

微小変化型ネフローゼ症候群の病態発症機序,  
診断マーカーの有用性についての検討  
—ラット Puromycin aminonucleoside 腎症における  
各種ポドサイト機能分子の発現解析—

金子 博 司

新潟大学大学院医歯学総合研究科  
生体機能調節医学専攻分子病態学分野  
(主任: 河内 裕教授)

Expression of Podocyte Molecules in Puromycin Aminonucleoside Nephrosis,  
A Mimic of Human Minimal Change Nephrotic Syndrome

Hiroshi KANEKO

Department of Cell Biology, Institute of Nephrology,  
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences  
(Director: Prof. Hiroshi KAWACHI)

要 旨

微小変化型ネフローゼ症候群 (minimal change nephrotic syndrome: MCNS) は糸球体上皮細胞 (ポドサイト) の機能異常により発症すると考えられているが, その発症機序の詳細は不明である. 本研究では, MCNS の実験モデルとして多用されている puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症をラットに誘導し, 病態誘導 1, 5, 10 日目の腎材料における各種ポドサイト分子の発現, 局在様式を詳細に解析した. スリット膜の構成分子である nephrin, podocin, ZO-1 は蛋白尿が観察されはじめる病態誘導 5 日目材料で既に著明な染色パターンの変化, 染色強度の低下を認め, 蛋白尿がピークとなる病態誘導 10 日目においてもほぼ同様の変化の程度を示した. 一方, 他のスリット膜分子である CD2AP, NEPH1 の 5 日目での変化は軽度で, 10 日目で著明な変化が確認された. 二重蛍光抗体法を用いて nephrin, podocin の局在の検討を行った結果, 蛋白尿の程度に依存して両分子の乖離が顕著になることを観察した. podoplanin は, スリット膜分子同様早期から染色性の低下がみられたが, synaptopodin,  $\alpha 3$ -integrin および podocalyxin は本病態モデルにおいて発現の変化はほとんど認められなかった. 本研究の観察結果は nephrin, podocin, ZO-1 の発現解析が, MCNS の早期診断に有用で, NEPH1, CD2AP を合わせた解析により MCNS の病期, 病勢の推測が可能であることを示していると考えられる. また, nephrin と podocin の乖離が病態形成に重要な役割を果たしていることが示された.

キーワード: 蛋白尿, ネフローゼ症候群, PAN 腎症, ポドサイト, スリット膜

Reprint requests to: Hiroshi KANEKO  
Department of Cell Biology Institute of  
Nephrology Niigata University Graduate School  
of Medical and Dental Sciences  
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,  
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757  
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 金子 博 司

## 緒 言

微小変化型ネフローゼ症候群 (minimal change nephrotic syndrome: MCNS) は、小児に好発する疾患であるが、成人においても多く、わが国の一次性ネフローゼ症候群の38.7%を占める重要な疾患である。副腎皮質ステロイド薬に対する反応性は良好であり、90%以上の症例で寛解に至るが、再発が約30~70%程度にみられ、頻回再発やステロイド依存性を示す症例も存在する。MCNS症例は電子顕微鏡での観察で糸球体上皮細胞(ポドサイト)の足突起の消失が見られるが、光学顕微鏡での観察では形態変化はごく微小ではば正常像を示す。最近の研究で、多くの糸球体疾患における蛋白尿はポドサイトの機能異常により発症すると考えられてきている<sup>1)~11)</sup>。MCNSの発症にもポドサイトの機能異常が関与していると考えられているが、その障害発症機序は十分に理解されていない。また、ポドサイト障害の部位、程度と臨床病態との関連についての解析は現在までほとんど報告されていない。本研究は、(1) MCNSの鑑別診断法の確立、(2) MCNSの病態形成機序の解明に寄与することを目的として、MCNSのモデルとして多用されている puromycin aminonucleoside (PAN) 腎症ラットにおける各種ポドサイト機能分子の発現、局在様式を免疫組織化学的手法を用いて詳細に解析した。

糸球体の毛細血管壁は血管腔に面している内皮細胞、間に存在する糸球体基底膜、その外側に位置するポドサイトの3層で構成されている。従来、血漿蛋白が原尿中に漏出するのを防ぐメインバリアーは糸球体基底膜であると考えられてきたが、現在はポドサイトがバリアーとして重要な役割を果たしていると考えられている<sup>12)</sup>。ポドサイトは細胞体から太い1次突起が伸びており、そこから足突起(2次突起)が伸び出している。ポドサイトの足突起は同じ胞体から出た突起同士でからみあうことは無く、別の胞体から出た突起が隣り合って基底膜の外側を覆っており、足突起間にはスリット膜と呼ばれる構造物が存在している<sup>13)</sup>。スリット膜は極めて高度に分化した細胞間接着装

置で、ポドサイトのバリアー機能維持における中心的な役割を果たしていると考えられている。スリット膜の構成分子として最初に報告されたのはZO-1である<sup>14)</sup>。ZO-1はtight junctionの構成分子として同定された分子でスリット膜の基部の細胞質部に局在している。近年、スリット膜機能分子としてnephrin, NEPH1, podocin, CD2APなどの分子が同定されている<sup>5)15)~18)</sup>。nephrin, NEPH1はスリット膜の細胞外部を構成する分子でpodocin, CD2APは細胞質に局在しており、nephrinの細胞質部と結合していると報告されている(図1)。

PAN腎症ラットの蛋白尿は病態誘導5日目ごろよりはじまり、10日目をピークとする顕著な蛋白尿を示すが、ほぼ1ヶ月で消退する。MCNS同様、電子顕微鏡的観察で足突起の消失が見られる

