

原

著

アルポート症候群モデルマウスの作成と 腎糸球体上皮細胞障害に関する研究

新潟大学医学部小児科学教室（主任：内山 聖教授）

中山 正 成

Generation of Alport Mouse Model and
its Glomerular Epithelial Cell Injury

Masanari NAKAYAMA

*Department of Pediatrics,
Niigata University Faculty of Medicine*

Alport syndrome is a progressive hereditary renal disorder caused by mutations in the glomerular basement membrane (GBM) type IV collagen genes *COL4A3*, *COL4A4*, and *COL4A5*. However, the pathogenetic mechanism of this disease has not yet been fully understood. To elucidate the molecular nature of Alport syndrome, we generated *Col4a4* deficient mice as a mouse model for autosomal form of the disease.

These mice developed a progressive glomerulonephritis with microhematuria and proteinuria and died of renal failure at 19 ± 3 (mean \pm SD) weeks of age. Electron microscopic analysis revealed multilaminated thickening and thinning of GBM, which is a characteristic finding of Alport syndrome. Immunofluorescence analysis of GBM showed absence of type IV collagen $\alpha 3$, $\alpha 4$, and $\alpha 5$ chains and a persistence of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains. Northern blot analysis revealed the absence of *Col4a4* transcript, whereas mRNAs for the remaining chains were unchanged. In this report, we focused on the degeneration of mutant glomerular epithelial cells. The number of epithelial glomerular cells was significantly decreased and a marker for glomerular epithelial cell injury, Desmin was detected at 8 weeks of age.

Key words: Alport syndrome, knockout mouse
IV型コラーゲン, 腎糸球体上皮細胞, 腎不全

Reprint requests to: Masanari NAKAYAMA,
Department of Pediatrics,
Faculty of Medicine, Niigata University,
Niigata City, 951-8510 JAPAN.

別刷請求先:

〒951-8510 新潟市旭町通1番町757番地
新潟大学医学部小児科学教室

中山 正 成

緒 言

アルポート症候群は、難聴と時に眼病変を伴う進行性腎疾患であり、遺伝性腎症としては最も頻度の高い疾患である。通常、小児期までは腎機能は正常であり、思春期以降徐々に腎機能が低下し始め、10歳代後半から30歳代にかけて腎不全に陥る。本症の病因については、1990年に、最も頻度の高い伴性劣性遺伝型アルポート症候群が腎糸球体基底膜の主要な構成成分であるⅣ型コラーゲン α 鎖のうちの $\alpha 5$ 鎖遺伝子(COL4A5) NC1ドメイン領域の突然変異により発症することが初めて報告され¹⁾、その後、常染色体遺伝型 Alport 症候群は $\alpha 3$ 鎖あるいは $\alpha 4$ 鎖遺伝子(COL4A3あるいはCOL4A4)の突然変異が原因であることが明らかにされた²⁾。これらの変異により、糸球体基底膜の基本骨格であるⅣ型コラーゲン α 鎖による高次の網目構造が形成されないため糸球体基底膜の菲薄化、層状化、断裂が生じ、糸球体基底膜が担っている濾過機能が次第に失われる結果、蛋白尿が増加し、最終的には糸球体硬化に至る。

Ⅳ型コラーゲン遺伝子はヒトではCOL4A1~A6、マウスではCol4a1~a6が存在し、 $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖遺伝子、 $\alpha 3$ 鎖と $\alpha 4$ 鎖遺伝子、 $\alpha 5$ 鎖と $\alpha 6$ 鎖遺伝子がそれぞれ組みになって、同一の染色体上に共通のプロモーターを挟んで並ぶ、いわゆる head-to-head 構造をとる。これらの遺伝子産物である α 鎖蛋白は細胞外で通常1本の状態(モノマー)では存在できず、3本がC末端にあるNC1ドメインで接着し纏り合った状態(ヘテロトリマー)で存在する。その組み合わせは($\alpha 1^2 + \alpha 2$)、($\alpha 5^2 + \alpha 6$)、($\alpha 3 + \alpha 4 + \alpha 5$)の3通りが知られている^{3)~6)}。腎臓の糸球体基底膜は($\alpha 1^2 + \alpha 2$)と($\alpha 3 + \alpha 4 + \alpha 5$)により、腎ボウマン嚢基底膜は($\alpha 1^2 + \alpha 2$)と($\alpha 5^2 + \alpha 6$)により構成されている。胎生期の腎糸球体基底膜は、($\alpha 1^2 + \alpha 2$)のみで構成されているが、生後まもなく、それまで糸球体係蹄部基底膜を構成していた($\alpha 1^2 + \alpha 2$)によるコラーゲン骨格が、より強度のある($\alpha 3 + \alpha 4 + \alpha 5$)による骨格に置換され始め、マウスでは2週齢で置換が完了する。Col4a3、Col4a4、Col4a5のいずれに変異があっても、($\alpha 3 + \alpha 4 + \alpha 5$)のヘテロトリマーに異常が生じ、糸球体基底膜の変性が惹起される。

しかしながら、現在においても、Ⅳ型コラーゲン遺伝子の変異から糸球体硬化に至るまでのアルポート症候群の進展機序の詳細についてはほとんど不明のままである。

また、有効な治療法がないため腎不全を阻止することもできない。進展機序を解明し、遺伝子治療を含めた治療法を開発するためには、アルポート症候群のモデル動物が有用となる。モデル動物として、犬ではCol4a5に変異のある Samoid 犬⁷⁾、変異点が未だ明らかでない Novasota 犬⁸⁾、English-cocker-spaniel 犬⁹⁾、Bull-terrier 犬¹⁰⁾が、マウスではCol4a3ノックアウトマウス¹¹⁾¹²⁾、Col4a3とCol4a4の両方にまたがった挿入変異のあるCol4 Δ 3-4トランスジェニックマウス¹³⁾が現在までに報告されている。

今回、私たちはジーンターゲティング法を用いて、NC1ドメインを破壊したCol4a4ノックアウトマウスを作成した。このマウスはアルポート症候群の表現型を呈し、本症候群のモデルマウスになりうると考えられた。さらに、糸球体基底膜に付着して基底膜とともに濾過機能を担う上皮細胞に焦点をおき、上皮細胞障害マーカーとされるデスミン¹⁴⁾を免疫染色することによりCol4a4ノックアウトマウスにおいて腎糸球体上皮細胞障害が存在することを明らかにした。

