

# 内 容 要 旨 目 次

## 主 論 文

The level of urinary semaphorin3A is associated with disease activity in patients with minimal change nephrotic syndrome.

(尿中 Semaphorin3A は微小変化型ネフローゼ症候群の疾患活動性に関連する)

鳥井章子, 喜多村真治, 和田 淳, 辻 憲二, 槇野博史

International Journal of Nephrology and Renovascular Disease (掲載予定)

平成 26 年 5 月 The 14th Asia Pacific Congress of Nephrology 2014 で発表

平成 26 年 7 月 第 57 回日本腎臓学会総会で発表

# 主論文

## The level of urinary semaphorin3A is associated with disease activity in patients with minimal change nephrotic syndrome

(尿中 Semaphorin3A は微小変化型ネフローゼ症候群の疾患活動性に関連する)

### 【諸言】

微小変化型ネフローゼ症候群 (MCNS) や膜性腎症 (MN)、IgA 腎症 (IgA-N)、巣状分節性糸球体硬化症 (FSGS) のような尿蛋白を伴う腎疾患では、糸球体ポドサイトの融合やスリット膜の消失が生じ、長期に尿蛋白が持続することでネフロンが失われ、糸球体硬化や線維化が進むと考えられている。Semaphorin3A (Sema3A) は器官形成や免疫反応、癌の進展などに関与することが知られている分泌型蛋白であり、腎臓に関しては、発生の過程や糸球体での濾過機能の維持に影響を与えることが報告されている。また急性腎障害 (AKI) 患者やアルブミン尿を伴う慢性腎臓病で尿中 Sema3A が検出され尿細管障害との関連が示唆されている一方で、糖尿病性腎症においても尿中 Sema3A が検出されたという報告や、糖尿病性腎症の腎障害の進展についても Sema3A が関与している可能性も指摘されている。このため我々は Sema3A が腎の尿細管障害だけでなく尿蛋白を伴う糸球体疾患についても何らかの役割を持つと考えた。

今回、当院とその他の病院で腎疾患を診断、治療した患者の血清と尿中の Sema3A を測定し、解析した。また数名の免疫抑制療法を受けた MCNS 患者の Sema3A のデータを追跡し、MCNS の疾患活動性と尿中 Sema3A との関連につき検討を行った。

### 【対象と方法】

#### 患者登録および評価項目

2011 年から 2016 年 1 月までに尿検査異常や腎機能障害で入院した岡山大学病院の 72 名と、姫路赤十字病院、重井医学研究所附属病院、倉敷中央病院に入院した 3 名の患者の血清と尿の検体を用いた後方視的な研究である。患者の年齢は 17 歳から 90 歳の範囲であり、血液・尿の検体は腎生検を行う際に採取した。腎疾患の最終診断は、臨床所見と腎生検の組織所見で行い、それぞれ菲薄基底膜病 (TBM)、MCNS、IgA-N、MN、FSGS と診断された。5 人の健常人ボランティアを対照群とした。また、治療過程で寛解した 7 人の MCNS 患者の発症時と寛解後の尿中 Sema3A 値を比較した。尿細管間質障害のマーカーとして尿中 N アセチル β グルコサミニダーゼ (NAG) の測定も行った。さらに、腎生検の残余の組織を用いて免疫組織学的な検討も行った。その他に血清 Cr 値・尿蛋白量 (尿蛋白クレアチニン比) を診療情報録から抽出した。(岡山大学倫理委員会 受付番号 2063、UMIN000013422、UMIN000010104) すべての患者にはインフォームドコンセントを実施し、同意を得た。

#### ELISA による Sema3A の測定

血清と尿中の Sema3A 値の測定は ELISA キット (My Biosource) を用いて行った。Sema3A に対する抗体をコーティングしてあるマイクロプレートに検体を添加し、スタンダードとバッファを加え、Enzyme conjugate を加えて混合し、1 時間 37 度で反応させた。その後、基質等を加えた後、硫酸で反応を停止し、450nm で吸光度を測定した。

#### 比色分析による NAG の測定

尿中 NAG 値は  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase assay kit (SIGMA-ALDRICH) を用いて比色分析法により測定した。本測定法は酵素による NAG 基質の 4-ニトロフェノール N-アセチルセチグルコサミニドの加水分解に基づいている。サンプルにキットの試薬を 10 分間反応させたのちストップソリューションで反応を停止し、405nm で吸光度を測定した。

#### 免疫組織学的分析

健常人以外の各腎疾患のホルマリン固定パラフィン封入の腎生検組織を用いた。脱パラフィンを行い再水和し、マイクロウェーブで抗原の賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼを 3% 過酸化水素で失活させ、3% ウシ血清アルブミンでブロッキングした。それぞれ Sema3A とニューロピリン-1 の一次抗体と反応させ、洗浄後ビオチン結合の二次抗体を反応させた。アビジン-ビオチン標識酵素複合体を滴下したのちジアミノベンジジンで 5 分間反応させたのち反応を停止させた。

