

Thesis

掲載論文は学位論文(Thesis)であり原著論文ではない。

従って掲載論文を他論文で引用することを禁止する。

新規尿中マーカーによるループス腎炎の組織所見の予測

臨床医学研究系 内科学 リウマチ・膠原病内科学

井熊 大輔

【目的】ループス腎炎(LN)は全身性エリテマトーデス(SLE)に合併する腎炎である。LNは組織型によって予後が異なるため、腎生検による組織診断と治療方針の決定が推奨されている。しかし、腎生検は侵襲的であり禁忌となる症例も少なくない。近年podocyte (Pod), podocalyxin (PCX), megalinが尿中で検出できるようになり、腎炎や腎症のマーカーとして注目されている。PodとPCXは糸球体細胞由来、megalinは尿管細胞由来であり、これらのような部位特異性のある細胞と分子がある特定の組織学的病変を反映する非侵襲的なマーカーとなるのではないかという仮説を立てた。尿中Podマーカー[尿中Pod数/尿クレアチニン濃度比(U-Pod/Cr)と尿中PCX濃度/尿クレアチニン濃度比(U-PCX/Cr)]と尿中megalinマーカー[尿中A-megalin濃度/尿クレアチニン濃度比(A-meg/Cr)と尿中C-megalin濃度/尿クレアチニン濃度比(C-meg/Cr)]によってLNの組織所見が予測可能か尿検体を用いて検討した。

【方法】対象はSLE患者65名。臨床的にLNと診断されない者または完全寛解状態のLN患者25名をLN(-)群とし、臨床的に初発または再燃が疑われ腎生検によってLNと診断した40名をLN(+)群とした。U-Pod/Crは間接蛍光抗体法でPCX陽性細胞をカウントし、U-PCX/Cr、A-meg/Cr、C-meg/Crはsandwich ELISA法にて測定した。全ての検体は尿中クレアチニン濃度補正を行った。腎組織評価は盲検的に行い、糸球体病変に関してInternational Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) 2003分類に従い分類し、活動性および慢性病変に関してはAustinらの報告に従い所見をスコア化した。

【結果】U-Pod/Cr、U-PCX/Cr、C-meg/CrはLN(+)群で有意に高値であった($P<0.0001$, $P<0.0001$, $P=0.0003$)。Class IVのU-Pod/Crはclass Vと比較して有意に高値であり($P<0.05$)、class VのU-PCX/Crはclass IIIと比較して有意に高値であった($P<0.05$)。U-Pod/Crは組織学的なactivity indexと中等度の相関があった($r=0.4704$, $P=0.0029$)。U-Pod/Crと関連がある組織学的病変はcellular crescents(CC)であった($P<0.0001$)。U-PCX/Cr、A-meg/Cr、C-meg/Crと関連のある組織学的病変はなかった。U-Pod/CrでCCの存在を予測する場合のreceiver operating characteristic (ROC) analysisでのarea under the curve (AUC)は0.72270であった($P=0.01964$)。カットオフ値を2.785cells/mgCrより大とした時の感度は47.06%、特異度は85.71%であった。血清クレアチニン値、推定糸球体濾過量(eGFR)、尿中蛋白/尿クレアチニン濃度比(uPCR)ではCCの存在を予測できなかった。

【結論】U-Pod/Cr、U-PCX/Cr、C-meg/CrはLN(+)群で有意に高値を示した。U-Pod/Crは組織学的activity indexと相関し、CCの存在予測に有用であった。

緒言

ループス腎炎(LN)は全身性エリテマトーデス(SLE)の30-50%に合併する腎炎であり¹⁾、本邦では毎年250-300名のLN患者が透析導入に至っていることからSLE患者にとって現在も深刻な合併症である²⁾。LNでは腎に沈着した

免疫複合体が炎症を惹起し^{1,3)}、沈着物はメサンギウム、上皮、内皮、尿管間質などに認められる。しかしその分布は症例により大きく異なり、LNは多種多様な組織像が観察される事で知られる。今日ではInternational Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) 2003分類によりLNはclass Iからclass VIに分類され⁴⁾、class間で腎予後が異なるために⁵⁻⁷⁾国際的なガイドラインではclassに応じた治療法が推奨されている⁸⁻¹⁰⁾。以下に

医学博士 甲第1279号 平成27年3月27日(埼玉医科大学)

○著者は本学論文の研究内容について他者との利害関係を有しません。

ISN/RPS 2003 分類と国際ガイドラインで推奨されている治療を述べる(治療の中には本邦では保険適用になっていないものもあり留意が必要である)。光学顕微鏡では異常を認めないがメサングウムへの沈着が間接蛍光抗体法で認められる場合は微小メサングウム性ループス腎炎としてclass I, 沈着物がメサングウムのみにありメサングウム細胞や基質の増加を呈した場合はメサングウム増殖性ループス腎炎としてclass IIに分類し、いずれも高度の蛋白尿が出ていない限りはLNに対してのステロイド薬や免疫抑制療法の使用は不要である。沈着が上皮下に存在してスパイク病変や寡刻像を呈した場合は膜性ループス腎炎としてclass Vに分類する。Class Vはネフローゼ症候群を起こす場合が多く、その場合の長期腎予後は良好でないことから、中等量ステロイド薬とmycophenolate mofetil (MMF)をはじめとした免疫抑制薬の併用が推奨されている。沈着が内皮下に存在してワイヤーループ病変、ヒアリン血栓、白血球浸潤、管内増殖病変、核破壊像、管外増殖病変などを呈した場合は増殖性ループス腎炎として病変のある糸球体が全糸球体の50%未満ならばclass III, 50%以上ならばclass IVに分類する。Class IIIとclass IVは腎機能が悪化する患者も多く腎予後も不良であるため、中等量~大量ステロイド薬とMMFもしくはcyclophosphamideの併用を行い、重症例にはステロイドパルス療法を追加するなどより強力な治療が推奨されている。LNにより9割以上の糸球体が全節性硬化に陥っている場合は硬化性ループス腎炎としてclass VIに分類し、ステロイド薬や免疫抑制薬による回復は見込みにくいため、慢性腎不全として加療を行う。

更に、このISN/RPS 2003 分類のみで腎予後や治療法が画一的に決まる訳ではない。LNではinterstitial fibrosis (IF)¹¹⁾, interstitial inflammation (II)¹²⁾, cellular crescent (CC)¹³⁾の程度が強いと腎生存率が悪いと報告されている。また、AustinらはLNで出現する複数の急性組織所見をスコア化し合計したactivity indexが高い程腎生存率が低下し、同様に慢性組織所見をスコア化し合計したchronicity indexも高値であると腎生存率が低下すると報告している¹⁴⁾。従って、ISN/RPS 2003 分類のみならずこれらの詳細な組織病変の存在を知ることは、LNの腎予後の推定や治療法の決定に重要な意味を持つと考えられる。

このように、LNの治療戦略を立てる上では可能な限り腎生検による組織診断を行う事が望ましい。しかし、腎生検は侵襲的な手技であり、禁忌となる症例も少なくない。

Podocyte (Pod) は高度に分化した糸球体上皮細胞であり¹⁵⁾, 糸球体内皮細胞や糸球体基底膜 (GBM) とともに主に尿中への蛋白喪失を防ぐための糸球体障壁を形成している^{15, 16)}。他にもGBM成分の生成や高い還流圧がかかる糸球体係蹄の形態維持といった役割を持っている¹⁷⁾。Podは傷害を受けると足突起の消失(癒合)や細胞体の萎縮などの形態変化を起こし、傷害が継続するとやがて糸球体

