

## 蛋白尿発現の分子機構： ネフリンのネフローゼ症候群における臨床的意義

清水不二雄 河内 裕

### 要 旨

ラット腎糸球体上皮細胞 (GEC) 足突起間スリット膜に対する単クローン抗体投与によりラットに高度の蛋白尿が惹起されることやスリット膜構成分子ネフリンの遺伝子レベルにおける異常が重症の先天性ネフローゼ症候群をもたらすことなどから、スリット膜が、最終的に高分子透過阻止に関与することが明らかにされた。ネフリンが発端となり、ポドシン、CD2APなどGEC、とりわけスリット膜関連分子の遺伝子レベルにおける異常が蛋白尿ないし家族性の糸球体硬化症をもたらすことが相次いで報告されている。新しく登場する分子も含めたこれら諸分子の相互関係の解明をとうして、GECの構造・機能を制御する情報伝達系の詳細が明らかにされ、その結果、蛋白尿の合理的な抑制策の確立とそれによる慢性腎不全状態への進展阻止が可能となるものと期待され、その中心的な存在であるネフリンは新しい治療法開発への重要な鍵をにぎる対象として注目され続けていくと思われる。

〔日内会誌 92：1337～1343, 2003〕

**Key words**：蛋白尿，糸球体上皮細胞，スリット膜，ネフリン

### はじめに

蛋白尿は腎病変の最も一般的で客観的な指標であり、尿検査は腎臓病の診断には欠かせないものである。またその蛋白尿が実は腎病変の進展に大変重要な役割を演じている悪玉であることも明らかにされている。したがってもし蛋白尿を制御できればその原因疾患の如何を問わず腎病変の進展を阻止し、慢性腎不全状態に陥る患者数を減少させる可能性があることから、蛋白尿発現機構の解明は現在の腎臓病学分野における最重要課題と位置づけられよう。

蛋白尿の発現とはとりもなおさず正常の糸球体透過性機構の破綻であると解されることから、蛋白尿発現機構の解析は透過性保持機構の解析

と軌を一にした課題である。糸球体透過性の保持に主役を演じるのは糸球体基底膜なのか、あるいは足突起間スリット膜なのかについては有名な長きにわたる論争があったが、少なくとも次の2つの事実からスリット膜が流しの目皿の如く、最終的に高分子透過阻止に密接に関与していることが明らかとなった。即ち〔1〕ラット腎糸球体上皮細胞 (GEC) 足突起間スリット膜に対する単クローン抗体の投与によりラットに高度の蛋白尿が惹起されたこと<sup>1)</sup>〔2〕スリット膜構成分子であるネフリンの遺伝子レベルにおける異常が重症の先天性ネフローゼ症候群をもたらすこと<sup>2)</sup>である。加えてネフリンが発端となり、ポドシン、CD2APなどGEC、とりわけスリット膜関連分子の遺伝子レベルにおける異常が蛋白尿ないし家族性の糸球体硬化症をもたらすことが相次いで報告されるに及んで、GEC・スリット膜に対する関心は高まる一方で、研究者の層

しみず ふじお、かわち ひろし：新潟大学大学院  
医歯学総合研究科付属腎研究施設分子病態学分野

も広がり、被検索論文数もうなぎのぼりに増加の一途を辿っている。またそれに呼応してGECの生物学と銘打った国際シンポジウムが毎年開催されるに至っているし、podocytopenia<sup>3)</sup>, podocytopathy<sup>4)</sup>, podocytology (これは2002年新潟で開催された上記の第4回国際シンポジウムで著者らが用いた) といった言葉が新しく生み出されつつある。

本稿では上記の歴史的といっても過言ではないと思われる2つの事実をより詳細に記述するとともにスリット膜構成・関連分子に関する最新の知見を紹介して蛋白尿制御の可能性を探ってみたい。

