

## トピックス

## III. 最近の話題

## 1. 蛋白尿の分子機序

河内 裕

## 要 旨

腎糸球体係蹄壁は、内皮細胞、糸球体基底膜、そしてその外側を覆う糸球体上皮細胞足突起の3層からなり、足突起間にはスリット膜とよばれるフィルター様の構造物がある。従来、糸球体係蹄壁の蛋白透過を防ぐメインバリアーは、基底膜であるとする考え方が一般的であったが、近年、上皮細胞スリット膜の重要性を示唆する多くの報告がなされてきている。nephrin, podocinは、スリット膜の機能分子で多くの病態で、蛋白尿発症に関わっていると考えられてきており、今後の治療のターゲットとして有力視されている。〔日内会誌 93：954～959, 2004〕

**Key words**：糸球体基底膜、スリット膜、nephrin, podocin

## 1. 糸球体のバリアー機能について

糸球体は、1日に約160lの水分を濾過し、かつ蛋白の透過を最小限に抑える役割を果たしている。Bowman腔内の蛋白濃度の正確な数字はわかっていないが、1～3mg/mlという数字が報告されているので、血清蛋白の濃度7g/dlとの比で計算すると糸球体の毛細血管壁は、99.9%の血清蛋白をブロックして通過しないようにしていることになる。蛋白尿はいくつかの種類に分けられるが、糸球体のバリアー機能が破綻して蛋白尿が出るものを糸球体性の蛋白尿とよんでおり、臨床的にみられる多くの蛋白尿はこの糸球体性蛋白尿に分類される。

糸球体毛細血管は、束ねの位置にメサンギウム細胞が存在し、Bowman腔に面した係蹄壁は、内側から内皮細胞、基底膜、上皮細胞の3層からなる構造をしている。この3層構造で血清蛋白

白が尿中(正確にはBowman腔中)に漏れ出るのを防ぐバリアーとしての機能を果たしている。バリアー機能は、サイズバリアーとチャージバリアーとに分類される。糸球体基底膜は、5～7nmの網目(孔)構造を持ち、上皮細胞の足突起間にあるスリット膜と呼ばれる構造には、幅4nmの孔が存在していると考えられている。これらの孔より大きなサイズの分子の通過を妨げる役割をサイズバリアーと呼んでいる。また、内皮細胞、基底膜、上皮細胞の表面は陰性に荷電しており、陰性に荷電している血清蛋白が糸球体係蹄壁を通過するのを妨げる役割をチャージバリアーと呼んでいる。糸球体性蛋白尿は、これらのバリアー機能の破綻によりもたらされる。

血管腔に直接面している糸球体内皮細胞は、径70～100nmの窓をもついわゆる窓あき型内皮と呼ばれている細胞で、細胞表面が陰性に荷電しているため、アルブミンなど陰性に荷電している血清蛋白を血管壁に近づきにくくしている役割があるが、バリアーとしては、ほとんど機能していないと考えられている。2層目には、糸

かわち ひろし：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

球体基底膜があり、その外側(3層目)を、糸球体上皮細胞が覆っている。従来、糸球体基底膜が糸球体係蹄壁のメインバリアーであり、上皮細胞は、基底膜を通過したわずかな蛋白をせきとめる“モニター”的な機能を有するにすぎないと考えられてきたが、近年、上皮細胞もバリアーとして重要な働きをしていると考えられるようになってきている。

## 2. 糸球体から蛋白尿が生じる機序

### 1) 糸球体基底膜障害による蛋白尿

糸球体基底膜の骨格は、IV型コラーゲンで形成されているが、このIV型コラーゲンは、3本の $\alpha$ 鎖がらせんを巻いたトリプルヘリックス構造をしている。IV型コラーゲンの $\alpha$ 鎖は、 $\alpha 1$ - $\alpha 6$ 鎖のアイソフォームがある。X連鎖型の遺伝形式のAlport症候群の家系で $\alpha 5$ 鎖遺伝子の変異が、常染色体劣性の遺伝形式をとる家系で $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 鎖遺伝子の変異があることが報告されている。Alport症候群は、病初期、血尿を呈し、進行とともに蛋白尿が増加し、ネフローゼ症候群を呈する病態である。Alport症候群では、これら $\alpha$ 鎖の異常が糸球体基底膜の形成異常を引き起こし蛋白尿が発症するものと考えられている。

