

## 遺伝性腎炎の分子病態

小林 武 弘

新潟大学大学院医歯学総合研究科小児科学分野

### Molecular Mechanisms Underlying the Pathogenesis of Alport Syndrome

Takehiro KOBAYASHI

*Division of Pediatrics, Department of Homeostatic Regulation and Development,  
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences*

#### 要 旨

アルポート症候群は、神経性難聴や眼症状を高頻度に伴う遺伝性の進行性糸球体腎炎である。IV型コラーゲン $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ 鎖をコードするCOL4A3, COL4A4, COL4A5遺伝子の異常が原因である。われわれは、これらの三鎖が単独ないし複数発現する細胞株を樹立し、これら三鎖が細胞内でヘテロ三量体を形成し、分泌されることを明らかにした。また、この複合体形成にはheat shock protein 47が必須であることを明らかにした。更に、 $\alpha 5$  (IV)鎖にアルポート症候群患者で認められる種々の変異を導入してヘテロ三量体形成について検討した。NC1ドメインに変異を導入した15種類の $\alpha 5$  (IV)鎖では、ヘテロ三量体は形成されないか、形成されても細胞から分泌されず、これがアルポート症候群の分子病態の一つと考えられた。一方で、コラーゲンドメインに変異を有する12種類の $\alpha 5$  (IV)鎖においては、5種類では減弱していたが複合体形成を認め、3種類では複合体形成は正常と差異がなかった。これらの $\alpha 5$  (IV)鎖では、分泌されたヘテロ三量体が一旦は糸球体基底膜のネットワークを構成するが、ネットワーク構造は徐々に破綻し、これら三鎖も次第に欠損していくことが予想される。複合体形成に対する影響が軽微な変異を持つモデル動物の作出が更なる病態の解明や新たな治療法の開発に有用と思われる。

キーワード：アルポート症候群, IV型コラーゲン, ヘテロ三量体, 変異, 組み換え蛋白

Reprint requests to: Takehiro KOBAYASHI  
Division of Pediatrics Department of  
Homeostatic Regulation and Development  
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  
新潟大学医歯学総合研究科小児科学分野

小林 武 弘

## はじめに

アルポート症候群は、神経性難聴や眼症状を高頻度に伴う遺伝性の進行性糸球体腎炎である。腎症状は当初は血尿が唯一の所見であるが、進行とともに蛋白尿が増加し、10代後半から30代で末期腎不全に至ることが多い。腎組織では電顕像が特徴的で、糸球体基底膜 (GBM) の不規則な肥厚や層状の断裂、網目状変化を認める。発症頻度は約1/5,000人といわれ、小児期慢性腎不全の約5%を占めている。遺伝形式はX連鎖性 (85%)、常染色体劣性 (14%)、常染色体優性 (稀) があり、X連鎖性はIV型コラーゲン $\alpha$ 5鎖遺伝子 (COL4A5)、常染色体性は $\alpha$ 3鎖ないし $\alpha$ 4鎖遺伝子 (COL4A3, COL4A4) の異常が原因である<sup>1)2)</sup>。IV型コラーゲンは $\alpha$ 1 (IV)~ $\alpha$ 6 (IV) 鎖から成り、このうち $\alpha$ 1 (IV) 鎖と $\alpha$ 2 (IV) 鎖は [ $\alpha$ 1 (IV)]<sub>2</sub> $\alpha$ 2 (IV) のヘテロ三量体を形成し生体内の基底膜に広範に分布するが、他の $\alpha$  (IV) 鎖は組織特異的に存在する。腎臓では $\alpha$ 3 (IV)、 $\alpha$ 4 (IV) 鎖はGBMに局限し、 $\alpha$ 5 (IV) 鎖はGBMに加え $\alpha$ 6 (IV) 鎖と共にポウマン嚢にも存在する<sup>3)4)</sup>。これらの分布パターンに加え、アルポート症候群ではCOL4A3、COL4A4、COL4A5遺伝子のいずれか一つの異常で $\alpha$ 3 (IV)、 $\alpha$ 4 (IV)、 $\alpha$ 5 (IV) 鎖全てがGBMから欠損することから、 $\alpha$ 3 (IV)、 $\alpha$ 4 (IV)、 $\alpha$ 5 (IV) 鎖はヘテロ三量体を構成し、その形成不全がアルポート症候群を引き起こすことが予想されていた。

