

NELL-1 – nový antigen u membranózní nefropatie

Sethi S, Debiec H, Madden B, et al. Neural epidermal growth factor-like 1 protein (NELL-1) associated membranous nephropathy.

Kidney Int 2020;97:163–174.

Membranózní nefropatie (MN) je způsobena autoprotilátkami proti antigenům v glomerulární bazální membráně (GBM) a následnou tvorbou komplexů antigen-protilátka. Cílovým antigenem je u pacientů s primární MN přibližně v 70 % PLA2R (M-typ receptoru pro fosfolipázu A2)¹ a v 1–5 % THSD7A (thrombospondin type-1 domain-containing 7A).² Cílový antigen nebo cílové antigeny ve zbývajících případech primární MN dosud nebyly odhaleny a pokusit se o jejich objasnění bylo cílem komentované studie.

Pro identifikaci hlavních proteinů nacházejících se v tkáni u MN byla použita metoda laserové mikrodisekce s hmotnostní spektrometrií. Ta byla poté doplněna imunohistochemií a imunofluorescencí pro možnost lokalizovat a dále charakterizovat nalezené proteiny.

Využité vzorky pocházely z Mayo Clinic v USA z let 2015–2018. V kontrolní skupině pro hmotnostní spektrometrii bylo 111 vzorků (např. diabetická nefropatie, minimální změny, fokálně segmentální glomeruloskleróza, IgA nefropatie i PLA2R-pozitivní MN), pro imunohistochemickou analýzu bylo v kontrolní skupině 20 biopsií. Jako validační kohorta byly využity vzorky z Francie a Belgie.

Do „pilotní“ kohorty bylo vybráno 35 renálních biopsií s PLA2R-negativní MN. Pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie byl u 6 pacientů s PLA2R-negativní MN nově detekován protein NELL-1 (neural epidermal growth factor-like 1, volně přeloženo jako nervový protein s doménami podobnými epidermálnímu růstovému faktoru-1). Všechny kontroly včetně PLA2R-pozitivních případů MN byly negativní.

Následně bylo 35 vzorků z pilotní kohorty a 91 dalších PLA2R-negativních případů MN („discovery“ kohorta) vyšetřeno imunohistochemicky se značením NELL-1 a nalezeno bylo 29 pozitivních biopsií (23 %; 6 z pilotní a 23 vzorků z „discovery“ kohorty). Všechny pozitivní vzorky vykazovaly jasnou (2–3+/3) granulární pozitivitu pro NELL-1 podél GBM, která zrcadlila granulární depozita IgG podél GBM. Kolokalizace NELL-1 a imunoglobulinu G (IgG) podél GBM byla potvrzena dále metodou konfo-

kální fluorescenční mikroskopie. Kontrolní vzorky (opět včetně PLA2R-pozitivních případů MN) byly i metodou imunohistochemie potvrzeny jako negativní.

Pozitivní vzorky z „discovery“ kohorty vyšetřené imunohistochemicky byly (v případě dostupného materiálu, N = 14) dále vyšetřeny také tandemovou hmotnostní spektrometrií, kde byla přítomnost NELL-1 potvrzena u všech 14 případů. U NELL-1-asociované MN bylo zjištěno zastoupení všech čtyř tříd IgG, nejvíce IgG1, následně IgG3, IgG2 a nejméně IgG4.

Ve validační kohortě bylo vyšetřeno na přítomnost NELL-1 pozitivní u 5 z 84 (5,9 %) PLA2R-negativních a THSD7A-negativních biopsií (tři pozitivní pacienti pocházeli z francouzské [45 vzorků] a dva z belgické kohorty [39 vzorků]). První případ byl vyšetřen metodou imunohistochemickou i imunofluorescenční (IF), v dalších čtyřech případech byl průkaz NELL-1 proveden již pouze IF metodou.

