

慢性糸球体腎炎の病態関連遺伝子の探求

新潟大学医学部腎研究施設構造病理学分野

山本 格

Searching for Genes involved in Pathological
Processes of Chronic Glomerulonephritis

Tadashi YAMAMOTO

*Department of Structural Pathology,
Institute of Nephrology, Faculty of Medicine,
Niigata University**(Director: Prof. Tadashi YAMAMOTO)*

No efficient therapeutic methods or drugs have been developed for human chronic glomerulonephritis probably because the pathogens and the pathological mechanisms were not well understood. Although several candidates were proposed as possible pathogens of the disease, none of them have been confirmed to be pathogenic yet. Experimental glomerulonephritis models have been extensively studied to understand the pathological processes of the models and also human chronic glomerulonephritis. Examined chiefly was whether mechanisms shown to play crucial roles in inflammatory processes of other tissues or organs were involved or not in the experimental glomerulonephritis models. However, mechanisms or molecules involved specifically in chronic glomerulonephritis have not been elucidated by these trials. To understand the pathological processes as molecular interactions, all molecules present in the diseased glomeruli need to be clarified whether they may be already known or not. To make this possible we aimed to search for genes uniquely expressed in normal and diseased glomeruli and to interpret the pathological processes as molecular interactions and integration of gene products. Therapeutic strategies for chronic glomerulonephritis will be

Reprint requests to: Tadashi YAMAMOTO,
Department of Structural Pathology,
Institute of Nephrology, Faculty of Medicine,
Niigata University, 1-757 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510, JAPAN.

別刷請求先:

〒951-8510 新潟市旭町通り1番町 757
新潟大学医学部腎研究施設構造病理学分野
山本 格

planned through understanding the pathological processes of chronic glomerulonephritis as molecular interactions.

Key words: chronic glomerulonephritis, gene expression, gene search
慢性糸球体腎炎, 遺伝子発現, 遺伝子探索

はじめに

疾患の病因や病態を解明し、その予防法、治療法を確立することは、医学の重要な目標である。腎臓疾患のうち進行して慢性腎不全に至るいわゆる慢性腎炎はその予防法、治療法の開発が望まれている疾患の一つであるが残念ながら慢性腎炎の予防や進行を阻止できる有効な方法は現在のところ無いに等しいと言わざるをえない。

慢性腎炎とは慢性、すなわち数カ月から数年の経過で進行して腎不全にいたる疾患群の総称で、その中にはさまざまな疾患が含まれている。中でも日本で最も多い疾患は IgA 腎症と呼ばれる糸球体に IgA が特に著明に沈着し傷害がおこる糸球体腎炎である。糸球体に沈着している IgA は抗原と結合し、免疫複合体を形成し、その免疫複合体が炎症を起こしていると考えられている。その抗原を IgA 腎症の病因と推定し、IgA 腎症の糸球体に沈着している抗原を明らかにしようとする試みがこれまで多くのなされ、さまざまな抗原が報告されてきた。しかしながら、未だ明確に証明されたものはほとんど無く、さらには糸球体に沈着している IgA は免疫複合体を形成しているのではなく、IgA 分子の構造異常があるためとする研究すら報告されている¹⁾。

このような病因追求の困難さや IgA 腎症以外の糸球体腎炎や糖尿病による糸球体傷害、腎傷害も進行して腎不全になることから、それら糸球体腎炎、糸球体傷害が発症した後の病態形成や腎障害の機序を明らかにすることにより、その病態を制御し、糸球体障害の進行を抑制しようという研究も盛んに行われてきた。

1 慢性腎炎の病態解析の研究

ヒトの慢性腎炎の病態の研究はその対象となる試料の入手がそう簡単ではないことやその進行が数年に及んだりすることから困難が多い。そのため、実験動物を用いた糸球体腎炎モデルの病態の成立機序を解明し、ヒトの糸球体腎炎の病態を理解しようという研究がこれまで多く行われてきた。そのためにさまざまな糸球体腎炎モデルが開発され、その解析から、その病態形成に中心的役割を果たす機序が分子レベルで把握できるようになってき