方 法

ノックアウトマウスの作成

Col4a4 cDNA の NC1 ドメインの約 650 b の断片をプローベにし、129 Sv マウスゲノミックライブラリーをスクリーニングして約 15 kb のゲノム断片を得た。NC1 ドメインをコードするエクソンを含む約 3.5 kb の Kpn I - Bgl II 部分をネオマイシン耐性遺伝子 MC1 neoPA と入れ替え、DTA カセットに挿入し、ターゲティングベクターを構築した(図1)。相同組換え体の選択およびキメラマウスの作成は、里方らの方法¹⁵⁾によった。すなわち、制限酵素 Xho I により線状化したターゲティングベクターをエレクトロポレーション法により 129 Sv マウスの ES 細胞である J1 細胞に導入し、G 418 添加培地で培養し、G 418 抵抗性クローンを得た。これらのクローンの中から、図1に示したエクスターナルプローベを用いたサザンブロットにより、相同組換え体を決定した。相同組換え体を C57BL/6 マウスの 3.5 日胚盤胞にマイクロインジェクションし、偽妊娠 ICR マウス子宮に移植してキメラマウスを得た。生殖系列に入ったキメラマウスを用いて交配を進め Col4a4 ノックアウトマウスを得た。

ノーザンブロットハイブリダイゼーション

TRIZOL (Sigma) を用いて腎の total RNA を抽出した。20%ホルマリン/1.5%アガロースゲルに total

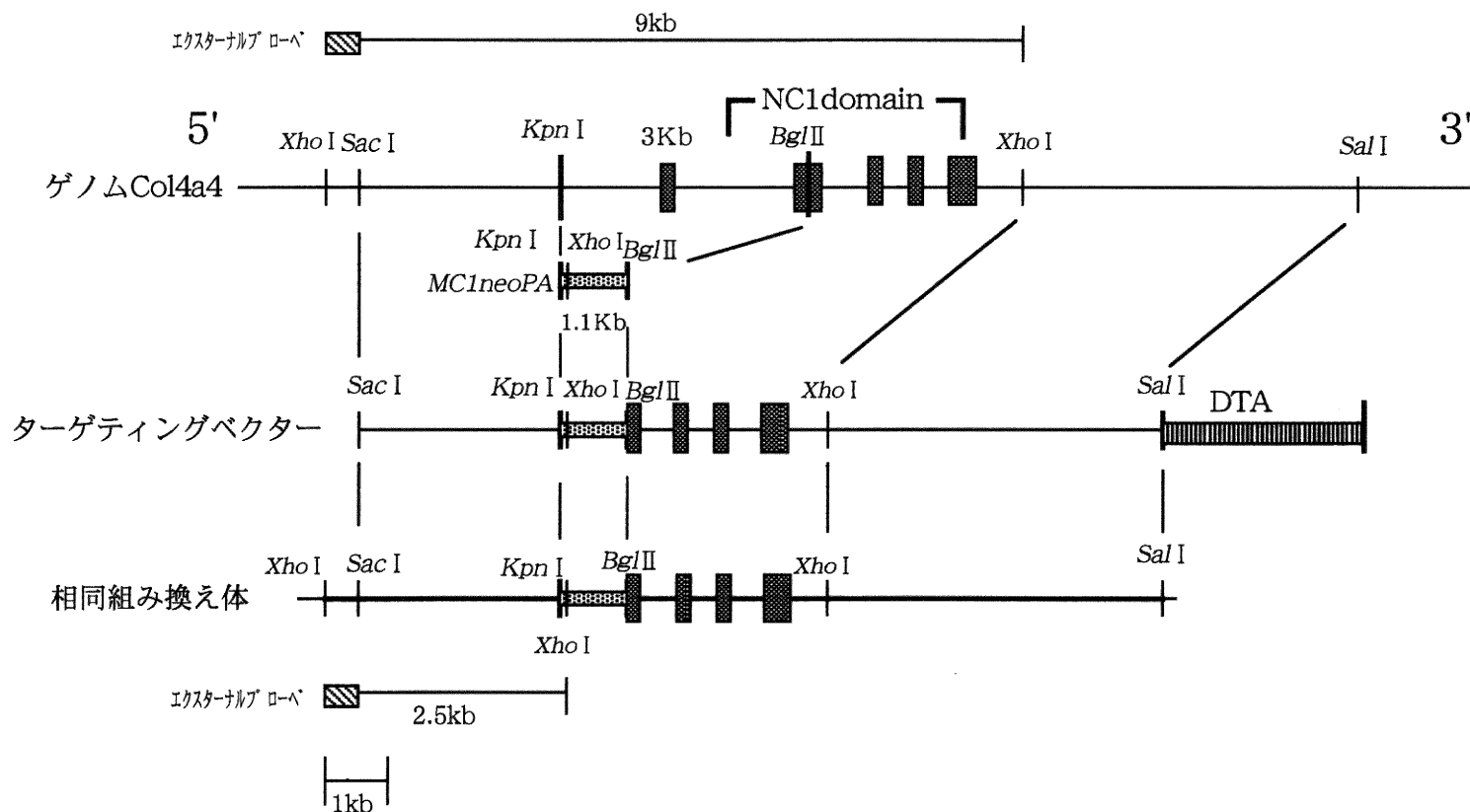


図1 ターゲティングベクターの構造

129 Sv マウスゲノミクライブラリーより得た約 15 kb のマウスゲノム断片ゲノム *Col4a4* 中の約 3.5 kb の *Kpn*I - *Bgl*II 断片を約 1.1 kb のネオマイシン耐性遺伝子 *MC1neoPA* と入れ替え DTA カセットに挿入し、ターゲティングベクターを構築した。線状化には制限酵素 *Xho*I を用いた。サザンブロットにはターゲティングベクターに用いた断片の外側約 250 b の断片をエクスターナルプローベとして用いた。

RNA 20 μ g を注いで電気泳動を行い、HybondN⁺ ナイロンメンブレン (Amersham) に 0.05 N 水酸化ナトリウム液を用いてブロットした。ハイブリダイゼーションに用いたプローベは各 IV 型コラーゲン α 鎖遺伝子の NC 1 ドメイン領域にあり、以下のプライマーを用いて PCR により増幅した。

Col 4a1 ; センス : 5' - CATCTGTGGACCATGGCTTC - 3', アンチセンス : 5' - TTGTCATGCACACTTGGCAG - 3',

Col 4a2 ; センス : 5' - GCTACCTCCTGGTGAA GCAC - 3', アンチセンス : 5' - CATGCACACTTGGCAGCGGC - 3',

Col 4a3 ; センス : 5' - GGAAACAAACGTGCACATGG - 3', アンチセンス : 5' - GACTGGCTCGGAATTCTTC - 3',

Col 4a4 ; センス : 5' - CACTGGAGCTGGGGACCAAG - 3', アンチセンス : 5' - CATGCAAACCTGGCACCTGC - 3',