本稿では、組み換え蛋白や培養細胞を用いた、 $\alpha$ 3 (IV)、 $\alpha$ 4 (IV)、 $\alpha$ 5 (IV) 鎖の複合体形成についてのわれわれの解析について紹介したい。

### $\alpha$ 3 (IV)、 $\alpha$ 4 (IV)、 $\alpha$ 5 (IV) 鎖の ヘテロ三量体形成

はじめにCOL4A3、COL4A4、COL4A5遺伝子cDNAにそれぞれ異なるエピトープタグ (myc, V5, FLAG) を付加した後に発現ベクターにサブクローニングしHEK293細胞に導入し、更に薬剤

で選択することにより安定形質転換株を樹立した。樹立した細胞株に他の $\alpha$  (IV) 鎖遺伝子cDNAを導入することにより、単独ないし複数の $\alpha$  (IV) 鎖を発現する細胞株を樹立した。これらの細胞株の全細胞抽出液および培養上清を用いて、 $\alpha$ 5 (IV) 鎖に付加したFLAGエピトープに対するモノクローナル抗体での免疫沈降、ウエスタンブロット解析を行うことにより複合体形成についての解析を行った。それらの結果は以下の通りであった。① $\alpha$ 3 (IV)、 $\alpha$ 4 (IV)、 $\alpha$ 5 (IV) 鎖はヘテロ三量体を形成した。②この三量体は細胞内で形成された後に細胞外に分泌された。③ $\alpha$ 3 (IV) 鎖と $\alpha$ 4 (IV) 鎖、 $\alpha$ 3 (IV) 鎖と $\alpha$ 5 (IV) 鎖、 $\alpha$ 4 (IV) 鎖と $\alpha$ 5 (IV) 鎖の組み合わせでは複合体を形成しなかった。④ $\alpha$  (IV) 鎖は、モノマーの形でも細胞外に分泌されていた。⑤ $\alpha$  (IV) 鎖は、N末端側のGly-X-Yの繰り返し構造をもつ約1,400残基のコラーゲンドメインとC末端側の約230残基のNC1ドメインから成るが、いずれのドメインを欠いても複合体を形成しなかった<sup>5)</sup>。

以上の結果から、生体内において $\alpha$ 3 (IV)、 $\alpha$ 4 (IV)、 $\alpha$ 5 (IV) 鎖は糸球体上皮細胞中でヘテロ三量体を形成した後に分泌され、GBMにおけるコラーゲンの網目状構造を構成することが推察された。

### NCIドメインに変異を有する $\alpha$ 5 (IV) 鎖の複合体形成

NC1ドメインは約230アミノ酸から成り、 $\alpha$  (IV) 鎖のC末端に位置する。NC1ドメインには分子認識配列があると考えられており、選択された三本の $\alpha$  (IV) 鎖はここで会合した後、コラーゲンドメインにおいてN末端側に向かって巻かれてトリプルヘリックス構造を形成していく<sup>6)</sup>。NC1ドメインはその長さ比べ、アルポート症候群患者で多くの変異が報告されており、その重要性がうかがわれる。われわれは、X連鎖アルポート症候群患者で報告されている12種類のミスセンス変異および3種類のナンセンス変異、C末端