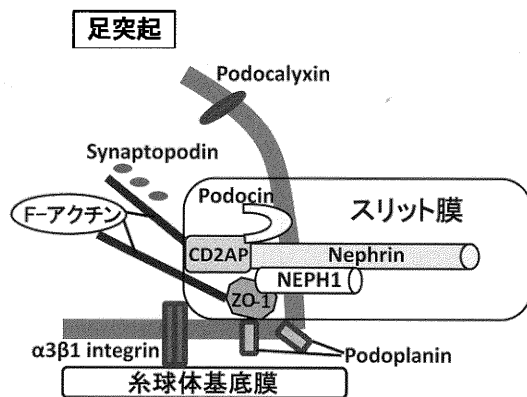


図1 ポドサイト機能分子の局在の概略図

ポドサイト足突起部における機能分子群の局在。nephrinはスリット膜の細胞外を構成する分子であり、CD2AP, podocin および NEPH1 と結合性を有している。NEPH1は細胞質部でZO-1と結合性を有している。podoplaninはスリット膜近傍を含むポドサイトの細胞膜部の広範囲に発現している。synaptopodinはアクチン線維の近傍に存在している。α3β1-integrinはポドサイトの基底部に発現し、糸球体基底膜との連結に関与している。podocalyxinはポドサイトの頂部に発現している膜蛋白である。

が，光学顕微鏡での観察では糸球体の形態変化はごく微小でほぼ正常像を示す．今回の検討では，上述の5種のスリット膜構成分子に加えポドサイトの頂部の細胞膜マーカーである podocalyxin<sup>19)</sup>，足突起の細胞骨格の機能維持に役割を果たしていると報告されている分子である synaptopodin<sup>20)</sup>，足突起の基底部に存在している分子である  $\alpha 3$ -integrin<sup>21)</sup> 並びにポドサイトの膜分子で足突起の維持に関与していると想定されている分子である podoplanin<sup>22/23)</sup> の9つの分子のPAN腎症材料における発現，局在様式を詳細に解析し，蛋白尿発症との関連についての考察を行った．

今回の検討で，蛋白尿発症初期の病態誘導5日目の材料で既にスリット膜構成分子群の染色パターンが変化していることが観察された．各分子の変化（半定量法での解析に用いた染色スコアの低下）はスリット膜分子間で異なる動態を示した．PAN腎症ラット糸球体では nephrin, podocin は乖離して局在しており，両者の乖離度は，尿蛋白量に依存して顕著になることを観察した．PAN腎症では，蛋白尿がピークとなる病態誘導10日目材料においても podocalyxin,  $\alpha 3$ -integrin の染色パターン，染色強度に変化が見られず，PAN腎症における病変はスリット膜部に限局していると考えられた．

## 材料と方法

### 1. 動物

6週齢雌性 Wistar ラット（体重 150–170g）（Charles River Japan, Atsugi, Japan）を使用した．すべての動物実験は，新潟大学動物実験施設の設けるガイドラインに従い行なった．

### 2. PAN腎症ラットの作製

PAN腎症は Wistar ラットに 100 mg/kg 体重の PAN を尾静脈より単回投与することにより作製した．9匹のラットに PAN を投与後，1日後，5日後および10日後にそれぞれ3匹ずつ屠殺した．コントロールとして9匹のラットに上記と同用量の生理食塩水を投与し，1日後，5日後および10

日後にそれぞれ3匹ずつ屠殺した．屠殺後腎臓を摘出し，蛍光抗体法の検討材料とした．

### 3. 尿蛋白量測定

ラットを代謝ケージに入れ，24時間尿を採取した．蛋白濃度は Bio-Rad Protein Assay Reagent（Bio-Rad, Hercules, CA）を用いて測定し，1日尿蛋白量を表記した．

### 4. 免疫組織化学

蛍光抗体法は Kawachi ら<sup>24)</sup>の方法に従って行った．腎組織は皮質部分を切り出した後， $-70^{\circ}\text{C}$  の n-ヘキサンで瞬時に凍結した．クリオスタットで  $3\mu\text{m}$  に薄切片アセトンで1分間または PLP（periodate-lysine-paraformaldehyde）で1分間（CD2APのみ）固定した．本法において使用した1次抗体は以下である：マウス抗ラット nephrin 抗体<sup>25)</sup>，ウサギ抗ラット podocin 抗体<sup>5)</sup>，ウサギ抗 NEPH1 抗体<sup>26)</sup>，ウサギ抗 CD2AP 抗体<sup>9)</sup>，ウサギ抗 podoplanin 抗体<sup>27)</sup>，ウサギ抗 podocalyxin 抗体<sup>28)</sup>，マウス抗 ZO-1 抗体（Zymed Laboratories (San Francisco, CA) 社より購入），マウス抗  $\alpha 3$ -integrin 抗体（Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) 社より購入）およびマウス抗 synaptopodin 抗体（Progen (Heidelberg, Germany) 社より購入）．2次抗体は，FITC 標識抗マウス immunoglobulins 抗体および FITC 標識抗ウサギ immunoglobulins 抗体（共に Dako Cytomation (Glostrup, Denmark) 社より購入）を使用した．作製した標本は蛍光顕微鏡（BX50; Olympus, Tokyo, Japan）で観察した．CD2AP と nephrin の二重蛍光抗体法は，凍結切片を PLP で1分間固定した後，ウサギ抗 CD2AP 抗体，FITC 標識抗ウサギ immunoglobulins 抗体で染色し，その後マウス抗 nephrin 抗体，TRITC（Tetra-methyl-rhodamine isothiocyanate）標識抗マウス immunoglobulins 抗体（Dako Cytomation 社より購入）を用いて染色を行った．nephrin と podocin の二重蛍光抗体法は，凍結切片をアセトンで1分間固定した後，ウサギ抗 podocin 抗体，FITC 標識抗ウサギ immunoglobulins 抗体で染色し，その後