Col 4a5 ; センス : 5' - CCAGCCATTCATTAGTCGAT - 3', アンチセンス : 5' - GGCTAATACGCGTCCTCAAG - 3' 標識には (α - ³²P) dCTP と DNA Multiprime labelling kit (Amersham) を用いた。

電顕標本の作成

腎組織を数ミリ角に切り、これを 2.3 % グタールアルデヒド・リン酸バッファー液で固定し、次いで 1 % 過酸化オスミウムで固定して Epon 812 (Taab) で封埋した。ウルトラミクロトームを用いて 100 nm 厚の切片を作成し、グリットにマウントして酢酸ウランとクエン酸鉛で染め、エレクトロンマイクロスコプで観察した。

免疫蛍光染色

腎組織を OCT コンパウンド (Miles) に封埋後、液体窒素で凍結し、クライオトームを用いて 5 μ m 厚の切片を作成した。室温で乾燥させた後、尿素処理をして 1 次抗体を室温で 1 時間反応させた。その後、2 次抗体を室温で 30 分反応させた。最後に Perma Flow (Shandon) で包埋して観察した。1 次抗体には各 α 鎖特異的抗ヒト IV 型コラーゲンラット IgG モノクローナル抗体³⁾を使用した。また、デスミン染色には抗ヒトデスミンマウス IgG モノクローナル抗体 (Dako) を使用した。デスミン陽性細胞の局在を知るために基底膜構成成分のラミニンの二重染色も同時に行った。ラミニン染色には抗マウスラミニンウサギ IgG モノクローナル抗体 (Serotec) を使用した。2 次抗体には FITC-抗ウサギ IgG (Cooper Biomedical), TRITC-抗マ

ウス IgG (Cooper Biomedical) を使用した。

腎糸球体細胞数の測定

2 週, 4 週, 8 週齢の腎糸球体について測定した。1 腎につき 3 切片, 1 切片につき 25 糸球体の細胞数と糸球体径を計測した。細胞数は糸球体の総細胞数 (A) と糸球体基底膜の尿細管側の細胞数 (B) を数えた。B は糸球体上皮細胞数と考えられる。また、A から B を減じた細胞数 (C) は糸球体の上皮細胞以外の細胞 (メサンギウム細胞 + 内皮細胞) 数と考えられる。A, B, C について各週齢の野生型およびノックアウトマウス間の差の有無をマンホイットニーの U 検定を用いて検討した。

結 果

1. *Col 4a4* ノックアウトマウスの作成

648 個の G 418 抵抗性クローンより 5 個の相同組換え体を得た。このうちの 2 クローンをを用いてキメラマウスを作成したが、いずれも生殖系列に入った。野生型、ヘテロ接合体、ホモ接合体の出現比は、メンデルの法則に従っていた (図 2)。

各 α 鎖遺伝子の NC ドメイン領域をプローベにしたノーザンブロットでは、*Col 4a4* ノックアウトマウス腎組織の *Col 4a4* mRNA だけが検出されなかった (図 3)。

IV 型コラーゲンの各 α 鎖モノクローナル抗体を用いた 8 週齢の免疫組織化学では、野生型では、 $\alpha 1$, $\alpha 2$ 鎖はメサンギウム領域のみに認められるのに対し、*Col 4a4* ノックアウトマウスでは糸球体基底膜係蹄領域にも認められた。 $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ 鎖のいずれも、*Col 4a4* ノックアウトマウスの糸球体基底膜領域には検出されなかった。 $\alpha 5$ 鎖は、*Col 4a4* ノックアウトマウスのボウマン嚢基底膜領域には野生型と同様に認められた (図 4)。

2. 臨床経過および病理組織学的所見

血尿は 4 週齢の *Col 4a4* ノックアウトマウスで既に出現していた。蛋白尿は 8 週齢以降の *Col 4a4* ノックアウトマウスに出現した。*Col 4a4* ノックアウトマウスは死亡の約 1 週間前に浮腫ならびに BUN 上昇が出現し、19 週 ± 3 週で腎不全により死亡した。

電顕ではアルポート症候群に特有の基底膜の菲薄化や層状化が 8 週齢で認められた。同じく 8 週齢で上皮細胞足突起の消失、癒合、微小絨毛の過形成が認められた (図 5)。

3. 糸球体上皮細胞障害

デスミンとラミニンの二重免疫組織化学では、8 週齢

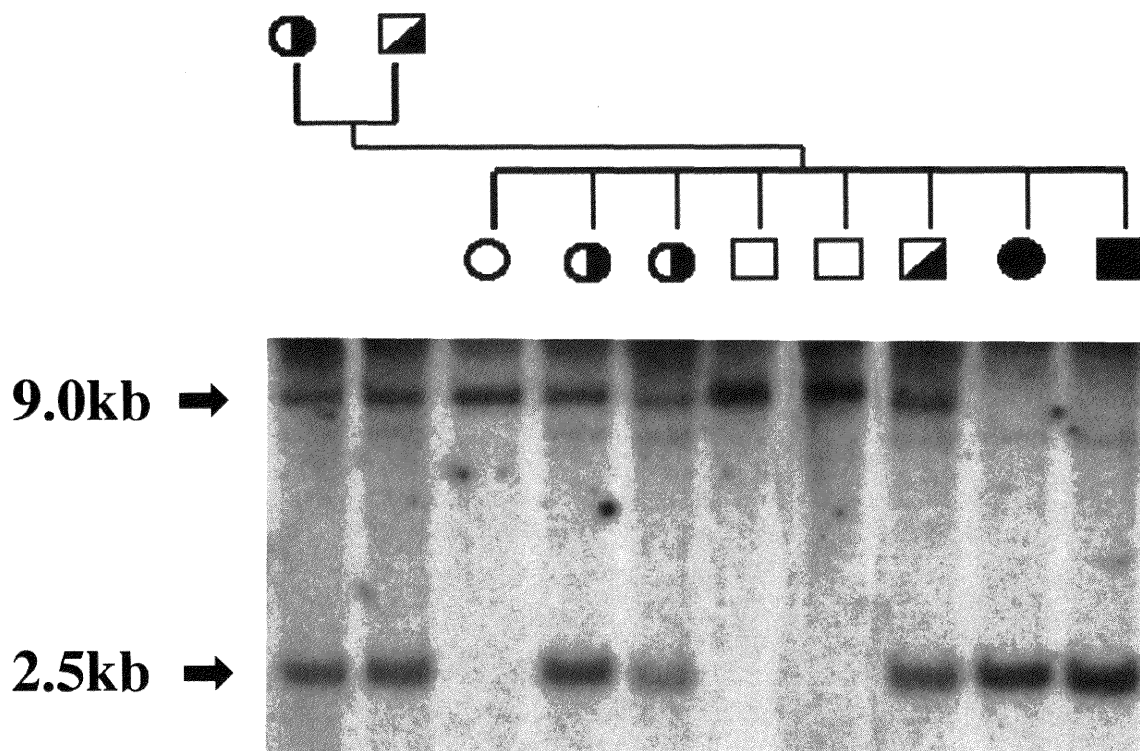


図2 ヘテロ接合体 F1 マウス交配による F2 マウスのゲノミックサザンブロット解析
マウスゲノム DNA を制限酵素 *Xho*I により消化したサザンブロットでは野生型は 9.0 kb, ホモ接合体 2.5 kb, ヘテロ接合体では両方のバンドが検出された. 野生型, ヘテロ接合体, ホモ接合体の出現比はメンデルの法則に従っていた.