表1 NC1ドメインにアミノ酸置換を有する $\alpha 5$ (IV)鎖

Amino acid change in human $\alpha 5$ (IV) chain	Onset of ESRD (age)	Hearing loss	Ocular lesions	Function of recombinant $\alpha 5$ (IV) chain		
				Heterotrimer		$\alpha 5$ (IV) secretion
				Cell	Medium	
A1498D	A (37)	ND	ND	+	-	+
P1517T	J (16)	+	-	+	-	+
R1677Q	A (40-62)	+	-	+	-	-
W1538R				-	-	-
W1538S	A (33)	-	-	-	-	-
R1511H	J (<30)	+	-	-	-	+
R1563Q	J (25-29)	+	-	-	-	+
L1649R	A (>31)	+	ND	-	-	+
G1486A	- (49)	+	ND	-	-	-
C1564S	A (33)	+	ND	-	-	-
C1567R	J (16)	+	+	-	-	-
C1586R	J (14)	+	ND	-	-	-
Wild type	-	-	-	+	+	+

表2 C末端側にアミノ酸欠失を有する $\alpha 5$ (IV)鎖

Amino acids deletion in human $\alpha 5$ (IV) chain	Onset of ESRD (age)	Hearing loss	Ocular lesions	Function of recombinant $\alpha 5$ (IV) chain	
				Heterotrimer in cell extract	$\alpha 5$ (IV) secretion
$\Delta$ C123	J (23)	+	-	-	-
$\Delta$ C9	J (13~25)	+	+	-	-
$\Delta$ C7	- (15)	-	ND	-	-
$\Delta$ C4				-	-
$\Delta$ C3				-	-
$\Delta$ C2				-	-
$\Delta$ C1				±	-
Wild type	-	-	-	+	+

側の1~4アミノ酸の欠失を $\alpha 5$ (IV)鎖に導入し、 $\alpha 3$ (IV)鎖、 $\alpha 4$ (IV)鎖との複合体形成について検討し、以下の結果を得た(表1, 2)。①3種類のミスセンス変異(A1498D, P1517T, R1677Q)を有する $\alpha 5$ (IV)鎖では、細胞内でヘテロ三量体を形成したが、その三量体は分泌されなかった。②その他のミスセンス・ナンセンス変異を有する $\alpha 5$ (IV)鎖は細胞内でもヘテロ三量体を形成しなかった。③5種類のミスセンス変異(A1498D, R1511H, P1517T, R1563Q, L1649R)では $\alpha 5$ (IV)鎖はモノマーで分泌された。④これらの障害のパターンと臨床所見(末期腎不全に至る年齢、難聴・眼病変の有無)との間で明らかな相関はなかった。⑤C末端側の1アミノ酸を欠失するとヘテロ三量体の形成は減弱し分泌されず、2アミノ酸を欠くとヘテロ三量体は全く形成されなかった<sup>7)</sup>。

以上のことから、NC1ドメインに変異を有する $\alpha 5$ (IV)鎖は $\alpha 3$ (IV)鎖、 $\alpha 4$ (IV)鎖との複合体形成に障害があり、これがアルポート症候群の分子病態の一つと考えられた。また、機能を維持する上で $\alpha 5$ (IV)鎖C末端側アミノ酸は重要と考えられた。

#### 症状が軽微な家系でみられたC1638Y変異

最近、腎症状の進展が緩徐で腎外症状を欠き、腎組織でも $\alpha 3$ (IV)、 $\alpha 4$ (IV)、 $\alpha 5$ (IV)鎖が残存するニュージーランドの大家系において、 $\alpha 5$ (IV)鎖NC1ドメインでのC1638Y変異が報告された<sup>8)</sup>。この変異を有する $\alpha 5$ (IV)鎖の複合体形成について解析したところ、変異 $\alpha 5$ (IV)鎖は、正常に比べ量は減少していたが、細胞内でヘテロ三量体を形成し培養液中に複合体として分泌されていた。また、複合体のプロテアーゼに対する感受性は変異 $\alpha 5$ (IV)鎖と正常 $\alpha 5$ (IV)鎖でほぼ同等であった。C1638Y変異 $\alpha 5$ (IV)鎖では $\alpha 3$ (IV)、 $\alpha 4$ (IV)鎖との複合体形成能及び複合体としての分泌能が若干残存しており、そのためアルポート症候群としての症状が軽微であると考えられた<sup>9)</sup>。

