

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17742

研究課題名（和文）ファブリー病におけるマルベリー細胞定量的評価法の開発とその臨床的価値

研究課題名（英文）Urinary mulberry bodies as a potential biomarker for early diagnosis and efficacy assessment of enzyme replacement therapy in Fabry nephropathy

研究代表者

余西 洋明 (Yonishi, Hiroaki)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40822143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：51名のファブリー病（FD）患者を対象に解析を行いマルベリー小体（MB）を認めるが蛋白尿が陰性の患者が全体の41%存在することを確認し、多くの症例でMBが尿蛋白に先行する事を示した。続いてMBが腎臓構成細胞のどの部位から由来するのか探索するため、腎臓構成細胞のマーカーで免疫染色を行いMBがポドサイト由来であることを明らかにした。さらに半定量MBの量と腎生検標本におけるポドサイトの空胞変性の程度が相関することを示した。また半定量MBはERTの期間が長い症例ほど低値をとり、18か月のERTにより有意に減少する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿蛋白や腎機能障害が出現したファブリー病（FD）では、腎病変に対して酵素補充療法（ERT）では十分な治療効果が得られない。FDの腎病変の早期マーカーの確立が求められる中、FD患者に特徴的な尿沈査であるマルベリー小体（MB）に着目し、その臨床的意義について検討した。本研究により尿中MBがポドサイト障害を示し、蛋白尿に先行する早期マーカーであることと、ERTの治療効果の指標となる事明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：【Methods】 Fifty-one Fabry disease (FD) patients were enrolled. Urinary mulberry bodies (uMBs) were immunostained for renal cell markers to determine their origin. The association between semiquantitative uMB excretion and the histological severity of podocyte vacuolation was investigated using the vacuolated podocyte: glomerular average area ratio. The association between the semiquantitative estimate of uMB excretion and duration of ERT was analyzed.

【Results】 Thirty-two patients (63%) had uMBs, while only 31% showed proteinuria. The uMBs were positive podocalyxin, suggesting they were derived from podocytes. We observed more severe podocyte vacuolation with increased uMB excretion ;however, the same was not observed with increased proteinuria. The percentage of patients with substantial uMB excretion increased with shorter ERT duration. Eighteenmonth-long ERT reduced uMB excretion without affecting proteinuria.

研究分野：腎臓疾患

キーワード：ファブリー病 尿中マルベリー小体 グロボトリアオシルセラミド リソソーム ポドサイト

## 1. 研究開始当初の背景

Fabry 病は、リソソーム内酵素である  $\alpha$ -galactosidase A の遺伝子に変異が生じることで発症する糖脂質代謝異常症である。酵素の欠損に伴い、globotriaosylceramide (Gb3) が全身の細胞に蓄積する。その結果様々な臓器障害をきたし、腎不全の原因になる。Fabry 病の腎病変に関しては、腎機能低下や蛋白尿といった臨床所見出現以前よりポドサイトの足突起の融合や Gb3 の蓄積等の組織学的変化を来すことが知られている。臨床所見出現後に酵素補充療法 (ERT) が開始された場合、予後改善効果は限定的であるため早期診断が重要となる。早期に腎生検を行い脂質の蓄積を確認することは早期診断に有用であるが、一般的に臨床所見を持たない症例では腎生検の適応がない。そのため蛋白尿に代わる Fabry 病の腎病変に特異的なマーカーが求められている。そこで尿中マルベリー小体という Fabry 病患者に特異的に認められる尿沈渣所見に着目した。臨床所見が乏しいにも関わらず尿中マルベリー小体を契機に Fabry 病が診断された症例報告が過去に散見されるが、尿中マルベリー小体に関する研究はほとんどなく、その正体および由来について不明な部分が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では Fabry 病腎合併症における尿中マルベリー小体の臨床的意義ならびに尿中マルベリー小体の正体および由来について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

2011 年 1 月～2019 年 3 月に大阪大学医学部附属病院を受診した Fabry 病患者 51 例を対象とした。

(1) 尿中マルベリー小体並びに蛋白尿の有無の 4 群で患者背景を比較検討した。

(2) 尿中マルベリー小体の由来を検討するために尿沈渣に免疫染色を行った。尿中マルベリー小体が腎臓構成細胞のどの部位から由来するのか探索するため、ポドサイト、近位尿細管、遠位尿細管それぞれのマーカーで免疫染色を行った。