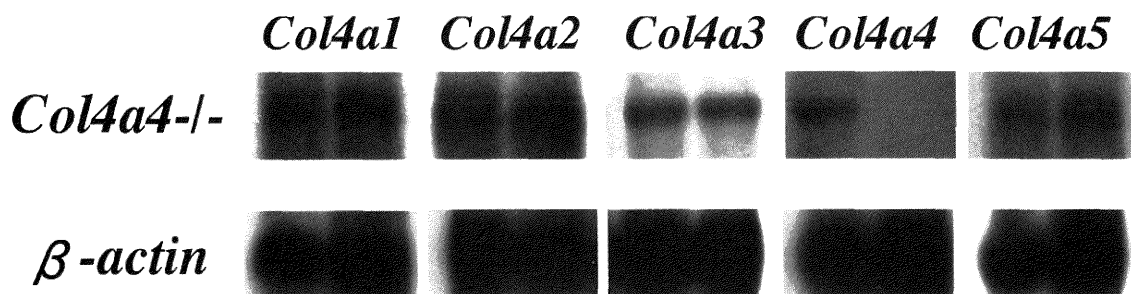
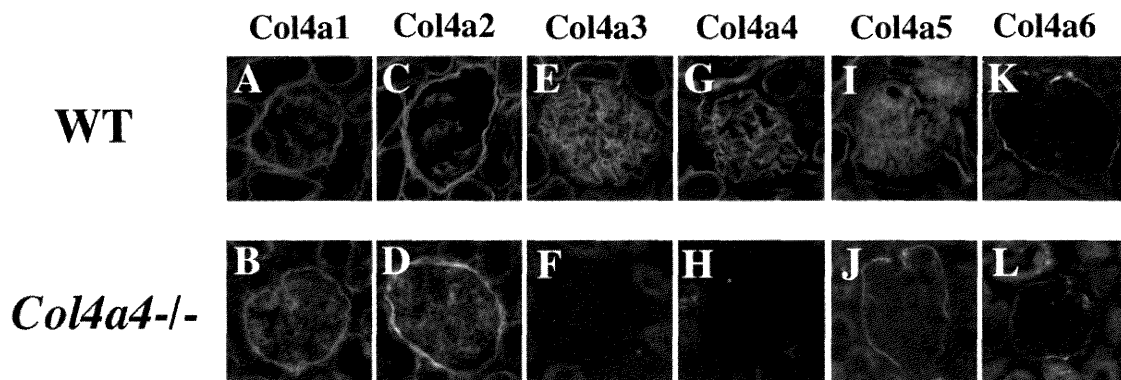


図3 IV型コラーゲン α 鎖特異的プローベによるノーザンブロット解析
各 α 鎖の NC ドメイン領域をプローベとしたノーザンブロットでは, ノックアウトマウスの *Col4a4* mRNA だけが検出されなかった.

図4 IV型コラーゲン α 鎖特異的抗体による免疫組織化学

上：8週齢の野生型 (A, C, E, G, I, K) および *Col4a4* ノックアウトマウス (B, D, F, H, J, L). IV型コラーゲンの各 α 鎖モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学では、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 鎖については、野生型 (A, C) がその発現がメサンギウム領域に限定されるのに対し、*Col4a4* ノックアウトマウス (B, D) では糸球体基底膜で広範に発現していた。 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 鎖については *Col4a4* ノックアウトマウスの糸球体基底膜 (F, H, J) では検出されなかった。 $\alpha 5$ 鎖は *Col4a4* ノックアウトマウスのボウマン嚢基底膜 (J) に認められた。

の *Col4a4* ノックアウトマウスの糸球体上皮細胞と考えられる基底膜の尿細管側の細胞にデスミンが認められ (矢印)、上皮細胞の障害が示唆された (図6)。

腎糸球体細胞数は、8週齢の *Col4a4* ノックアウトマウス皮質表層の糸球体では髓質近傍の糸球体および野生型皮質表層の糸球体より有意に細胞数が少なかった。減少した細胞は上皮細胞であり、内皮細胞およびメサンギウム細胞の数には有意差は認められなかった。また、*Col4a4* ノックアウトマウスでは、皮質表層の糸球体径が野生型よりも有意に拡大していた。

考 案

私たちの作成した *Col4a4* ノックアウトマウスは、ノーザンブロットおよび免疫組織化学の結果から null mutant であると考えられた。また、遺伝形式、臨床所見、病理組織学的所見から考えて、COL4A4変異による常染色体劣性型アルポート症候群のモデルマウスであると考えられた。

免疫組織化学所見では、*Col4a4* ノックアウトマウス腎において $\alpha 1/2$ 鎖が $\alpha 3/4/5$ 鎖を代償するがごとく糸球体に発現していた。しかし、腎機能障害は進行するので、機能機能的には代償されていないと考えられる。このことに関して、 $\alpha 1/2$ 鎖は $\alpha 3/4/5$ 鎖より蛋白分解酵素の影響を受けやすいという報告がある¹⁶⁾。このため一見、免疫蛍光染色では発現が増強して

いるように見えても、蛋白分解酵素が活性化している場所の $\alpha 1/2$ 鎖は消化され、基底膜が破壊、断裂していることが考えられる。また、分子構造上、 $\alpha 1/2$ 鎖は $\alpha 3/4/5$ 鎖と比べ強い張力に弱く、糸球体血管内圧に耐えられない可能性がある。このような耐久性の違いにより $\alpha 1/2$ 鎖は $\alpha 3/4/5$ 鎖を代償できないと考えられる。

