

綜

説

最終講義

腎不全への進展阻止を目指して

— ラットとともに40年 —

清水 不二雄

新潟青陵大学

Aiming to Inhibit the Progression to Renal Insufficiency

— Forty Years Together with Rats —

Fujio SHIMIZU

*Niigata Seiryō University***Abstract**

Masugi nephritis, induced by Masugi et al, demonstrated that immune reactions in glomeruli caused renal lesions. It was induced by injection of heterologous antiserum produced against whole kidney homogenates. In order to analyze the responsible immune reactions causing renal lesions, two methods were applied. The first one is the approach from the antigenic side, that is, the purification of antigen used for immunization and second one is from the antibody side, namely, the application of the advanced technology for monoclonal antibody (mAb) production. The group of the author succeeded in producing two kinds of proteinuria inducing mAbs, anti-thy-1 mAb 1-22-3 and anti-rat nephrin mAb 5-1-6. Using the latter, we analyzed the proteinuria mechanism and suggested the importance of the slit diaphragm in keeping the normal glomerular permselectivity. Succeeding in cloning the rat homologues of podocin as well as of nephrin, we demonstrated that such slit diaphragm-associated molecules are intimately related to the acquired renal lesions too. Initiated by nephrin many new functional molecules associated with podocyte function have been reported and such a complex is regarded as playing the roles of signal transduction, essential for podocyte biological functions. These molecules are targets for trials to prevent the proteinuria resulting in the amelioration of the progression of renal lesions to the irreversible renal insufficiency.

Key words: Masugi-nephritis, monoclonal antibody, proteinuria, slit diaphragm, podocyte (visceral glomerular epithelial cell)

Reprint requests to: Fujio SHIMIZU
Niigata Seiryō University
1-5939 Suido-cho,
Niigata 951-8121 Japan

別刷請求先: 〒951-8121 新潟市水道町1-5939
新潟青陵大学 清水不二雄

この最終講義での講演内容は2005年10月新潟市ときメッセで開催された第35回日本腎臓学会東部学術大会における会長講演“臨床腎臓学発展に果たす実験腎炎の役割”に一部手直しをしたものである。

実験腎炎の嚆矢と目される馬杉腎炎は1930年代の初めに千葉大学病理学教室の馬杉復三教授により千葉医学会誌に発表された¹⁾。動物A(例えばラット)の全腎臓を動物B(例えばウサギ)に免疫してそのB由来抗A腎抗血清をAに投与することによりAの腎を場とした抗原抗体反応の結果としてある種のヒト腎病変に類似した腎障害が惹起されることが明らかにされた。この原著論文は“我々は本実験よりして、人類の糸球体腎炎が一種のアレルギー性疾患なることを益々確実にし得たりと信ずるものなり。”と誇らしげに結ばれている。馬杉らの熱き思いが伝わってくるように思われる。

然しこの馬杉腎炎はその示した包括的で重要な意味合いから見て不当な軽視を受けたように著者には思える。自己免疫機序がいまだ十分に理解されていない時期に、病因を解析するに当たって他種動物の抗腎血清の受身投与といういわば非生理的な惹起方法が用いられたことに加えて、それが示唆した同様の抗原特異性を有する自己抗体によるヒト腎炎例(Goodpasture症候群)の希少さがさらにその冷遇に拍車をかけたものと思われる。そのあたりの経緯を同教室の後輩に当たられる岡林篤教授が“馬杉腎炎40年—尽きせぬ免疫病理学的含意²⁾”と題して“先達の哀しみの漂うこの糸球体腎炎。生体では実際にはおこり得ない機序をあやつって作り出した架空の、horror autotoxicusの教義に反する異端の腎炎。幻想の生んだその現実の、しかし、なんと確かでみごとなことよ。”と表現しておられる。素晴らしい美文調で馬杉腎炎賛歌に満ち満ちており、著者の最も敬愛する総説の一つである。

一方、より受け入れられやすい機序として提唱されたのが“免疫複合体型糸球体腎炎(Immune Complex Glomerulonephritis)”の概念である。これは抗原の進入を受けて抗体が産生され、結果と

