

## 蛋白尿発症メカニズムの解明 — 新規治療法開発に向けた取り組み —



新潟大学大学院医歯学総合研究科  
附属腎研究施設分子病態学分野

河内 裕

### はじめに

慢性腎不全による血液透析患者数は26万人を超えたと報告されている。また、腎不全の予備軍とも考えられる慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease：CKD）患者数は、480万人とも報告されている。このような状況下において、腎臓病の発症機序の解明、新規治療法開発に向けた研究は極めて重要な研究課題である。新潟大学には全国で唯一の腎に関する特別研究施設が医歯学総合研究科に付置されており、国内外から多くの研究者を受け入れ研究を進めてきた。筆者の所属する分子病態学分野（旧免疫学部門）は腎研究施設の2番目の研究部門（分野）として昭和55年にスタートし、「蛋白尿の発症機序に関する研究」を主要な研究テーマの1つとして掲げ、その病態解明に取り組んできた。

蛋白尿は糸球体の障害を示す重要な指標であるとともに、高度な蛋白尿による低蛋白血症は様々な病態を引き起こす。また、尿細管は、糸球体のバリアーから漏出した血漿蛋白を再吸収しようとすることにより、過重な負荷、傷害を受ける。最近のいくつかの研究から、蛋白尿は、それ自体が腎不全へと進行させる最も重要な悪化因子であるということが明らかになっている。多くの腎障害において、蛋白尿を抑制、改善することができれば腎不全への進行を防ぐ、少なくとも進行を遅らせることができると考えられている。このような状況下において、蛋白尿を改善させるための新規治療法開発に向けた研究は極めて重要な、社会的な要請度の高い研究であると考えられる。しかしながら蛋白尿の発症機序は未だに十分に解明されていないというのが現状である。本稿では、蛋白

尿発症機序についてのこれまでの考え方の経緯、最新の研究動向、筆者らの研究グループがこれまでに取り組んできた研究について紹介させていただきたい。

### 腎糸球体毛細血管壁の構造—バリアーは何処か？—

腎糸球体の毛細血管壁は、内側から内皮細胞、基底膜、そしてその外側を糸球体上皮細胞足突起が覆う構造をしている（図1）。糸球体上皮細胞の足突起と足突起の間には、スリット膜と呼ばれるフィルター様の構造物がある（図2）。内皮細胞、基底膜、スリット膜の3層構造の障壁で1日に約160ℓの水分をろ過し、かつ血漿蛋白の通過を最小限に抑える役割を果たしている。糸球体内皮細胞は、径70-100 nmの窓を有する窓開き型内皮と呼ばれている細胞で、血漿蛋白が通過するのを防ぐためのバリアーとしての機能はほとんど有していないと考えられている。蛋白の通過を防ぐメインバリアーは、糸球体基底膜か、スリット膜か？という問題について、1960年代から今日にいたるまで多くの議論があった。筆者らの研究グループは1980年代からスリット膜の重要性を示す所見を報告してきたが、当時、スリット膜の重要性を強調するグループは私たちのグループを含め2-3の研究グループのみで、糸球体血管壁の蛋白通過を防ぐメインバリアーは、糸球体基底膜とする考え方が一般的であった。しかしながら近年、先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子の遺伝子産物である分子が、スリット膜の構成分子であることが明らかになり、スリット膜がバリアーとして重要な働きをしているとする考えが広く受け入れられ