Col4a4 ノックアウトマウスは平均19週 \pm 3週で死亡する。これに対し *Col4a3* ノックアウトマウスはDominicらの報告では平均14週で死亡し¹¹⁾、Minerらの報告では4ヶ月以上生き残るものが5%未満であるという¹²⁾。また、*Col4 Δ 3-4*トランスジェニックマウスでは平均10週とさらに短命となる¹³⁾。蛋白尿が出現するまでの期間も *Col4 Δ 3-4*トランスジェニックマウスは2週、*Col4a3* ノックアウトマウスは5週、*Col4a4* ノックアウトマウスは8週であり、蛋白尿出現までの期間が短いほど腎不全に早く陥る可能性が考えられる。

Minerらが作成した *Col4a3* ノックアウトマウスは私たちのマウスと同様の遺伝的背景 (マウスストレイン129とC57BL/6) を有し、遺伝子破壊の部位もともにNC1ドメイン領域と同じであるにもかかわらず、*Col4a3* ノックアウトマウスの方が明らかに生存期間が短い理由は不明であるが以下の機序が考えられる。

最近、伴性劣性アルポート症候群 (COL4A5変異)

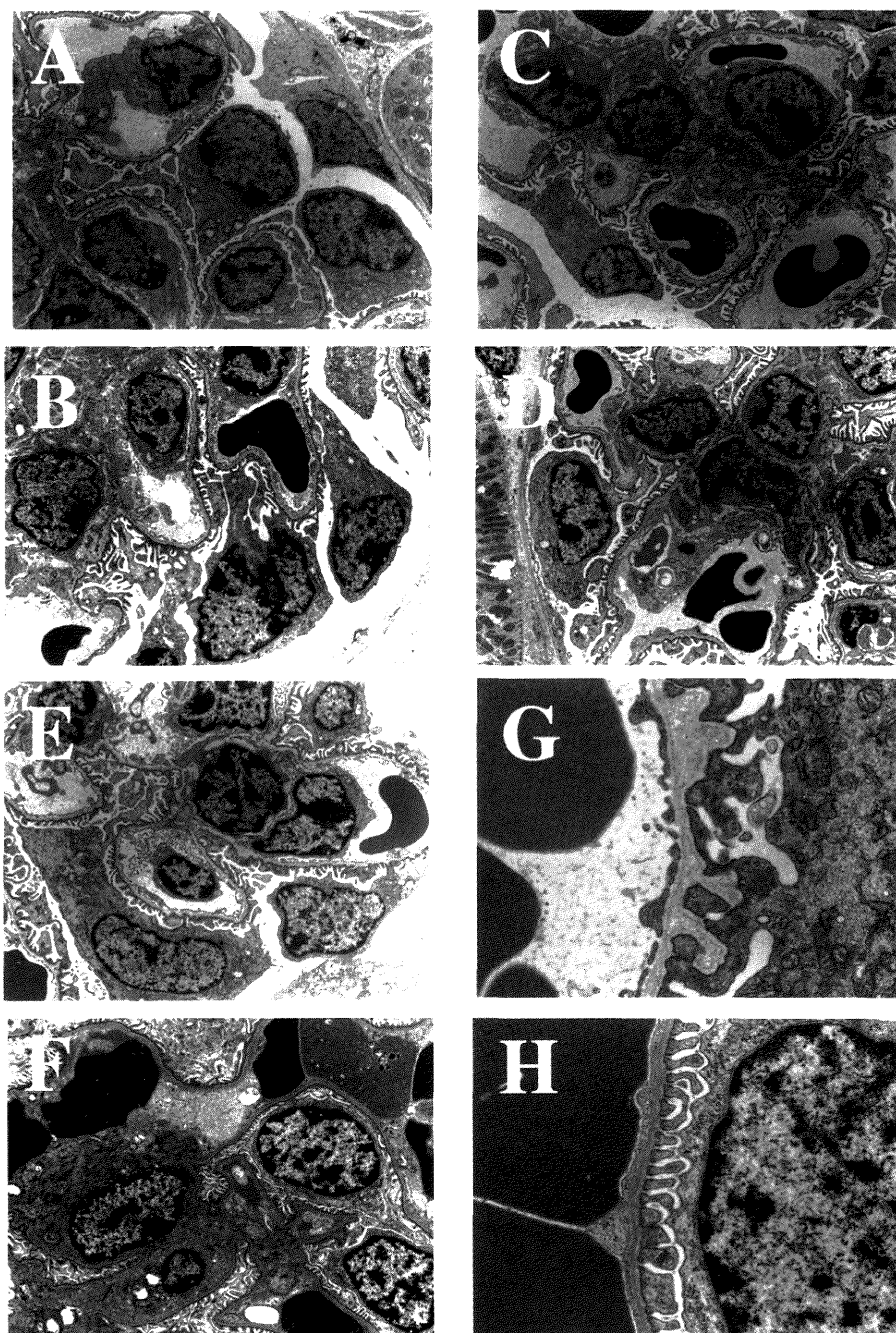


図5 腎糸球体の電顕所見

*Col4a4*ノックアウトマウス (A, C, E, G) および野生型 (B, D, F, H). それぞれ, 2週齢 (A, B), 4週齢 (C, D), 8週齢 (E, F, G, H). 2, 4週ではまだ基底膜に明らかな異常所見がない. 8週齢以降で*Col4a4*ノックアウトマウスの基底膜にアルポート症候群に特有の菲薄化や層状化が認められた. 上皮細胞でも足突起の減少, 癒合, 微小絨毛の過形成が認められた (G, H は8週齢の拡大像).