## 1. 蛋白尿惹起単クローン抗体 5-1-6<sup>1)</sup>

腎を場とした免疫反応が腎障害をもたらすことを、複雑で多岐にわたる抗原に対する抗体の受身投与により、その反応の総和として惹起された馬杉腎炎や(受身) Heymann腎炎が明らかにして以来、障害に直接関与する抗原抗体系の、より詳しい分子レベルでの解析が意図された。その目的にモノクローナル抗体(mAb)が最適の武器であることに異論はなく、腎を抗原として多種のmAb作製が試みられた。しかしエピトープが限定されることから、当然量的にも質的にも制限を受け、腎障害をもたらすmAbの産生は容易ではなかった。著者らがそのような背景のもとで幸いにも作製に成功したラットに蛋白尿惹起可能なmAb5-1-6は、蛋白尿発現機序解明に欠かせない有益な手段として国際的にも大いに注目された。

### 1) mAb5-1-6 とその対応抗原

mAb5-1-6はIgG1(K鎖)抗体で等電点5.7である。その対応抗原は免疫電顕(IEM)により主としてラットGEC足突起間のスリット膜に局在することが明らかにされた。この抗原分子のスリット膜への限局性は、protamine sulfate処理後に位置を変えるスリット膜上に局在が証

明されることから再確認されている。

### 2) mAb5-1-6により惹起される病態

mAb微量静注によりラットに通常3~5日をピークとした一過性ではあるが顕著な蛋白尿が惹起される。形態学的変化は軽微であり、蛋白尿の極期においてすら電顕レベルでごく一部に足突起の消失が認められる程度である。経過中に補体活性化の証はなく、また炎症細胞の浸潤も認められない。

### 3) mAb5-1-6による蛋白尿惹起機序

蛋白尿惹起機序解明の糸口は静注後に、結合mAb並びに対応抗原の局在が時間の経過とともに変化することで与えられた。即ち、静注直後の係蹄壁に沿った線状に近い蛍光抗体法(IF)陽性所見が3日後、12日後には顆粒状となる。IEMでも同様に当初スリット膜上に認められた金コロイド粒子が数日後にはGECの細胞表面尖端部(Bowmanのう腔側)にまで移動し、一部GEC内にも証明されるようになる。このとき対応抗原も同時に抗原抗体複合体として移動していることが、有効なelution bufferを用いたIFならびにIEMにより実証された。

細胞生物学の知見によれば、この種の局在変化(redistribution)は最初に細胞表面上の受容体(receptor)(この場合、対応抗原)が二価の反応因子(ligand)(この場合はmAb)により架橋されることが必要だとされている。酵素処理により得られる一価のmAb5-1-6Fab分画は、ともに二価の抗体全分子またはF(ab')<sub>2</sub>分画なら蛋白尿惹起可能な量以上に腎に結合しても、蛋白尿を発現させ得ない。この場合のIF像は5日後でも典型的な線状類似パターンにとどまっていた。さらにmAb5-1-6に対する系統間感受性に関して検討したところ、Wistar, Brown-Norway, Lewisラットでは蛋白尿が惹起されたが、Sprague-Dawley(SD)ラットではほとんど蛋白尿が認められなかった。このSDにおける結合mAbのIF像は2時間後には他系と区別のつかない線状に近い陽性像を呈した。しかしながら、6日後に蛋