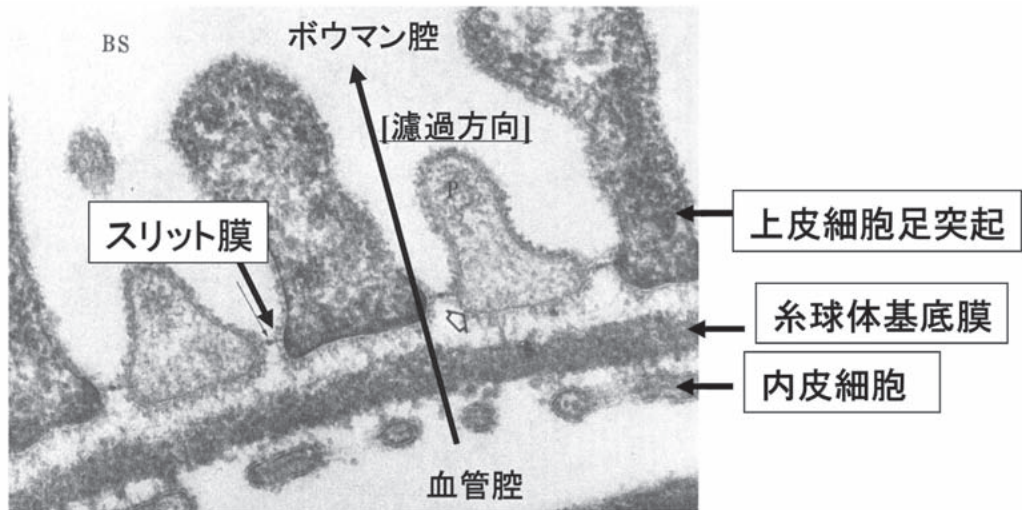


図1：腎糸球体毛細血管壁の透過電顕所見

糸球体の毛細血管壁は、内側から内皮細胞、基底膜、そしてその外側を糸球体上皮細胞足突起が覆う3層構造をしている。糸球体上皮細胞の足突起と足突起の間には、25-60 nm の間隙があり、基底膜から約60nm 離れた部位にスリット膜と呼ばれる電子密度の高い線状の物質が張られている。

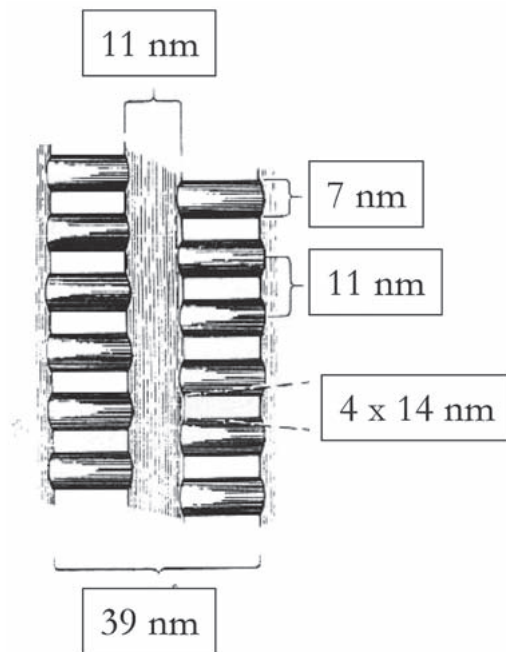


図2：スリット膜の模式図

スリット膜は、図1で示したような、前面から見た通常の透過電顕所見では電子密度の高い線状の線として観察されるが、スリット膜を上から見るとこの模式図のようなフィルター様の構造物として観察される。スリット膜は、約14 x 4 nm の大きさの孔をもつフィルターで、アルブミンなどの血清蛋白の透過を防ぐバリアーとして機能していると考えられている。

るようになってきている。

糸球体上皮細胞は、増殖能を持たない終末分化細胞であると考えられており、高度に分化した極めてユニークな形態をしている。糸球体上皮細胞は分岐した多くの足突起を持っており、ポドサイト、(タコ)足細胞などと呼ばれている。足突起は、同じ胞体から出た突起同士で絡み合うことはなく常に別の細胞から出た突起と絡み合って基底膜の外側を覆っている(図3)。この足突起と足突起の間には、25-60 nm の間隙があり、基底膜から約60nm 離れた部位にスリット膜と呼ばれる電子密度の高い線状の物質が張られている。この構造物をスリット膜と呼んでいる。スリット膜は、約14 x 4 nm の大きさの孔をもつ“ジッパー”様の構造をしており、アルブミンなどの血漿蛋白の通過を防ぐバリアーとしての機能にふさわしい構造であると報告されている。ここで強調しておきたいことは、スリット膜は、隣り合った細胞から出た突起間に存在する構造物であるので、細胞間接着装置の1種であるということである。現在の考え方は、この上皮細胞間の細胞間接着装置の障害により蛋白尿が発症するということである。