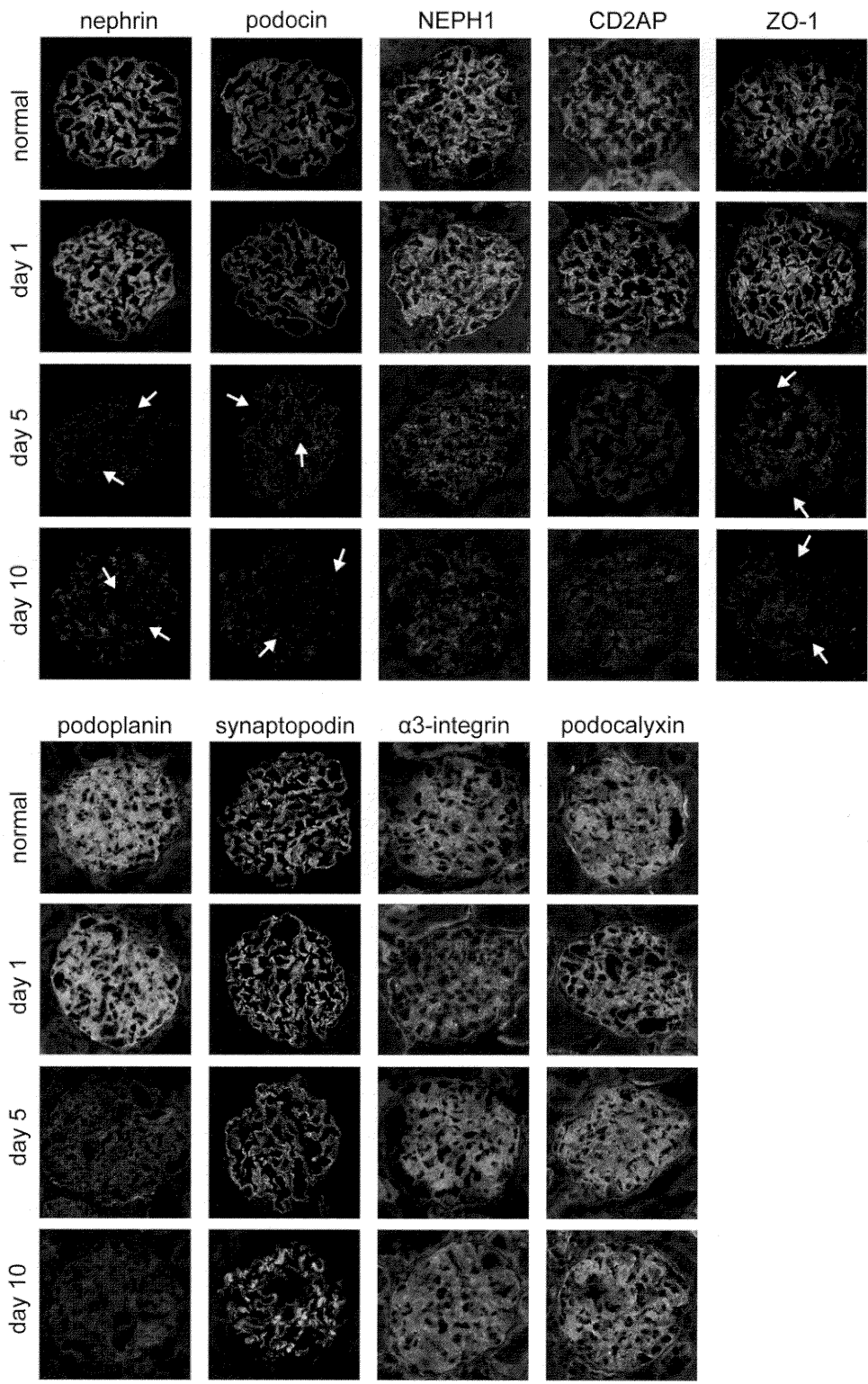


図2 ポドサイト機能分子の免疫染色像の経時的変化

PAN 腎症 1 日目，5 日目および 10 日目におけるポドサイト分子の蛍光抗体法所見。正常ラットの糸球体では，nephrin, podocin, NEPH1, CD2AP, ZO-1, synaptopodin および  $\alpha 3$ -integrin は糸球体毛細血管壁に沿った連続的なパターンで観察された。podoplanin, podocalyxin は，より広い領域に局在しているのが観察された。nephrin, podocin および ZO-1 は，5 日目，10 日目でいずれも不連続なパターンへと変化し（矢印），染色強度も大きく低下した。podoplanin も同様に染色強度が大きく低下した。NEPH1 および CD2AP の染色強度は 5 日目でやや低下し 10 日目では大きく低下していた。synaptopodin は 10 日目で部分的に染色強度の低下が観察された。 $\alpha 3$ -integrin および podocalyxin は 1 日目，5 日目，10 日目いずれの時期においても，発現，局在の変化が観察されなかった（倍率 $\times$ 400）。

マウス抗 nephrin 抗体，TRITC 標識抗マウス immunoglobulins 抗体で染色を行った。糸球体における各分子の半定量的解析（スコア付け）は Macconi ら<sup>29)</sup>の方法に従って行った。nephrin, podocin, NEPH1, CD2AP, ZO-1, podoplanin, synaptopodin,  $\alpha 3$ -integrin および podocalyxin, それぞれの分子の糸球体における発現の程度を次の基準で評価した。染色パターンの連続性の低下ならびに染色性の低下が認められる領域が糸球体の 0-25 % のものをスコア 4, 25-50 % のものをスコア 3, 50-75 % のものをスコア 2, 75-100 % のものをスコア 1 と評価した。スコアは各分子とも無作為に選り出した 20 個の糸球体（最長径断面の糸球体）についてスコア付けし，その平均値で表した。

## 結 果

### 1. ポドサイト分子群の発現の経時的変化，半定量的解析

スリット膜構成分子である nephrin, podocin, NEPH1, CD2AP および ZO-1 ならびに他のポドサイト機能分子である podoplanin, synaptopodin,  $\alpha 3$ -integrin および podocalyxin の蛍光抗体法所見を図 2 に示した。正常ラットの糸球体では，nephrin, podocin, NEPH1, CD2AP, ZO-1, synaptopodin および  $\alpha 3$ -integrin は糸球体毛細血管壁に沿った連続的なパターンで観察された。podoplanin, podocalyxin は，より広い領域に局在しているのが観察された。

nephrin, podocin および ZO-1 は，PAN 腎症誘導 5 日目，10 日目でいずれも不連続なパターンへと変化し染色性も大きく低下した。podoplanin も同様に染色性が大きく低下した。NEPH1 および CD2AP の染色性は PAN 腎症 5 日目でやや低下し，10 日目では大きく低下した。synaptopodin は 5 日目までは変化がなく，10 日目で部分的な染色性の低下が観察された。 $\alpha 3$ -integrin および podocalyxin は観察期間中，発現，局在の変化は確認されなかった。