#### コラーゲンドメインに変異を有する $\alpha 5$ (IV)鎖の複合体形成

コラーゲンドメインはGly-X-Yの繰り返し構造を持っているが、アルポート症候群ではこのグリシンについて数多くのミスセンス変異が報告されている。このうち末期腎不全に、比較的早く(10代)至った6種類の変異、比較的遅く30代後半以降に至った6種類の変異についてそれぞれ $\alpha 5$ (IV)鎖に導入し、ヘテロ三量体の形成能について解析した(表3)。12種類の変異 $\alpha 5$ (IV)鎖のうち、4種類では $\alpha 3$ (IV)鎖、 $\alpha 4$ (IV)鎖との複合体形成を認めず、5種類では減弱していたが複合体形成がみられた。3種類の変異 $\alpha 5$ (IV)鎖では、複合体形成に異常を認めなかった。また、これら複合体形成や分泌における障害のパターンと臨床症状との間に相関は明らかでなかった。複合体が形成されていてもその構造が十分でない可能性もあり、今後、形成された複合体のプロテアーゼ抵抗性について解析を行う予定である。

#### HSP47 (heat shock protein 47) の 複合体形成への関与

HSP47は小胞体に存在するストレス蛋白質の一つである。コラーゲンに特異的な分子シャペロンであり、コラーゲンのトリプルヘリックス形成に関与している<sup>10)</sup>。HEK293細胞ではHSP47の発現が低いことが今までに報告されている<sup>11)</sup>。われわれの樹立した $\alpha 345$ 細胞( $\alpha 3$ (IV)、 $\alpha 4$ (IV)、 $\alpha 5$ (IV)鎖を発現する細胞)において、形成されるヘテロ三量体が三鎖の発現量に比べて少ないのは、ホストであるHEK293細胞でのHSP47の低発現に起因すると思われた。そこで、 $\alpha 345$ 細胞に対しHSP47を線維芽細胞と同程度まで強発現させたが、ヘテロ三量体の形成に変化はなかった。一方で、 $\alpha 345$ 細胞にHSP47siRNA発現プラスミドを導入しHSP47の発現を減弱させたところ、ヘテロ三量体の形成は不良となった。① $\alpha 3$ (IV)、 $\alpha 4$ (IV)、 $\alpha 5$ (IV)鎖の複合体形成にはHSP47は必須であること、②HEK293細

表3 コラーゲンドメインにアミノ酸置換を有する $\alpha 5$  (IV) 鎖

Amino acid change in human $\alpha 5$ (IV) chain	Onset of ESRD (age)	Hearing loss	Ocular lesions	Function of recombinant $\alpha 5$ (IV) chain		
				Heterotrimer		$\alpha 5$ (IV) secretion
				Cell	Medium	
G292V	J (15)	+	-	+	+	+
G1030S	A (37)	+	ND	+	+	+
G1196R	J (18)	+	-	+	+	+
G524D	A (41)	+	-	±	+	+
G545V	J (17)	-	-	±	+	+
G567A	J (16)	+	-	±	+	+
G941C	A (50, 40)	+	ND	±	+	+
G216R	J (15)	+	-	±	±	+
G264R	A (48)	+	-	-	-	+
G497C	A (47)	+	ND	-	-	+
G669R	J (18)	+	+	-	-	+
G626A	A (38, 60)	+	ND	-	-	±
Wild type	-	-	-	+	+	+

胞では HSP47 の発現は低いがこのヘテロ三量体形成に対しては十分量であることが考えられた。

### おわりに

多くの変異 $\alpha 5$  (IV) 鎖は、 $\alpha 3$  (IV)、 $\alpha 4$  (IV) 鎖とのヘテロ三量体形成に支障を来し、それがアルポート症候群の分子病態の一つと考えられた。一方で、コラーゲンドメインに変異を有する $\alpha 5$  (IV) 鎖では、ヘテロ三量体形成や分泌が正常と変わらないものが存在した。「これらのヘテロ三量体は糸球体上皮細胞から分泌され、GBMのネットワークを一旦は構成するが、構造の物理的脆弱性やプロテアーゼへの感受性亢進などのために、ネットワークは徐々に破綻し、GBMから三鎖が欠損していく」ことをもう一つの分子病態として予想している。多くのアルポート症候