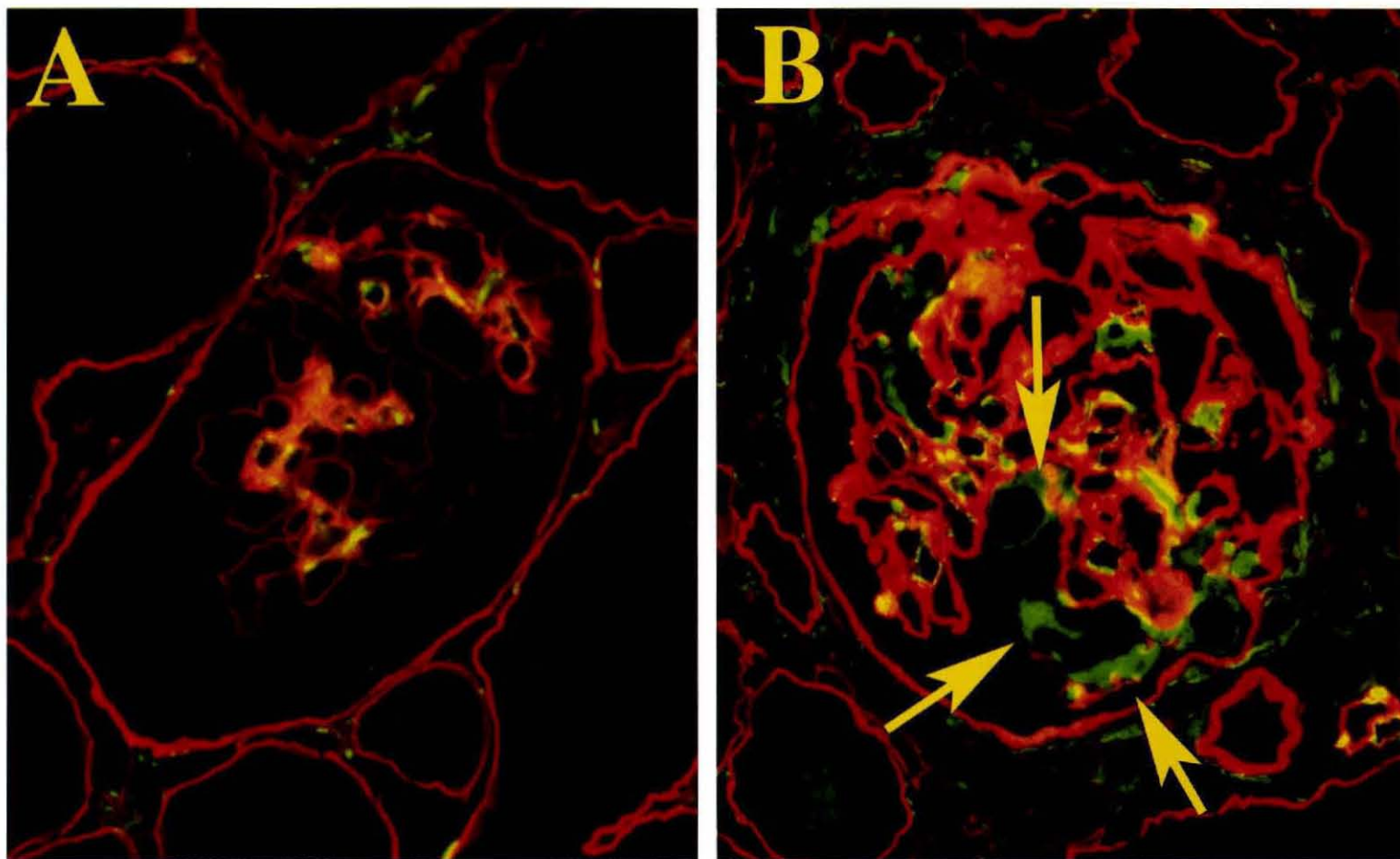


図6 デスミンとラミニンの二重免疫組織化学

糸球体のデスミン (FITC 標識：黄緑色) とラミニン (TRITC 標識：赤色) の二重免疫組織化学, 8 週齢の野生型 (A) と *Col4a4* ノックアウトマウス (B). *Col4a4* ノックアウトマウスでは糸球体上皮細胞と考えられる基底膜の尿細管側の細胞にデスミンの発現が認められ (矢印), 上皮細胞の障害が考えられた. 2 週齢, 4 週齢の糸球体上皮細胞にはデスミン陽性細胞は認められなかった.