#### 統計分析

すべてのデータは平均値と標準偏差 (SD) で示した。多重比較は Kruskal-Wallis 検定を用いた。尿中 Sema3A 値や尿中 NAG 値と尿蛋白量の相関の検定には Spearman の順位相関係数を用いた。MCNS の発症時と寛解後の尿中 Sema3A 値の変化は Wilcoxon の符号順位検定を用いた。P 値 < 0.05 を有意とした。

### **【結果】**

#### 患者背景

TBM 群は 4 名、MCNS 群は 22 名、IgA-N 群は 21 名、MN 群は 16 名、FSGS 群は 9 名であった。TBM 群や IgA-N 群、MN 群は血液や尿検体、腎組織の採取まで未治療であったが、MCNS 群の 15 名と FSGS 群の 5 名は検体の採取前に既に免疫抑制剤による治療を開始していた。MN 群は MCNS 群と IgA-N 群に比べて年齢が高かった。MCNS 群、MN 群、FSGS 群は対照群と比較してそれぞれ有意に尿蛋白が高値であったが、MCNS 群の既に治療を開始していた 15 名のうちの 4 名は寛解状態となっており、残りの 11 名の尿蛋白も減少傾向であった。このため、検体採取時にネフローゼ域の尿蛋白を呈していた MCNS 患者は 13 名 (MCNS の 59%) であった。

### 尿中 Sema3A は MCNS の寛解と関連している

MCNS、IgA-N、MN の 3 群において、尿中 Sema3A 値は対照群と比較して有意に上昇していた。追跡可能であった 7 人の MCNS 患者の寛解後の尿中 Sema3A 値を発症時と比較したところ、発症時よりも寛解後で尿中 Sema3A 値が有意に減少しており、この結果から尿中 Sema3A 値は MCNS における急性の糸球体の病態変化を反映している可能性が示唆された。尿中 Sema3A 値が上昇していた MCNS、IgA-N、MN の 3 群では尿中 NAG 値も対照群と比較して増加していた。このことから尿中 Sema3A 値はこれら 3 つの腎疾患群の尿細管間質障害についても反映していることが示唆された。また、血清 Sema3A 値は MCNS と MN 群で対照群より高かった。

### MCNS における Sema3A とニューロピリン-1 の発現部位

免疫組織学的検討より、各腎疾患において糸球体のポドサイト・遠位尿細管・集合管に Sema3A が発現していることが明らかとなった。また、Sema3A の主要なレセプターの一つであるニューロピリン-1 についても免疫組織学的評価をしたところ、Sema3A と同様、いずれの腎疾患でも糸球体内のポドサイト・遠位尿細管・集合管の管腔側で発現を認め、Sema3A、ニューロピリン-1 とともに MCNS における特異的な発現部位は同定できなかった。

### 尿中 Sema3A と尿蛋白量の相関性はみられなかった

すべての腎疾患群において、尿中 Sema3A 値と尿蛋白量には相関を認めなかった。治療による修飾の可能性を考え、免疫抑制治療を受けていない患者を抽出して検討をおこなったが、やはり有意な相関は認めなかった。

### IgA-N、MN、FSGS 群では尿中 Sema3A と尿中 NAG が相関していた

尿中 Sema3A 値と尿中 NAG 値の相関を検討したところ、IgA-N、MN、FSGS の 3 群において正の相関を認めた。一方、MCNS では同様の相関は認めなかった。IgA-N や MN、FSGS におけるこの結果は、慢性的な病勢の進行に伴う尿細管間質障害により尿細管から逸脱した Sema3A を反映したものと考えられた。

### **[考察]**

Sema3A は AKI の発症や慢性腎臓病の重症度を予測する新たなバイオマーカーの候補として報告されている。我々は腎糸球体疾患での血清および尿中 Sema3A の値とその発現について検討し、また MCNS の寛解前後での変化を確認した。本研究結果より、MCNS の患者で寛解後に尿中 Sema3A 値が減少することを見出し、尿中 Sema3A 値が MCNS の疾患活動性と関連がある可能性が示唆された。

AKI で尿中に Sema3A が排出されるとの報告があり、MCNS は循環障害や糸球体濾過機能の障

害により AKI を起こしうるが、本研究で対象となった MCNS 患者は AKI ではなかった。今回の研究結果で尿中 Sema3A が尿細管由来か糸球体由来かを特定することはできないが、ポドサイトと尿細管の両者に Sema3A が発現していたことから、両者の可能性があると考えられた。Sema3A は糖尿病性腎症の治療対象の候補としても報告されており、既報では Sema3A を阻害するペプチドの投与により動物モデルの糖尿病性腎症を改善させた。MCNS における Sema3A の役割についてはさらなる検討が必要であるが、Sema3A は MCNS の病態に関与している可能性があり、尿中 Sema3A 値の変動が MCNS に対する免疫抑制治療への反応性を評価するためのバイオマーカーになる可能性もあると考えられる。

#### **【結論】**

MCNS の尿中 Sema3A 値は発症時に増加し、寛解後に低下した。尿中 Sema3A 値は MCNS の疾患活動性を反映し、MCNS のバイオマーカーとして他の腎疾患との鑑別に有用である可能性がある。一方、IgA-N、MN、FSGS の尿中 Sema3A 値は尿細管間質障害を反映して増加していることが示唆された。