係蹄から剥離してしまう。高度に分化した細胞であるPodは自己増殖能に乏しいため、Podが剥離した糸球体係蹄は露出したままとなり露出部位からボーマン嚢への癒着が起こりやがて糸球体硬化に至ると考えられている^{15, 18-20)}。

HaraらはPod傷害が生じればその結果として尿中にPodが排泄されると考え、間接蛍光抗体法を用いて尿沈渣中のPodを検出する事に成功した^{21, 22)}。そして非侵襲的な糸球体疾患のマーカーとして尿中Podが目ざされ、IgA腎症と紫斑病性腎炎²³⁾, 糖尿病性腎症²⁴⁾, 巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)²⁵⁾などで活動性の腎症があると尿中Pod数が増加することが報告されている。LNに対してはNakamuraらが蛋白尿や血尿、腎機能悪化で定義された活動性LNでは尿中Podの脱落があったが、非活動性LNでは尿中への脱落がなかったと報告している²⁶⁾。また、Vogelmannらは小児のLNとFSGSについて検討し、いずれも腎症の活動性がある時に尿中Pod数/尿クレアチニン濃度比(U-Pod/Cr)が高く、また活動性FSGSよりも活動性LNの方においてU-Pod/Crが有意に高値であったと報告している²⁷⁾。しかしLNにおいて尿中Podと組織学的病変についての詳細な検討の報告はまだない。

Podocalyxin (PCX) はPod, 造血前駆細胞, 血管内皮細胞などに発現している1回膜貫通分子である²⁸⁾。Podにおいてはapical cell membraneに局在し、Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor 1 (NHERF1) やezrinを介してactin線維と結合して足突起の形態維持と形成に関わっている^{28, 29)}。HaraらはPodが傷害されるとPod表面のmicrovilliの形成が亢進し、PCXを含んだvesicleがmicrovilliの先端から尿細管腔に放出される事を報告し^{30, 31)}, さらに様々な腎症(IgA腎症, 微小変化型ネフローゼ症候群, LN, 膜性腎症)で正常コントロールと比較して尿中PCX濃度/尿クレアチニン濃度比(U-PCX/Cr)が上昇する事を報告した³²⁾。しかしLNの詳細な組織学的病変との関連はまだ検討されていない。

Megalinは分子量約600 kDaの1回膜貫通分子で、近位尿細管、副甲状腺、甲状腺などに発現している³³⁾。近位尿細管細胞においては、糸球体から濾過された様々な分子(albuminやvitamin B12など)を細胞内に取り込むendocytosisの機能を担っている³⁴⁾。Ogasawaraらは細胞外領域の結合活性化領域に対する抗体によって認識されるamino [A]-megalin, 細胞内領域に対する抗体によって認識されるCOOH [C]-megalin, 両者の抗体で認識されるfull [F]-megalinについて検討し、正常コントロールの尿からはA-megalinのみが検出されるが2型糖尿病患者の尿からはA-megalinのみならずC-megalinとF-megalinも検出される事を報告した³⁵⁾。そして2型糖尿病患者において尿中アルブミン/尿クレアチニン濃度比が高いほど尿中C-megalin濃度/尿クレアチニン濃度比(C-meg/Cr)が高く、さらに推定糸球体濾過量(eGFR) 60 mL/min/1.72m²未満の患者でC-meg/Crが高いことも報告した³⁵⁾。SekiらはIgA腎症の検討においてC-meg/Crがメサングウム増殖病変およ

び慢性管外増殖病変と相関し、組織学的重症度と臨床的重症度によって導かれる透析導入リスクが高い患者ほどC-meg/Crが高く、また膜性腎症において正常コントロールよりC-meg/Crが高かった事を報告した³⁶⁾。しかしLNの尿中megalinに対する報告は皆無である。

尿中Podと尿中PCXは糸球体細胞由来、尿中megalinは近位尿管細胞由来である。本研究では、特定の組織学的所見がこれらの細胞の傷害を惹起して、その結果これらの新規尿中マーカーを上昇させるのではないかと、またこれらの新規尿中マーカーにより特定の組織病変を予測できるのではないかという仮説を立て、LN症例の臨床検体を用いて検討を行った。

材料と方法

この臨床評価に関する研究は埼玉医科大学病院アイアールビーの承認(申請番号 09-016)を受けており、この研究に参加した全ての患者はヘルシンキ宣言に基づくインフォームドコンセントを受けている。

1. 患者

対象患者は本研究の同意を得られた65名のSLE患者(埼玉医科大学病院リウマチ膠原病科33名、群馬大学大学院生体制御内科学教室32名)とした。臨床的にLNの初発または再燃を疑い、そして腎生検にて確定診断した症例をLN(+)群とし、臨床的にLNを疑いにくいSLE患者または完全寛解状態のLN患者をLN(-)群とした。臨床的にLNを疑う所見は2012年のAmerican College of Rheumatology (ACR)のガイドライン⁸⁾に従い、0.5 g/day以上の蛋白尿もしくは試験紙法による尿蛋白+3以上の持続、または赤血球円柱、ヘモグロビン円柱、顆粒円柱、尿細管円柱、あるいはその混合を含む細胞性円柱の存在とした。臨床的にLNの再燃を疑う所見は2012年のKidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)のガイドライン¹⁰⁾の中等度再燃以上とし、血清クレアチニン値の上昇(ベースラインの血清クレアチニン値が2.0 mg/dL未満の時は0.2 mg/dL以上の増加、2.0 mg/dL以上の時は0.4 mg/dL以上の増加)あるいは蛋白尿の増加[ベースラインの尿中蛋白/尿クレアチニン濃度比(uPCR)が500 mg/gCr未満の時は1000 mg/g以上への増加、500-1000 mg/gCrの時は2000 mg/gCr以上への増加、1000 mg/gCrの時は2倍以上への増加があるか5000 mg/gCr以上の増加]とした。LNの完全寛解の定義も2012年のKDIGOのガイドライン¹⁰⁾に従い、血清クレアチニン値のベースラインへの回復およびuPCRの500 mg/gCr未満への低下とした。

患者背景および検査データは診療録より取得し、eGFRは松尾らの報告³⁷⁾に従い算出した。

2. 組織学的評価

腎生検標本の評価はHematoxylin Eosin (HE) 染色、Periodic Acid-Schiff (PAS) 染色、Periodic Acid Silver-Methenamine (PAM) 染色、Masson's Trichrome (MT) 染色、蛍光抗体染色を用い、2名の熟練した検者によっ