S využitím rekombinantního lidského proteinu NELL-1 a metody western blot byla studována i přítomnost cirkulujících anti-NELL-1 protilátek v séru u pěti pacientů (čtyř z validační a jednoho z „discovery“ kohorty). Všech pět pacientů vykazovalo reaktivitu s NELL-1, zatímco kontrolní vzorky byly negativní. U jednoho pacienta s dostupnými opakovanými vzorky nabranými v průběhu sledování byl patrný pokles této reaktivity již v době zahájení léčby rituximabem a její následné kompletní vymizení. Predominantní třídou IgG u protilátek proti NELL-1 byla i zde třída IgG1 u dvou ze tří vyšetřených pacientů, zatímco u jednoho pacienta byla popsána přítomnost IgG1, IgG2 i IgG4.

V pilotní a „discovery“ kohortě bylo nalezeno celkem 29 případů NELL-1-asociované MN ze 126 vyšetřených (celkem 15 mužů a 14 žen s průměrným věkem v době diagnózy 63 let, průměrnou vstupní koncentrací kreatininu 150 μmol/l a proteinurií 6,9 g/24 hodin). Kromě positivity antinukleárních protilátek u jednoho pacienta bylo u všech ostatních sérologické vyšetření (včetně hepatitidy) negativní. Renální biopsie byla u všech hodnocena jako typická primární MN, bez známek případné sekundarity.

U tří pozitivních případů ve francouzské validační kohortě byla v době diagnózy MN nebo krátce po jejím stanovení zjištěna přítomnost nádorového onemocnění (jedenkrát karcinom plic, jedenkrát metastazující karcinom slinivky a jedenkrát metastazující karcinom prsu). V belgické skupině byl u jednoho ze dvou pozitivních pacientů osm měsíců po stanovení diagnózy

MN zjištěn uroteliální karcinom, zatímco u pacientů v pilotní a „discovery“ kohortě žádné malignity zjištěny nebyly.

Závěrem autoři shrnují, že nově identifikovali protein NELL-1 přítomný u části PLA2R-negativních případů MN podél GBM. NELL-1-asociovaná MN se pak zdá být samostatným podtypem primární MN.

KOMENTÁŘ

MUDr. Zdenka Hrušková, Ph.D.

Membranózní nefropatie je častým nálezem v renálních biopsiích u pacientů s nefrotickým syndromem. U málokteré nefrologické diagnózy byl za posledních přibližně deset let učiněn takový pokrok v porozumění patogenезi a podstatě onemocnění jako právě u MN. Objev PLA2R antigenu a anti-PLA2R protilátek v roce 2009¹ byl skutečně revolučním z hlediska přístupu k pacientům s MN a vedl i ke změně našeho klinického algoritmu pro volbu léčby. Pozitivita anti-PLA2R protilátek může nejen podpořit (i neinvazivní – sérologickou) diagnózu primární MN, ale jejich sledování v čase může potvrdit nastupující imunologickou odpověď (pokles koncentrace protilátek), která, jak známo, může o měsíce předcházet odpovědi klinické (poklesu proteinurie), vzestup protilátek pak zase v některých případech předpovídá riziko relapsu.³⁻⁵

V dalších letech došlo k objevu antigenu THSD7A (thrombospondin type-1 domain-containing 7A)² a v roce 2019 přibyl i exostosin, který se nachází zejména u pacientů s autoimunitní sekundární MN.⁶ Stále ale zbývalo až 20 % případů primární MN, kde nebyl antigen znám nebo dosud nalezen. Právě na tyto pacienty se soustředila komentovaná práce, která objevila zcela nový antigen u MN, protein NELL-1.

Gen NELL-1 kóduje protein o velikosti 90 kDa a jeho vysoká exprese je nacházena v osteoblastech, nadměrná exprese u pacientů s kraniosynostózou.⁷ V ledvině je exprese NELL-1 normálně vyšší v tubulech než v glomerulech, i když část buněk v glomerulech může NELL-1 exprimovat. NELL-1-asociovaná MN se ale zdá být prvním onemocněním ledvin spojeným s nadměrnou expresí NELL-1. Pozitivita byla zjištěna u pacientů se spíše vyšším věkem (průměr 63 let) a nebyl zjištěn rozdíl mezi pohlavím. Vyšetření provedená v komentované studii celkem přesvědčivě dokazují, že NELL-1 je skutečně cílovým antigenem u podskupiny pacientů s MN, i když jeho přesná lokalizace na podocytech musí být ještě ozřejmena, stejně jako možná úloha anti-NELL-1 protilátek v patogenезi onemocnění.

