

腎糸球体のバリア機構の解明：蛋白尿に対する 新規治療標的の探索

福住好恭

新潟大学大学院医歯学総合研究科
附属腎研究センター腎分子病態学分野

Elucidation of the Glomerular Barrier Function: Exploration of
novel therapeutic targets for proteinuria

Yoshiyasu FUKSUMI

*Department of Cell Biology, Kidney Research Center, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences*

要 旨

多くの糸球体疾患における蛋白尿は、腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）の細胞間接着装置であるスリット膜のバリア機能の低下により発症することが明らかになっている。我々は遺伝子改変マウスを用いた解析等から、シナプス小胞分子 SV2B がスリット膜の形成、機能維持に関与していることを明らかにした。シナプス小胞様輸送機構がポドサイトスリット膜のバリア機能に重要な役割を果たしていることが示され、シナプス小胞輸送関連分子が蛋白尿に対する新たな治療のターゲットとなることが考えられる。

キーワード：ポドサイト、スリット膜、シナプス小胞、SV2B、蛋白尿

はじめに

慢性腎不全による血液透析患者数は 30 万人を超え、またその予備軍と考えられている慢性腎臓病（chronic kidney disease: CKD）患者数は、

1,300 万人（日本人全人口の 8 人に 1 人）と報告されている。腎不全に至る原疾患として重要なのは慢性糸球体腎炎、糖尿病性腎症などの糸球体疾患である。蛋白尿は、糸球体の障害を示す重要な指標で、高度な蛋白尿による低蛋白血症は様々な

Reprint requests to: Yoshiyasu FUKSUMI
Department of Cell Biology, Kidney Research
Center, 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
附属腎研究センター腎分子病態学分野 福住好恭

病態を引き起こす。また、尿細管は、糸球体のバリアから漏出した血漿蛋白を再吸収しようとするにより、過重な負荷、傷害を受けるため、蛋白尿自体が尿細管障害を誘導し、腎不全へと進行させる悪化因子であると考えられている。

最近の疫学研究により、蛋白尿陽性者の心・脳血管イベントの発症率は陰性者の約3倍と報告されている。蛋白尿は心・脳血管疾患においても極めて重要な危険因子であることが明らかになり、蛋白尿を抑制、改善することができれば、腎不全への進行を遅らせるだけでなく、心・脳血管イベントの発症率を抑えることができる。このように、蛋白尿を改善するための新規治療法開発に向けた研究は喫緊の課題である。

腎糸球体毛細血管壁のバリア構造

腎糸球体の毛細血管壁は、内側から内皮細胞、糸球体基底膜、糸球体上皮細胞(ポドサイト)から形成されており、血漿蛋白が原尿中へ漏出するのを防ぐバリアとしての機能を果たしている。バリアの最外層に位置するポドサイトは細胞核を中心とした細胞体から太い一次突起が伸び、そこから多数の細い足突起が伸び出している。足突起は、同じ細胞体から出た突起同士で絡み合うことはなく、常に別の細胞由来の突起が隣り合う形で絡み合っており、基底膜の外側を覆っている。足突起間にはスリット膜と呼ばれる極めて高度に分化した細胞間接着装置が存在し、糸球体の形態と血漿蛋白の透過を防ぐバリア機能の維持に役割をはたしている。

スリット膜構成分子

これらの構造物で糸球体濾過障壁を形成しているが、「血漿蛋白が通過するのを防ぐメインバリアはどこか?」ということについて、1960年代から今日に至るまで多くの議論がある。筆者らのグループは1980年代からスリット膜の重要性を示す所見を報告してきたが、当時、スリット膜の重要性を強調するグループは少数で、基底膜がメイン

バリアであるとする考え方が一般的であった¹⁾²⁾。しかし、1998年にフィンランド型先天性ネフローゼ症候群の原因遺伝子が、スリット膜を構成する分子であることが明らかになり³⁾、スリット膜がバリアとして重要な働きをしているとする考えが広く受け入れられるようになった。この分子はNephrinと名付けられ、現在スリット膜の最も重要な機能分子の一つであると考えられている。

Nephrinが同定された2年後には常染色体劣性の遺伝形式をもつ家族性ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の原因遺伝子(NPHS2)が同定され、その遺伝子産物であるPodocinも、スリット膜部に存在していることが明らかになった⁴⁾。また、ノックアウトマウスでの検討で、Nephrinの基部の細胞質部に局在するCD2-associated protein(CD2AP)⁵⁾、Nephrinと同様にスリット膜の細胞外部を構成しているNEPH1⁶⁾がスリット膜の機能維持に関わる分子であることが明らかになった。しかし、スリット膜の分子構造の詳細は未だ未解明である。また、スリット膜の形成、維持の分子機構は、まだほとんど分かっていないというのが現状である。