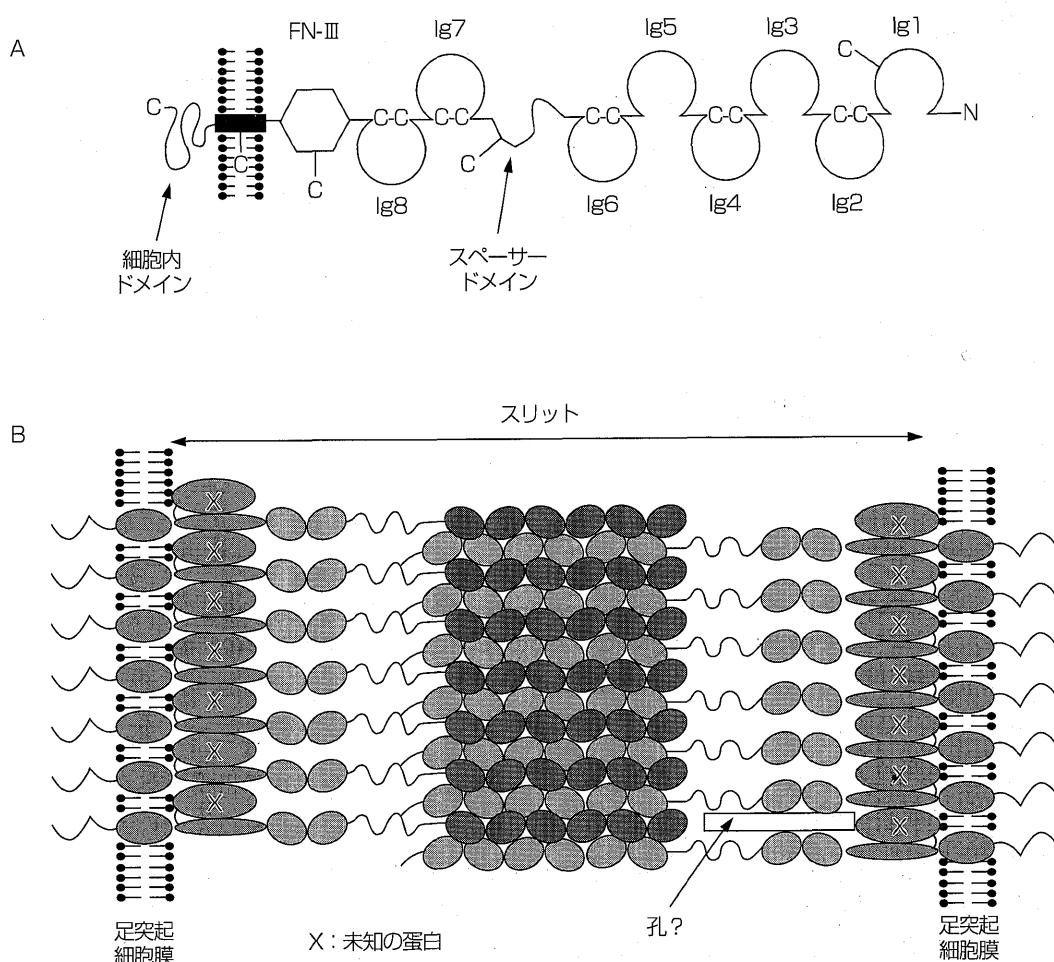


図 1<sup>2)</sup> . ヒトネフリンの分子構造(A)とネフリンによるスリット膜構成仮想図(B)

白尿の惹起される他の系ではすべて顆粒状パターンに変化することと対照的に, SDでは依然線状パターンのままであった。これらのことから, 著者らは二価mAbと細胞表面抗原分子とが結合後局在を換えることが蛋白尿の発現に至る重要な過程であると考えている。

この細胞表面上のredistributionに密接に関与するのは細胞骨格系であり後述のGEC・スリット膜関連諸分子との相関も含めて, この系の蛋白尿発現への関与につき精力的な検索がなされつつある。いずれにしろ, 対応抗原が一時期スリット膜で減少または消失していることが予測され, そのことが<sup>125</sup>Iを用いた定量的検索によっ

ても実証されている。この対応抗原の減少・消失は, アミノヌクレオシド腎症など他の蛋白尿惹起モデルでも認められており, その結果としてのスリット膜における分子構造の乱れにより蛋白尿がもたらされると想定された。