て盲検的に行った。ISN/RPS 2003 分類⁴⁾に従って分類した。Class Vはclass IIIやclass IVと合併する事がある。その場合はmixedに分類し、このような合併例はclass III, class IV, class Vに含まれないようにした。また、LNは組織学的な急性病変や慢性病変の重症度が腎予後に相関するため、activity indexとchronicity indexを用いたスコアリングを行った¹⁴⁾。Activity indexとchronicity indexの算出に用いた組織学的病変とスコアの定義は下記の通りである。Endocapillary hypercellularity (EH): この病変は糸球体係蹄の循環量の低下を引き起こす係蹄内の細胞増殖(メサングウム細胞、内皮細胞、浸潤した単球)と定義した。スコアは病変のある糸球体が全糸球体の25%未満(+1)、25-50%(+2)、50%以上(+3)とした。Leukocyte infiltration (LI): 糸球体1個あたり2つ以上の多核白血球の浸潤を異常とした。スコアはmild(+1)、moderate(+2)、extensive(+3)とした。Fibrinoid necrosis/ karyorrhexis (FN): Karyorrhexisは濃縮し断片化した核として、fibrinoid necrosisは糸球体の凝固した分節の中の強い好酸性成分の存在と定義した。スコアはkaryorrhexisのみかkaryorrhexisとfibrinoid necrosisが全糸球体の25%未満(+1)、fibrinoid necrosisが全糸球体の25-50%(+2)、50%以上(+3)とした。この病変は重症度に大きく貢献するためにスコアを2倍にカウントした。CC: ボーマン嚢の1/4以上を占める細胞性の管外増殖病変をCCと定義した。CCかfibrous crescents (FC)かの決定にはMT染色を用いた。スコアは病変のある糸球体が全糸球体の25%未満(+1)、25-50%(+2)、50%以上(+3)とした。この病変は重症度に大きく貢献するためにスコアを2倍にカウントした。Subendothelial hyaline deposits (SH): 糸球体毛細血管の管腔表面に沿って存在する均質な好酸性物質と定義した。スコアは病変のある糸球体が全糸球体の25%未満(+1)、25-50%(+2)、50%以上(+3)とした。II: 単核球(リンパ球、形質細胞、マクロファージ)の間質への浸潤と定義した。スコアはmild(+1)、moderate(+2)、extensive(+3)とした。Glomerular sclerosis (GS): メサングウム基質とそれに引き続く硬化を伴う糸球体管腔の虚脱が分節性か全節性に見られる病変と定義した。スコアは分節性硬化のみか分節性硬化と全節性硬化が全糸球体の25%未満(+1)、全節性硬化が25-50%(+2)、50%以上(+3)とした。FC: 線維化組織が優位なcrescentをFCと定義した。スコアは病変のある糸球体が全糸球体の25%未満(+1)、25-50%(+2)、50%以上(+3)とした。Tubular atrophy (TA): 萎縮性変化は尿管基底膜の肥厚と定義した。スコアはmild(+1)、moderate(+2)、extensive(+3)とした。IF: 糸球体や尿管周囲の線維の沈着をMT染色で評価した。スコアはmild(+1)、moderate(+2)、extensive(+3)とした。Activity indexはEH, LI, FN, CC, SH, IIのスコアを合計して算出し、chronicity indexはGS, FC, TA, IFのスコアを合計して算出した。また、multiple liner regression analysisにおいてclass Vで見られる膜性病変について評価するために上皮下沈着物、

スパイク病変、篆刻像が分節性／全節性にあるかも評価し、spike/bubbly appearance (SB) とした。

3. 新規尿中マーカーの測定

入院患者は早朝新鮮尿、外来患者は随時新鮮尿を用いた。U-Pod/CrはLSIメディエンスに、U-PCX/Cr、尿中A-megalin濃度／尿クレアチニン濃度比(A-meg/Cr)、C-meg/Crはデンカ生研株式会社試薬研究開発部に測定を依頼した。測定の方法は下記の通りである。

U-Pod/CrはHaraらの報告に従い間接蛍光抗体法でカウントした²¹⁾。33 mLの新鮮尿を700 gで5分間遠心し、上澄を吸引して尿沈渣を得た。尿沈渣は0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) で洗浄し、10 mLのPBSで再懸濁し、Autosmear (Sakura, Japan) を用いてポリ-L-リジンでコーティングしたスライドにサイトスピンした。スライドは30分空気乾燥させ、4℃のacetoneで5分間固定した。サイトスピンした領域をPAP-pen (Deko, Japan) で6区画(1.0×1.0 cm²/区画)に区切った。PBSで洗浄後、1:200に希釈した20 µLのマウス抗ヒトPCX抗体PHM5 (Australian Monoclonal Development, Australia) に30分間反応させた。PBSで洗浄後、1:50に希釈したフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 標識抗マウスIgGグロブリン抗体 (Cappel, USA) に30分間反応させた。その後PBSで洗浄し、buffered glycerolで包埋した。作製した標本は蛍光顕微鏡で評価し、陽性細胞をPodとしてカウントし、尿中クレアチニン濃度を用いて補正を行いU-Pod/Crとした。

U-PCX/CrはAsaoらの報告に従いsandwich ELISA法にて測定した³⁸⁾。抗ヒトPCX細胞内領域モノクローナル抗体として#147抗体と#5抗体を用いた³²⁾。150 µLの新鮮尿と等量の処理液(400mM N-[tris (hydroxymethyl) methyl]-2-aminoethanesulfonic acid sodium-NaOH, 40mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.4% [volume for volume] Triton X-100, pH 7.0) を混合して得られた尿試料溶液100 µLを、#147抗体を固相化したELISAプレート上に添加し、37℃で1時間反応させた。ウェルから尿試料溶液を除去し、3回洗浄を行った。その後、horseradish peroxidaseで標識した#5抗体を100 µL添加し、37℃で1時間反応させた。ウェルから標識化抗体を除去し、3回洗浄を行った。その後、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) を100 µLを添加して、遮光下にて25℃で30分間反応させた。反応を停止させた後、マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定し、標準物質から作成した検量線により検体中のPCX濃度を導き出し、尿中クレアチニン濃度を用いて補正を行U-PCX/Crとした。

A-meg/CrとC-meg/CrはOgasawaraらの報告に従いsandwich ELISA法にて測定した³⁵⁾。A-meg/Cr測定系には抗ヒトmegalin細胞外領域モノクローナル抗体としてA5抗体とA12抗体を、C-meg/Cr測定系には抗ヒトmegalin細胞内領域モノクローナル抗体としてC25抗体とC37抗体を用いた³⁹⁾。90 µLの新鮮尿と10 µLの処理液(2 mol/L Tris-

HCl, 0.2 mol/L EDTA, 10% [volume for volume] Triton X-100, pH 8.0) を混合し、A-meg/Cr測定用試料は50℃で3時間、C-meg/Cr測定用試料は室温で1時間反応させた。A-meg/Cr測定系ではA12抗体を固相化したELISAプレート上に添加し37℃で1時間反応させ、C-meg/Cr測定系ではC25抗体を固相化したELISAプレート上に添加し37℃で1時間反応させた。ウェルから尿試料溶液を除去し、3回洗浄を行った。その後、A-meg/Cr測定系ではA5抗体を、C-meg/Cr測定系でC37抗体をalkaline phosphataseで標識し、これらの標識化抗体を添加し、37℃で1時間反応させた。ウェルから標識化抗体を除去し、4回洗浄を行った。その後、Assay Buffer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) で2回洗浄を行った。次に、CDP-Star substrate and Emerald-II enhancer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) を添加して、遮光下にて37℃で20分反応させた。その後、直ちにマイクロプレートリーダーにて1秒間の積算発光強度を測定し、標準物質から作成した検量線により検体中のA-megalin濃度とC-megalin濃度を導き出し、尿中クレアチニン濃度を用いて補正を行いA-meg/CrとC-meg/Crとした。

4. 統計学的検討

全ての値は注釈がなければ中央値(四分位範囲)で表記した。統計学的検討はGraph Pad PRISM software version 6.0とSPSS software version 15.0を用いてMann-Whitney U test, Chi square test, Dunn's multiple comparison test, Spearman's rank correlation *r* test, multiple liner regression analysis, receiver operating characteristic (ROC) analysisを行った。Multiple liner regression analysisについては、前述のactivity indexとchronicity indexで定義されるEH, LI, FN, CC, SH, GS, FCの病変をもつ糸球体の割合(%), SBの有無, mild(+1)以上のII, TA, IFの有無について単変量解析(Spearman's rank correlation *r* test)を行い、*P*<0.20となる項目を独立変数として選択し強制投入法で解析した。