Goodpasture症候群は、著明な蛋白尿を呈する病態であるが、本症候群患者血清中に、IV型コラーゲン $\alpha 3$ 鎖のNCドメインと呼ばれているサイトと反応する自己抗体が存在することが報告されている。また、動物モデルでの検討でも、IV型コラーゲン $\alpha$ 鎖のNCドメインに抗体が結合すると蛋白尿が発症することが確認されている。IV型コラーゲンのこの部位に抗体が結合すると、IV型コラーゲンのネットワーク構造が変化し、サイズバリアーの異常を引き起こし蛋白尿が発症するものと考えられている。

基底膜の陰性荷電が低下すると、アルブミンを主体とする蛋白尿が認められることが実験的に確認されている。微小変化型ネフローゼ症候

群は、アルブミンを主体とする蛋白尿を呈する病態である。同症候群の患者のリンパ球の培養上清が基底膜の陰性荷電を低下させたとの報告があり、同症候群の発症にTリンパ球の異常が関与していると考えられている。また、これらの報告は、微小変化型ネフローゼ症候群の蛋白尿発症に基底膜の陰性荷電の低下が関わっていることを示唆している。

### 2) 糸球体上皮細胞障害による蛋白尿

従来、糸球体係蹄壁の蛋白透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が、近年糸球体上皮細胞がバリアーとして重要な働きをしていることを示唆する多くの報告がなされてきている。糸球体上皮細胞は極めて高度に分化した細胞で、足突起と呼ばれる構造を持つ特徴的な形態をしている。この足突起は、同じ胞体から出た突起同士で絡み合うことなく、常に隣り合った細胞の突起と絡み合っており、基底膜の外側を覆っている。この足突起と足突起の間には、25~60nm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で、細胞間接装置の1種であるということである。スリット膜は、約14×4nm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清蛋白の透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<sup>1)</sup>(図1)。筆者らのグループは、糸球体上皮細胞足突起間のスリット膜と結合し、著明な蛋白尿を誘導するモデルについての検討を報告してきた<sup>2)</sup>。また、フィンランド型先天性ネフローゼ症候群の責任遺伝子、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の遺伝子産物として同定されたnephtrin, podocinは、いずれも糸球体上皮細胞スリット膜に発現する蛋白であることが明らかになった。これらの報告は、糸球体上皮細胞スリット膜が糸球体係蹄壁の蛋

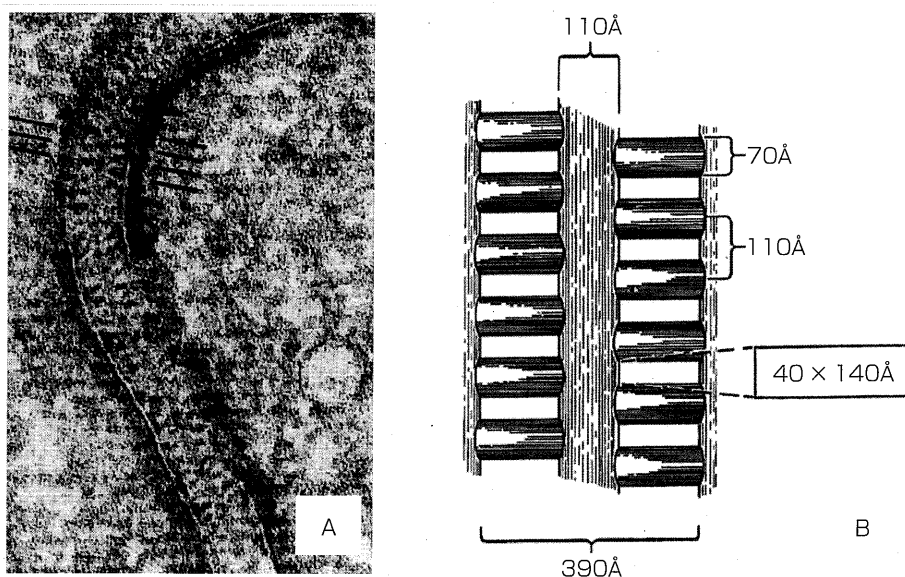


図1. 糸球体上皮細胞スリット膜のジッパー構造モデル  
Rodewald-Karnovskyは、タンニン酸固定による標本での観察(左)から、スリット膜は、 $4 \times 14 \text{ nm}$  ( $40 \times 140 \text{ Å}$ ) の孔を持つジッパー状構造のフィルターであるとするモデル(右)を提唱している。(文献1より引用)