## 2. ネフリン nephrin<sup>2)</sup>

1998年Tryggvason一派は, フィンランド型先天性ネフローゼ症候群を引き起こす責任遺伝子(NPHS1)を明らかにして, その遺伝子産物(遺伝子によりコードされる蛋白分子)をネフリン(nephrin)と命名した。

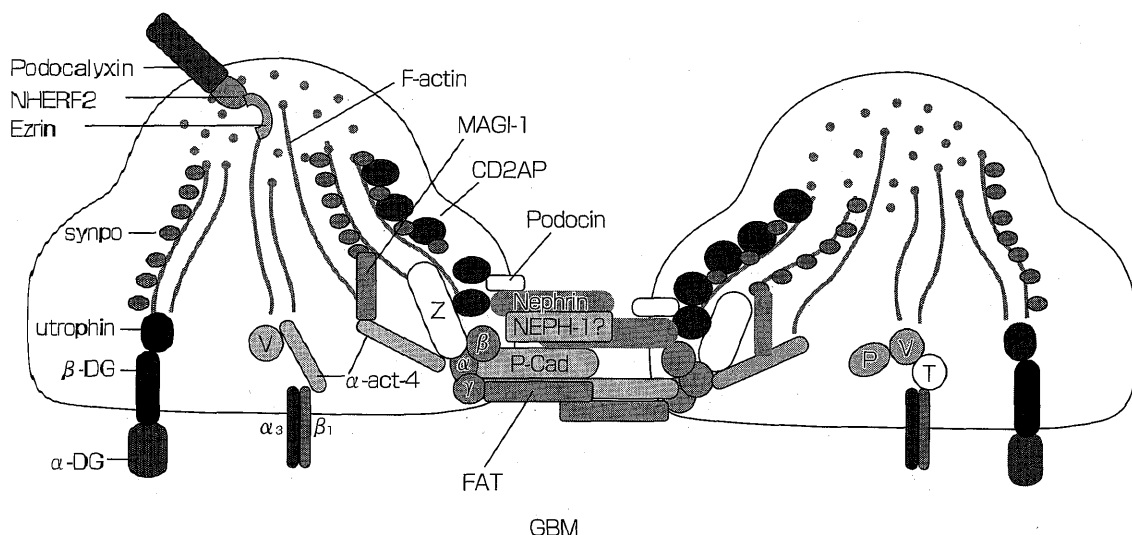


図 2<sup>3)</sup>. 足突起・スリット膜の分子構造仮想図

GBM ; glomerular basement membrane, DG ; dystroglycan, NHERF2 ; Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup>exchanger regulatory factor 2, P ; paxillin, P-cad ; P-cadherin, Synpo ; synaptopodin, T ; talin, V ; vinculin

### 1) フィンランド型先天性ネフローゼ症候群

常染色体劣性遺伝形式をとり、高度の蛋白尿がすでに胎生期から認められ、新生児期には 20～30g/日に達する。電子顕微鏡による検索で足突起の広範な消失が認められる。腎摘出と腎移植なしには通常生後 2 年以内に死亡するとされる。フィンランドでは 1/10,000 の割合で認められる。他国でも報告されているがその頻度は低い。

### 2) ネフリンの分子構造と存在様式

ネフリンは 1,241 個のアミノ酸からなる分子量約 180kd の糖蛋白で 8 個の免疫グロブリン様モジュール（基本単位）と 1 個の III 型ファイブロネクチン様モジュール、それに 1 つの膜貫通部分をもつ免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子様構造を有する（図 1A）。このネフリンがスリット膜に局在することも明らかにされ、またこの分子が如何にスリット膜を構成しているかについても Tryggvason 一派は同じく図 1B に示すような示唆に富む仮想図を提案した。これにはタンニン酸処理による電顕所見から主張された古典的なスリット膜のジッパー様