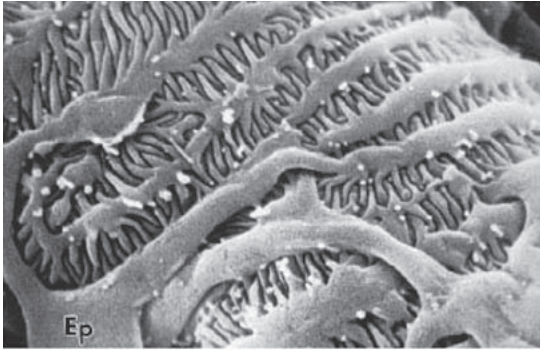


図3：糸球体の走査電顕所見

糸球体上皮細胞は分岐した多くの足突起を持つ極めてユニークな形態をしている。足突起は、同じ胞体から出た突起同士で絡み合うことはなく常に別の細胞体から出た突起が隣り合うように絡み合っており、基底膜の外側を覆っている。

### 糸球体上皮細胞スリット膜のバリアーとしての重要性を示した報告

#### 1) 単クローン抗体を用いたモデルでの報告

筆者の所属する研究グループは、腎炎発症の引き金を引く抗原抗体系を解析することを目的として糸球体をターゲットとした単クローン抗体の作成を続けてきた。これまでいくつかの抗体について報告してきたが、その中の1つで私たちが516抗体と名付けた抗体は、スリット膜と反応する抗体で、ラットに静注すると著明な蛋白尿が誘導される。<sup>125</sup>I標識抗体を用いた検討で、投与された抗体は、糸球体基底膜を通過し、静注1時間後には、スリット膜への結合がピークとなることを明らかにしている。また、抗体投与数時間後には病的蛋白尿が出現することを確認している。蛋白尿分画の検討の結果、アルブミン尿のみならず、IgGなどの高分子蛋白の尿中への漏出も確認している。蛋白尿発症時、炎症細胞浸潤像、補体の沈着などの所見は一切認められず、抗体の結合によりスリット膜の分子構造に変化が起り、スリット膜のバリアー構造に乱れが生じて血漿蛋白の漏出をもたらしたと考えている<sup>1, 2)</sup>。最近の研究でこの抗体は後述のネフリンと名付けられた先天性ネフローゼ症候群の原因分子の細胞外部を認識する抗体で、この抗体の結合によりネフリン並びにその関連分子の発現、局在が変化することを明らかにしている<sup>3, 4)</sup>。この抗体を用いた一連の研究は、

スリット膜がバリアーとして重要な役割を果たしていることを直接示した所見である。

#### 2) 先天性ネフローゼ症候群の原因分子の同定

1998年にフィンランドのグループが、フィンランド型先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子(NPHS1)の変異遺伝子を同定し、その責任遺伝子の遺伝子産物として同定された分子をネフリンと名づけた。この分子は、1241個のアミノ酸残基からなる分子量約180 kdの分子で接着分子様の構造をもつ1回膜貫通型の比較的大きな分子である。ネフリンの分子機能についてはまだ不明な点が多いが、前述のように筆者らは、これまで報告してきた蛋白尿誘導能を持つ抗スリット膜抗体はネフリンの細胞外部を認識していることを明らかにしており、ネフリン分子はスリット膜のバリアー構造維持に直接関与している分子であることを明らかにしている。ネフリンの同定の2年後の2000年にフランスのグループが常染色体劣性の遺伝形式をもつ家族性のステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の原因遺伝子(NPHS2)の遺伝子を同定し、その責任遺伝子の遺伝子産物として同定されたポドシンも、スリット膜部に存在していることを明らかにした。免疫電顕による検討で、ポドシンは、N末部、C末部ともに細胞質に存在する1回膜貫通型のヘアピン様の構造を持った分子と考えられている。また、ドイツのグループは、ポドシンはネフリンと結合性を持つことを証明しており、ポドシンはネフリンを細胞質側から支え、ネフリンのバリアー機能維持に関わっている分子であると考えられてきている。また、ノックアウトマウスでの検討で、CD2-associated protein (CD2AP)、Neph1と呼ばれる分子もスリット膜の機能維持に関わる分子であることが明らかになっている。

#### 日常診療で見られる病態における蛋白尿発症にスリット膜障害が関与しているのか？

上述のようにネフリン、ポドシンなどの分子は先天性疾患の原因分子として同定された分子であるが、これらスリット膜関連分子の機能低下が臨床で多く見られる後天性の疾患の蛋白尿の発症にも関与していると考えられてきている。筆者らのグループは、ネフリン、ポドシン、CD2APのラッ