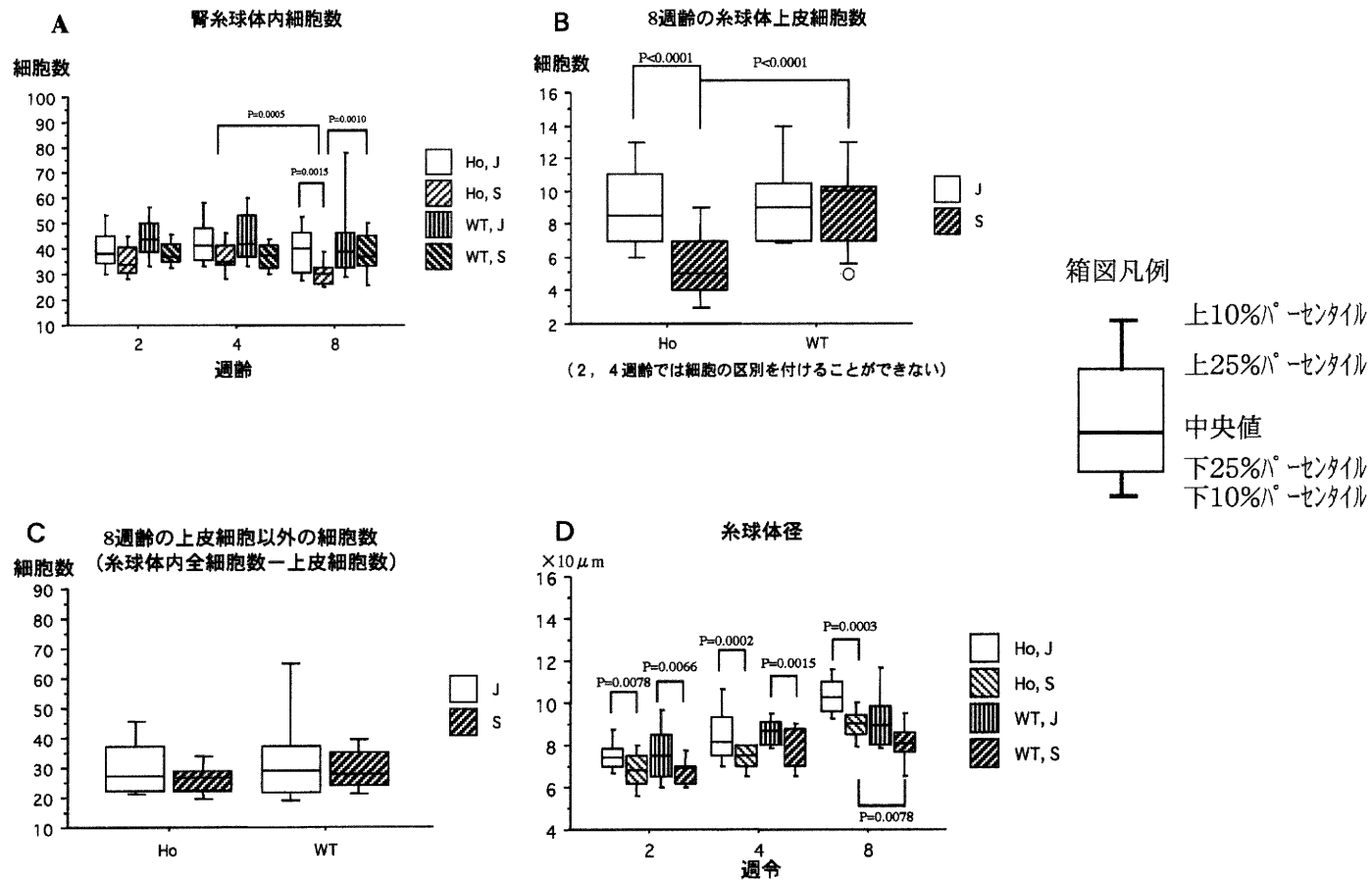


図7 腎系球体細胞数及び糸球体径の測定

2週, 4週, 8週齢の糸球体について検討した。細胞数は各糸球体中の総細胞数(A)と糸球体基底膜の尿管側細胞数を別に数えた(B)。Bは糸球体上皮細胞数と考えられる。また, AからBを減じた細胞数(C)は糸球体の上皮細胞以外の細胞数(メサンギウム細胞+内皮細胞)と考えられる。8週齢 $Col4a4$ ノックアウトマウス腎皮質表層の糸球体では髄質近傍の糸球体および野生型の皮質表層の糸球体より有意に細胞数が少なく, 減少した細胞は上皮細胞と考えられた。糸球体径では, 皮質表層の糸球体径が野生型よりも有意に拡大していた。

S: 腎皮質表層の糸球体 J: 腎髄質近傍の糸球体 Ho: $Col4a4$ ノックアウトマウス WT: 野生型マウス

や Samoid 犬 (*Col4a5* 変異) において $\alpha 3$ 鎖の発現が上皮細胞内に認められるという報告がなされた¹⁷⁾¹⁸⁾。また, Laurence らは Samoid 犬の *Col4a5* 領域のうちの変異のない部分をプローベとした *in situ* hybridization により変異 *Col4a5* mRNA の存在を証明し¹⁸⁾, 上皮細胞内に変異蛋白が存在する可能性を示唆した。以上のことから *Col4a3* ノックアウトマウスでは変異 $\alpha 3$ 鎖と正常 $\alpha 4$ 鎖, $\alpha 5$ 鎖, *Col4a4* ノックアウトマウスでは変異 $\alpha 4$ 鎖と正常 $\alpha 3$ 鎖, $\alpha 5$ 鎖から構成されるヘテロトライマーが上皮細胞内で形成されている可能性が考えられる。また, これらのヘテロトライマーは私たちが用いた通常の免疫蛍光染色では検出できないほど微量な可能性が考えられる。さらに, これらの微量なヘテロトライマーが上皮細胞から分泌され基底膜上に取り込まれ $\alpha 1$ 鎖, $\alpha 2$ 鎖で形成されるコラーゲンネットワークとともに糸球体基底膜の骨格を形成している可能性が考えられる。ここで, 変異 $\alpha 3$ 鎖を含むヘテロトライマーは変異 $\alpha 4$ 鎖を含むヘテロトライマーより不安定で, 基底膜に取り込まれる効率も低く, そのため *Col4a3* ノックアウトマウスの基底膜の変性が早期に起こるとすれば, *Col4a3* ノックアウトマウスの生存期間が *Col4a4* ノックアウトマウスよりも短くなることを説明しうる。 *Col4 Δ 3-4* トランスジェニックマウスの生存期間が *Col4a3* ノックアウトマウスさらに短くなるのは, $\alpha 3$ 鎖, $\alpha 4$ 鎖がともに変異したヘテロトライマーはさらに不安定になるためかもしれない。もし微量な IV 型コラーゲンの検出系が開発されれば, この仮説を検討することも可能かと思われる。

上皮細胞の障害マーカーとして, デスミン¹⁴⁾, GLEPP1¹⁹⁾, SPARC²⁰⁾ などが知られている。GLEPP1 は腎硬化性病変あるいはその前状態時に発現が消失し, SPARC は補体依存性障害時に特異的に発現が増強するといわれている。これに対し, デスミンは細胞骨格の中間径繊維の構成成分であり, 本来筋系細胞のマーカーで, 正常上皮細胞では検出されず障害上皮細胞にのみに発現する。上記 2 つのマーカーのように特定の病態に限らず, いかなる障害時にも出現する。今回, 私たちは 8 週齢の *Col4a4* ノックアウトマウス腎皮質表層の糸球体上皮細胞でデスミンが陽性となり, かつ, 同じ 8 週齢までに皮質表層の糸球体では上皮細胞数が減少することを明らかにした。また, 上皮細胞の減少が認められた 8 週齢皮質表層の糸球体の直径が野生型に比べ有意に増大していた。腎では発生上, 皮質表層部糸球体は髄質近傍部に比較して個々の糸球体の成熟が早く起こる。このた

め, 皮質表層部の糸球体ではより早い時期から $\alpha 3/4/5$ 鎖ヘテロトライマーを必要とすることになる。さらに, 野生型糸球体では発現しているべき $\alpha 3/4/5$ 鎖がない *Col4a4* ノックアウトマウスの糸球体では前述したように糸球体血管内圧に耐えられず糸球体径が拡大し, 腎皮質表層部と髄質近傍部での所見の差となったと考えられる。幼若ラットの腎摘後の糸球体形態の検討で, 糸球体微小血管内圧がより上昇すると考えられる残存腎糸球体の糸球体が肥大し, 係蹄も拡大し, 上皮細胞もこれを覆うために肥大し, 過度の肥大が上皮細胞障害を引き起こしたという報告がある²¹⁾²²⁾。この報告では皮質表層と髄質近傍での差は検討していないが, 私たちのノックアウトマウスの腎皮質表層における糸球体でも係蹄が拡大し, 上皮細胞も肥大し傷害された可能性が考えられる。

Col4a3 ノックアウトマウスでは, フィブロネクチン, エンタクチン, ラミニン, ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどの細胞外基質の増加が報告されている¹²⁾。私たちが作成した *Col4a4* ノックアウトマウスでは, これらの細胞外基質の他にテネイシン C の発現も増加している (未発表データ)。これらの細胞外基質は上皮細胞の恒常性の維持に必要な基底膜-上皮細胞間シグナルを担うとされているので, 細胞外基質の増加が糸球体上皮細胞障害を惹起する可能性も考えられる。糸球体微小血管内圧上昇と細胞外基質増加による相互作用も考えられる。アルポート症候群においては, 糸球体基底膜の骨格となる IV 型コラーゲンを産生する糸球体上皮細胞が糸球体基底膜の変性により障害を受け剥離し, 基底膜に IV 型コラーゲンを供給できなくなり基底膜の変性を促進するという悪循環の回路が形成されていると考えられる。