た。実際、それらの分子の機能を制御したり、除去することで糸球体腎炎モデルの進展や糸球体障害が抑制されることも示された²⁾。しかし、このような実験動物モデルの病態成立機序の解明がヒトの糸球体腎炎の治療法に結びついたかと考えるとかなり懐疑的である。糸球体腎炎モデルのほとんどは急性炎症モデルであったこと、発症機序がヒトの慢性腎炎とはかなりかけ離れたものである可能性があったこと、そこでの解析は腎炎以外の炎症でその重要性が知られている機序や因子の関与を検討するものが多かったことなどから、必ずしもそれをヒトの特に慢性糸球体腎炎に当てはめることができなかつたことが考えられる。

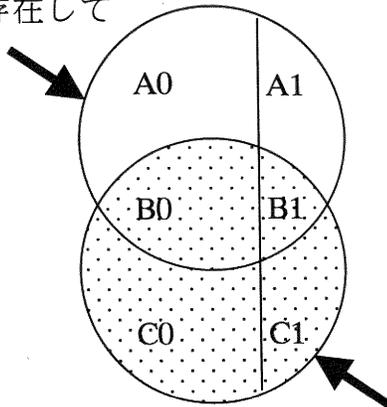
このような現状を打開するためにはこれまでのヒト慢性腎炎の研究戦略を再検討する必要があると思われる。すなわち、慢性腎炎、中でも IgA 腎症などの病因を明確にする研究を第一に推進し、その病因を究明することで、予防法、治療法の開発に結び付ける必要がある¹⁾。第二に動物モデルの解析ではなく、ヒト慢性腎炎の病態を直接解析し、そこで機能している分子を明らかにし、その病態形成の機序や因子を全体的、総合的に把握し、そこで特異的に機能している機序や因子を特定することが特異的な治療法の確立には必要であろう。そのためには既成の概念や既知の因子だけに捕われずに、未知の機序、未知の因子を含めて包括的に研究する必要がある。

2 慢性腎炎の病態形成に関与する分子群の概念

ヒト慢性糸球体腎炎、特に糸球体腎炎の病態形成が全て分子の相互作用と捕えると図1に示したような概念でその分子を把握できるであろう²⁾。ヒト慢性糸球体腎炎の病態形成に関与する分子には、一般的な炎症に関与する血漿成分や白血球成分などに由来する分子と、炎症に反応したり、傷害を受けたりする糸球体固有細胞やそれらが産生する分子がある。後者の糸球体固有の応答は、糸球体腎炎の病態形成の特異的機序と考えることができ、糸球体腎炎を特異的に制御する治療法の確立にもつながるであろう。この糸球体固有の応答の理解には正常糸球体の分子的理解も必要になる。

糸球体に特異的な分子を明らかにしようとする研究は、

正常糸球体に存在して
いる分子群



糸球体腎炎の糸球体に
存在している分子群

図1 正常および糸球体腎炎の糸球体に存在している分子群

正常糸球体に存在している分子群 ($A0 + A1 + B0 + B1$) には糸球体以外の組織と共通して存在する分子群 ($A0 + B0$) と糸球体に特異的な分子群 ($A1 + B1$) がある。そのうち、 $A0$, $A1$ は糸球体腎炎では消失する分子、 $B0$, $B1$ は糸球体腎炎でも存在する分子とする。また、糸球体腎炎の糸球体に存在している分子群 ($B0 + B1 + C0 + C1$) には正常糸球体に存在していた分子群 ($B0 + B1$) の他に新たに発現、産生された分子群 ($C0 + C1$) がある。糸球体腎炎の糸球体で新たに認められるようになった分子群にも糸球体腎炎以外の炎症に共通して存在する分子群 ($C0$) と糸球体腎炎に特異的な分子群 ($C1$) が区別される。これらの中で糸球体腎炎で特異的に消失する分子は $A1$ 、特異的に発現、産生される分子は $C1$ である。 $B1$ の中はその量が増減する分子が含まれる。