トホモログのクローニングを行い、ラット実験モデルにおける、蛋白尿発症時のこれら分子の動態について詳細な検討を行った<sup>4,5)</sup>。ネフリン並びにポドシンと反応する抗体を用いた二重染色蛍光抗体法での検討で、正常糸球体では、ネフリン、ポドシンは、ともに係蹄壁にそった線状のパターンで観察され、両者は、極めて近傍に存在することを確認している。微小変化型ネフローゼ症候群のモデルである PAN 腎症では、蛋白尿発症時、ネフリン、ポドシンの発現は、不連続な顆粒状パターンとなり（図4）、両者は、必ずしも同じ局在を示さず、ネフリン、ポドシン分子が乖離して局在している所見を得ている。また、微小変化型ネフローゼ症候群の臨床材料においてもネフリンの発現が著明に低下している症例を経験しており微小変化型ネフローゼ症候群の発症にスリット膜機能の低下が関わっていることを明らかにしてい

る。また筆者らの研究グループの中枝らは、膜性腎症のモデルであるハイマン腎炎におけるスリット膜関連分子の動態を詳細に検討し、このモデルでの蛋白尿発症時、ネフリン、ポドシンの発現が著明に低下し、不連続な顆粒状パターンとなることを確認している<sup>6)</sup>。また、二重染色での検討で、それぞれの分子の発現量、局在変化がまだ著明でない病変誘導の早期にすでに、ネフリンーポドシン、ネフリンーCD2AP の局在が乖離していることを観察している。また、蛋白尿が出現する前に、ネフリン、ポドシンの mRNA 発現量が著明に低下していることも観察している。また、ハイマン腎炎の尿所見を Western blot 法で検討したところ、病変初期に尿中にネフリン分子が漏出しているのを確認している。この観察は、尿中ネフリンが、スリット膜障害の有無を知るための有用な診断法となりうることを示している。膜性腎症の臨

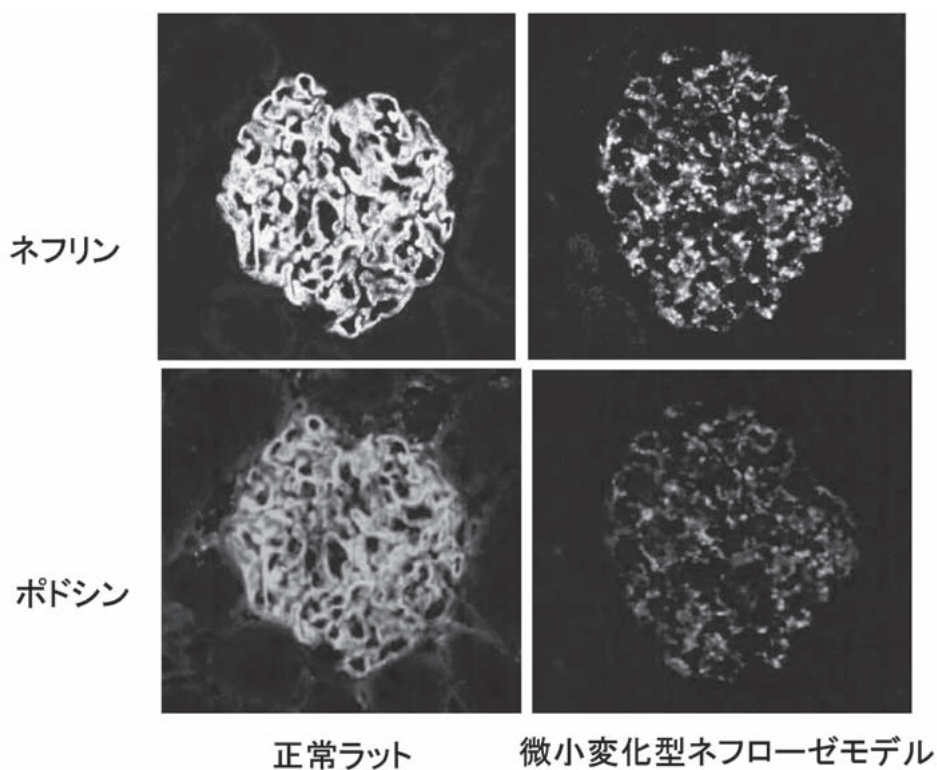


図4：ネフリン、ポドシンの局在を示した蛍光抗体法所見

ネフリン、ポドシン分子は、ともに正常糸球体では、糸球体毛細血管壁に沿った線状のパターンとして観察されるが、微小変化型ネフローゼ症候群のモデルである PAN 腎症では、両分子ともその発現量が著しく低下しており、不連続な顆粒状のパターンとして観察される。