白透過を防ぐバリアーとして重要な役割を果たしていることを示している。最近, nephrin, podocinに続いていくつかのスリット膜関連分子が同定, 報告されてきている<sup>2,3)</sup> (図2参照)。また, 特殊な先天性の病態における蛋白尿だけでなく日常みられる多くの蛋白尿を示す病態においても, これら上皮細胞関連分子の機能不全が関与しているのではないかと考えられてきている。以下の稿では, スリット膜構成分子の性状を簡単に紹介し, 病態モデルにおけるこれらの分子の発現動態, 分子間の相互作用に関する最近の知見について紹介する。

### 3. スリット膜関連分子の性状

#### 1) nephrin

nephrinは, フィンランド型の先天性ネフローゼ症候群の責任遺伝子 (NPHS1) の遺伝子産物として同定された。ヒトnephrinは, 1,241 個のアミノ酸残基からなる分子量約 180kdの糖蛋白で,

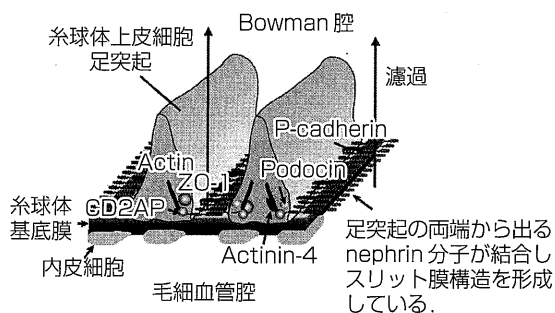


図2. 糸球体上皮細胞スリット膜関連分子の局在を示したシエマ

Khoshnoodi, Tryggvasonらのグループは, 足突起の両側から互い違いに出ているnephrin分子は, 先端の6個のIg-like moduleの部分で結合し, スリット膜のフィルター構造を形成しているとするモデルを提唱している。podocin, CD2AP, ZO-1などの分子はnephrin分子の細胞質部の近傍に存在すると考えられている。(文献3より引用一部改)

8個のIg-like moduleと1個のfibronectin type III-like motif, 並びに1つの膜貫通部を持つ接着分子様の構造をしている。免疫電顕での検討でnephrinは, 糸球体上皮細胞足突起間のスリット膜部

に存在することが確認されている<sup>2,3)</sup> (図3). 筆者らのグループが報告したマウス単クローン抗体 (5-1-6 抗体) は, ラットに静注するとneph-  
rinのextracellular siteと結合し, 補体並びに炎症  
性メディエーター非依存性に著明な蛋白尿を誘  
導する. このことは, nephrinは, 透過性制御に  
きわめて重要な役割を果たしている分子である  
ことを示している<sup>2)</sup>.

## 2) podocin

podocinは, 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) の遺伝子産物として同定さ  
れた. podocinは, 383 個のアミノ酸残基からな  
る分子量 42kd, ひとつの膜貫通部を持つ蛋白で,  
band-7 stomatin familyに属する蛋白群とアミノ  
酸組成の類似性を持っている. しかしながら,  
podocinのN末端側 97 アミノ酸, C末端側 36 アミ  
ノ酸は, 既知のどの蛋白とも相同性を持たない.  
podocinのN末部, C末部に対する抗体を用いた免  
疫電顕での検討で, podocinは, 糸球体上皮細胞  
スリット膜部近傍に限局していること, podocin  
は, N末部, C末部ともに細胞質に存在することが  
確認されている. podocinは, 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. 筆者らのグループは, podocinは, 腎糸球体  
上皮細胞だけでなく, 神経組織にも局在してい  
ることを観察している<sup>4)</sup>.

## 3) CD2AP

CD2-associated protein (CD2AP) は, CD2  
のcytoplasmic siteと結合する蛋白として同定さ  
れた蛋白で, 接着分子であるCD2の機能を増強  
していると考えられている. CD2APノックアウト  
マウスは, 生後 1~2 週で蛋白尿の出現を認め,  
6~7 週までに腎不全により死に至ると報告され  
ている. CD2APは, nephrinと結合性を持つと考  
えられており, CD2AP分子の欠損がnephrinの機  
能低下をもたらし, その結果, 糸球体壁のバリアー  
機能の低下をもたらしたのと考えられる. 最近,  
CD2APをコードする遺伝子に異常があると

