

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08382

研究課題名(和文)尿細胞診による腎疾患の非侵襲性検査法の確立 - 腎生検の頻度減少のために -

研究課題名(英文)Utility of urine cytology as a non-invasive testing in glomerular disease.

研究代表者

大崎 博之(Ohsaki, Hiroyuki)

神戸大学・保健学研究科・准教授

研究者番号：80438291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：尿中に出現するポドサイトとボウマン嚢上皮細胞を用いて糸球体腎炎の予後不良因子である半月体を検出できるか否かについて検討を行った。対象は、糸球体腎炎52症例(半月体あり15例、半月体なし37例)の腎生検組織と尿細胞診である。これら標本に、ポドサイトとボウマン嚢上皮細胞のマーカーであるWT1抗体を用いた免疫染色を実施して、半月体形成と尿中WT1陽性細胞数の関連を調査した。その結果、半月体ありの症例では半月体なしの症例よりも尿中WT1陽性細胞の出現数が有意に多いこと、尿中WT1陽性細胞のカットオフ値を5個/10mLとすることで中等度の正確性を持って半月体形成を検出できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to assess the relationship between urinary WT1-positive cells (podocytes and parietal epithelial cells) and WT1-positive cells in renal biopsy to investigate whether urinary WT1-positive cells are useful for detection of crescent formation. Fifty-two patients with kidney disease were investigated (15 cases with crescentic lesion and 37 cases with non-crescentic lesion) for immunoenzyme staining using anti-WT1 antibody for urine cytology and renal biopsy. Numbers of WT1-positive cells in urine and renal biopsy were counted, respectively. The number of urinary WT1-positive cells in patients with crescentic lesion was significantly higher than in patients with non-crescentic lesion. In addition, the best cut-off value to detect patients with crescentic lesions using urinary was 5 cells/10mL. The results of our study suggest urinary WT1-positive cells can be used to detect patients with crescentic formation using 5 cells/10mL cutoff value.

研究分野：人体病理学

キーワード：尿細胞診 ポドサイト 糸球体腎炎 半月体形成 WT1

## 1. 研究開始当初の背景

近年、尿中に出現する糸球体上皮細胞(ポドサイト)やボウマン嚢上皮細胞と、各種糸球体腎炎との関連が報告されている。しかし、これら研究で実施されている尿中ポドサイト・ボウマン嚢上皮細胞の検出方法では、高額な機器や特殊な試薬を使用しているため、一般病院の日常検査として実施するのは困難である。

そこで我々は、国際的標準法になり得ること、一般病院の日常検査として実施可能であることを念頭に、尿中ポドサイト・ボウマン嚢上皮細胞の検出方法を考案した。具体的にはLiquid-based cytologyのBD SurePath用手法で作製した尿細胞診標本に、ポドサイトとボウマン嚢上皮細胞のマーカーであるWT-1抗体を用いた酵素抗体法(免疫染色)を実施する方法である(Ohsaki H, et al. Bio protocol. 2018)。

我々の考案した方法を用いて検討を行った結果、糸球体腎炎の50%(33/66)にWT-1陽性細胞(ポドサイト・ボウマン嚢上皮細胞)の出現を認め、下部尿路疾患(0/45)と健常者(0/30)にはWT-1陽性細胞の出現を認めなかった( $P < 0.001$ )。さらに、尿中WT-1陽性細胞の出現数は、尿蛋白や血清クレアチニンなど各種腎疾患マーカーの検査結果と相関しなかった。そのため、尿中WT-1陽性細胞は独立した非侵襲的バイオマーカーとなる可能性が示された(Ohsaki H, et al. Cytopathology. 2016)。

上記のごとく我々は、一般病院でも実施可能な尿中ポドサイト・ボウマン嚢上皮細胞の検出方法の考案と、尿中ポドサイト・ボウマン嚢上皮細胞が糸球体腎炎の非侵襲的かつ独立したバイオマーカーとなり得ることを明らかにしてきた。

糸球体腎炎の予後不良因子として半月体形成がある。半月体形成は、各種抗体や補体、液性成分、メカニカルストレスなどの傷害を受けたポドサイトが、アポトーシスや上皮間葉転換を起こして基底膜から剥離することが引き金になるとされている。ポドサイトは終末分化細胞であるため、残存したポドサイトも増殖することができず、剥離したポドサイトが覆っていた基底膜はむき出しとなる。そこで、対極に存在するボウマン嚢上皮細胞が基底膜に接着して基底膜を覆うが、その後、ボウマン嚢上皮細胞が過剰に増殖をすることがあり、これが半月体形成につながるとされている。

半月体は、細胞性半月体に始まり、線維細胞性半月体、線維性半月体と進行していく。細胞性や線維細胞性半月体の段階で適切な治療を行えば、治癒が可能とされているが、線維性半月体になると非可逆的となり、治療できない。そのため、半月体形成の早期発見と早期治療が重要となる。