床症例での検討もいくつか報告されており、筆者らはオランダのグループとの共同研究で膜性腎症症例でネフリンの染色性が著明に低下し、不連続な顆粒状のパターンに変化していることを観察している。また、最近、筆者らの研究グループの大滝らは、巣状糸球体硬化症のモデルである ADR 腎症におけるスリット膜関連分子の動態を詳細に検討し、この病態では病変誘導の極めて早期からネフリンと Neph1 の結合性が変化していることを明らかにしている。また、筆者らの研究グループの森岡ら<sup>7)</sup>、韓ら<sup>8, 9)</sup> は、スリット膜機能分子の機能低下がメソサンギウム増殖性腎炎モデルでの蛋白尿の進行に関与していることを明らかにしている。一連の研究は、スリット膜の機能障害は、特殊な先天性の疾患だけでなく日常臨床で見られる後天性の糸球体疾患における蛋白尿発症にも関わっていることを示している。

## 蛋白尿治療法開発に向けた研究

### 1) 新たな治療ターゲットの探索にむけた研究

筆者らは、現在、新たな治療のターゲットとなるスリット膜機能分子を探索することを目的として研究を続けている。筆者らは、これまで臨床材料、実験モデルなどを用い、スリット膜機能分子の発現動態と蛋白尿の関係について詳細な解析を続けてきた。これまでの研究でスリット膜関連分子の発現、局在の変化が蛋白尿を発症させる重要な要因となることを証明してきた。しかし一方で、スリット膜関連分子の発現、局在の変化が、どのような原因、機序で引き起こされるのか？という問題については、まだ手付かずという状況である。筆者らは現在、既知のスリット膜関連分子の発現が変化するより前に、その発現が変化する分子を同定する作業を行っている。正常ラット糸球体より抽出した RNA (sample A)、微小変化型ネフローゼ症候群モデル誘導直後、蛋白尿発症前の動物より抽出した糸球体 RNA (sample B) を用い、サブトラクション (引き算) アッセイを行い、(A - B = C) の分画に残った RNA を解析する作業を行っている。この作業で得られた分子群は、病態の極めて早期にその発現が低下している分子群である。得られた分子の糸球体上皮細胞における発現、局在、病態での動態を解析する作業を地道

に続けている。筆者らの研究グループの宮内らは、この中の 1 つの synaptic vesicle protein 2B (SV2B) と呼ばれるシナプス顆粒に存在する分子に注目し解析を行った<sup>10)</sup>。これまでシナプス小胞関連分子群が糸球体に発現するという報告は無かったが、SV2B は正常糸球体において、スリット膜近傍に局在していること、スリット膜障害により発症する病態モデルでは、極めて早期、蛋白尿発症以前にその発現が著明に低下していることを確認している。また、siRNA 技術を用い SV2B をノックダウンした細胞では、スリット膜機能分子が正常な局在部位である突起部に存在できず、細胞質部に散在しているのを観察している。この観察は、SV2B がスリット膜関連分子が正しい位置に局在するための細胞内輸送に重要な役割を果たしていることを示している。現在、SV2B と相互作用を持つと考えられるシナプス小胞関連分子群の糸球体上皮細胞における発現、機能についての解析を進めている。これらの分子群は、蛋白尿治療のターゲットとしてだけでなく、新規診断法開発のためのマーカーとしても有用であると考え解析を行っている。解析中の分子のいくつかは、病的な状態の尿中で観察されることを確認している。また興味深いことに、その中の 1 つの分子は、予後の悪い病態である巣状糸球体硬化症モデルでは、病初期から尿中に検出できるのに対し、一過性の蛋白尿を示す微小変化型ネフローゼ症候群モデルでは、蛋白尿がピークの時期においても尿中に検出されないことを観察している。この分子はネフローゼ症候群の予後判定に有用であると考え、現在臨床材料を用いた解析を進めており、新規診断法としての特許出願の準備を進めている。また、シナプス小胞関連分子群以外の分子にも着目し、新規治療法、診断法開発のためのターゲットとなる分子を探索する作業を進めている<sup>11, 12, 13)</sup>。