群患者の腎組織では $\alpha 3$  (IV)~ $\alpha 5$  (IV) 鎖全てが欠損しているが、それはこの終末像を観察しているのかもしれない。胎児期を含め幼若期からの腎組織の経時的な観察には、モデル動物が有用である。既存のアルポート症候群のモデル動物（ノックアウトマウスやアルポート症候群を自然発症するイヌ）は全て当初から $\alpha 3$  (IV)~ $\alpha 5$  (IV) 鎖がGBMに存在しないタイプであり<sup>12)13)</sup>、更なる病態解明のためには不完全なヘテロ三量体がGBMに存在するようなモデル動物（変異のノックインマウスなど）の作出が望まれる。また、ヘテロ三量体を形成しうるアルポート症候群においては、このヘテロ三量体の維持に向けた治療法（特異的なプロテアーゼの抑制など）も想定され、その点からも新たなアルポート症候群モデル動物が必要と思われる。

## 参考文献

- 1) Tryggvason K and Martin P: Alport syndrome and basement membrane collagen. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed, Vol 4, McGraw - Hill, New York, pp 5453 - 5466, 2001.
- 2) Thorner PS: Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *Nephron Clin Pract* 106: c82 - c88, 2007.
- 3) Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M and Neilson EG: Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 348: 2543 - 2556, 2003.
- 4) Byers PH: Disorders of collagen biosynthesis and structure. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8th ed, Vol 4, McGraw - Hill, New York, pp 5241 - 5285, 2001.
- 5) Kobayashi T and Uchiyama M: Characterization of assembly of recombinant type IV collagen  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  and  $\alpha 5$  chains in transfected cell strains. *Kidney Int* 64: 1986 - 1996, 2003.
- 6) Hudson BG: The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J Am Soc Nephrol* 15: 2514 - 2527, 2004.
- 7) Kobayashi T, Kakihara T and Uchiyama M: Mutational analysis of type IV collagen  $\alpha 5$  chain, with respect to heterotrimer formation. *Biochem Biophys Res Commun* 366: 60 - 65, 2008.
- 8) Wilson JC, Yoon HS, Walker RJ and Eccles MR: A novel Cys1638 Tyr NC1 domain substitution in  $\alpha 5$  (IV) collagen cause Alport syndrome with late onset renal failure without hearing loss or eye abnormalities. *Nephrol Dial Transplant* 22: 1338 - 1446, 2007.
- 9) Kobayashi T and Uchiyama M: Mutant - type  $\alpha 5$  (IV) collagen in a mild form of Alport syndrome has residual ability to form a heterotrimer. *Pediatr Nephrol* 25: 1169 - 1172, 2010.
- 10) Taguchi T and Razzaque MS: The collagen - specific molecular chaperone HSP47: is there a role in fibrosis? *Trends Mol Med* 13: 45 - 53, 2007.
- 11) Hosokawa N, Hohenadl C, Satoh M, Kuhn K and Nagata K: HSP47, a collagen - specific molecular chaperone, delays the secretion of type III pro - collagen transfected in human embryonic kidney cell line 293: a possible role for HSP47 in collagen modification. *J Biochem* 124: 654 - 662, 1998.
- 12) Heikkila P, Tryggvason K and Thorner P: Animal models of Alport syndrome: advancing the prospects for effective human gene therapy. *Exp Nephrol* 8: 1 - 7, 2000.
- 13) Cosgrove D, Kalluri R, Miner JH, Segal Y and Borza DB: Choosing a mouse model to study the molecular pathobiology of Alport glomerulonephritis. *Kidney Int* 71: 615 - 618, 2007.