipoprotein C-I ELISA Kit (Assaypro LLC, USA) を用いた ELISA 法により、2 群のサンプルの血中 Apo C1 値を測定した。ELISA 法の測定原理としてサンドウィッチ法を用いた。それぞれのサンプルを希釈液 (EIA Diluent Concentrate; Assaypro LLC) を用いて 100 倍希釈した後、各ウェルに 50 μ L ずつ注入し 2 時間室温で静置した。洗浄液 (Wash Buffer Concentrate; AssayPro LLC) 300 μ L でプレートを 6 回洗浄した後、ビオチン化抗体 (Biotinylated Apo C-I Antibody; Assaypro LLC) を 50 μ L ずつ各ウェルに注入し、室温下で 2 時間静置した。洗浄液でプレートを洗浄後、ストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ複合体 (Streptavidin-Peroxidase Conjugate; AssayPro LLC) 50 μ L をそれぞれのウェルに注入し、室温下で 30 分静置した。洗浄液でプレートを洗浄後、ペルオキシダーゼ酵素基質 (Chromogen Substrate; AssayPro LLC) 50 μ L を各ウェルに注入し、室温下で 30 分間静置した。停止液 (Stop Solution; Assaypro LLC) 50 μ L を各ウ

エルに注入後、450 nm の波長に対する吸光度をマイクロプレートリーダー (Benchmark Plus Microplate Reader; Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて測定した。

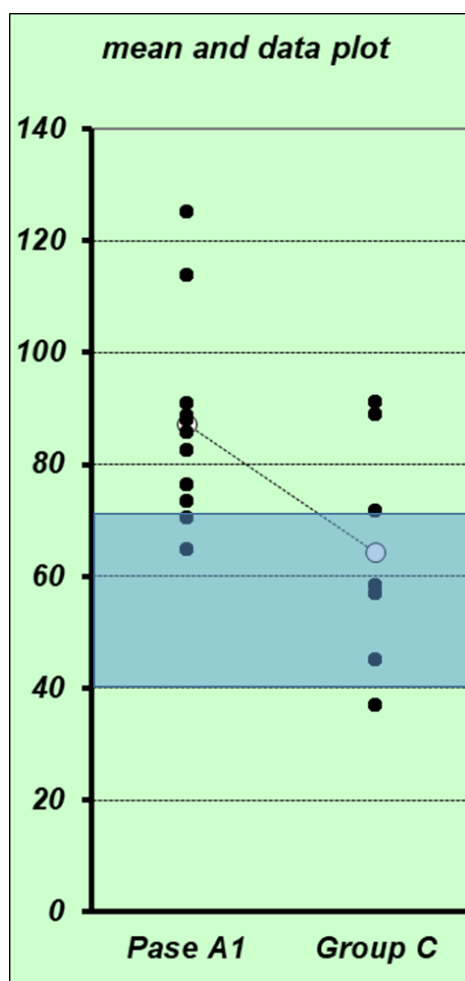
③ 統計解析法

Phase A1 と Group C 間の血中 Apo C1 値の比較には Student's t 検定を用いた。

P 値は 0.05 未満を有意差ありと判断した。

(3) 結果

血中 Apo C1 値の平均値は Phase A1 で Group C と比較し有意に高値であった (87 ± 18 μg/mL vs. 64 ± 21 μg/mL, $P < 0.05$)。図 17 に結果を示す。白丸が平均値で、水色の帯が血清 Apo C1 の基準範囲である。Phase A1 の血中 Apo C1 値の平均は基準値である 40-70 μg/mL よりも高値である一方で、Group C では基準範囲内であった。



(図 17) 血清 Apo C1 値

考察

小児 ISSNS の急性期 (Phase A1) に血中濃度が上昇する蛋白として、Apo C1 を同定し、そのペプチドイオンのインテンシティレベルは尿蛋白/Cr 値と相関していることを示した。この結果から、血中 Apo C1 値の上昇は、ネフローゼ症候群で見られる高脂血症による二次的なものではない、と判断した。我々の知る限り、今回の報告は、Apo C1 と小児 ISSNS の病勢との関連を示した初めてのものである。