Zajímavé, ale ne úplně jasné jsou také rozdíly mezi původní (pilotní a „discovery“) kohortou pacientů z Mayo Clinic v USA a evropskými validačními kohortami, a to jak v celkovém procentu pozitivních případů, tak v přítomnosti pacientů s maligním onemocněním. Procento NELL-1 pozitivních pacientů bylo poměrně výrazně vyšší v americké než v evropské skupině pacientů (23 % vs. 6 %), a i když, jak navrhuji autoři, k tomu může přispívat rozdílně genetické pozadí, roli může hrát i to, že evropské případy onemocnění MN ve studii byly PLA2R-negativní i THSD7A-negativní, zatímco v USA byly pouze PLA2R-negativní. Jistě to bude vyžadovat ověření v dalších studiích a doplněno by mělo být vyšetření NELL-1 u THSD7A-pozitivních pacientů.³ Pokud by se relativně vysoká frekvence NELL-1-asociované MN (16 % z celkem 210 vyšetřených případů) potvrdila, stane se NELL-1 druhým nejvýznamnějším antigenem u MN, neboť jeho výskyt je zřejmě častější než výskyt THSD7A.

Dalším rozdílem, který musí být vysvětlen v dalších studiích, je vysoká přítomnost pacientů s maligním onemocněním mezi NELL-1-pozitivními MN v evropské skupině pacientů (80 % z NELL-1 pozitivních), která nebyla zjištěna v americké skupině. Vyšší asociace s maligním onemocněním byla dříve popsána i u pacientů s pozitivitou THSD7A, kde v některých případech byla popsána i nadměrná exprese THSD7A v nádorové tkáni a u THSD7A-pozitivních pacientů bylo doporučeno provedení screeningu malignity.^{3,8} Je možné, že se v případě NELL-1 jedná o náhodnou koincidenci, ale je také možné, že u části pacientů s NELL-1-asociovanou MN a nádorovým onemocněním je MN ve skutečnosti sekundární.

Přes některé nejasnosti a nutnost budoucích studií, které doplní naše stávající poznatky, je objev NELL-1 u membranózní nefropatie dalším významným krokem k pochopení tohoto onemocnění. Čas ukáže, zda se stanovení anti-NELL-1 protilátek stane součástí našeho rutinního vyšetřovacího postupu u pacientů s MN.

LITERATURA

1. Beck Jr LH, Bonegio RG, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2009;361:11–21.
2. Tomas NM, Beck LH Jr, Meyer-Schwesinger C, et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 2014;371:2277–2287.
3. Ahmad SB, Appel GB. Antigens, antibodies, and membranous nephropathy: a decade of progress. *Kidney Int* 2020;97:29–31.
4. Ruggenti P, Fervenza FC, Remuzzi G. Treatment of membranous nephropathy: time for a paradigm shift. *Nat Rev Nephrol* 2017;13:563–579.
5. Francis JM, Beck LH Jr, Salant DJ. Membranous Nephropathy: A Journey From Bench to Bedside. *Am J Kidney Dis* 2016;68:138–147.

6. Sethi S, Madden BJ, Debiec H, et al. Exostosin 1/Exostosin 2-Associated Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2019;30:1123–1136.
7. Zhang X, Zara J, Siu RK, et al. The role of NELL-1, a growth factor associated with craniosynostosis, in promoting bone regeneration. *J Dent Res* 2010;89:865–878.
8. De Vriese AS, Glassock RJ, Nath KA, et al. A proposal for a serology-based approach to membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2017;28:421–430.