これまでは主に糸球体に特異的に反応する抗体をつくり、その対応抗原を明らかにしようという手法で行われてきた。しかし、この手法は技術的に難しい点が多かったためか成果がおおいに上がったとは言い難かった。そこで最近では分子生物学的手法を用いて糸球体に特異的に発現している遺伝子をクローニングし、その翻訳蛋白質を解析する手法が注目されている。この方法で遺伝子を先に単離すると、その塩基配列からアミノ酸配列を推定するのが容易で、さらにアミノ酸配列から合成ペプチドを作成し、それに対する抗体の作製も容易なためである。また、アミノ酸配列の類似性をもとに蛋白質の機能を推定することも可能であるなどの利点がある。

次に、糸球体腎炎の糸球体で特異的に発現している分子を明らかにし、その機能や役割を明らかにしようとする試みも可能になる。これまでの糸球体腎炎の病態解析の研究の多くは他の組織の炎症モデルで既にその関与が知られている分子が糸球体腎炎モデルの糸球体にも存在するかどうかを検討することで行われてきた。そして、

その分子の重要性はその分子を抗体などで阻害し、糸球体腎炎が抑制されるかどうかで研究されてきた。このような研究からいくつかの分子が糸球体腎炎モデルで重要な役割を演じていることが明らかにされた³⁾。しかし、それらの分子がヒト慢性腎炎でも重要な役割を演じていることが示されたものはほとんど無いのである。このことは実験的糸球体腎炎モデルの病態とヒト慢性腎炎の病態が必ずしも同じでないことや既知の分子の関与を検討するだけでは糸球体腎炎で特異的に機能している分子を捕らえることができなかったためと思われる。

糸球体腎炎でその病態形成に関与している分子には蛋白質、脂質、糖質などさまざまなものがあると想定される。それらを分離、同定し、その機能や糸球体腎炎における役割を検討することが糸球体腎炎の病態形成の理解とさらにはその制御手段の開発につながると考えられるがそれは容易でない。そこで、私どもは分子生物学的手法を用いて、糸球体で特異的に発現している分子、糸球体腎炎の糸球体で特異的に発現している分子を遺伝子と

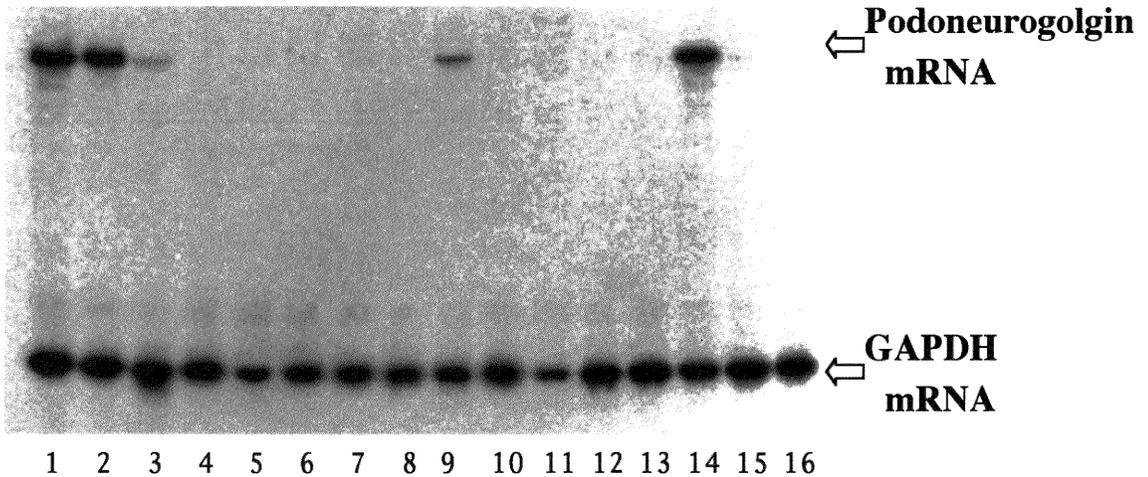


図2 Podoneurogolgin の全身臓器での mRNA 発現

Podoneurogolgin は腎糸球体と大脳, 小脳に多く発現し, 眼と肺にも明らかな発現が認められる. しかし, その他の臓器にはその発現は認められない.