結 果

25名のLN(-)群と40名のLN(+)群の患者背景および検査データをTable 1に示した。両群間で年齢(*P*=0.4000)、性別(*P*=0.7864)、糖尿病有病率(*P*=0.4256)で有意差がなかった。1時間赤沈値(*P*=0.3605)と抗二本鎖DNA抗体(*P*=0.2139)は両群間で有意差がなかった。補体50%溶血単位(CH50, *P*=0.0026)とeGFR(*P*=0.0049)はLN(+)群で有意に低値であり、血清クレアチニン値(*P*=0.0007)とuPCR(*P*<0.0001)は有意にLN(+)群で高値であった。尿細管傷害マーカーである尿中N-acetyl-beta-D-glucosaminidase濃度／尿クレアチニン濃度比(NAG/Cr, *P*=0.0001)と尿中α1ミクログロブリン濃度／尿クレアチニン濃度比(α1MG/Cr, *P*=0.0107)はLN(+)群で有意に高値であったが、尿中β2ミクログロブリン濃度／尿クレアチニン濃度比(β2MG/Cr, *P*=0.2852)では有意差はな

かった。

LN (-) 群と LN (+) 群の U-Pod/Cr, U-PCX/Cr, A-meg/Cr, C-meg/Cr を Fig. 1 に示した。LN (+) 群の U-Pod/Cr は

1.31 (0.33-4.19) cells/mgCr であり, LN (-) 群より有意に高かった ($P<0.0001$)。加えて, 40 名の LN (+) 群の内 7 名の U-Pod/Cr が 10 cells/mgCr 以上であった。LN (-) 群の

Table 1. 患者背景および検査データ。データは中央値 (四分位範囲) で表した。両群間における値の比較に Mann-Whitney U test を用いた。† 両群における割合の比較には Chi square test を用いた。LN: ループス腎炎, NA: not applicable, CH50: 補体 50% 溶血単位, eGFR: 推定糸球体濾過量, uPCR: 尿中蛋白/尿クレアチニン濃度比, NAG/Cr: 尿中 N-acetyl-beta-D-glucosaminidase 濃度/尿クレアチニン濃度比, α 1MG/Cr: 尿中 α 1 ミクログロブリン濃度/尿クレアチニン濃度比, β 2MG/Cr: 尿中 β 2 ミクログロブリン濃度/尿クレアチニン濃度比, ISN/RPS: International Society of Nephrology/Renal Pathology Society, Mixed: class III+V or class IV+V.

Characteristics	LN (-) group (n=25)	LN (+) group (n=40)	P value
Age (years)	36 (28-51)	36 (28-42.3)	0.4000
Sex (% female)	92.0	90.0	0.7864†
HbA1c > 6.5% (%)	0.0	3.0	0.4256†
Erythrocyte sedimentation rate (mm/h)	48.5 (28.5-101)	66 (37-85)	0.3605
Anti-ds-DNA antibody (IU/mL)	26.5 (10-189)	118 (19.75-400)	0.2139
CH50 (U)	30.8 (20.7-36.5)	19.25 (10.98-26.85)	0.0026
Serum creatinine (mg/dL)	0.52 (0.45-0.57)	0.69 (0.545-0.965)	0.0007
eGFR (mL/min/1.73m ²)	106.6 (83.1-132.4)	79.4 (54.5-99.6)	0.0049
uPCR (g/gCr)	0.10 (0.04-0.31)	2.43 (0.96-4.63)	<0.0001
NAG/Cr (IU/gCr)	5.33 (1.98-8.23)	11.23 (6.01-19.77)	0.0001
α 1MG/Cr (μ g/gCr)	7.18 (3.08-14.35)	17.59 (8.05-24.08)	0.0107
β 2MG/Cr (μ g/gCr)	183.37 (137.12-1364.68)	541.19 (186.57-3609.11)	0.2852
ISN/RPS 2003 classification (I/II/III/IV/V/mixed)	NA	0/0/6/15/7/12	NA
Histological activity index	NA	6 (3-11.25)	NA
Histological chronicity index	NA	2 (1.75-3)	NA

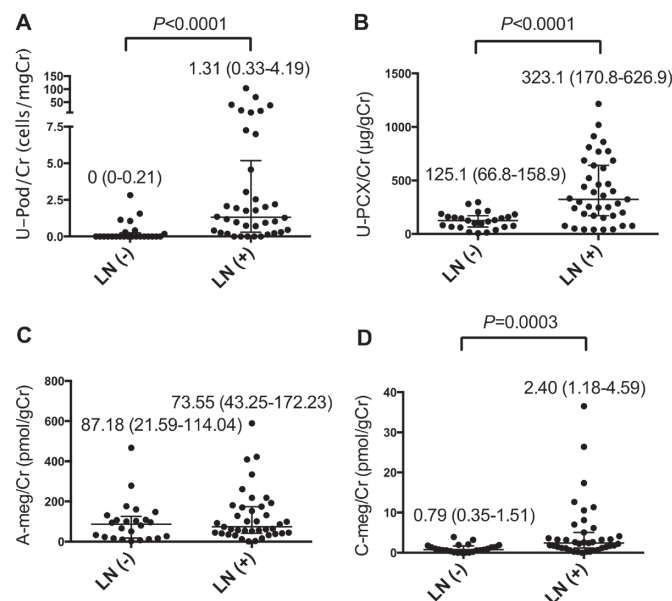


Fig. 1. LN (-) 群と LN (+) 群での新規尿中マーカーの比較。(A) U-Pod/Cr。(B) U-PCX/Cr。(C) A-meg/Cr。(D) C-meg/Cr。U-Pod/Cr, U-PCX/Cr, C-meg/Cr は LN (-) 群より LN (+) 群で有意に高値であった。Mann-Whitney U test を用いた。Error bar は中央値と四分位範囲を表し, 値も中央値 (四分位範囲) を表す。U-Pod/Cr: 尿中 podocyte 数/尿クレアチニン濃度比, U-PCX/Cr: 尿中 podocalyxin 濃度/尿クレアチニン濃度比, A-meg/Cr: 尿中 A-megalin 濃度/尿クレアチニン濃度比, C-meg/Cr: 尿中 C-megalin 濃度/尿クレアチニン濃度比。

25 名中 7 名の U-Pod/Cr は 0 cells/mgCr でなかった。LN (+) 群の U-PCX/Cr は 323.1 (170.8-626.9) $\mu\text{g/gCr}$ であり、LN (-) 群より有意に高かった ($P<0.0001$)。LN (+) 群の C-meg/Cr は 2.40 (1.18-4.59) pmol/gCr であり、LN (-) 群より有意に高かったが ($P=0.0003$)、A-meg/Cr は LN (+) 群と LN (-) 群で有意差はなかった。

LN (+) 群で U-Pod/Cr、U-PCX/Cr、A-meg/Cr、C-meg/Cr と既知の血清／尿中マーカーとの相関を Table 2 に示した。U-Pod/Cr と U-PCX/Cr は uPCR と弱い正の相関があった (相関係数 $r=0.3894$, $P<0.05$ および $r=0.3300$, $P<0.05$)。C-meg/Cr は uPCR ($r=0.3703$, $P<0.05$) と弱い正の相関があり、尿細管傷害マーカーである NAG/Cr

($r=0.3550$, $P<0.05$) と $\alpha 1\text{MG/Cr}$ ($r=0.3572$, $P<0.05$) とも弱い正の相関があった。