著者らのグループでは、蛋白尿発症機序に関与する分子を同定するため、cDNAサブトラクション法や次世代シーケンサを用いて、正常と各種病態モデル糸球体における発現解析を行ってきた。一連の検討で得られたポドサイト(スリット膜)機能分子として、細胞膜分子であるEphrin-B1⁷⁾、細胞間接着装置関連分子であるJAM4⁸⁾、ケモカインとその受容体⁹⁾、そしてシナプス関連分子¹⁰⁾¹¹⁾を同定した。

シナプス形成分子 Neurexin

著者らのグループは、Neurexinがラットとヒトのポドサイトで発現していることを報告した¹¹⁾。Neurexinは当初クロゴケグモの毒成分である α -latrotoxinの受容体として単離されたタンパク質であり、シナプス前部の膜表面に局在し、シナプス後部を誘導することが明らかになっている¹²⁾。Neurexinはシナプス小胞輸送関連分子である

Synaptotagmin と相互作用し、シナプス小胞のドッキングと開口に関与している¹³⁾。Neurexin はカルシウム/カルモジュリン依存性セリンタンパク質キナーゼである CASK と結合する¹⁴⁾。CASK は Nephrin と結合することが報告されており¹⁵⁾、CASK もまたスリット膜の構成分子として受け入れられている。

著者らは Neurexin が腎糸球体で発現し、免疫蛍光染色法と免疫沈降法による解析から Neurexin は CD2AP と共局在し、相互作用することを報告した¹¹⁾¹⁶⁾。また、種々のネフローゼ症候群発症モデル動物において、Nephrin よりも早く Neurexin の発現が変動することを明らかにした¹¹⁾。これらの研究から、Neurexin はスリット膜の機能を制御する重要な分子の1つであると考えている。

シナプス小胞分子 SV2B

Synaptic vesicle protein 2 (SV 2) は、膜貫通型シナプス小胞蛋白質であり、シナプス間隙において神経伝達物質の放出と小胞輸送に関与している

17)–19)。SV2 は主に神経組織で発現しているときされてきたが、近年、いくつかの組織でも発現が報告されている²⁰⁾²¹⁾。SV2 のアイソフォームの1つである SV2B は松果体細胞の微小胞での発現が観察されている²⁰⁾。松果体細胞とポドサイトは突起を有しており、SV2B が突起の先端への細胞内輸送に関与することが示唆された。

これまでに著者らのグループでは、SV2B が、糸球体においてスリット膜近傍に局在していること、スリット膜障害により発症する病態モデルにおいて、蛋白尿発症以前に SV2B 発現が著明に低下すること、SV2B 発現のノックダウン法 (siRNA 法) を処理した培養細胞において、スリット膜構成分子の1つである CD2AP がその正常な局在部位である突起部には認められず、細胞質部に散在していることを報告した¹⁰⁾。以上の結果は、SV2B がスリット膜構成分子 CD2AP のスリット膜への細胞内輸送に重要な役割を果たしていることを示した。

ポドサイト機能維持における SV2B 発現シナプス小胞様小胞の役割を解明するため、著者らは

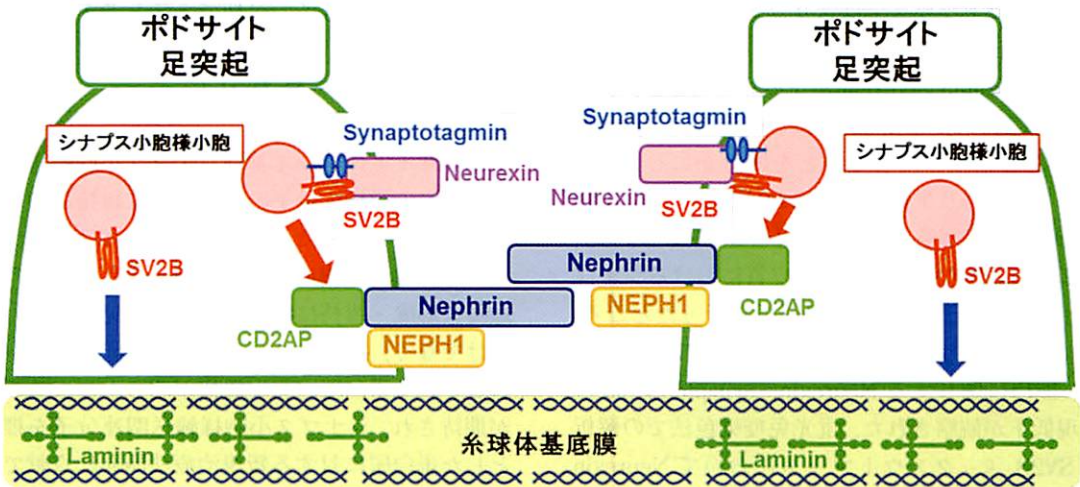


図1 ポドサイトスリット膜の形成、維持における SV2B の役割

SV2B はポドサイトのシナプス小胞様小胞における Synaptotagmin の発現を制御している。SV2B と Synaptotagmin 複合体はスリット膜で Neurexin と相互作用している。SV2B/Synaptotagmin/Neurexin 複合体はスリット膜構成分子 Nephrin, NEPH1, CD2AP の正常局在を制御することにより、スリット膜の形成と維持に関与している。また SV2B は糸球体基底膜の Laminin のエキソサイトーシスにも関与している。