1, 大脳; 2, 小脳; 3, 眼; 4, 食道; 5, 胃; 6, 小腸; 7, 大腸; 8, 心臓; 9, 肺; 10, 肝臓; 11, 脾臓; 12, 副腎; 13, 腎臓; 14, 糸球体; 15, 腎皮質; 16, 腎髄質

して単離し, それらが翻訳する蛋白質を解析し, 糸球体腎炎で特異的に病変や病態形成にかかわっている蛋白質を明らかにしようとする試みを行っているのでその研究について以下に紹介する.

3 糸球体に特異的発現している遺伝子を探索する研究⁴⁾

正常な糸球体に特異的または著明に発現している遺伝子を拾い出す目的で正常ラット糸球体から mRNA の分離し, cDNA ライブラリーを作製し, 個々の遺伝子クローンが糸球体以外の腎臓の部位, 髄質や皮質で発現していないか発現が顕著に少ない遺伝子を differential スクリーニングし, ribonuclease protection assay 法を用いて確認した. その結果, 糸球体優位に発現しているいくつかの遺伝子を得た. このうち糸球体優位に発現していることが既に報告されている IV 型コラーゲンの $\alpha 3$ 鎖や $\alpha 3$ integrin などの他に, 既知の遺伝子であるが糸球体に優位に発現していることが示されたことがない olfactomedin-related protein⁵⁾, β -COP, thymosin β_4 などとこれまで単離されていない未知の遺伝子が得られた.

これらの中から olfactomedin-related protein を例に紹介すると, このタンパク質はすでに報告されてい

た olfactomedin 蛋白質を翻訳する遺伝子とホモロジーが高く, 神経細胞に特異的な遺伝子として既にクローニングされていたが, その翻訳蛋白質の機能は不明であった. この遺伝子の全身臓器における mRNA 発現を再検討してみたところ, 大脳, 小脳などの神経組織と糸球体に強く, 肺と眼にわずかに発現していることが分かった (図 2). この遺伝子の発現している細胞を明らかにするため免疫組織化学, 免疫電子顕微鏡検索を行ったところ, この遺伝子の翻訳蛋白質は糸球体上皮細胞内のゴルジ装置の膜に一致して存在し, この細胞内局在は神経細胞でも同様であることが分かった⁶⁾.

これらの結果から, この蛋白質は糸球体上皮細胞と神経細胞で共通するゴルジ装置の特異的な機能に関係していると考えられ, 私共はこの分子を podoneurogolgin と呼ぶことを提唱し, 現在その機能を追求する研究を続けている.

4 糸球体腎炎で発現が変化している遺伝子を探索する研究⁷⁾

糸球体腎炎で発現が変化している遺伝子を拾うためにヒトの IgA 腎症などのメサンギウム増殖性糸球体腎炎に似た病変を呈するモデルであるラット Thy-1 腎炎を惹起し, その糸球体に発現し, 正常糸球体に発現が無