構造説に分子レベルで根拠を与えようという意図が示され高い関心を呼んだものではあるが、新しい分子の関与も含めた知見の集積によりさらに改変され続けていくものと思われる（図 2 参照）。ネフリンはスリット膜のみに局在するとされたが、最近脳や膵臓や精巣への局在も報告されている。いずれにしろ遺伝子レベルにおける変異により引き起こされるネフリンの異常が上述のような重症のネフローゼを惹起するというこの事実は、この分子が正常糸球体透過性機能の発生的構築並びにその保持に如何に重要な役割を演じているかを如実に物語っている。

### 3) ネフリンのラットホモログ(homologue)<sup>5)</sup>

腎炎モデル動物としてはラットが主として使用されることから、ネフリンのラットホモログのクローニングが著者らにより試みられた。その結果これが全長 1,252 個のアミノ酸からなり、ヒトネフリンとの間に 80% 以上の相同性を有することが判明した。またラットネフリンに対するポリクローナル特異抗体も作製されその応用により、mAb5-1-6 と化学的に強固に結合させた

抗原構造中にこの抗ネフリン特異抗体と反応する部分があること、さらにはmAb5-1-6がCOS細胞表面上に発現させたラットネフリンと反応することから、長く懸案であった蛋白尿惹起抗スリット膜mAb5-1-6の対応抗原はラットネフリンであると結論付けられた。蛋白尿惹起ラットモデルにおいて、蛋白尿に先立ってネフリンのmRNAレベルでの発現が早期に低下していることや、蛋白尿発現時に蛋白レベルでも減少していることが実証され、ネフリンの異常は先天的な腎疾患のみならず、後天的な腎疾患、とりわけ蛋白尿発現にも関与するものと想定されている。

#### 4) ネフリンの臨床的意義

ネフリンのヒト腎病変における発現変化について、現在膨大な検索結果が集積されつつある。当初は無変化であるとの報告も含めて結果は千差万別であったが、次第に著者らも含めて、実験動物モデルで示唆されたごとく、ヒトのネフローゼ症候群例でもネフリンの発現低下と局在変化を認めるとの報告が増えつつある。

先天性のネフローゼ症候群例で腎移植を受けた患者の約20%で蛋白尿が再び発現することが知られているが、その患者の大部分で抗ネフリン抗体が証明されたという。即ち移植された腎のスリット膜上のネフリン（抗原）に対して抗体が産生され、それがあたかもmAb5-1-6がラットで惹起した如く、蛋白尿を生じさせるものと考えられる。

### 3. その他の蛋白尿と関連つけられた糸球体上皮細胞・スリット膜関連分子

#### 1) CD2 関連蛋白 CD2 associated protein (CD2AP)<sup>6)</sup>

CD2AP (80Kd) は元来T細胞と抗原提示細胞との接触に重要な役割を演じる分子であり、CD2受容体と細胞骨格とを連結する役割を有するものとされている。この分子の透過性機能への関

連は半ば偶然に立証された。即ちShihらはCD2APのknock outマウスを作製したところ、外見は正常に産まれたが、6〜7週で腎不全により死亡した。蛋白尿は1〜2週で出現し、組織学的には足突起の消失やメサンギウム増殖性病変を伴った糸球体硬化性病変が認められたという。更に彼等はCD2APがネフリンの細胞質内部位と直接反応することを*in vitro*で証明している。CD2APの正常腎における局在についてはIFにより、GECと一部近位・遠位尿細管細胞への局在が、またIEMによりスリット膜の細胞質側への局在が証明されている。また、大変興味深いことに、CD2APのknock outマウスにおける糸球体の発生過程でのネフリンの発現には変化は認められなかったと報告されている。