して日常茶飯事的に抗原抗体複合体が形成されるが、種々の条件を満たすとこの複合体は生体の異物処理系による処理を免れ、流血中にとどまることとなり、濾過機能を担う腎の解剖生理学的特性によりこの複合体が腎糸球体に沈着して局所に炎症細胞の浸潤を促し腎炎に結果するという説である。当時のこの分野の大御所であったDixonが免疫学的機序により発症する腎炎の大部分はこの機序に由来する³⁾と主張したこともあって大方の受け入れられるところとなった。然し病因論的には受け入れやすいこの病態を実験的に実証することは困難を極めた。あたかも腎炎の病因が解明されたかのごとき危険な錯覚のもとに腎炎惹起抗原を具体的に臨床領域に提示できないまま実験腎炎は無力感を味わい続けた。この傾向に警鐘を鳴らすべくやはり千葉大学病理学教室の後輩にあたる多田富雄元東大免疫学教授は“いま糸球体腎炎を見つめる者には、いささかもドグマにとらわれぬ、しかし決して機械的、即物的、トリビアルではない、明せきな“見者(voian)”としての眼が必要なのではないだろうか。”と喝破されている⁴⁾。

ところでもう一つの免疫学的機序により惹起された実験腎炎の代表がHeymann腎炎⁵⁾である。上述馬杉腎炎がいわゆる受動免疫によるものであることに対して、これは能動免疫により惹起された。原法がともに抗原として全腎臓が使われており、前者が増殖性腎炎、後者が膜性腎症のモデルとされている。これらのモデルを用いて更に病態・病因を解明するための手法としては抗原側からの解析と抗体側からの解析が考えられる。馬杉腎炎の場合の抗原側からの解析は東大におられた柴田整一先生が得意の生化学的手法を活用して精力的に進められた。最終的には抗原性を欠くほど精製が進み理論上受動的には惹起不能となった糖ポリペプチドを能動的にラットに投与することで典型的な萎縮腎にいたるようなモデル確立が報告された⁶⁾。いわゆる柴田腎炎である。しかしながら追試がなされなかったこともあって国際的にも大方の認めるところとなっていないのは日本人として大変残念である。抗体側からのアプローチが単クローン抗体(mAb)手法により著者らによ

り試みられた。

Heymann 腎炎の場合も物理化学的な手法により主として受動型モデルを用いて抗原解析が進められ、gp330 からメガリンにまでいたったが最終的に本来の能動型との病態の解離が問題視される結果となった。抗体側からのアプローチとして著者らは同じく mAb を用いて病因に結びつく抗原抗体系の単離を試みたが目覚ましい成果は得られなかった。

ところで先述の馬杉腎炎の責任抗原の解析のための mAb 産生の試みから著者らは2種類の蛋白尿惹起 mAb を得た。

1) mAb 1-22-3 (抗 Thy-1 mAb) により惹起される病態⁷⁾

ラットへの一回投与でいわゆる Thy-1 腎炎と基本的には同様の一過性メサンギウム増殖性腎炎が惹起される。ヒト腎炎の進行性病変を模擬するために2回投与モデルと片腎一回投与モデルが著者らにより確立され、現在世界中で活用されている。その成果は著者らを共著者とした英文原著として2004年には7報、2005年には9報発表されている。

2) mAb 5-1-6 (抗ラットネフリン mAb) により惹起される病態⁸⁾

mAb 5-1-6 静注によりラットに補体や炎症細胞非依存的に一過性ではあるが著明な蛋白尿が惹起される。ラットネフリンがスリット膜に局在することも明らかにされた。

正常糸球体透過性保持に主として関与するのは糸球体基底膜なのかあるいはスリット膜なのかについて長い論争があったことは周知の事実である。勿論両者が関与することに疑いの余地はないが、少なくともスリット膜分子構造に何らかの異常が生じると蛋白尿が惹起されるということが二つのエピソードにより明らかにされた。すなわち演者らが報告した抗ラットスリット膜構成分子(ネフリン)単クローン抗体一回静注によりラットに一過性ではあるが著明な蛋白尿が惹起されるという事実⁸⁾とSwedenのTryggvason一派によるフィンランド型先天性ネフローゼ症候群の責任遺伝子産物ネフリンについての報告とネフリンの