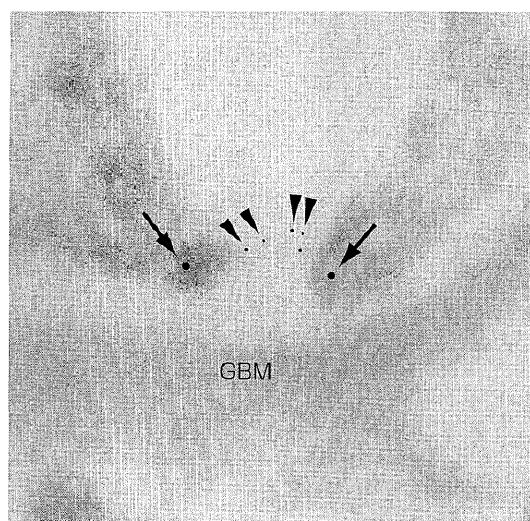


図3. nephrinの局在を示した免疫電顕所見  
nephrinは糸球体上皮細胞足突起間のスリット膜の  
細胞外部に局在している (小粒子: 矢頭). 細胞間  
接着装置の1つであるtight junctionの構成成分  
として同定されたZO-1はスリット膜の基部の細胞  
質部に存在している (大粒子: 矢印) (文献2より).

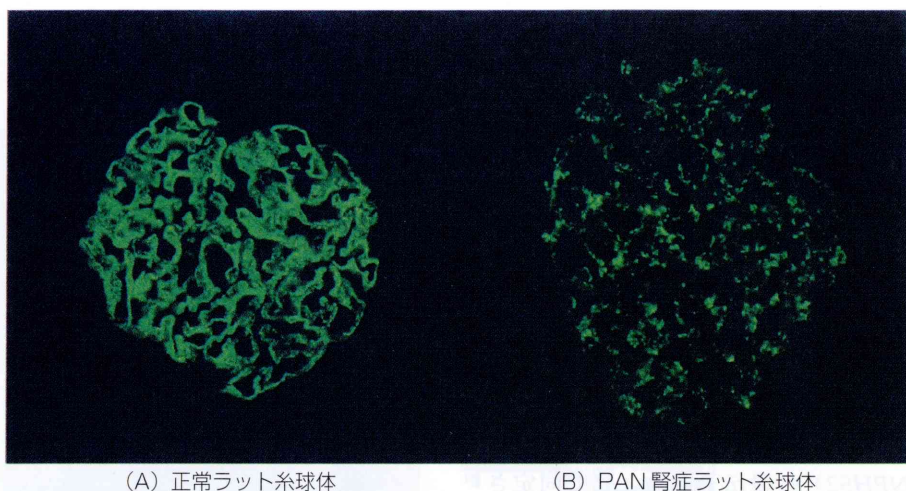
する巣状糸球体硬化症症例が報告され, CD2AP  
の異常がヒトの疾患にも直接関わっていること  
が示されている.

## 4) ZO-1

ZO-1 (zonula occludens-1) は, 細胞間接着装  
置のひとつであるtight junctionの構成分子とし  
て同定された 225kdの蛋白で, tight junctionの重  
要な構成分子である. ZO-1は, membrane-  
associated guanylate kinase homologues  
(MAGUKs) とよばれる分子群に属する分子で,  
tight junctionと細胞骨格とを結合する機能に関  
与していると考えられている. ZO-1は糸球体上  
皮細胞スリット膜の起部に存在することが観察  
されており (図3), ZO-1は, スリット膜を構成  
する蛋白のひとつであると考えられている.

## 5) Nephl

Neph1は, nephrinと相同性を持つ 605 アミノ  
酸残基からなる約 67kdの分子 (ヒトneph1) と  
して報告された. (その後の報告では, 789 個の  
アミノ酸残基からなる分子であるとされてい



(A) 正常ラット糸球体

(B) PAN腎症ラット糸球体

図4. podocinの染色像

podocinは、正常糸球体では、係蹄壁に沿った線状のパターンで観察されるが (A), PAN腎症の蛋白尿発症時、podocinは不連続な顆粒状のパターンとして観察される (B)。(文献4より引用、一部改)

る。) Neph1 は、nephrinと同様にIg like domainを持つ一回膜貫通型の膜蛋白で糸球体上皮細胞に局在している。Neph1 ノックアウトマウスは、生直後から、著明な蛋白尿、上皮細胞足突起の融合を認めることから、Neph1 は、nephrinと同様、スリット膜の機能維持に重要な役割を果たしている分子であると考えられている。