#### 2) ポドシン podocin<sup>7,8)</sup>

遺伝形式は常染色体劣性で小児期早期(3カ月〜5歳)に出現し、急速に腎不全へと進行するステロイド抵抗性のネフローゼ症候群を呈する家族性糸球体硬化症の責任遺伝子、NPHS2によりコードされる糸球体膜蛋白分子ポドシンがAntignac一派により報告された<sup>7)</sup>。当初*in situ* hybridization (ISH) 法により、NPHS2発現はGECに限局していることのみが報告されていたが、C末端、N末端に対する各特異抗体を用いたIEMによりスリット膜近傍の細胞質内局在が証明され、予測されたポドシンのヘアピン様構造に肯定的な傍証となった。ポドシンは構造的にはヒトストマチンファミリーに属し、その機能は未詳ではあるが、膜蛋白と細胞骨格を結びつけてGEC情報伝達に関与していると想定されている。

ネフリン同様ポドシンについても著者らはラットホモログのクローニング並びに特異抗体の作成に成功した<sup>8)</sup>。その結果全長383個のアミノ酸からなり、ヒトポドシンとの間に80%以上の相同性を有することが判明した。またIFによりネフリンの近傍に局在することやラット蛋白尿発現モデルではやはり顆粒状への局在変化が示された。抗ラットネフリンmAbによるモデルで

はネフリンの局在変化と同一変化を示すがアミノヌクレオシド腎症では両者の局在に分離が認められた。加えて神経組織中にも局在することが明らかとなりその機能的な意義が注目されている。

ポドシンが上記CD2APと同一局在を示し、かつ直接結合していることやネフリンとも相互作用を有することが明らかにされ、これら3者が一体となってスリット膜の構造・機能の維持に預かっていると考えられている。

### 3) $\alpha$ -アクチニン 4 $\alpha$ -actinin 4 ( $\alpha$ A4)<sup>4)</sup>

Kaplanらはアクチン・フィラメントを架橋する蛋白である $\alpha$ A4をコードする遺伝子(ACTN4)の異常が常染色体優性遺伝FSGS(focal segmental glomerulosclerosis)を惹起することを報告した。腎で $\alpha$ A4を最も強く発現しているのはGECである。彼等は正常 $\alpha$ A4に比較して異常 $\alpha$ A4が*in vitro*において、フィラメント状アクチンをより強く結びつけることを示して、この疾患においては、GECでのアクチン細胞骨格の制御が異常を来していることを示唆した。また症状発現までに長時間を要し、大人になってから発症しその進行もゆるやかであることから、他の障害因子に対して、この遺伝子異常がGECの感受性を亢進させるのではないかと推測されている。

### 4) ネフワン NEPH1

ネフリン類似の構造をもち、これをknock outされたマウスでは高度の蛋白尿が発現し大部分は生後12日以内に死亡した。興味あることに足突起の消失など異常な糸球体は主として傍髄質部に認められたという。この分子の詳細な局在やネフリンとの関係、スリット膜の構築と維持に果たす役割など加速度的に明らかにされていくものと期待される。

## 4. その他のスリット膜構成分子

### 1) ZO-1

ZO-1 (225Kd)は密着結合(tight junction)構成成分として知られ、そのスリット膜への局在がスリット膜は密着結合の一変型であるとの見解の根拠の一つとなっている。スリット膜局在ZO-1の濾過障壁に関連する役割については现阶段では未詳と言わざるを得ないが、上述のmAb 5-1-6による蛋白尿惹起時にZO-1の発現の減少が認められていること<sup>9)</sup>や、MWFラットにおいて、足突起が正常でスリット膜が保たれているのに発現する蛋白尿とZO-1の局在変化とが関連を有するという最近の報告はZO-1がネフリンと間接ではあるかも知れないが密接に関連し、スリット膜における正常透過性の保持に重要な役割を演じていることを示唆するものである。またオクルジン、クロージン等他の密着結合構成分子のスリット膜における役割については今後の検討に待つところが多い。