U-Pod/Cr、U-PCX/Cr、A-meg/Cr、C-meg/Cr を ISN/RPS 2003 分類別に比較した (Fig. 2)。U-Pod/Cr は多重比較の結果、class IV の U-Pod/Cr は class V と比較して有意に高値であった ($P<0.05$)。そして mixed において U-Pod/Cr が 5 cells/mgCr 以上であった 2 名はいずれも class IV+V であった。U-PCX/Cr は多重比較の結果、class V の U-PCX/Cr は class III と比較して有意に高値であった ($P<0.05$)。A-meg/Cr と C-meg/Cr は多重比較の結果、各 class 間で有意差はなかった。

LN (+) 群において組織学的な activity index, chronicity

Table 2. LN (+) 群における既知の血清／尿中マーカーと新規尿中マーカーとの相関係数 r 。U-Pod/Cr と U-PCX/Cr は uPCR と正の相関があった。C-meg/Cr は uPCR、NAG/Cr、 $\alpha 1\text{MG/Cr}$ と正の相関があった。Spearman's r correlation test を用いた。*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, ****: $P<0.0001$ 。

	U-Pod/Cr	U-PCX/Cr	A-meg/Cr	C-meg/Cr	eGFR	uPCR	NAG/Cr	$\alpha 1\text{MG/Cr}$
U-Pod/Cr								
U-PCX/Cr	0.3601*							
A-meg/Cr	0.3330*	0.5630***						
C-meg/Cr	0.5634****	0.4871**	0.5206***					
eGFR	-0.3005	0.2329	0.194	-0.1456				
uPCR	0.3894*	0.3300*	0.1468	0.3703*	0.1113			
NAG/Cr	0.3710*	0.3735*	0.2482	0.3550*	-0.09656	0.5107***		
$\alpha 1\text{MG/Cr}$	0.2663	0.06155	0.06155	0.3572*	-0.3634*	0.2849	0.4830**	
$\beta 2\text{MG/Cr}$	0.09541	-0.02824	-0.02824	0.2605	-0.3245*	-0.1948	0.0936	0.5915****

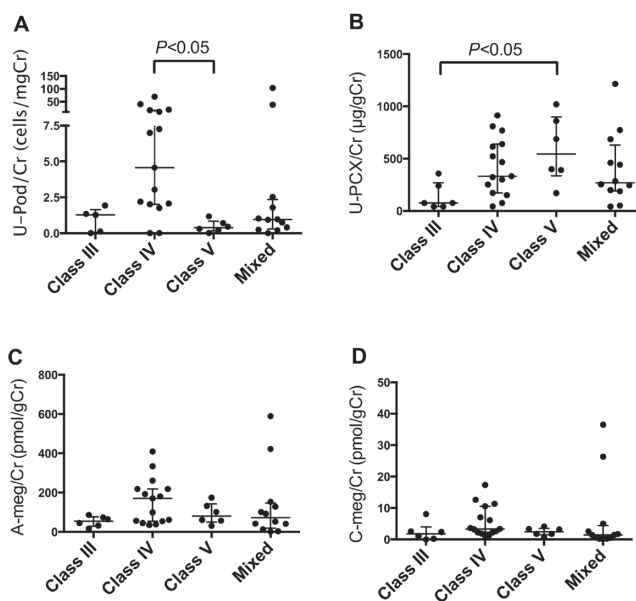


Fig. 2. ISN/RPS 2003 分類における新規尿中マーカーの比較。(A) U-Pod/Cr。多重比較の結果、class IV の U-Pod/Cr は class V と比較して有意に高値であった ($P<0.05$)。(B) U-PCX/Cr。多重比較の結果、class V の U-PCX/Cr は class III と比較して有意に高値であった ($P<0.05$)。(C) A-meg/Cr。(D) C-meg/Cr。A-meg/Cr と C-meg/Cr は多重比較の結果、各 class 間で有意差はなかった。多重比較には Dunn's multiple comparison test を用いた。Error bar は中央値と四分位範囲を表す。

indexとU-Pod/Cr, U-PCX/Cr, A-meg/Cr, C-meg/Crとの相関をFig. 3に示した。Activity indexとU-Pod/Crに中等度の正の相関が見られたが($r=0.4704$, $P=0.0029$), U-PCX/Cr, A-meg/Cr, C-meg/Crとの有意な相関はなかった。Chronicity indexと有意な相関があった尿中マーカーはなかった。

LN (+) 群において, U-Pod/Cr, U-PCX/Cr, A-meg/Cr, C-meg/Crと関連のある組織病変検索のために単変量解析および多変量解析を行った (Table 3)。U-Pod/Crを従属変数, Spearman's rank correlation r testにて $P<0.20$ であったEH, LI, CC, FCを持つ糸球体の割合とSBの有無を独

立変数としたmultiple liner regression analysisによると, U-Pod/CrとCCを持つ糸球体の割合に有意な正の相関があった (標準化係数 $\beta=0.809$, $P<0.0001$)。多変量解析においてU-PCX/Cr, A-meg/Cr, C-meg/Crと関連のある組織学的病変はなかった。

U-Pod/CrがCCと正の相関があったことから, LNにおいてU-Pod/CrからCCの存在を予測できるのではと考えた。LN (+) 群において, U-Pod/CrでCCの存在を予測する場合のROC analysisでのarea under the curve (AUC)は0.72270であった ($P=0.01964$, Fig. 4)。カットオフ値を $>2.785\text{cells/mgCr}$ とした時の感度は47.06%, 特異度は

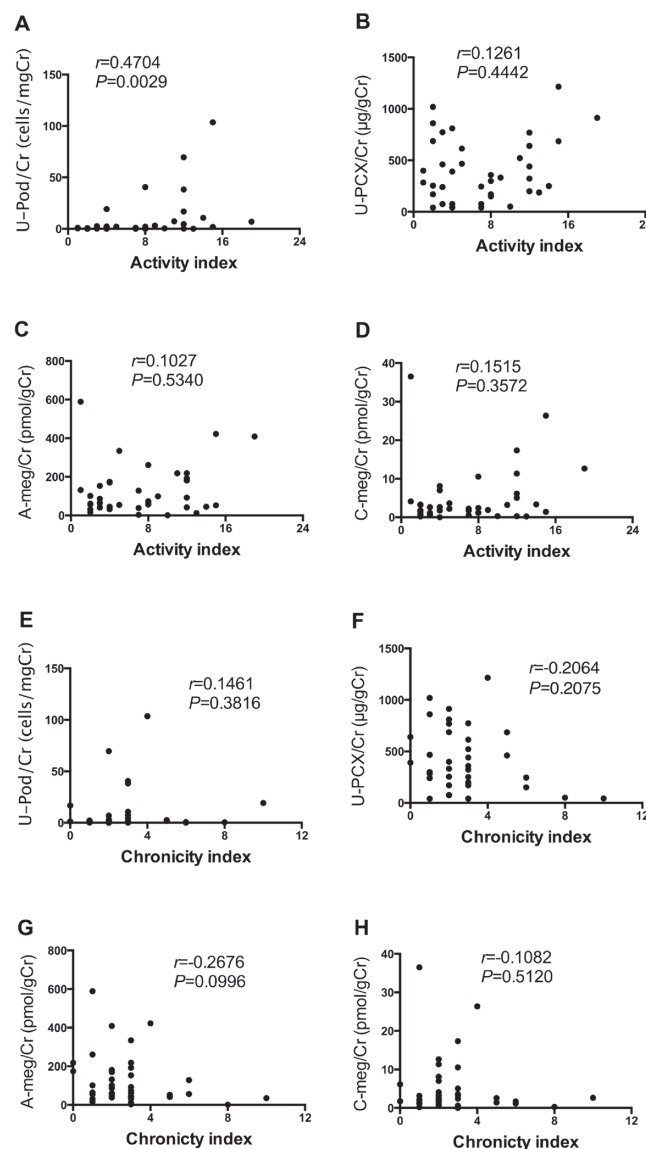


Fig. 3. 組織学的activity index, chronicity indexと新規尿中マーカーとの相関。(A) U-Pod/Crと組織学的activity indexとの相関。(B) U-PCX/Crと組織学的activity indexとの相関。(C) A-meg/Crと組織学的activity indexとの相関。(D) C-meg/Crと組織学的activity indexとの相関。(E) U-Pod/Crと組織学的chronicity indexとの相関。(F) U-PCX/Crと組織学的chronicity indexとの相関。(G) A-meg/Crと組織学的chronicity indexとの相関。(H) C-meg/Crと組織学的chronicity indexとの相関。U-Pod/Crと組織学的activity indexとの間に正の相関があった ($r=0.4704$, $P=0.0029$)。Spearman's r correlation testを用いた。