Apo C1 は、57 のアミノ酸からなる最も小さなアポリポ蛋白 (6.6 kDa) であり、カイロミクロンや VLDL、HDL といったリポ蛋白を構成し、脂質の代謝に関与する³¹⁻³²。腎への作用として、糖尿病患者の腎症進展に関わる因子であること³³、その多型性が糖尿病腎症発症のリスクを増大させること³⁴⁻³⁵、が報告されているが、小児 ISSNS の病態との関連を示す報告はこれまでない。

この他に生体内での役割として、単球がマクロファージに分化する際に Apo C1 の mRNA の転写が促進すること、また、Apo C1 がマクロファージの炎症性サイトカイン産生を促すこと、が知られている^{33, 36}。小児 ISSNS のネフローゼ期にマクロファージの活性化を示唆する報告は既にあり³⁷⁻³⁸、小児 ISSNS のネフローゼ期における血中 Apo C1 値の上昇は、マクロファージの活性化を反映しているのかもしれない。我々もこれまでの研究において、小児 ISSNS 症例のス

ステロイド療法中には、ステロイド終了後寛解期と比較し、血清 Macrophage Inflammatory Protein-1 β (MIP-1 β) 量が有意に上昇していることを報告した³⁹。また、Schlecker ら⁴⁰は MIP-1 β を腫瘍内注入することにより調節性 T 細胞 (Treg 細胞) の腫瘍内浸潤数を増多させることを示した。このことはマクロファージから産生される MIP-1 β が、Treg 細胞の遊走作用を有していること示唆している。一方で、Treg 細胞は、その T 細胞増殖抑制効果が小児 ISSNS の再発時に低下しており、病態との関連が示唆されている¹⁹。これらの事実から、小児 ISSNS のネフローゼ期におけるマクロファージの活性化は、MIP-1 β の産生を増加させ、Treg 細胞の遊走を促し、その作用を増強させることで ISSNS を寛解状態に導入している可能性があり、小児 ISSNS 急性期の血清 Apo C1 値の上昇はマクロファージの活性化を反映したものである可能性が考えられる。

推定される第 2 のメカニズムとして、type 2 ヘルパー T 細胞 (Th2 細胞) 優位な免疫状態への誘導作用が考えられる。小児 ISSNS 患児はアトピー性疾患を高率に合併する⁴¹。アトピー性疾患は Th2 優位な免疫状態で特徴づけられ⁴²、Th2 細胞は小児 ISSNS の病態形成において重要な役割を担っている可能性が示唆されている⁴³。Nagelkerken ら³²は肝と皮膚にヒト Apo C1 を発現させたトランスジェニックマウスがアトピー性皮膚炎の症状を呈したと報告しており、Apo C1 の過剰発現が Th2 優位の免疫状態を誘導した結果ではないかと推定している。

同様に、小児 ISSNS においても Apo C1 が Th2 優位の免疫状態を誘導することで、その病態形成に関与している可能性が考えられる。また、我々は先の研究において、 m/z 8695 のペプチドイオンを Apo A2 由来であることを同定した²⁹。Apo A2 は CD4⁺T 細胞におけるインターフェロン γ (IFN- γ) の産生を阻害し Th2 優位な免疫状態に導きうる⁴⁴。このように、小児 ISSNS の病態において Apo C1 は Apo A2 とともに Th2 優位な免疫状態に誘導している可能性がある。

推定される第3のメカニズムとして、リポポリサッカライド (LPS) を介した作用を挙げる。LPS を投与されたマウスでは、その足細胞上に CD80 を発現し、足突起の融合を来して蛋白尿が誘導されることが報告されている⁴⁵。一方で、Berbée ら⁴⁶は、Apo C1 が LPS と結合し、LPS が誘導する生体反応を促進することを示した。これらことから、Apo C1 が LPS の反応を介し足細胞上の CD80 の発現を誘導して小児 ISSNS の病態形成に関わっている可能性が疑われる。また、LPS はマクロファージを刺激して Th2 サイトカインの産生を促進する作用がある⁴⁷。この LPS の作用を Apo C1 が促進し、さらに Th2 優位な免疫状態に誘導することで、小児 ISSNS の病態形成に関わっているのではないかと考えた。