糸球体における染色パターンの変化（連続的パターンの崩壊および染色性の低下）の範囲を半定量的に解析しスコア化した結果（スコア 1-4）を図 3-A に示した。nephrin, podocin, ZO-1 および podoplanin は 5 日目で既にスコアが著明に低下し，10 日目でもほぼ同様の低下の程度を示した。NEPH1 および CD2AP は 5 日目で軽度低下を示し，10 日目では著明な低下が見られた。10 日目での発現低下の程度は nephrin, podocin, ZO-1 と同等であった。

### 2. ポドサイト分子群の発現の変化と尿蛋白量の相関

各個体におけるポドサイト分子の発現変化の半定量スコアと尿蛋白量との関係を図 3-B に示した。nephrin, podocin, ZO-1 および podoplanin は，蛋白尿未発症の個体（病態誘導 5 日目，尿蛋白量 14.0 mg/day）においても，染色性の変化が確認された（染色スコア：各々 2.0, 1.4, 2.8, 1.5）。尿蛋白量 150mg/day 以上を示す個体では著明な

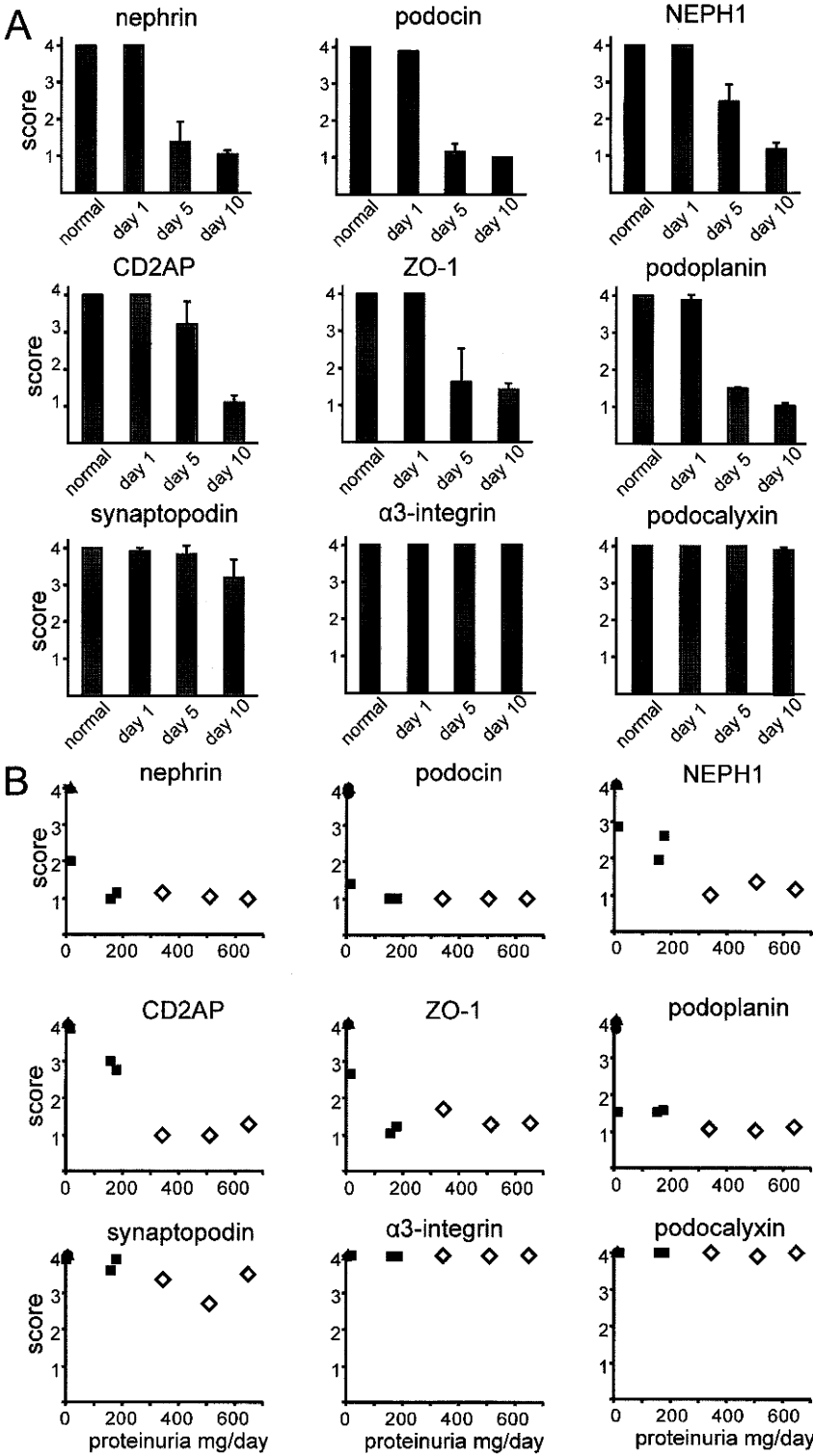


図3 ポドサイト機能分子の半定量的解析，尿蛋白量との相関

(A) 糸球体における染色性の変化（染色パターンの変化および染色強度の低下）の範囲を半定量的スコア化した結果（正常所見がスコア4，75%以上の領域に変化があるとスコア1，詳細は本文，方法を参照）。nephrin, podocin, ZO-1 および podoplanin は PAN 腎症5日目でも既にスコアが著明に低下し，10日目でもほぼ同様の低下の程度を示した。NEPH1 および CD2AP は5日目で軽度低下がみられ，10日目では上記4分子と同程度の著明な低下がみられた。synaptopodin は10日目で軽度低下を示した。 $\alpha 3$ -integrin および podocalyxin は経過観察中いずれの時期においても発現変化はみられなかった。データは平均値±SD (n = 3 rats) で示した。