## 2. 研究の目的

ポドサイトの剥離が半月体形成の引き金となるのであれば、尿中に出現してくるポドサイトを検出することで半月体を早期発見できる可能性が高い。また、細胞性半月体の主な構成細胞はボウマン嚢上皮細胞であるため、半月体形成時にはボウマン嚢上皮細胞も尿中に剥離してくる可能性がある。

そこで今回、尿中のポドサイトとボウマン嚢上皮細胞を検出することで、半月体形成を発見できるか否かについて検討を行った。

## 3. 研究の方法

### 1) 対象

対象は香川大学医学部附属病院の腎臓内科にて腎生検がなされた52症例(半月体あり15例、半月体なし37例)である。

### 2) 尿細胞診

上記対象の腎生検当日の自然尿10mLを用いてBD SurePath用手法で尿細胞診標本作製した。

### 3) 免疫染色

尿細胞診標本、腎生検標本ともにWT1を一次抗体とした酵素抗体法を実施した。

### 4) 検討項目

上記標本を用いて以下の検討を行った。

尿中WT1陽性細胞の染色態度と形態

尿中WT1陽性細胞と腎生検組織中WT1陽性細胞の関連

尿中WT1陽性細胞と半月体形成の関連

尿中WT1陽性細胞の至適カットオフ値

## 4. 研究成果

尿中WT1陽性細胞の染色態度は、細胞質陽性で核陰性であった。WT1は転写調節因子であるため、核と細胞質に存在する。今回、核が陰性になった原因は、細胞の剥離を防ぐために熱による抗原賦活を実施しなかったためと考える。また、細胞形態に関して、WT1陽性細胞の長径は20-40 $\mu$ mでしばしば多核を呈した(写真1)。ポドサイトは終末分化細胞であるが、刺激が加わると細胞周期に入り核が分裂する。しかし、その強固な細胞骨格により細胞質の分裂ができないため多核になるとされており、我々の結果に矛盾しない。

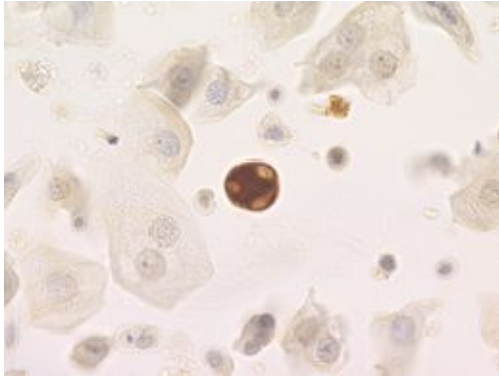


写真 1 : 尿中 WT1 陽性細胞

尿中 WT1 陽性細胞と腎生検組織中 WT1 陽性細胞の関連については、相関を認めなかった (Spearman correlation=-0.133, P=0.346)(図 1)。これは、糸球体から剥離したポドサイトが尿中出现すること、腎生検で得られる糸球体は全糸球体のごく一部であること等が原因と考えられる。

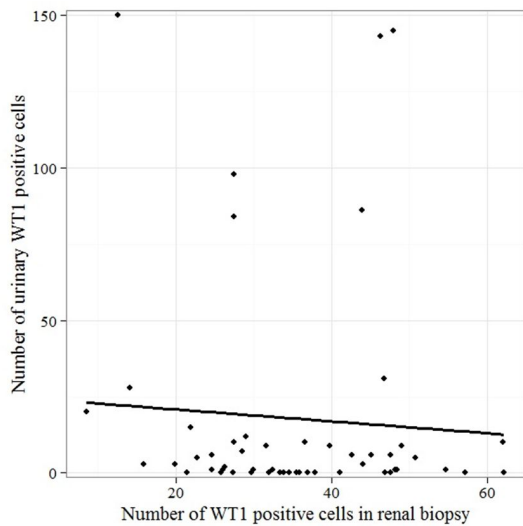


図 1 : 尿中 WT1 陽性細胞と腎生検組織中 WT1 陽性細胞の関連

尿中 WT1 陽性細胞と半月体形成の関連については、半月体ありの症例群では半月体なしの症例群に比して、WT1 陽性細胞の出現数が有意に多いことが明らかとなった (P=0.007)(図 2)。

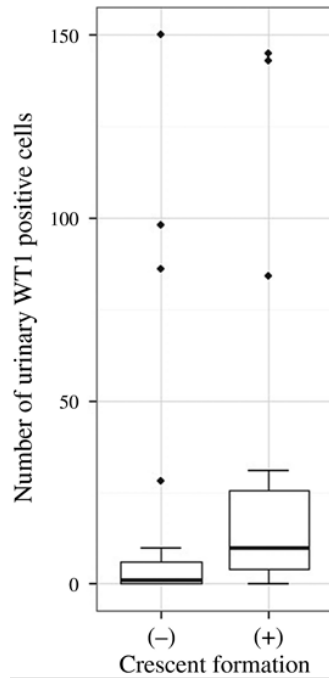


図 2 : 尿中 WT1 陽性細胞と半月体形成の関連

尿中 WT1 陽性細胞の至適カットオフ値を ROC 曲線から算出した結果、5 個/10mL (感度 73.3%, 特異度 64.9%, AUC: 0.735) であり、中等度の正確性をもって半月体形成を検出できることが明らかとなった (図 3)。