VII. 結論

今回、小児 ISSNS の病態に影響を与える外的・内的要因に関する検討を行った。外的要因として発症時の季節変動を認め、秋に多いこと、内的要因として、急性期において血中 Apo C1 値が上昇すること、そして血中 Apo C1 値は尿蛋白/Cr 値と相関し、病勢と相関があることを確認した。Apo C1 は、ヘルパー T 細胞のプロファイルに影響を与え、Th2 優位の免疫状態を誘導している可能性もあり、この場合、IgE が関与するアレルギー性疾患の病態とも関係してくる。このように、今回の研究で確認された小児 ISSNS の病態に影響を与えうる外的・内的要因には関連性が示唆される。今回得られた知見から、今後は、Apo C1 の作用によるヘルパー T 細胞のプロファイルの変化の検証と、その変化が小児 ISSNS のネフローゼ期で確認され、寛解期に改善するのかが確認することが必要である。

また、今回の研究では、対照群の症例数が比較的少ないため、今後さらに症例数を増やして再検討を行っていきたい。

今回得られた知見は、今後、小児 ISSNS の病態生理を解明していく上で重要な手がかりとなる可能性がある。

VIII. 参考文献

- (1) 日本小児腎臓病学会編集。小児特発性ネフローゼ症候群診療ガイドライン 2013。
- (2) 厚生労働省難治性疾患克服研究事業進行性腎障害に関する調査研究班。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。
- (3) Hahn D, Hodson EM, Willis NS, Craig JC. Corticosteroid therapy for nephrotic syndrome in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 3:CD001533, 2015.
- (4) Tarshish P, Tobin JN, Bernstein J, Edelmann CM Jr. Prognostic significance of the early course of minimal change nephrotic syndrome: report of the International Study of Kidney Disease in Children. *J Am Soc Nephrol.* 8:769-76, 1997.
- (5) Vogt AB, Avner DE. Nephrotic syndrome. In: Kliegman MR, Jenson BH, Behrman ER, Stanton FB, editors. *Nelson textbook of pediatrics.* 18th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. p. 2190–5.
- (6) 張田豊。ネフローゼ症候群の発症機序。日本小児科学会雑誌。120:1186-94, 2016。
- (7) Abdel-Hafez M, Shimada M, Lee PY, Johnson RJ, Garin EH. Idiopathic nephrotic syndrome and atopy: is there a common link? *Am J Kidney Dis.* 54:945-53, 2009.
- (8) Lin CY, Lee BH, Lin CC, Chen WP. A study of the relationship between childhood

- nephrotic syndrome and allergic diseases. *Chest*. 97:1408-11, 1990.
- (9) Meadow SR, Sarsfield JK. Steroid-responsive nephrotic syndrome and allergy. *Arch Dis Child*. 56:509-16, 1981.
- (10) 里村憲一、中島滋郎、山本勝輔、松本小百合、西垣敏紀、島雅昭、藪田玲子、蘆野伸彦、山本威久、平田良、阪田まり子、中川喜美子、有田耕司、下辻常介、大藪恵一。小児期ステロイド感受性ネフローゼ症候群における発症・再発の季節性。日本小児科学会雑誌。109:650-53, 2009。
- (11) Toyabe S, Nakamizo M, Uchiyama M, Akazawa K. Circannual variation in the onset and relapse of SSNS. *Pediatr Nephrol*. 20:470-73, 2005.
- (12) 岩田力。小児アレルギーの疫学。治療。5:1778-83, 2007。
- (13) 小林茂俊。総 IgE 値と特異的 IgE 抗体価の意味するところ。小児内科。36:558-61, 2004。
- (14) 近藤富雄、安田寛二、西田隆、他。気管支喘息発作における気象因子の検討 発作当日の気象因子との関連。アレルギーの臨床。10:189-92, 1990。
- (15) 西間三馨。学校のアレルギー疾患のガイドライン。日本小児科学会雑誌。113:1545-56, 2009。
- (16) Kanai T, Shiraishi H, Yamagata T, Ito T, Odaka J, Saito T, Aoyagi J, Momoi MY. Th2 cells predominate in idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Exp*

Nephrol. 14:578-83, 2010.