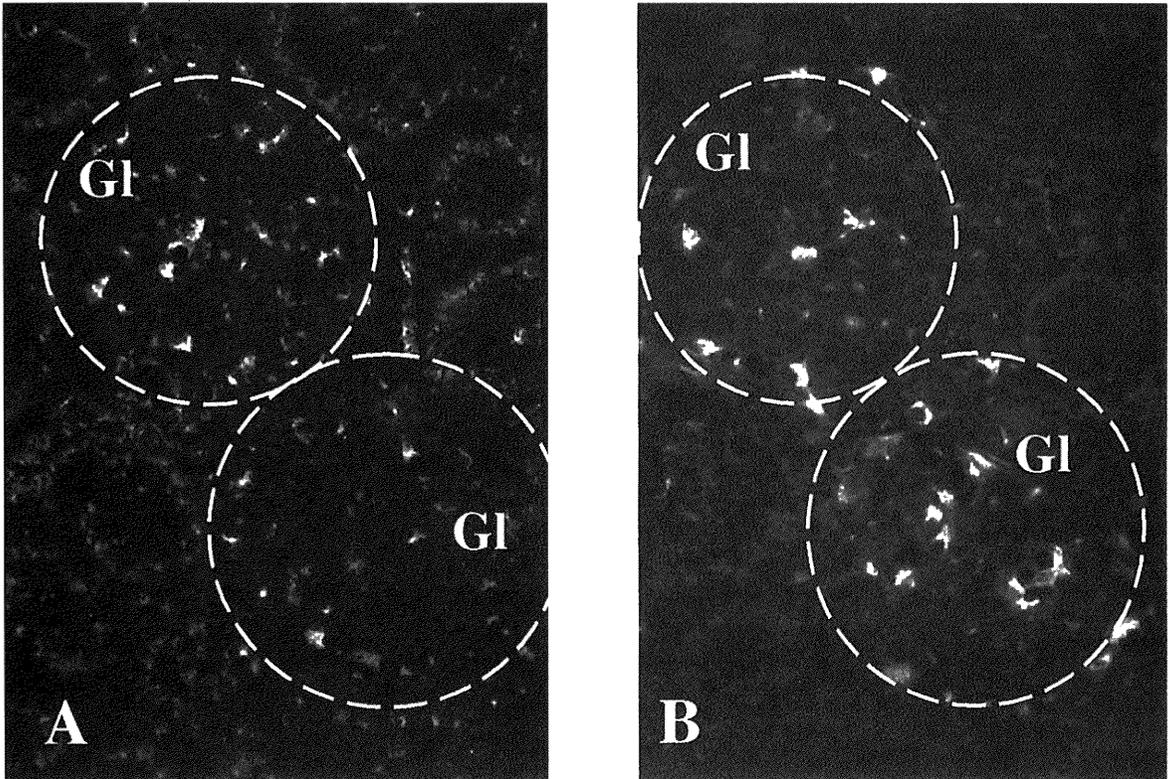


図3 免疫染色による podonurogolgin の局在

ゴルジ装置に存在することが示されている giantin (A) はさまざまな細胞のゴルジ装置に認められる。中でもゴルジ装置が大きく発達した糸球体 (G1) 上皮細胞には強く認められる。podonurogolgin (B) は糸球体上皮細胞のゴルジ装置に強く認められるが他の細胞にはほとんど認められない。

いか、乏しい遺伝子を探索した。ラットに抗 Thy-1 抗体を静脈注射すると Thy-1 抗原が特異的に細胞表面に発現している糸球体メサンギウム細胞に結合し、メサンギウム細胞を障害し、ヒトのメサンギウム増殖性糸球体腎炎に似た病変を呈する腎炎が惹起されることが知られている。われわれはこの病変の成立に mRNA の増減を介して関与している遺伝子を検出するため、differential display 法を用いた。この結果、抗 Thy-1 腎炎の糸球体でその発現が増加しているいくつかの既知、未知の遺伝子が単離された。既知の遺伝子としては vascular endothelial (VE)-cadherin, glucose-regulated protein (GRP) 78, insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) などがあつた。

これらのうち、現在解析している VE-cadherin について述べると、この蛋白は血管内皮細胞に特異的かつ

恒常的に発現している細胞間接着分子で、炎症などの際、白血球が内皮細胞間を通過するのに関与していると報告されている分子である。本モデルではメサンギウム細胞の増殖性変化に加えてマクロファージなどの細胞浸潤が著明であるが、その病変形成に糸球体内皮細胞の VE-cadherin 増加が関与していることが示唆されたことになる。すなわち、メサンギウム細胞増殖性病変の形成に糸球体内皮細胞の活性化や増殖、白血球浸潤の誘導などが関与していたと考えられる。

5 ヒト慢性糸球体腎炎の病態形成関連遺伝子の探索⁸⁾

このような実験モデルでの検討はヒト慢性糸球体腎炎の解析のための予備実験であり、現在、ヒト慢性糸球体腎炎の病態形成に関与する遺伝子の研究に着手している。

ここで最も制約をうけるのが対象試料の採取である。ヒト遺伝子解析の倫理問題のほかに糸球体で発現している遺伝子を研究対象とする場合、糸球体を単離し、そこに存在する mRNA がかなりの量必要になるので、それを収集することの困難さである。その収集は腎生検などの少ない試料で行うことはほとんど困難なため、私たちは腎腫瘍などで摘出せざるを得なかった腎臓の腫瘍以外の部分を検索し、そこに気付かれていなかった腎病変、特に糸球体疾患の有無を検索し、そのような不顕性病変のある糸球体と正常糸球体試料を研究対象にして収集している。