Table 3. 新規尿中マーカーと各々の組織学的病変との相関. (A) U-Pod/Cr. 多変量解析によるとU-Pod/CrとCCを持つ糸球体の割合は正の相関があった. (B) U-PCX/Cr. (C) A-meg/Cr. (D) C-meg/Cr. U-PCX/Cr, A-meg/Cr, C-meg/Crは多変量解析によると特定の組織学的病変との有意な相関はなかった. 単変量解析にはSpearman's r correlation testを, 多変量解析にはmultiple liner regression analysisを用いた. EH: endocapillary hypercellularity, LI: leukocyte infiltration, SH: subendothelial hyaline deposits, FN: fibrinoid necrosis/karyorrhexis, CC: cellular crescents, II: interstitial inflammation, GS: glomerular sclerosis, FC: fibrous crescents, TA: tubular atrophy, IF: interstitial fibrosis, SB: spike/bubbly appearance.

A				
U-Pod/Cr				
Variables	Univariate analysis r	Univariate analysis P value	Multivariate analysis β	Multivariate analysis P value
EH	0.4307	0.0070	-0.162	0.858
LI	0.2966	0.0766	-0.138	0.285
SH	0.1213	0.4683	NA	NA
FN	0.1338	0.4231	NA	NA
CC	0.4936	0.0016	0.809	<0.0001
II	0.05168	0.7580	NA	NA
GS	-0.01778	0.9156	NA	NA
FC	-0.2157	0.1934	0.089	0.441
TA	-0.01772	0.9159	NA	NA
IF	0.1409	0.3988	NA	NA
SB	-0.3163	0.0530	0.020	0.866

B				
U-PCX/Cr				
Variables	Univariate analysis r	Univariate analysis P value	Multivariate analysis β	Multivariate analysis P value
EH	0.2418	0.1380	0.112	0.521
LI	0.3378	0.0355	0.319	0.059
SH	0.008855	0.9573	NA	NA
FN	-0.06305	0.7030	NA	NA
CC	0.1899	0.2469	NA	NA
II	-0.1353	0.4114	NA	NA
GS	-0.3827	0.0162	-0.145	0.507
FC	-0.3764	0.0182	-0.200	0.340
TA	-0.2209	0.1766	-0.198	0.199
IF	0.02253	0.8917	NA	NA
SB	0.1343	0.4149	NA	NA

C				
A-meg/Cr				
Variables	Univariate analysis r	Univariate analysis P value	Multivariate analysis β	Multivariate analysis P value
EH	0.07112	0.6670	NA	NA
LI	0.2061	0.2082	NA	NA
SH	0.1711	0.2975	NA	NA
FN	0.03433	0.8357	NA	NA
CC	0.04805	0.7715	NA	NA
II	-0.1208	0.4637	NA	NA
GS	-0.3644	0.0226	-0.196	0.372
FC	-0.3991	0.0119	-0.156	0.477
TA	-0.1425	0.3868	NA	NA
IF	-0.1389	0.3989	NA	NA
SB	-0.05791	0.7262	NA	NA

D				
C-meg/Cr				
Variables	Univariate analysis r	Univariate analysis P value	Multivariate analysis β	Multivariate analysis P value
EH	0.3364	0.0363	0.100	0.605
LI	0.3205	0.0467	0.199	0.281
SH	-0.09207	0.5772	NA	NA
FN	-0.07784	0.6376	NA	NA
CC	0.1694	0.3024	NA	NA
II	0.05558	0.7368	NA	NA
GS	-0.2914	0.0717	-0.300	0.214
FC	-0.2916	0.0717	0.001	0.997
TA	-0.1177	0.4753	NA	NA
IF	0.1277	0.4386	NA	NA
SB	-0.2965	0.0669	0.090	0.596

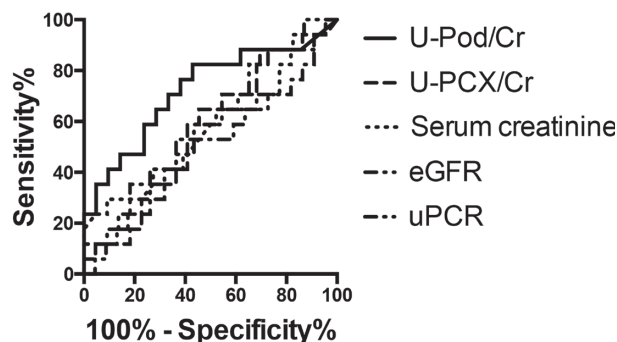


Fig. 4. CCの存在予測のためのROC解析. U-Pod/CrでCCの存在を予測する場合のreceiver operating characteristic (ROC) analysisでのarea under the curve (AUC)は0.72270であった ($P=0.01964$). カットオフ値を2.785 cells/mgCrより大とした時の感度は47.06%, 特異度は85.71%であった. 他のマーカーではCCの存在を予測できなかった.

85.71%であった. 血清クレアチニン値, eGFR, uPCRではCCの存在を予測できなかった.

考 察

U-Pod/Cr, U-PCX/Cr, C-meg/Crは活動性のLNで上昇する. U-Pod/Cr, U-PCX/Cr, C-meg/Crは蛋白尿との相関があり, C-meg/Crは既知の尿細管傷害マーカーとも相関があった. Class IVのU-Pod/Crはclass Vと比較し高値であり, class VのU-PCX/Crはclass IIIと比較して高値であった. U-Pod/Crは組織学的なactivity indexと中等度の正の相関があった. U-Pod/Crと関連がある組織学的病変はCCであり, ROC解析によるとCCの存在の予測にU-Pod/Crは役立つ事が分かった.

Nakamuraらは蛋白尿, 血尿, 腎機能悪化で定義された非活動性LNでは0 (0-0) cells/mL ($n=8$), 活動性LNでは4.0 (1.7-5.2) cells/mL ($n=8$)の尿中Podの脱落があったと報告している²⁶⁾. 検体数, 尿中クレアチニン濃度補正の有無, 活動性の定義, 重症度などの相違はあるが, 本研究の結果はこの結果とほぼ一致していると考えられた. LNにおいてU-Pod/Crと組織学的病変の検討の報告はまだない. 本研究ではU-Pod/Crは急性増殖病変が大きく影響を与える組織学的activity indexおよびCCを持つ糸球体の割合と正の相関があることからU-Pod/Crは増殖性病変の影響を受けると考えられた. Haraらは, 小児IgA腎症および紫斑病性腎炎20名において尿中Pod数とCCを表す管外病変スコアが相関していると報告し²³⁾, Asaoらは, 成人IgA腎症35名において, U-Pod/Crと管外病変スコアは有意な相関は見いだせなかったと報告している³⁸⁾. 三者で結果が異なる原因として, 腎炎の種類や成人/小児という対象患者の差の他に, Asaoらの研究ではuPCRが0.34 (0.17-0.55) g/gCrであったのに対しHaraらの研究では

2.28±0.55 g/gCr (平均値±標準偏差), 本研究では2.43 (0.96-4.63) g/gCrであったことからより腎炎の活動性が高く, U-Pod/CrとCCのある糸球体の割合に有意な相関が出た可能性が考えられた.