- (17) 榎本雅夫、程雷、白河太郎。Th1/Th2 theory のアレルギー性鼻炎、喘息への確証。 *Prog Med.* 24:3167-72, 2004。
- (18) Lin CY, Hsu HC. Histopathological and immunological studies in spontaneous remission of nephrotic syndrome after intercurrent measles infection. *Nephron.* 42:110-5, 1986.
- (19) Araya C, Diaz L, Wasserfall C, Atkinson M, Mu W, Johnson R, Garin E. T regulatory cell function in idiopathic minimal lesion nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 24:1691-8, 2009.
- (20) Van den Berg JG, Weening JJ. Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Sci (Lond).* 107:125-36, 2004.
- (21) Shao XS, Yang XQ, Zhao XD, Li Q, Xie YY, Wang XG, Wang M, Zhang W. The prevalence of Th17 cells and FOXP3 regulate T cells (Treg) in children with primary nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 24:1683-90, 2009.
- (22) Maruyama K, Tomizawa S, Shimabukuro N, Fukuda T, Johshita, T, Kuroume T. Effect of supernatants derived from T lymphocyte culture in minimal change nephrotic syndrome on rat kidney capillaries. *Nephron.* 51:73-6, 1989.
- (23) Ali AA, Wilson E, Moorhead JF, Amlot P, Abdulla A, Fernando ON, Dorman A,

- Sweny P. Minimal-change glomerular nephritis. Normal kidneys in an abnormal environment? *Transplantation*. 58:849-52, 1994.
- (24) Glassock RJ. Circulating permeability factors in the nephrotic syndrome: a fresh look at an old problem. *J Am Soc Nephrol*. 14:541–3, 2003.
- (25) Brenchley PE. Vascular permeability factors in steroid-sensitive nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 18 :vi21–5, 2003.
- (26) McCarthy ET, Sharma M, Savin VJ. Circulating Permeability Factors in Idiopathic Nephrotic Syndrome and Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 5:2115-21, 2010.
- (27) Andersen RF, Palmfeldt J, Jespersen B, Gregersen N, Rittig S. Plasma and urine proteomic profiles in childhood idiopathic nephrotic syndrome. *Proteomics Clin Appl*. 6:382-93, 2012.
- (28) Khurana M, Traum AZ, Aivado M, Wells MP, Guerrero M, Grall F, Libermann TA, Schachter AD. Urine proteomic profiling of pediatric nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 21:1257–65, 2006.
- (29) Kanai T, Yamagata T, Ito T, Odaka J, Saito T, Aoyagi J, Mariko Y, Momoi. Apolipoprotein AII levels are associated with the UP/UCr levels in idiopathic steroid-

sensitive nephrotic syndrome. *Clin Exp Nephrol.* 19:107–13, 2015.