スリット膜局在の証明である⁹⁾。

3) mAb 5-1-6 による蛋白尿惹起機序

静注後抗原存在部位であるスリット膜に結合した mAb に由来する係蹄壁に沿った線状に近い蛍光抗体法 (IF) 陽性所見が数日後には顆粒状となり、またその陽性蛍光の減弱も認められた⁸⁾。標識金コロイドによる免疫電顕でも同様に当初スリット膜上に認められた結合 mAb が数日後には臓側糸球体上皮細胞(足細胞)表面尖端部(ポーマンのう腔側)にまで移動し、一部足細胞内にも証明されるようになる。このとき対応抗原(ネフリン)も同時に抗原抗体複合体として移動していることが、免疫電顕で明らかにされている¹⁰⁾。

酵素処理により得られる一価の mAb 5-1-6 Fab 分画は、ともに二価である抗体全分子または F(ab')₂ 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日後でもまるで結合直後のような典型的な線状類似パターンにとどまっていた¹¹⁾。さらに mAb 5-1-6 に対するラット系統間感受性に関して検討したところ、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が、6日後に蛋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のに対して、SD では依然線状類似パターンのままであった¹²⁾。これらのことから、二価 mAb との結合後のネフリンの局在変化、あるいは先述のごとくその発現低下の結果としてのスリット膜における量的減少ないし消失が蛋白尿の発現に至る重要な過程であると考えられた。この細胞表面上の局在変化に密接に関与するのは細胞骨格系であり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検索がなされつつあるが臨床応用可能な結果には至っていない。

著者らはラットネフリンを同定し、それが mAb 5-1-6 対応抗原であることを明らかにするとともに、蛋白尿惹起ラットモデルを用いてネフリンが先天性のみならず後天性の腎病変にも関与していることを報告した¹³⁾。

ネフリンの臨床的意義についての検索も進んでいる。ネフリンのヒト腎疾患における腎生検材料での発現動態については、従来、発現の変化なしとするものや発現低下ありとするものなど混乱が見られたが、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、臨床材料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。ネフリン以降ポドシン¹⁴⁾、CD2AP¹⁵⁾、Neph-1¹⁶⁾など相次いでスリット膜ないし足細胞関連機能分子が同定されてきており、その相互作用についての検索も精力的になされている。著者の教室からもラットポドシンの同定¹⁷⁾を始め、JAM4¹⁸⁾、SV2B¹⁹⁾など新しい関連分子が報告されている。最近ではこれら関連分子が一つの動的な機能分子群を構築して足細胞の種々の生物学的機能への情報伝達系として重要な役割を演じていることが明らかにされつつあり²⁰⁾、蛋白尿の制御に向けての新しい治療策確立の研究対象として注目されている。

実験腎炎分野において、適切なモデルの作成ならびに新しい実験動物種の開発は病因・病態の解析や予後判定と合理的な治療戦略確立のためには大変重要な課題となっている。問題点としては *in vitro* から *in vivo* へならびに実験動物からヒトへの結果の適合性の検討が挙げられる。

急速に蓄積されつつある“podocyte biology (足細胞生物学)”に関する知見に基づいて、よりの確に狙い定められた分子レベルにおける治療・予防策の確立により、腎病変の進展を阻止することが私達の最終的な目標でありこの方向への探求が続くことを期待している。上述の岡林先生の総説の最後は“時は流れ人は移ろうとも、探求の歩みには停ることはない²⁾。”と結ばれており、目的達成を新進気鋭の後進に託したい。

謝 辞

この最終講演を可能にしてくださいましたすべての方々に心から厚く御礼申し上げます。旧東大第1内科：吉利和教授、旧東大医科学研究所免疫学部門：川村明義教授、旧国立公害研究所環境生理部：久保田憲太郎部長、ドイツ Freiburg 大学 Hygiene Institut: Arnold Vogt