(B) 各個体におけるポドサイト分子のスコアと尿蛋白量との関係。nephrin, podocin, ZO-1 および podoplanin は，蛋白尿未発症の個体（病態誘導5日目，尿蛋白量14.0 mg/day）においても，染色性の変化が確認され（染色スコア：各々2.0, 1.4, 2.8, 1.5），尿蛋白量150 mg/day以上を示す個体では1.0に近いスコアであった。NEPH1 および CD2AP は尿蛋白量が300 mg/day以上を示す個体で1.0に近いスコアとなった。synaptopodin は尿蛋白量が300 mg/day以上を示す個体で軽度低下がみられた。 $\alpha 3$ -integrin および podocalyxin は600 mg/day以上の高度蛋白尿量を示した個体においても発現パターン，発現強度の変化は確認できなかった。

(△：正常，●：PAN 腎症1日目，■：PAN 腎症5日目，◇：PAN 腎症10日目)

発現変化（75%以上の領域で発現パターンの変化が見られる染色スコアが1.0近く）が見られた。NEPH1 および CD2AP は尿蛋白量が300 mg/day以上を示す個体でスコア1.0に近い結果となった。synaptopodin は10日目の個体で軽度低下を示した個体が見られたが， $\alpha 3$ -integrin および podocalyxin は600 mg/day以上の高度蛋白尿を示した個体においても発現パターン，発現強度の変化は確認できなかった。

### 3. スリット膜構成分子群の局在様式，位置関係の解析

#### (1) CD2AP と nephrin の共局在の解析

二重蛍光抗体法を用いた検討で正常ラット糸球体では CD2AP と nephrin がほぼ一致して観察されたが，病態誘導5日目の糸球体では，nephrin の染色性が変化し CD2AP が単独で局在している部分が多く見られた。（代表的な所見を図4-Aに示した。図で提示した病態誘導5日目の所見は蛋白尿未発症個体での所見）。

#### (2) nephrin と podocin の共局在の解析

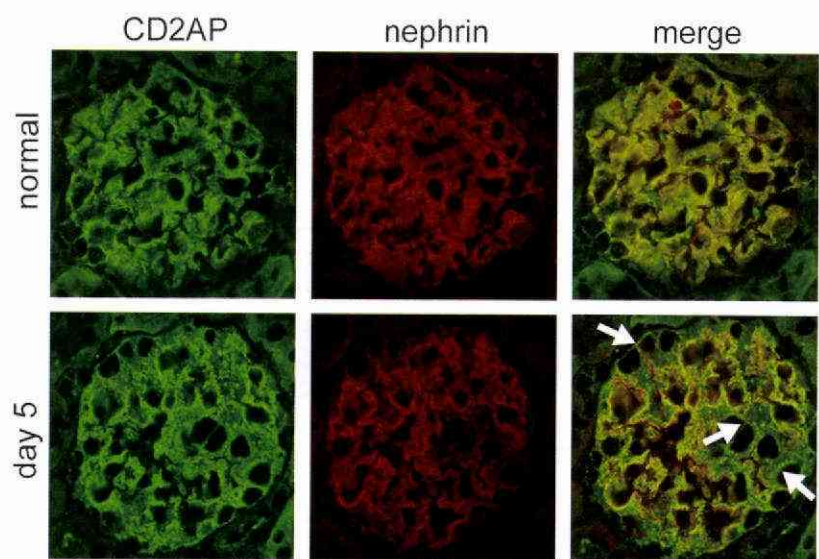
二重蛍光抗体法を用いた検討で正常ラット糸球体では nephrin と podocin がほぼ一致して観察された。病態誘導5日目の糸球体では残存する

nephrin と podocin は近傍に観察される部位が多く見られたが，病態誘導10日目の材料では，nephrin と podocin は乖離して局在している部位が多く見られた。蛋白尿量647.8 mg/dayの個体では，残存する nephrin と podocin はほぼすべての分子が乖離して観察された。（代表的な所見を図4-Bに示した。図で提示した病態誘導5日目の所見は尿蛋白量157.6 mg/dayの個体，10日目の所見は尿蛋白量647.8 mg/dayの個体）

### 考 察

本研究では，MCNSの病態形成機序の解明，MCNSの病勢診断，難治例の鑑別のための新規診断法の確立に寄与することを目的として，MCNSのモデルであるPAN腎症ラットにおける各種ポドサイト機能分子の発現，局在様式を免疫組織化学的手法を用いて詳細に解析した。まず，発現動態の検討を行った。nephrin, podocin, ZO-1, NEPH1, CD2APの5つのスリット膜構成分子はいずれも病態誘導5日の時点で既にパターンの変化，染色強度の低下が確認されたが，その変化の程度は，nephrin, podocin, ZO-1の3つの分子とNEPH1, CD2APの2分子との間に明らかな差を