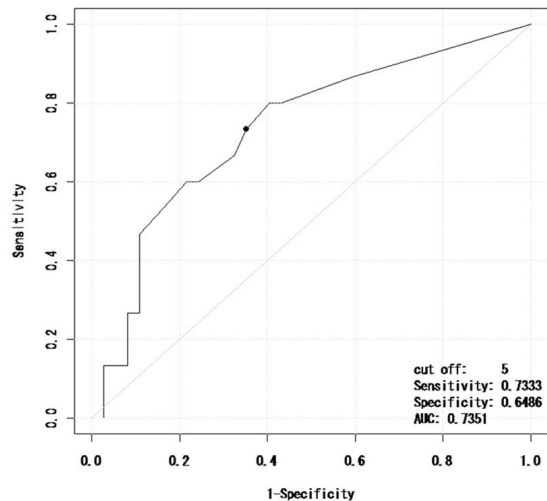


図 3 : 尿中 WT1 陽性細胞の至適カットオフ値

腎生検は、糸球体腎炎の診断に不可欠なものであるが、患者への侵襲が強いことに加え、ごく一部の糸球体を無作為にしか採取できないため、部分的な(巣状)糸球体病変を見落とす可能性がある。一方、尿は侵襲がないことから頻回の検査が可能であり、機能している全ての糸球体の状態を反映するという

利点もある。

我々の考案した方法を用いれば、糸球体腎炎のスクリーニングや、予後不良因子の半月体形成を非侵襲的に検出できることが明らかとなった。今後、我々の方法が普及すれば糸球体腎炎や半月体形成の早期発見のみならず、腎生検の実施回数も減少させることが可能と考える。

#### 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3件)

- 1) Ohsaki H, Matsunaga T, Fujita T, Tokuhara Y, Kamoshida S, Sofue T. Quantifying podocytes in human urine using liquid-based cytology and WT1 immunoenzyme staining. Bio Protocol(査読あり). 2018; 8: pii: e2827. DOI: 10.21769/BioProtoc.2827
- 2) Fujita T, Sofue T, Tokuhara Y, Wakisaka H, Kushida Y, Haba R, Ohsaki H. Urinary WT1 positive cells as a non-invasive biomarker of crescent formation. Cytopathology(査読あり). 2017; 28: 524-530.
- 3) Ohsaki H, Sofue T, Kawakami K, Nishijima Y, Hara T, Matsunaga T, Kushida Y, Haba R, Shigematsu Y, Irino S. WT1 immunoenzyme staining using SurePath processed urine cytology helps to detect kidney disease. Cytopathology(査読あり). 2016; 27: 43-49.

#### 〔学会発表〕(計4件)

- 1) 大崎博之, 藤田泰史, 徳原康哲, 鴨志田伸吾, 平川栄一郎, 松永徹, 串田吉生, 羽場礼次. 尿中ポドサイトは糸球体腎炎や半月体形成の非侵襲性バイオマーカーである. 第59回日本臨床細胞学会総会, 2018.
- 2) 大崎博之, 徳原康哲, 藤田泰史, 松永徹, 串田吉生, 羽場礼次, 鴨志田伸吾. 尿中ポドカリキシン陽性細胞は半月体形成のバイオマーカーとなり得るか. 第59回日本臨床細胞学会総会, 2018.
- 3) Urinary WT1 positive cells as a non-invasive biomarker of crescent

formation.

Ohsaki H, Sofue T, Moritoki M, Nishijima Y, Tokuhara Y, Wakisaka H, Matsunaga T, Kushida Y, Haba R. 29<sup>th</sup> European Congress of Pathology. 2017.

- 4) 藤田泰史, 大崎博之, 串田吉生, 羽場礼次. 腎疾患患者における尿中・腎生検組織中のWT1陽性細胞数についての検討. 第55回日本臨床細胞学会秋期大会 2016.

#### 〔図書〕(計1件)

- 1) 大崎博之 他, 篠原出版新社, 液状化検体細胞診断マニュアル, 2016, 297(5-11, 129-131).

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
種類:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大崎 博之(OHSAKI Hiroyuki)  
神戸大学・大学院保健学研究科・准教授  
研究者番号: 80438291

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

祖父江 理(SOFUE Tadashi)  
香川大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 80452671

串田 吉生(KUSHIDA Yoshio)  
香川大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 30325352

入野 了士 (IRINO Satoshi)  
愛媛県立医療技術大学・保健科学部・講師  
研究者番号：70634418

(4)研究協力者

徳原 康哲 (TOKUHARA Yasunori)  
愛媛県立医療技術大学・保健科学部・講師  
研究者番号：60746329