アルポート症候群に限らず他の糸球体腎炎においても, 糸球体上皮細胞の剥離が生じると半月体形成, 糸球体硬化へと進行する。今後, アルポート症候群の病態を解明するためには, 糸球体基底膜-上皮細胞間シグナルについて解明していくことが重要であると思われる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり直接ご指導いただきました里方一郎教授 (新潟大学医歯学総合研究科口腔生命科学専攻摂食環境制御学講座分化再生制御学分野), 研究指導および論文の御校閲をいただきました内山聖教授 (新潟大学医歯学総合研究科小児科学分野), 山本 格教授, 矢尾板永信助教授 (新潟大学付属腎研究施設構造病理分野) に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Barker, D.F., Hostikka, S.L., Zhou, J., Chow, L.T., Oliphant, A.R., Gerken, S.C., Gregory, M.C., Skolnick, M.H., Atkin, C.L. and Tryggvason, K.: Identification of mutations in the COL 4 A 5 collagen gene in Alport syndrome. *Science*, **248**: 1224~1227, 1990.
- 2) Mochizuki, T., Lemmink, H.H., Mariyama, M., Antignac, C., Gubler, M.C., Pirson, V., Verellen, D.C., Chan, B., Schroder, C.H., Smeets H.J. and Reeders, S.T.: Identification of mutations in the alpha 3 (IV) and alpha 4 (IV) collagen gene in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat. Genet.*, **8**: 77~81, 1994.
- 3) Sado, Y., Kagawa, M., Kishiro, Y., Sugihara, K., Naito, I., Jerome, M.S., Sugimoto, M., Oohashi, T. and Ninomiya, Y.: Establishment by the rat lymph node method of epitopedefined monoclonal antibodies recognizing the six different α chains of human type IV collagen. *Histochemistry Cell Biol.*, **104**: 267~275, 1995.
- 4) Nakanishi, K., Yoshikawa, N., Iijima, K., Kitagawa, K., Nakamura, H., Ito, H., Yoshioka, K., Kagawa, M. and Sado, Y.: Immunohistochemical study of α 1-5 chains of type IV collagen in hereditary nephritis. *Kidney Int.*, **46**: 1413~1421, 1994.
- 5) Ninomiya, Y., Kagawa, M., Iyama, K., Naito, I., Kishiro, Y., Jerome, M.S., Sugimoto, M., Oohashi, T. and Sado, Y.: Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL 4 A 6 and COL 4 A 5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptidespecific monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.*, **130**: 1219~1229, 1995.
- 6) Gubler, M.C., Knebelmann, B., Beziau, A., Broyer, M., Pirson, V., Haddoum, F., Kleppel, M.M. and Antignac, C.: Autosomal recessive Alport syndrome: Immunohistochemical study of type IV collagen chain distribution. *Kidney Int.*, **47**: 1142~1147, 1995.
- 7) Zheng, K., Thorner, P., Marrano, P., Baumal, R. and McInnes, R.R.: canine X chromosome-linked hereditary nephritis: A genetic model for human X-linked hereditary nephritis resulting from a single base mutation in the gene encoding the α 5 chain of collagen type IV. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 3989~3993, 1994.
- 8) Lees, G.E., Kashtran, C.E., Michael, A.F. and Kim, Y.: Renal and epidermal expression of α (IV) chains in two new dog models of Alport syndrome (AS). *J. Amer. Soc. Nephrol.*, **8**: 1814A, 1997.
- 9) Lees, G.E., Wilson, P.D., Helman, R.G., Homco, L.D. and Frey, M.s.: Glomerular ultrastructural findings similar to hereditary nephritis in 4 English cocker spaniels. *J. Vet. Intern. Med.*, **11**: 80~85, 1997.
- 10) Hood, J.C., Savige, J., Hentlass, A., Kleppel, M.M., Huxtable, C.R. and Robinson, W.F.: Bull terrier hereditary nephritis: A model for autosomal dominant Alport syndrome. *Kidney Int.*, **47**: 758~765, 1995.
- 11) Dominic, C., Daniel, T.M., James, A.G., Jody, M.K., Robinlyn, S., William, J.H. and Gina, C.S.: Collagen COL 4 A 3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome. *Genes & Development*, **10**: 2981~2992, 1996.
- 12) Miner, J.H. and Sanes, J.R.: Morecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen α 3 (IV): Implication for Alport syndrome. *J. Cell Biol.*, **135**: 1403~1413, 1996.
- 13) Wei, L., Carrie, L.P., Paul, D.K., Tommy, H., Wilbur, R.H., F.F.B.Elder, Jeffrey, H., Paul, A.O. and Miriam, H.M.: Insertional mutation of the collagen genes *Col 4 a 3* and *Col 4 a 4* in a mouse model of Alport syndrome. *Genomics*, **61**: 113~124, 1999.
- 14) Yaoita, E., Kawasaki, K., Yamamoto, T. and Kihara, I.: Variable expression of desmin in rat glomerular epithelial cells. *Am. J. Pathol.*, **136**: 899~908, 1990.
- 15) Satokata, I. and Maas, R.: *Msx-1* deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature Genetics*, **6**: 348~356, 1994.
- 16) Prockop, D.J. and Kivirikko, K.I.: Collagens: Molecular biology, diseases and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**: 403~434, 1995.

- 17) Laurence, H., Yi, C., Liliane, G., Corinne, A., and Marie-Claire, G.: Glomerular Expression of type IV collagen chains in normal and X-linked Alport syndrome kidneys. *Am. J. Pathol.*, **156**: 1901~1910, 2000.
- 18) Scott, J.H., Keqin, Z., Yoshikazu, S., Ichiro, N., Yoshifumi, N., Robert, M.J., Billy, G.H. and Paul, S.T.: Role of distinct type IV collagen networks in glomerular development and function. *Kidney Int.*, **54**: 1857~1866, 1998.
- 19) Yang, D.H., Goyal, M., Sharif, K., Kershaw, D., Thomas, P., Dysko, R. and Wiggins, R.: Glomerular epithelial protein 1 and podocalyxin-like protein 1 in inflammatory glomerular disease (crescentic nephritis) in rabbit and man. *Lab. Invest.*, **74**: 571~584, 1996.
- 20) J. Floege, Chrsls, E.A., E.H.Sage, Pamela, P., Katherine, G., Richard, J.J. and William, G.C.: Markers of complement-dependent and complement-independent glomerular visceral epithelial cell injury *in vivo*. *Lab. Invest.*, **67**: 486~497, 1992.
- 21) Nagata, M., Schaerer, K. and Kriz, W.: Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. I. Hypertrophy and distortion of capillary architecture. *Kidney Int.*, **42**: 136~147, 1992.
- 22) Nagata, M. and Kriz, W.: Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. *Kidney Int.*, **42**: 148~160, 1992.

(平成13年1月30日受付)