A CD2AP / nephrin



B nephrin / podocin

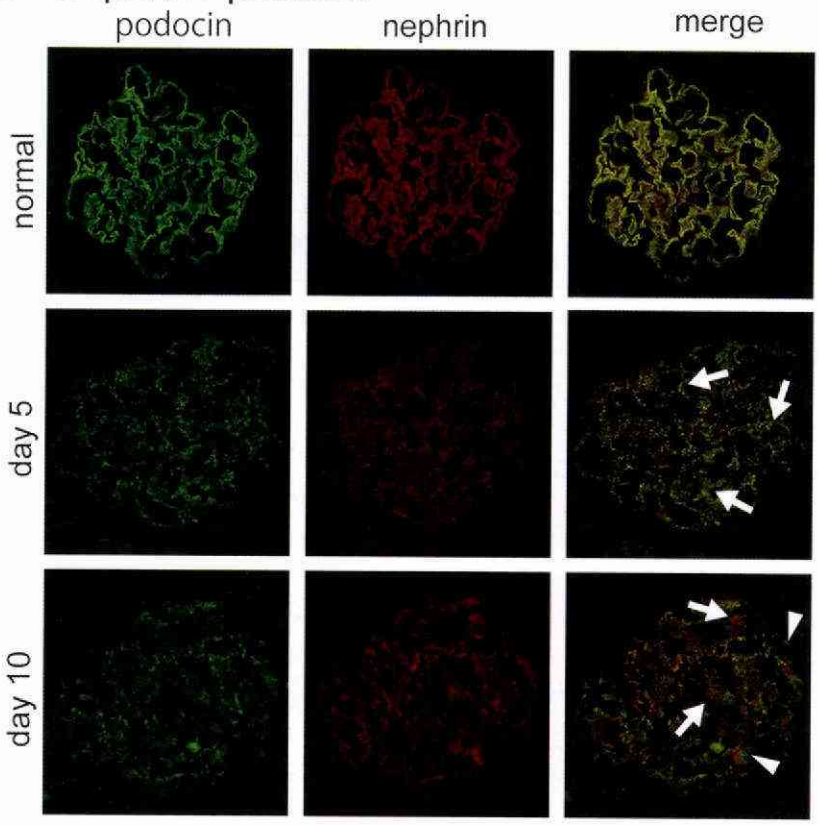




図4 スリット膜構成分子の二重蛍光抗体法所見

(A) CD2AP と nephrin の二重染色所見. 正常ラット糸球体は CD2AP (緑) と nephrin (赤) の局在がほぼ一致して黄色に観察される (上段) のに対し, 病態誘導 5 日目の糸球体では, nephrin の染色性が低下し CD2AP が単独で緑色に染色されている部分が広範囲に見られた (矢印) (下段). (図で提示した病態誘導 5 日目の所見は病的蛋白尿未発症個体での所見) (倍率×400)

(B) nephrin と podocin の二重染色所見. 正常ラット糸球体の nephrin と podocin は毛細血管壁に沿った連続したパターンで観察され, 両者の局在はほぼ一致して黄色に観察された (上段). 病態誘導 5 日目の尿蛋白量 157.6mg/day の個体 (中段) では残存する nephrin と podocin は近傍に観察される部位 (黄色; 矢印) が見られたが, 病態誘導 10 日目の蛋白尿量 647.8mg/day の個体 (下段) では, 残存する nephrin と podocin はほぼすべての分子が乖離して観察された (nephrin, 赤で観察, 矢印: podocin, 緑で観察, 矢頭) (倍率×400)

認めた. nephrin, podocin, ZO-1 は病態誘導 5 日の時点で既に糸球体毛細血管壁の 75 % 以上の領域に変化を認めるスコア 1 となり, 蛋白尿がピークとなる誘導 10 日目での所見とほぼ同程度の変化が見られた. 一方, NEPH1, CD2AP の変化は病態誘導 5 日の時点では軽度で, 高度の蛋白尿を示す誘導 10 日目にスコア 1 となる著明な変化が見られた (図 2, 図 3-A). 次に, これら分子群の発現変化と蛋白尿との関係を検討した. PAN 腎症では, 病態誘導 5 日前後に病的蛋白尿が観察されはじめる. 本研究では, 5 日目では正常値を示す個体と比較的軽度な蛋白尿 (150 mg/day) を示す個体が確認され, 誘導 10 日目では全個体が 300 mg/day を超える極めて高度の蛋白尿を示した. 個体データをプロットした所見を図 3-B に示した. nephrin, podocin, ZO-1 は病態誘導 5 日目, 1 日尿蛋白量が 150 mg を超える個体ではすべてスコア 1 を示しており, nephrin, podocin, ZO-1 はポドサイト傷害を感知する感度の高い早期マーカーとして有用であることを示している. 一方, NEPH1, CD2AP は 1 日尿蛋白量が 300 mg を超える個体でのみスコア 1 を示した. 現時点での検討では, NEPH1, CD2AP の著明な発現変化は, 病態誘導後の時間経過に依存するのか高度の蛋白尿の発症という臨床像に依存するのかは明確ではないが, 今回の観察は NEPH1, CD2AP の変化は進行した病態をモニターするために有用な指標となり得ることを示している. 今回の検討で得られた興味深い所見として強調しておきたいことは, PAN

腎症誘導 5 日目のまだ病的蛋白尿を呈していない個体においても nephrin, podocin の 2 分子の明確な発現変化が観察されたことである. 特に podocin の変化が著明であった. この結果は, ① podocin が極めて鋭敏なポドサイト傷害のマーカーであること, ② podocin の発現変化は, 病的蛋白尿発症に依存しない変化であることを示している. これらの観察はポドサイト障害, スリット膜障害の発症機序を考える上で極めて示唆的な所見であると考えられる.

今回の検討では, 上述のスリット膜分子に加え podoplanin, synaptopodin, podocalyxin,  $\alpha 3$ -integrin の 4 つのポドサイト機能分子の発現動態の解析を行った. PAN 腎症では MCNS 症例と同様, 病態誘導初期からポドサイトの足突起の消失が観察される. podoplanin は, 足突起の消失を示す有用なマーカーであると報告されている<sup>22)23)</sup>. 今回の検討でも, podoplanin の発現変化は病態誘導 5 日の時点で既に見られた. PAN 腎症誘導 5 日目の病的蛋白尿未発症の個体においてもほぼ同程度の変化が観察され, podoplanin の発現変化は病的蛋白尿非依存性の変化であることを示している. podoplanin は, スリット膜近傍領域を含め広い領域に発現している膜蛋白であると報告されている. podoplanin の分子機能については未だ不明な点が多いが, 今回の結果は, podoplanin はスリット膜構成分子の nephrin, podocin と同様にポドサイト傷害の早期マーカーとして有用であることを示している.