HaraらはLN 5名においてU-PCX/Crが44.3±10.8 ng/μmolCr [391.0±95.5 μg/gCr (平均値±標準偏差)]であり, 正常コントロール群の69名の7.1±0.5 ng/μmolCr [61.9±4.42 μg/gCr (平均値±標準偏差)]よりも高値であったと報告している³²⁾. 本研究のLN (+) 群の結果はこの結果とほぼ一致していると考えられ, またLN (-) 群のU-PCX/CrはLN (+) 群よりも正常者に近い事が示唆された. LNにおいてU-PCX/Crと組織学的病変の検討の報告はまだない. Asaoらは成人IgA腎症35名においてU-PCX/CrとCCを表す管外病変スコアが正の相関を示していたと報告しており³⁸⁾, 多変量解析で相関のある病理組織所見を見いだせなかった本研究の結果と合致しなかった. 軽度の糖尿病性腎症や膜性腎症など尿中Pod数は上昇しないがU-PCX/Crが上昇するため^{24, 40, 32)}, U-PCX/Crを上昇する性質の組織学的病変は, U-Pod/Crを上昇させる性質の組織学的病変より多く存在する事が示唆される. LNは様々な病変が混在する腎症であり, 特定の病変ではなく様々な病変が合わさってU-PCX/Crを上昇させている可能性が考えられた.

LNの尿中megalinに関する報告は皆無である. Ogasawaraらは2型糖尿病においてA-meg/CrよりもC-meg/Crの方が尿中アルブミン/尿クレアチニン濃度比との相関は大きく, さらにeGFR 60 mL/min/1.72m²未満患者のC-meg/Crが高かったがA-meg/Crは高くなかったことを報告している³⁵⁾. SekiらはC-meg/Crのみの検討でIgA腎症における組織学的評価と透析導入リスクとの関連, 膜性腎症における正常コントロールとの有意差を報告している³⁶⁾. 本研究ではC-meg/CrがLN (+) 群で上昇しており, uPCR, α1MG/Cr, NAG/Crと相関していた. 従って, C-meg/CrはLNにおいても前述の腎症と同様に上昇し, 尿所見と相関すると考えられた. Megalinは近位尿細管細胞由来であることから尿細管間質の組織学的病変との相関が期待される. しかしSekiらによるIgA腎症での検討ではTAとIFのスコアとC-meg/Crの相関は見いだせなかった³⁶⁾. 本研究でもII, TA, IFとC-meg/Crの相関は見いだせなかった. この事は組織学的変化が出現する前の軽微な傷害でもC-meg/Crが既上昇してしまっている可能性, II, TA, IFはmegalinの由来となる近位尿細管の急性の病理組織所見を直接評価していないため相関を検出できなかった可能性, 腎生検で得たサンプルが必ずしも腎全体の尿細管間質病変を反映していなかった可能性, 尿細管間質の組織学的変化C-meg/Crと関連がない可能性が考えられた.

本研究ではU-Pod/Cr>2.785 cells/mgCrならば感度47.06%, 特異度85.71%でLNのCCの存在予測ができる事が分かった. CCが存在で想定される強力な免疫抑制

療法は有害事象も少なくなく、過剰治療を防ぐためにも、高い特異度を保つようにこのカットオフ値を選択した。CCはLNにおいて腎の予後不良因子であり¹³⁾、ACRのガイドラインでもCCがある場合は強力な免疫抑制療法を行う事を推奨している⁸⁾。抗凝固剤が中止できないなど腎生検の禁忌があり、活動性のLNが疑われる症例においては、U-Pod/Crの高値はCCの存在を示唆し、強力な免疫抑制療法開始の有用な基準の1つになるかもしれない。U-Pod/Crと正の相関があった組織学的activity indexも腎予後を反映すると報告されている^{14, 41, 42)}。そしてU-PCX/Cr, C-meg/Crと正の相関があったuPCRはLNを含む腎症/腎炎でバイオマーカーとして使用されている。従って、U-Pod/Cr, U-PCX/Cr, C-meg/CrはLNの組織学所見のみならずLNの腎予後を反映する非侵襲的バイオマーカーになりうる可能性があり、今後も縦断研究を継続していきたい。

この研究には6つの限界がある。第1に、ほとんどの患者には腎機能低下がなく早期に診断されたLNでの検討であり、そして多くがchronicity indexの低い患者群である事である。従って腎炎の進行例や慢性病変が強いLNにおいては今回の研究結果が適用できない可能性がある。第2に、LN(+)群にclass I, II, VIが含まれておらず一般に免疫抑制療法が必要ないclass I, II, VIと免疫抑制療法が必要なclass III, IV, Vとの比較ができなかった事である。第3に、尿所見が正常にも関わらず腎生検にて光学顕微鏡での増殖性腎炎や電子顕微鏡での高度電子沈着物などのLNの所見を持つSLE患者群がおり、silent lupus nephritisとして報告されている⁴³⁾。本研究でLN(-)群は腎機能や尿所見を用いて分類されており、silent lupus nephritisが含まれていることでLN(-)群の結果に影響を及ぼした可能性がある。第4に、LN(+)群の再燃症例などの一部で既に免疫抑制療法やアンジオテンシン変換酵素阻害薬/アンジオテンシン受容体拮抗薬の介入がなされ、腎保護的に働き⁴⁴⁾結果に影響を与えた可能性がある。第5に過去のU-Pod/Cr, U-PCX/Cr, A-meg/Cr, C-meg/Crについての報告では尿沈渣との関連を検討したものはなかったため、本研究でも検討のデータに含めていなかった。しかしLNを含む腎症/腎炎において尿沈渣は重要なデータであり、今後の検討には含めるべきと考えた。そして最後に、本研究は一時点における臨床データをもとに尿中マーカーの検討を行ったが、本研究の尿中マーカーの有用性を確認するには中長期的な腎予後や治療反応性などの情報が今後必要になると考えた。

結 論

U-Pod/Crは組織学的な活動性を反映する。U-Pod/Crは強力な免疫抑制療法が必要とされるCCの存在の予測の非侵襲的なマーカーになる可能性がある。C-meg/Crは活動性のLNで上昇し、既知の尿細管傷害マーカーと正の相関があった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本論文のご指導、ご高閲を賜りました埼玉医科大学リウマチ膠原病科 三村俊英教授と梶山浩先生、また、検体採取にご協力頂いた外来受け持ち医、病棟受け持ち医、外来スタッフ、病棟スタッフ、医局研究助手、医局秘書の皆様には深謝いたします。