### 2) 糸球体局所のアンジオテンシン作用制御による新規治療法の開発に向けた研究

アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン II (AII) レセプターブロッカー (ARB) など AII 作用を抑制する薬剤が蛋白尿に有用であることが大規模臨床研究で証明されている。ま

たこれらの薬剤が蛋白尿改善効果を有することは多くの臨床医が既に経験しているところである。しかしながら、その作用機序、AII 阻害薬がどのような機序で蛋白尿を改善するのか?ということについては、今なお十分に理解されていないというのが実情である。筆者らの研究グループの鈴木らは、ネフリン分子をターゲットとする単クローン抗体により誘導される蛋白尿モデルにおけるARBの効果の検討を行った<sup>14)</sup>。前述のようにこのモデルは、炎症反応、血圧、糸球体濾過量の変動などを伴わず、スリット膜の分子構造の変化により誘導される蛋白尿モデルであるため、AII作用とスリット膜との関係の解析のためには最良のモデルであると考えられる。一連の検討でARBは、この病態で観察されるネフリンなどのスリット膜機能分子の発現低下を抑制することにより蛋白尿を改善することを明らかにしている。この観察結果はARBが、スリット膜の機能分子の発現維持、機能維持に直接作用していることを示していると考えている。またこの解釈を検証するため培養糸球体上皮細胞を用いた検討を行い、AII刺激がネフリン発現を抑制すること、その抑制をARBが改善することを確認している。また、AIIの1型、2型受容体それぞれに特異的な阻害剤、刺激剤を用いた解析で、1型の受容体を介した刺激はスリット膜関連分子の発現を低下させること、一方で2型受容体を介した刺激は、スリット膜関連分子の発現を増強させることを証明している。一連の観察は、局所のAII作用が、スリット膜の機能維持、機能制御に関与していることを示している。2型受容体刺激は、蛋白尿治療の新たな方策として有用であると考えられ、現在、糸球体局所のAII作用制御機構の全体像の解明にむけた解析を進めている。局所のAII作用の制御は、蛋白尿に対する新たな治療戦略の上で重要であると考えている。

## おわりに

蛋白尿発症機序の解明は、腎臓病学の最も重要な命題の一つであるが、分子レベルでの発症機序の解析は進んでいなかった。ここ数年、ようやく糸球体上皮細胞スリット膜の分子レベルでの解析が進み、スリット膜構成分子の発現、局在の変化、分子間結合の異常が、多くの病態において蛋白尿発症の引き金を引くということがわかってきた。しかしながら、どのような機序で、どのような原因でスリット膜の機能異常が起こるのか?ということについては、その研究はまだ端緒についたばかりというのが現状である。ネフローゼ症候群のより有効な治療法の開発は急を要する課題である。スリット膜関連分子を標的とした治療薬が一日も早く臨床の現場で使われる日が来るよう努力を続けている。

## 文 献

- 1) Orikasa M et al: J Immunol 141: 807, 1988
- 2) Kawachi, H. et al: Am. J. Pathol 147: 823, 1995.
- 3) Kawachi H et al: Am J Physiol 273: F984, 1997
- 4) Kawachi H et al: Kidney Int; 57: 194, 2000
- 5) Kawachi H et al: J Am Soc Nephrol; 14: 46, 2003
- 6) Nakatsue T et al: Kidney Int 67: 2239, 2005
- 7) Morioka Y et al: Kidney Int 60:2192, 2001
- 8) Han GD et al: J Am Soc Nephrol; 14:3111, 2003
- 9) Han GD et al: J Am Soc Nephrol; 17: 442, 2005
- 10) Miyauchi N et al: J Am Soc Nephrol 17: 2748, 2006
- 11) Hashimoto T et al: Kidney Int; 72:954, 2007
- 12) Kawachi H et al: Nephrology 11: 274, 2006
- 13) 河内 裕 : 日本腎臓学会誌 49 : 77, 2007
- 14) Suzuki K et al: Am. J. Pathol 57: 413, 2007.