synaptopodin はポドサイトの2次突起(足突起)部に局在しているアクチン関連分子で、ポドサイトの形態維持、足突起構造の維持に関与していると考えられている<sup>20)</sup>。podocalyxin は、ポドサイトの頂部に局在する膜蛋白でポドサイト膜表面の陰性荷電の維持に重要な役割を果たしていると考えられている<sup>19)</sup>。 $\alpha 3$ -integrin はポドサイトの基底部と糸球体基底膜との連結に関与している分子である<sup>21)</sup>。synaptopodin は、PAN 腎症誘導10日目の材料で軽度の変化を認めたが、podocalyxin と $\alpha 3$ -integrin は今回の検討でいずれの時期にも発現の変化は確認されず、PAN 腎症誘導10日目の1日尿蛋白量が600 mgを超える個体においてもその発現は正常ラットと差がなかった。これらの観察は、可逆性の病態であるPAN 腎症では極めて高度の蛋白尿を示す個体においても傷害部位がスリット膜部に限局していることを示している。この観察はMCNSの発症機序を考える上で極めて重要な示唆を与える所見で、難治性の病態、巣状糸球体硬化症などの不可逆性のポドサイト障害との鑑別法の確立という観点からも極めて重要な所見であると考えられる。

本研究では各分子の発現動態の解析に加え、二重蛍光抗体法を用いた分子間の位置関係の解析を行った。各分子の単染色での発現動態の解析で、病態誘導5日目ではneph rin, podocinの染色性は変化していたが、CD2APの発現はほぼ正常像であった。正常糸球体においてCD2APはneph rinの細胞質部と結合性を有することが報告されている(図1)ので、病態誘導5日目材料でのCD2APとneph rinとの位置関係を解析するため二重蛍光抗体法解析を行った。正常ラット切片での二重蛍光抗体法での観察で両分子が一致して局在していることが観察されたが、病態誘導5日目の材料ではCD2APはneph rinと共染色されず単独で存在していることが確認された(図4-A)。このCD2APの存在様式の変化は、その後に引き続いて観察されるCD2APの発現の変化に先行する変化と捉えることができ、PAN 腎症の病態形成機序を考える上で重要な所見であると考えられる。

次に、スリット膜機能維持に最も重要な分子で

あると考えられており、今回の研究の単染色での検討でスリット膜の変化の最も鋭敏なマーカーであることが示されたneph rinとpodocinの位置関係、存在様式の解析を行った。図1のシェーマで示したようにpodocinはスリット膜の基部の細胞質に局在する分子でneph rinの細胞質部と結合性を有することが報告されており、今回の検討でも正常ラット切片での二重蛍光抗体法での観察で両分子が一致して局在していることが観察された。前述のように、単染色の検討では、neph rin, podocinの発現変化の程度は1日尿蛋白量が150 mgの個体と1日尿蛋白量が600 mgを超える個体とほぼ同等であった。そこで、neph rin, podocinの存在様式、位置関係を解析するために二重蛍光抗体法での解析を行った。1日尿蛋白量が150 mgの個体においてもneph rin, podocinはいずれも顆粒状パターンへの変化と染色性の著明な低下が見られたが、二重染色での観察では残存している両分子が共局在している部位が比較的多く観察された。一方、1日尿蛋白量が600 mgを超える個体では、両者が共局在している部位はほとんど確認できず、残存している両分子は乖離して存在していることが観察された(図4-B)。今回の観察は、PAN 腎症におけるneph rin, podocinの発現変化は、発現量の変化が先行し、それに引き続いて両者の乖離が起こることを示している。前述したように、PAN 腎症誘導5日目のまだ病的蛋白尿を呈していない個体においてもneph rin, podocinの2分子の明らかな発現変化が観察されている。この所見はneph rin, podocinそれぞれの分子の発現変化は極めて重要な所見であるが、両者の発現変化が認められる領域が75%を超える状態となっても両者が結合して存在している部位がある程度維持されている個体では病的蛋白尿の出現が見られないことを示している。この観察結果は各種病態におけるスリット膜の機能低下の発症機序を考える上で極めて重要な所見であると考えられる。今後、不可逆性の疾患を含めた各種病態におけるneph rin, podocinそれぞれの分子の発現変化、両者の存在様式の変化を経時的に比較検討していくことが重要であると考えられる。

MCNS はステロイド反応性の場合，腎生検の適応にならないケースも多い。しかし，ステロイド抵抗性を示す場合や先天性ネフローゼ症候群が疑われる場合は，腎生検による診断が行われる。MCNS の実験モデルを用いた今回の検討で，二重染色を含めた各種ポドサイト機能分子群の発現解析により病期，病勢の診断が可能であることが示された。今後，臨床材料を用いた検討が重要であると考えられる。

### 結 論

MCNS の実験モデルである PAN 腎症ラットにおける各種ポドサイト分子の発現動態，分子間の位置関係を単染色並びに二重蛍光抗体法を用いて解析した。スリット膜構成分子である nephrin, podocin, ZO-1 は病態誘導 5 日目に既に著明な染色パターンの変化，染色強度の低下が観察された。一方，他のスリット膜構成分子である CD 2AP, NEPH1 の 5 日目での変化は軽度で蛋白尿がピークとなる病態誘導 10 日目で著明な変化が確認された。病態誘導 5 日目の糸球体では残存している nephrin, podocin は極めて近傍に局在しているのが観察されたが，10 日目材料では両分子が乖離して局在している部位が多く見られた。両分子の乖離が蛋白尿の発症の要因として重要であると考えられた。PAN 腎症では，蛋白尿がピークとなる病態誘導 10 日目材料においても podocalyx-in,  $\alpha 3$ -integrin の染色パターン，染色強度に変化が見られず，PAN 腎症の病変はスリット膜部に局限していると考えられた。各種ポドサイト分子の発現解析は MCNS の病期，病勢診断に有用であると考えられる。

### 謝 辞

本研究においてご指導賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学専攻分子病態学分野河内 裕教授に深く感謝いたします。また研究を支えて頂きました腎研究施設分子病態学分野の皆様にも併せて御礼申し上げます。