### 2) P-カドヘリン P-cadherin<sup>3)</sup>

カドヘリンはMundel一派のReiserらにより、スリット膜構成分子として報告され、細胞間の間隙が広いこと等、形態学的に類似していることからスリット膜はP-カドヘリン、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ カテニン(catenin)とZO-1からなる接着結合(adherens junction)の一亜型であると結論づけられた(図2)。P-カドヘリンのスリット膜への局在は彼らにより金粒子を用いたIEMにより証明されている。但しこの局在証明は報告者と同一の市販抗体による染色を試みても陰性であったという著者らの経験や<sup>9)</sup>やその後の報告の欠如から最終的な結論には至っていない。またP-カドヘリンknock outマウスで腎の表現型に特徴的な異常は認められなかったという報告もある。

### 3) FAT<sup>10)</sup>

ショウジョウバエ(*Drosophila*)のfat遺伝子によりコードされる新しいカドヘリンスーパーファ

ミリーとしてFATが報告されたがそのスリット膜への局在が最近示唆された。即ちFATのmRNAレベルでの糸球体内発現が証明され、それがGECに存在することもISHにより示された。更に抗FAT抗体とmAb 5-1-6 とによる二重染色法が同一局在を示したことによりFATのスリット膜への局在が結論づけられた。他の構成分子との相互関係は不明である。

## 5. その他GEC関連分子

その他の関連分子としては図2にあるように接着分子 $\alpha_3\beta_1$  インテグリンや $\alpha\beta$ 各ディストログリカン、シナプトポジン、WT-1、ポドプラニンなど枚挙に暇がないが紙数の関係で省略せざるを得ない。

### おわりに

以上紹介してきた一連のGEC、スリット膜局在蛋白分子についての最新の知見を網羅してMundelらが発表した模式図(図2)<sup>3)</sup>は、知識の整理と今後の展開への示唆を得るうえに大変有用な図だと思われる。ネフリンの関与するスリット膜の分子構造の乱れはそれを構成する他の分子にも影響を与える可能性が高い。これら既知の諸分子との関連のもとに、新しいGEC機能分子がぞくぞくと明らかにされてくるものと期待される。形態学的な異常としての足突起の消失、機能的な異常としての蛋白尿の発現、更には糸球体硬化への進展といった各々の機序が分子レベルで語れる基盤が整備されつつある。例えばCD2AP,  $\alpha A4$ , ポドシンの異常がもたらす病態から、足突起消失に果たすアクチンの中心的役

割が浮き彫りにされてくる。ポドシンはそのC末端でCD2AP, ネフリンと関係を持つなどこれら3者の相互関係も明らかにされつつある。最終的にはこれら諸分子の相互関係の解明を通して、GECの構造・機能を制御する情報伝達系の詳細が明らかにされ、その結果、蛋白尿の合理的な抑制策の確立とそれによる慢性腎不全状態への進展阻止が可能となるものと期待され、その中心にあるネフリンは新しい治療法開発への重要な鍵をにぎる対象として注目され続けいくものと思われる。

### 文 献

- 1) Orikasa M, et al: Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody. *J Immunol* 141: 807-814, 1988.
- 2) Tryggvason K: Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 10: 2440-2445, 1999.
- 3) Mundel P, Shankland SJ: Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 13: 3005-3015, 2002.
- 4) Pollak M: Inherited podocytopathies: FSGS and nephrotic syndrome from a genetic viewpoint. *J Am Soc Nephrol* 13: 3016-3023, 2002.
- 5) Kawachi H, et al: Cloning of rat nephrin: Expression in developing glomeruli and in proteinuric states. *Kidney Int* 57: 1949-1961, 2000.
- 6) Shih NY, et al: CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am J Pathol* 159: 2303-2308, 2001.
- 7) Roselli S, et al: Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 160: 131-139, 2002.
- 8) Kawachi H, et al: Cloning of rat homologue of podocin: Expression in proteinuric states and in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 13: 46-56, 2003.
- 9) Kawachi H, Shimizu F: Molecular composition and function of the slit diaphragm: nephrin, the molecule responsible for proteinuria. *Clin Exp Nephrol* 4: 161-172, 2000.
- 10) Inoue T, et al: FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* 59: 1003-1012, 2001.