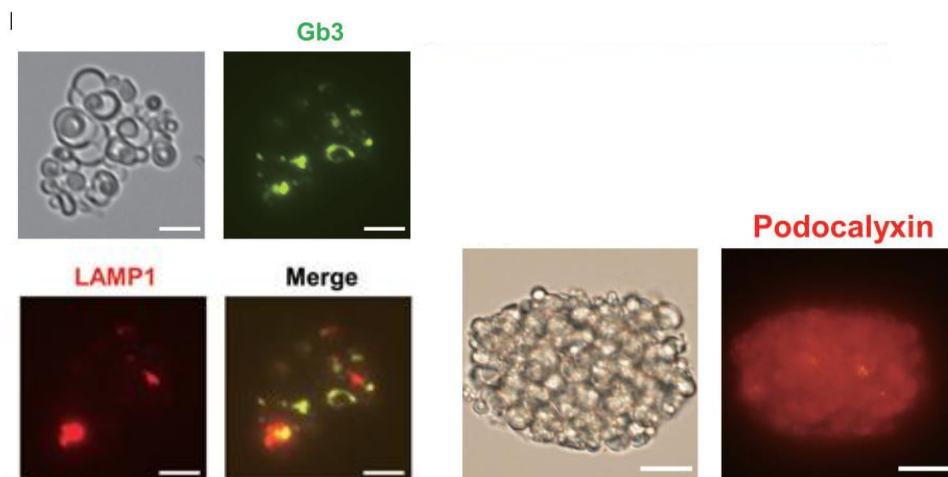
(3) 腎生検標本を用いて尿中マルベリー小体の量と糸球体当たりのポドサイトの空胞変性 (Fabry 病患者に特徴的な組織所見で Gb3 の蓄積を表す) の程度を調べた。尿中マルベリー小体は 2015 年から当院で独自に導入している 4 段階の半定量評価 (none, few, moderate, many) で評価した。以上の検討を 51 例の内、腎生検を施行した 7 例で行った。

(4) ERT が尿中マルベリー小体に与える影響に関して検討した。半定量法で尿中マルベリー小体が評価された 37 例を ERT の治療期間で 4 群に分け、治療期間と尿中マルベリー小体の排泄量に関して検討した。さらに新規に ERT を開始した 9 例を対して、治療前後の尿中マルベリー小体の変化を検討したとするため、18 ヶ月間の酵素補充療法でマルベリー小体の変化を調べた。

## 4. 研究成果

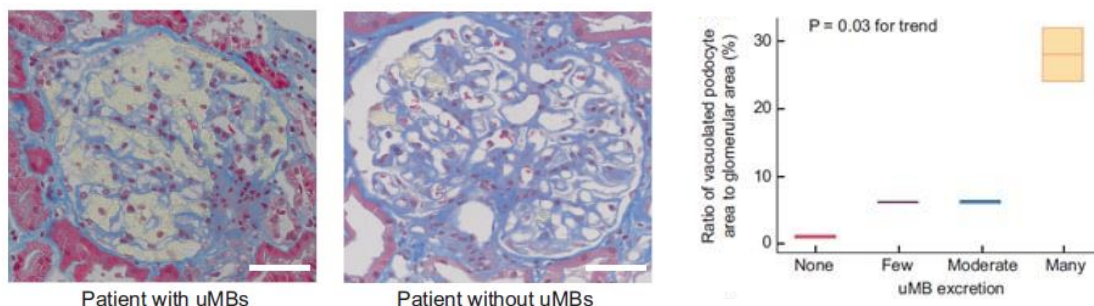
(1) Fabry 病患者 51 例を対象とし、尿中マルベリー小体並びに蛋白尿の有無の 4 群で患者背景を比較検討した所、蛋白尿が陰性にも関わらず、尿中マルベリー小体が陽性であった患者は 21 例 (41%) も認められ、尿中マルベリー小体が蛋白尿に先行することが示唆された。

(2) 尿中マルベリー小体に免疫染色を施した結果、Gb3 ならびにリソソームマーカーである LAMP-1 が尿中マルベリー小体に共局在していたことから、尿中マルベリー小体は Gb3 が蓄積したリソソームで構成されていることが示された。さらにポドサイトのマーカーである Podocalyxin に陽性であり、位尿細管、遠位尿細管のマーカーには陰性であったため、ポドサイト由来であることが示唆された。