### 参 考 文 献

- 1) Ahola H, Wang SX, Luimula P, Solin ML, Holzman LB and Holthofer H: Cloning and expression of the rat nephrin homolog. *Am J Pathol* 155: 907 - 913, 1999.
- 2) Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, Lupia E, Biancone L, Conaldi PG, Reponen P, Tryggvason K and Camussi G: Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 158: 1723 - 1731, 2001.
- 3) Furness PN, Hall LL, Shaw JA and Pringle JH: Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transpl* 14: 1234 - 1237, 1999.
- 4) Huh W, Kim DJ, Kim MK, Kim YG, Oh HY, Ruotsalainen V and Tryggvason K: Expression of nephrin in acquired human glomerular disease. *Nephrol Dial Transplant* 17: 478 - 484, 2002.
- 5) Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Sakai T and Shimizu F: Cloning of rat homologue of podocin: expression in proteinuric states and in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 14: 46 - 56, 2003.
- 6) Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Yaoita E, Orikasa M, Shia MA, Sakai T, Yamamoto T, Salant DJ and Shimizu F: Cloning of rat nephrin: expression in developing glomeruli and in proteinuric states. *Kidney Int* 57: 1949 - 1961, 2000.
- 7) Kawachi H, Kurihara H, Topham PS, Brown D, Shia MA, Orikasa M, Shimizu F and Salant DJ: Slit diaphragm-reactive nephritogenic MAb 5-1-6 alters expression of ZO-1 in rat podocytes. *Am J Physiol* 273: F984 - 993, 1997.
- 8) Kelly DJ, Aaltonen P, Cox AJ, Rumble JR, Langham R, Panagiotopoulos S, Jerums G, Holthofer H and Gilbert RE: Expression of the slit-diaphragm protein, nephrin, in experimental diabetic nephropathy: differing effects of anti-proteinuric therapies. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1327 - 1332, 2002.
- 9) Nakatsue T, Koike H, Han GD, Suzuki K, Miyauchi N, Yuan H, Salant DJ, Gejyo F, Shimizu

- F and Kawachi H: Nephrin and podocin dissociate at the onset of proteinuria in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int* 67: 2239 - 2253, 2005.
- 10) Toyoda M, Suzuki D, Umezono T, Uehara G, Maruyama M, Honma M, Sakai T and Sakai H: Expression of human nephrin mRNA in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 19: 380 - 385, 2004.
  - 11) Wernerson A, Duner F, Pettersson E, Widholm SM, Berg U, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Hultenby K and Soderberg M: Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 18: 70 - 76, 2003.
  - 12) Patrakka J and Tryggvason K: New insights into the role of podocytes in proteinuria. *Nat Rev Nephrol* 5: 463 - 468, 2009.
  - 13) Pavenstadt H, Kriz W and Kretzler M: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83: 253 - 307, 2003.
  - 14) Schnabel E, Anderson JM and Farquhar MG: The tight junction protein ZO - 1 is concentrated along slit diaphragms of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 111: 1255 - 1263, 1990.
  - 15) Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P and Antignac C: NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid - resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 24: 349 - 354, 2000.
  - 16) Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, Potter DG, Hawkins E, Barrish JP, Mathur BN, Turner CA, Geske R, Montgomery CA, Starbuck M, Brandt M, Gupta A, Ramirez - Solis R, Zambrowicz BP and Powell DR: Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* 21: 4829 - 4836, 2001.
  - 17) Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A and Tryggvason K: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein - nephrin - is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1: 575 - 582, 1998.
  - 18) Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH and Shaw AS: Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2 - associated protein. *Science* 286: 312 - 315, 1999.
  - 19) Kerjaschki D, Sharkey DJ and Farquhar MG: Identification and characterization of podocalyxin - the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 98: 1591 - 1596, 1984.
  - 20) Asanuma K, Yanagida - Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K and Mundel P: Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* 8: 485 - 491, 2006.
  - 21) Adler S: Characterization of glomerular epithelial cell matrix receptors. *Am J Pathol* 141: 571 - 578, 1992.
  - 22) Matsui K, Breitender - Geleff S, Soleiman A, Kowalski H and Kerjaschki D: Podoplanin, a novel 43 - kDa membrane protein, controls the shape of podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 14 Suppl 1: 9 - 11, 1999.
  - 23) Matsui K, Breiteneder - Geleff S and Kerjaschki D: Epitope - specific antibodies to the 43 - kD glomerular membrane protein podoplanin cause proteinuria and rapid flattening of podocytes. *J Am Soc Nephrol* 9: 2013 - 2026, 1998.
  - 24) Kawachi H, Oite T and Shimizu F: Studies on the 'linear pattern' in renal glomeruli demonstrated with immunofluorescence. *Nephron* 39: 36 - 39, 1985.
  - 25) Orikasa M, Matsui K, Oite T and Shimizu F: Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody. *J Immunol* 141: 807 - 814, 1988.
  - 26) Otaki Y, Miyauchi N, Higa M, Takada A, Kuroda T, Gejyo F, Shimizu F and Kawachi H: Dissociation of NEPH1 from nephrin is involved in development of a rat model of focal segmental glomerulosclerosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F1376 - 1387, 2008.
  - 27) Morioka Y, Koike H, Ikezumi Y, Ito Y, Oyanagi A,

- Gejyo F, Shimizu F and Kawachi H: Podocyte injuries exacerbate mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 60: 2192 - 2204, 2001.
- 28) Han GD, Koike H, Nakatsue T, Suzuki K, Yoneyama H, Narumi S, Kobayashi N, Mundel P, Shimizu F and Kawachi H: IFN - inducible protein - 10 has a differential role in podocyte during Thy 1.1 glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 14: 3111 - 3126, 2003.
- 29) Macconi D, Bonomelli M, Benigni A, Plati T, Sangalli F, Longaretti L, Conti S, Kawachi H, Hill P, Remuzzi G and Remuzzi A: Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury. *American Journal of Pathology* 168: 42 - 54, 2006.

(平成 26 年 1 月 19 日受付)