- (30) Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D. The SELDI-TOF MS Approach to Proteomics: Protein Profiling and Biomarker Identification. *Biochem Biophys Res Commun.* 292:587–92, 2002
- (31) Jong MC, Willems Van Dijk K, Dahlmans VE, Van Der Boom H, Kobayashi K, Oka K, Siest G, Chan L, Hofker MH, Havekes LM. Reversal of hyperlipidaemia in apolipoprotein C1 transgenic mice by adenovirus-mediated gene delivery of the low-density-lipoprotein receptor, but not by the very-low-density-lipoprotein receptor. *Biochem. J.* 338:281–7, 1999.
- (32) Nagelkerken L, Verzaal P, Lagerweij T, Persoon-Deen C, Berbée JF, Prens EP, Havekes LM, Oranje AP. Development of atopic dermatitis in mice transgenic for human apolipoprotein C1. *J Invest Dermatol.* 128:1165–72, 2008.
- (33) Bus P, Pierneef L, Bor R, Wolterbeek R, van Es LA, Rensen PC, de Heer E, Havekes LM, Bruijn JA, Berbee JF, Baelde HJ. Apolipoprotein C-I plays a role in the pathogenesis of glomerulosclerosis. *J Pathol.* 241:589-99,2017.
- (34) Mooyaart AL, Valk EJ, van Es LA, Bruijn, J. A, de Heer E, Freedman BI, Dekkers OM, Baelde HJ. Genetic associations in diabetic nephropathy: a metaanalysis. *Diabetologia.* 54:544-553, 2011.

- (35) McKay GJ, Savage DA, Patterson CC, Lewis G, McKnight AJ, Maxwell AP. Association analysis of dyslipidemia-related genes in diabetic nephropathy. *PLoS One*. 8:e58472, 2013.
- (36) Westerterp M, Van Eck M, de Haan W, Offerman EH, Van Berkel TJ, Havekes LM, Rensen PC. Apolipoprotein CI aggravates atherosclerosis development in ApoE-knockout mice despite mediating cholesterol efflux from macrophages. *Atherosclerosis*. 195:e9–e16, 2007.
- (37) Shalaby SA, Al-Edressi HM, El-Tarhouny SA, El-Bab MF, Zolaly MA. Type 1/type 2 cytokine serum levels and role of interleukin-18 in children with steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Arab J Nephrol Transplant*. 6:83–8, 2013.
- (38) Franke EI, Vanderbrink BA, Hile KL, Zhang H, Cain A, Matsui F, Meldrum KK. Renal IL-18 production is macrophage independent during obstructive injury. *PLoS One*. 7:e47417, 2012.
- (39) Kanai T, Yamagata T, Momoi MY. Macrophage inflammatory protein-1 β and interleukin-8 associated with idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Int*. 51:443–7, 2009.
- (40) Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, Cerwenka A. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-

- dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol.* 189:5602–11, 2012.
- (41) Lin C, Lee B, Lin C, Chen W. A study of the relationship between childhood nephrotic syndrome and allergic diseases. *Chest.* 97:1408–11, 1990.
- (42) Hopkin JM. The rise of asthma and atopy. *QJM.* 91:169–70, 1998.
- (43) Kanai T, Shiraishi H, Yamagata T, Ito T, Odaka J, Saito T, Aoyagi J, Momoi MY. Th2 cells predominate in idiopathic steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Clin Exp Nephrol.* 14:578–83, 2010.
- (44) Yamashita J, Iwamura C, Sasaki T, Mitsumori K, Ohshima K, Hada K, Hara N, Takahashi M, Kaneshiro Y, Tanaka H, Kaneko K, Nakayama T. Apolipoprotein A-II suppressed concanavalin A-induced hepatitis via the inhibition of CD4 T cell function. *J Immunol.* 186:3410–20, 2011.
- (45) Reiser J, von Gersdorff G, Loos M, Oh J, Asanuma K, Giardino L, Rastaldi MP, Calvaresi N, Watanabe H, Schwarz K, Faul C, Kretzler M, Davidson A, Sugimoto H, Kalluri R, Sharpe AH, Kreidberg JA, Mundel P. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 113:1390-7, 2004.
- (46) Berbée JF, Coomans CP, Westerterp M, Romijn JA, Havekes LM, Rensen PC. Apolipoprotein CI enhances the biological response to LPS via the CD14/TLR4

pathway by LPS-binding elements in both its N- and C-terminal helix. *J Lipid Res.* 51:1943–52, 2010.

- (47) Mukherjee S, Chen LY, Papadimos TJ, Huang S, Zuraw BL, Pan ZK. Lipopolysaccharide-driven Th2 cytokine production in macrophages is regulated by both MyD88 and TRAM. *J Biol Chem.* 284:29391-8, 2009.