また、病変糸球体と正常糸球体での遺伝子発現の差異を検討する方法として DNA チップを用いる手法や蛋白発現からみた差異の検討を現在進めている。約 3.5 万個と推定されている全遺伝子の発現が疾患組織でどのようなになっているかを調べる手段として、同時に何万個という多数の遺伝子の発現変化を検出できる DNA チップ法は魅力的である。ヒト糸球体腎炎と正常糸球体での全遺伝子発現を比較でき、病変、病態形成に関与する遺伝子を検出することが容易となってきたのである。十分な組織試料、RNA が得られればヒト糸球体腎炎の病態解析がこの方法で飛躍的に進むことは間違いない。その中で、各種糸球体疾患ごとに病態関連遺伝子がグループ分けされ、それぞれの病態が全体像として見えてくるであろう。

6 病態形成関連遺伝子の探索の現状

ヒトゲノム計画はヒトの全ゲノムの塩基配列を決定し、その遺伝情報を全て解読する目的で 1988 年に開始された。当初はその完成は 2005 年頃といわれていたが、解析が加速度的に進行し、2000 年中にほとんど終了してしまったとも伝えられている。また、ゲノムの塩基配列の解析と並行してその機能解析も行われているが、全遺伝子やその産物である蛋白質の機能の解明にはまだ長い年月を要すると考えられる。

これからの医学、医療では、疾患の病態を全ての遺伝子の mRNA や蛋白質の発現パターンとして把握できたり、個々のヒトの遺伝子を解析することにより、そのヒトの疾患感受性や薬剤感受性が把握できるようになると思われる。そして、遺伝子解析の次にはそれから作られる蛋白質の解析の重要性が分かっている。遺伝子解析では作られる蛋白質の量などが必ずしも推定できないことや、さらには、蛋白質が機能する際には活性化されたり、修飾されたり、分解されたりすることが必要である。

おわりに

腎障害関連遺伝子のクローニングについて、私どもの研究結果および最近の知見について紹介した。このような研究は未知の遺伝子を含め、さまざまな遺伝子が関連遺伝子として捉えられるが、それら遺伝子の機能を解明し、全体の病態を把握するには多くの時間が必要と思われる。病態形成が分子ネットワークとして把握されれば、どの分子がその中心的役割を果たすのかを見極めることも可能となる。さらには蛋白質だけでなく、それから作られる糖質や脂質、あるいは体外から取り込まれた分子やそれらが修飾されたり、活性化されたりすることが重要である可能性も考えなければならない。これらを念頭におき、糸球体腎炎の病態解析の研究を進めていくことが必要と思われる。

参考文献

- 1) 上家潤一, 山本 格: IgA 腎症の病因をめぐって. *Medical Practice* 17: 1904, 2000.
- 2) 山本 格, 佐藤暢夫: 腎障害関連遺伝子のクローニング. *Bio Clinica* 15: 39~43, 2000.
- 3) 山本 格: 糸球体腎炎とサイトカイン. 現代病理学大系(補遺3) 東京, 中山書店, 1996, 77-83.
- 4) 磯目正人, 山本 格: 糸球体特異遺伝子/糸球体傷害遺伝子. *腎と透析* 45: 525~529, 1998.
- 5) Danielson, P.E., Forss-Petter, S., Batternberg, E.L.F., deLecea, L., Bloom, F.E. and Sutcliffe, J.G.: Four structurally distinct neuron-specific olfactomedin-related glycoproteins produced by differential promoter utilization and alternative mRNA splicing from a single gene. *J. Neurosci. Res.* 38: 454~461, 1994.
- 6) Kondo, D., Yamamoto, T., Yaoita, E., Danielson, P.E., Kobayashi, H., Ohshiro, K., Funaki, H., Koyama, Y., Fujinaka, H., Kawasaki, K., Sutcliffe, J.G., Arakawa, M. and Kihara, I.: Localization of olfactomedin-related glycoprotein isoform (BMZ) in the Golgi apparatus of glomerular podocytes in rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11: 803~813, 2000.
- 7) 山本 格: 遺伝子クローニングによる腎疾患の解明. *医学のあゆみ* 193: 81~86, 2000.
- 8) 山本 格: 糸球体硬化促進因子. *腎と透析* 48: 97~102, 2000.