#### 4. 病的状態におけるnephrin, podocinの動態

筆者らのグループは、nephrin, podocin, CD2APのrat homologue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の検討を行っている。nephrin並びにpodocin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、nephrin, podocin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。抗nephrin抗体により誘導される蛋白尿モデルでの蛋白尿発症時、nephrinのみならず、podocinの発現も低下し、不連続

な顆粒状パターンとなることが観察されている。また、微小変化型ネフローゼ症候群のモデルであるpuromycin aminonucleoside (PAN) 腎症、膜性腎症のモデルであるHeymann腎炎においても、nephrin, podocin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、nephrin, podocin分子が乖離して局在している所見を得ている<sup>4)</sup>。また、nephrin, podocinのmRNA発現は、蛋白尿発症前に既に低下していることを観察している。これらの所見は、nephrin, podocin分子は、先天性の病態だけでなく、後天性の病態における蛋白尿発症にも関わっていることを示唆している。nephrin, podocinの発現、両者の結合がスリット膜機能を果たす上で重要であると考えられる。

スリット膜のバリアー機能維持におけるZO-1の役割については、ほとんど解明されていないが、私達は、抗nephrin抗体により誘導される蛋白尿発症時、ZO-1の染色パターンが変化し、その発現量が低下していることを確認している。また最近、イタリアのグループは、Munich Wistar Fromter ratにおける蛋白尿発症にZO-1の局

在の変化が関与しているとする報告をしている。これらの観察は、ZO-1 が、スリット膜のバリアー機能維持に重要な役割を果たしていることを示している。

## 5. スリット膜関連分子の相互関係

Tryggvasonらは、足突起の両側から互い違いに出ているnephrin分子が先端の6個のIg-like moduleの部分で結合し、スリット膜のフィルター構造を形成しているとするモデルを提唱している(図2)。nephrin分子が細胞接着分子様の構造をしていると考えるなら、1個のnephrin分子で35~45nmとされているスリット膜部の長さ近くまで進展可能であると述べている。このモデルは大変魅力的なものであるが、今後さらなる検討が必要である。

前述のCD2APノックアウトマウスについての報告で、強制発現系を用いた系での検討で、CD2APは、nephrinと結合性を持つことが示されている。また、ドイツのグループは、podocinがnephrinと結合性を持つことを同様の*in vitro*の系で証明している。また、最近podocinのC末部が、nephrin、CD2APと親和性を持つとする所見も報告されており、これらの分子が相互に結合し、スリット膜の機能維持に働いていると考えられている。nephrin、podocin、CD2AP、ZO-1の位置関係は、図2のシェーマにまとめている。これら分子相互の結合性については、分子を強制発現させた細胞を用いての検討が中心で、*in vivo*での検討はほとんどなされていないというのが現状である。今後、これら分子群の結合性について、*in vivo*での検討が必要であると考えている。

おわりに

蛋白尿は、糸球体病変の最も重要な症候の1

つであるばかりでなく、それ自体が尿細管傷害を引き起こす悪化因子として作用していることが明らかになっている。蛋白尿を抑制することは、多くの糸球体病変において、その予後を改善することにつながると考えられる。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、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、ようやく蛋白尿発症機序についての分子レベル、シグナル伝達レベルでの解析が始まったというのが現状である。本稿で紹介したスリット膜関連分子は治療のターゲットとしても有望であると考えられている。しかし、臨床的にもっとも重要な病態の一つであるメサンギウムを主体とする病変に伴う蛋白尿の発症機序などについては、まだほとんどわかっていない。今後さらなる研究が急がれる分野である。

紙面の都合上、舌足らずな表現になった部分も多い、蛋白尿発症機序についての詳細は既報<sup>5)</sup>を参照していただきたい。

## 文 献

- 1) Rodewald R, et al: Porous substructure of the glomerular slit in the rat and mouse. *J Cell Biol* 60: 423-433, 1974.
- 2) Kawachi H, et al: Molecular composition and function of the slit diaphragm: nephrin, the molecule responsible for proteinuria. *Clin Exp Nephrol* 4: 161-172, 2000.
- 3) Khoshnoodi J, et al: Unraveling the molecular make-up of the glomerular podocyte slit diaphragm. *Exp Nephrol* 9: 355-359, 2001.
- 4) Kawachi H, et al: Cloning of rat homologue of podocin: Expression in proteinuric states and in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 14: 46-56, 2003.
- 5) 河内 裕: 糸球体の構造と蛋白尿の出現機序, 専門医のための学腎臓病, 下条文武, 他編, 初版, 医学書院, 東京, 2002, 17-22.