参考文献

- 1) Contreras G, Roth D, Pardo V, Striker LG, Schultz DR. Lupus nephritis: a clinical review for practicing nephrologists. Clin Nephrol 2002;57:95-107.
- 2) 中井滋, 花房規男, 政金生人, 谷口正智, 濱野高行, 庄司哲雄, 他. わが国の慢性透析療法の現況 (2012年12月31日現在). 日本透析医学会雑誌 2014;47:1-56.
- 3) Waldman M, Appel GB. Update on the treatment of lupus nephritis. Kidney Int 2006;70:1403-12.
- 4) Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. J Am Soc Nephrol 2004;15:241-50.
- 5) Pollak VE, Pirani CL, Schwartz FD. The natural history of the renal manifestations of systemic lupus erythematosus. 1964. J Am Soc Nephrol 1997;8:1189-98; discussion-95.
- 6) Yokoyama H, Wada T, Hara A, Yamahana J, Nakaya I, Kobayashi M, et al. The outcome and a new ISN/RPS 2003 classification of lupus nephritis in Japanese. Kidney Int 2004;66:2382-8.
- 7) Hiramatsu N, Kuroiwa T, Ikeuchi H, Maeshima A, Kaneko Y, Hiromura K, et al. Revised classification of lupus nephritis is valuable in predicting renal outcome with an indication of the proportion of glomeruli affected by chronic lesions. Rheumatology (Oxford) 2008;47:702-7.
- 8) Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, Fitzgerald JD, et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. Arthritis Care Res (Hoboken) 2012;64:797-808.
- 9) Bertias GK, Tektonidou M, Amoura Z, Aringer M, Bajema I, Berden JH, et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. Ann Rheum Dis 2012;71:1771-82.
- 10) Kidney Disease: Improving global outcomes (KDIGO) glomerulonephritis work group. KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. Kidney Inter, Suppl

- 2012;2:139-274.
- 11) Bohle A, Wehrmann M, Bogenschutz O, Batz C, Vogl W, Schmitt H, et al. The long-term prognosis of the primary glomerulonephritides. A morphological and clinical analysis of 1747 cases. *Pathol Res Pract* 1992;188:908-24.
 - 12) Park MH, D'Agati V, Appel GB, Pirani CL. Tubulointerstitial disease in lupus nephritis: relationship to immune deposits, interstitial inflammation, glomerular changes, renal function, and prognosis. *Nephron* 1986;44:309-19.
 - 13) Yu F, Tan Y, Liu G, Wang SX, Zou WZ, Zhao MH. Clinicopathological characteristics and outcomes of patients with crescentic lupus nephritis. *Kidney Int* 2009;76:307-17.
 - 14) Austin HA, 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE. Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int* 1984;25:689-95.
 - 15) Kriz W, Gretz N, Lemley KV. Progression of glomerular diseases: is the podocyte the culprit? *Kidney Int* 1998;54:687-97.
 - 16) Drumond MC, Deen WM. Structural determinants of glomerular hydraulic permeability. *Am J Physiol* 1994;266:F1-12.
 - 17) Kriz W, Elger M, Mundel P, Lemley KV. Structure-stabilizing forces in the glomerular tuft. *J Am Soc Nephrol* 1995;5:1731-9.
 - 18) Lemley KV, Abdullah I, Myers BD, Meyer TW, Blouch K, Smith WE, et al. Evolution of incipient nephropathy in type 2 diabetes mellitus. *Kidney Int* 2000;58:1228-37.
 - 19) Lemley KV, Lafayette RA, Safai M, Derby G, Blouch K, Squarer A, et al. Podocytopenia and disease severity in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2002;61:1475-85.
 - 20) D'Agati VD. Podocyte injury in focal segmental glomerulosclerosis: Lessons from animal models (a play in five acts). *Kidney Int* 2008;73:399-406.
 - 21) Hara M, Yamamoto T, Yanagihara T, Takada T, Itoh M, Adachi Y, et al. Urinary excretion of podocalyxin indicates glomerular epithelial cell injuries in glomerulonephritis. *Nephron* 1995;69:397-403.
 - 22) Hara M, Yanagihara T, Takada T, Itoh M, Matsuno M, Yamamoto T, et al. Urinary excretion of podocytes reflects disease activity in children with glomerulonephritis. *Am J Nephrol* 1998;18:35-41.
 - 23) Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Cumulative excretion of urinary podocytes reflects disease progression in IgA nephropathy and Schonlein-Henoch purpura nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007;2:231-8.
 - 24) Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1379-83.
 - 25) Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, et al. The urinary podocyte as a marker for the differential diagnosis of idiopathic focal glomerulosclerosis and minimal-change nephrotic syndrome. *Am J Nephrol* 2000;20:175-9.
 - 26) Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Sekizuka K, et al. Urinary podocytes for the assessment of disease activity in lupus nephritis. *Am J Med Sci* 2000;320:112-6.
 - 27) Vogelmann SU, Nelson WJ, Myers BD, Lemley KV. Urinary excretion of viable podocytes in health and renal disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:F40-8.
 - 28) Nielsen JS, McNagny KM. The role of podocalyxin in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1669-76.
 - 29) Kerjaschki D, Poczewski H, Dekan G, Horvat R, Balzar E, Kraft N, et al. Identification of a major sialoprotein in the glycocalyx of human visceral glomerular epithelial cells. *J Clin Invest* 1986;78:1142-9.
 - 30) Hara M, Yanagihara T, Kihara I, Higashi K, Fujimoto K, Kajita T. Apical cell membranes are shed into urine from injured podocytes: a novel phenomenon of podocyte injury. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:408-16.
 - 31) Hara M, Yanagihara T, Hirayama Y, Ogasawara S, Kurosawa H, Sekine S, et al. Podocyte membrane vesicles in urine originate from tip vesiculation of podocyte microvilli. *Hum Pathol* 2010;41:1265-75.
 - 32) Hara M, Yamagata K, Tomino Y, Saito A, Hirayama Y, Ogasawara S, et al. Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with diabetes: establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin. *Diabetologia* 2012;55:2913-9.
 - 33) Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:256-66.
 - 34) Saito A, Sato H, Iino N, Takeda T. Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:403272.
 - 35) Ogasawara S, Hosojima M, Kaseda R, Kabasawa H, Yamamoto-Kabasawa K, Kurosawa H, et al. Significance of urinary full-length and ectodomain forms of megalin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2012;35:1112-8.
 - 36) Seki T, Asanuma K, Asao R, Nonaka K, Sasaki Y, Oliva Trejo JA, et al. Significance of urinary full-length megalin in patients with IgA nephropathy. *PLoS One* 2014;9:e114400.

- 37) Matsuo S, Imai E, Horio M, Yasuda Y, Tomita K, Nitta K, et al. Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. *Am J Kidney Dis* 2009;53:982-92.
- 38) Asao R, Asanuma K, Kodama F, Akiba-Takagi M, Nagai-Hosoe Y, Seki T, et al. Relationships between levels of urinary podocalyxin, number of urinary podocytes, and histologic injury in adult patients with IgA nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:1385-93.
- 39) Tanuma A, Sato H, Takeda T, Hosojima M, Obayashi H, Hama H, et al. Functional characterization of a novel missense CLCN5 mutation causing alterations in proximal tubular endocytic machinery in Dent's disease. *Nephron Physiol* 2007;107:p87-97.
- 40) Hara M, Yanagihara T, Kihara I. Urinary podocytes in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron* 2001;89:342-7.
- 41) Magil AB, Puterman ML, Ballon HS, Chan V, Lirenman DS, Rae A, et al. Prognostic factors in diffuse proliferative lupus glomerulonephritis. *Kidney Int* 1988;34:511-7.
- 42) Esdaile JM, Federgreen W, Quintal H, Suissa S, Hayslett JP, Kashgarian M. Predictors of one year outcome in lupus nephritis: the importance of renal biopsy. *Q J Med* 1991;81:907-18.
- 43) Mahajan SK, Ordonez NG, Feitelson PJ, Lim VS, Spargo BH, Katz AI. Lupus nephropathy without clinical renal involvement. *Medicine (Baltimore)* 1977;56:493-501.
- 44) Kent DM, Jafar TH, Hayward RA, Tighiouart H, Landa M, de Jong P, et al. Progression risk, urinary protein excretion, and treatment effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in nondiabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:1959-65.