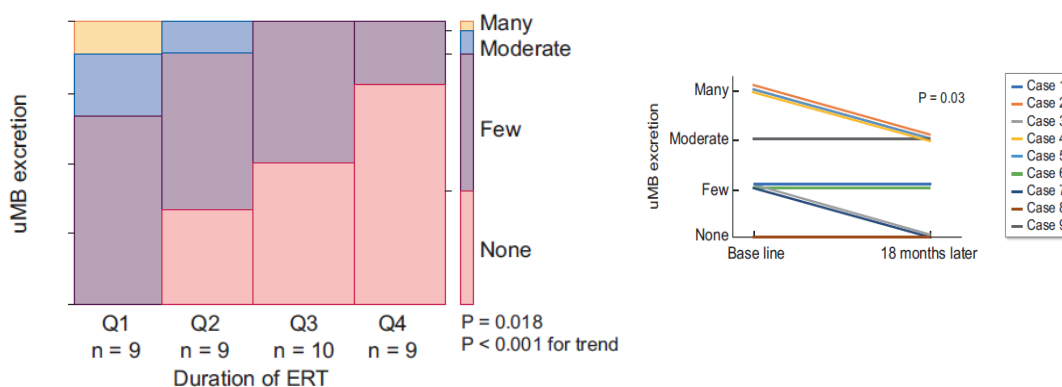


(3) 尿中マルベリー小体の量と腎生検標本での糸球体当たりの空胞変性の割合の関係を検討し

たところ、有意な正の相関を示した ( $P = 0.03$  for trend)。一方で蛋白尿とポドサイトの空砲変性の割合には相関が認められなかった。



(4) ERT が尿中マルベリー小体に与える影響を検討したところ、治療期間の長い症例ほど尿中マルベリー小体の排泄量が有意に少ないことが明らかとなった ( $P = 0.018$ )。また治療期間と蛋白尿あるいは糸球体ろ過量には有意な関係は認められなかった。最後に新規に ERT を開始した 9 例の検討では、18 ヶ月間の酵素補充療法でマルベリー小体は有意に減少した ( $P = 0.03$ )。一方で、ERT は蛋白尿ならびに糸球体ろ過量に有意な影響は与えなかった。



以上、尿中マルベリー小体はポドサイトに由来し、腎障害の一般的なマーカーである蛋白尿より先行して出現することが示唆された。さらに尿中マルベリー小体は、蛋白尿よりも組織病変と強く関連することが明らかとなった。また治療により尿中マルベリー小体は減少することが示された。以上より Fabry 病腎臓病変において尿中マルベリー小体は早期診断マーカー並びに治療評価マーカーとなることが示唆された。

更に尿中マルベリー小体の量をより正確に評価するため本研究で行った免疫染色による標識を利用して、尿の flow cytometry でより定量的評価する方法を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yonishi H, Namba-Hamano T, Hamano T, Hotta M, Nakamura J, Sakai S, Minami S, Yamamoto T, Takahashi A, Kobayashi W, Maeda I, Hidaka Y, Takabatake Y, Sakai N, Isaka Y.	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Urinary mulberry bodies as a potential biomarker for early diagnosis and efficacy assessment of enzyme replacement therapy in Fabry nephropathy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 Online ahead
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroaki Yonishi, Tomoko Namba-Hamano, Takayuki Hamano, Masaki Hotta, Shinsuke Sakai, Ryuta Fujimura, Satoshi Minami, Takeshi Yamamoto, Atsushi Takahashi, Yoshitsugu Takabatake, Norio Sakai, Yoshitaka Isaka
2. 発表標題 Urinary Mulberry Bodies as a Potential Biomarker for Early Diagnosis and Monitoring the Effectiveness of Enzyme Replacement Therapy in Fabry Disease
3. 学会等名 the 56th ERA-EDTA Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 余西 洋明、難波 倫子、濱野 高行、堀田 真希、酒井 晋介、藤村 龍太、南 聡、山本 毅士、高橋 篤史、高畠 義嗣、酒井 則夫、猪阪 善隆
2. 発表標題 尿中mulberry小体のFabry病における臨床的意義の検討
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------