教授、新潟大学医学部並びに新潟腎グループをはじめ、当教室に在籍した8人の助手、7人の本教室所属大学院生、39名に及ぶ研究生と他大学・他科大学院生、15名の外国人留学生、15名の研究・事務補助員の皆様に感謝申し上げます。とりわけ追手覬現新潟大学大学院腎研究施設機能制御学分野教授、河内裕同施設分子病態学分野助教授、折笠道昭新潟大学医学部保険学科教授にはその長年にわたる多大のお力添えに対しまして深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 馬杉復三, 佐藤保雄, 竹沢貞雄, 富塚八十三: 抗腎血清による実験的糸球体腎炎に就いて. 千葉医学会雑誌 10: 782-812, 1932.
- 2) 岡林 篤: 馬杉腎炎40年—尽きせぬ免疫病理学的含意. 千葉医学 50: 73-75, 1974.
- 3) Dixon FJ: The pathogenesis of glomerulonephritis. *Am J Med* 44: 493-498, 1968.
- 4) 多田富雄: 馬杉腎炎から Immune Complex 腎炎まで. 臨床科学 10: 1464-1467, 1974.
- 5) Heymann W, Hackel DB, Harwood S, Wilson SGF and Hunter JLP: Production of nephrotoxic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions. *Proc Soc Exp Biol Med* 100: 660-664, 1959.
- 6) 柴田整一: 柴田・腎臓内科学. 文光堂, 東京 1988.
- 7) Kawachi H, Orikasa M, Matsui K, Iwanaga T, Toyabe S, Oite T and Shimizu F: Epitope-specific induction of mesangial lesions with proteinuria by a MoAb against mesangial cell surface antigen. *Clin exp Immunol* 88: 399-404, 1992.
- 8) 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.
- 9) Tryggvason K: Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 10: 2440-2445, 1999.
- 10) Fujigaki Y, Morioka T, Matsui K, Kawachi H, Orikasa M, Oite T, Shimizu F, Batsford SR and Vogt A: Structural continuity of filtration slit (slit

- diaphragm) to plasmamembrane of podocyte. *Kidney Int* 50: 54 - 62, 1996.
- 11) Narisawa M, Kawachi H, Oite T and Shimizu F: Divalency of the monoclonal antibody 5 - 1 - 6 is required for induction of proteinuria in rats. *Clin exp Immunol* 93: 522 - 526, 1993.
 - 12) Gollner D, Kawachi H, Oite T, Oka M, Nagase M and Shimizu F: Strain variation in susceptibility to the development of monoclonal antibody 5 - 1 - 6 - induced proteinuria in rats. *Clin Exp Immunol* 101: 341 - 345, 1995.
 - 13) Kawachi H, Koike H, Yaoita E, Yamamoto T, Shiz MA, Orikasa M, Salant DJ and Shimizu F: Cloning of rat nephrin: Expression in developing glomeruli and in proteinuric states. *Kidney Int* 57: 1949 - 1961, 2000.
 - 14) Roselli S, Gribouval O, Boute N, Sich M, Benessy F, Attie T, Gubler MC, Antignac C: Podocin localizes in the kidney to the slit diaphragm area. *Am J Pathol* 160: 131 - 139, 2002.
 - 15) Shih NY, Li J, Cotran R, Mundel P, Miner JH and Shaw AS: CD2AP localizes to the slit diaphragm and binds to nephrin via a novel C - terminal domain. *Am J Pathol* 159: 2303 - 2308, 2001.
 - 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) 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* 13: 46 - 56, 2003.
 - 18) Harita Y, Miyauchi N, Karasawa T, Suzuki K, Han GD, Koike H, Igarashi T, Shimizu F and Kawachi H: Altered expression of junctional adhesion molecule 4 in injured podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F335 - 344, 2006.
 - 19) Miyauchi N, Saito A, Karasawa T, Harita Y, Suzuki K, Koike H, Han GD, Shimizu F and Kawachi H: Synaptic vesicle protein 2B is expressed in podocyte, and its expression is altered in proteinuric glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 17: 2748 - 2759, 2006.
 - 20) Benzing T: Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 15: 1382 - 1391, 2004.
-