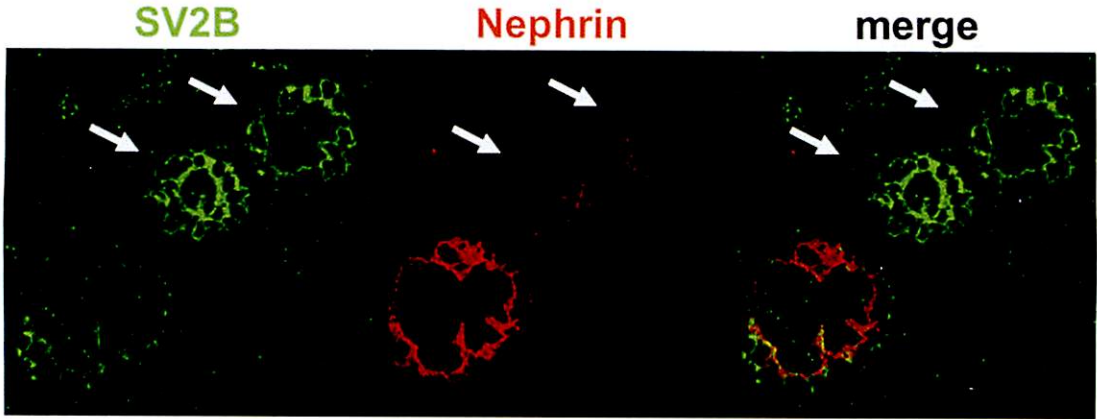


図2 発達期糸球体におけるSV2Bの発現

SV2Bは初期の糸球体発生時(S-shaped body)の未成熟なポドサイトの細胞表面に強い発現が観察された(矢印)。ポドサイトにおけるSV2Bの発現は、スリット膜構成分子Nephtrinの発現より早期であった。

SV2B ノックアウトマウスの解析を行った。SV2B ノックアウトマウスを用いた検討で、ノックアウトマウスは有意な蛋白尿を呈し、電子顕微鏡所見ではポドサイト足突起の消失と糸球体基底膜の肥厚が観察された。免疫蛍光染色法による解析で、ノックアウトマウスではスリット膜構成分子であるNephtrin, NEPH1, CD2APと基底膜構成分子であるLamininの局在異常を観察した。また、免疫沈降法による解析で、SV2BはNephtrin, CD2APと相互作用することを明らかにした。スリット膜のバリア機能維持におけるシナプス小胞様輸送関連分子の役割を明らかにするため、SV2B ノックアウトマウス腎皮質におけるシナプス小胞輸送関連分子の発現解析を行ったところ、前シナプスにおいてシナプス小胞とのドッキング、開口に関与するNeurexin, Synaptotagminの発現低下が観察された。蛍光免疫染色法での解析でSV2B ノックアウトマウスにおいてNeurexinの染色性の低下が観察され、SV2Bは前シナプス蛋白質であるNeurexinを介してスリット膜構成分子の発現、細胞内輸送に関与していることが示され、シナプス小胞様輸送機構がポドサイト、スリット膜の機能維持に重要な役割を果たしていることが示された(図1)。また、SV2Bは初期の糸

球体発生時の未成熟なポドサイトの細胞表面上に強い発現を観察しており(図2)、SV2Bは、糸球体濾過障壁の形成と維持に極めて重要な役割を果たしていると考えている¹⁶⁾。SV2B並びにシナプス小胞様輸送関連分子は、ネフローゼ症候群の新規治療法の標的分子の候補であると考えている。

おわりに

ポドサイトにおいて神経シナプス小胞輸送分子がスリット膜構成分子の輸送と局在維持に関与することを明らかにした。ポドサイトにおけるシナプス小胞様輸送機構の解析により、スリット膜の濾過障壁形成・維持に関する新しい知見が得られるだけでなく、糸球体のバリア機能が低下して引き起こされる蛋白尿の発症機構が明らかになることが期待され、シナプス小胞様輸送関連分子を標的とした蛋白尿に対する新規治療法開発に貢献できると考えられる。

文献

- 1) Oriyasa M, Matsui K, Oite T and Shimizu F: Massive proteinuria induced in rats by a single

- intravenous injection of a monoclonal antibody. *Journal of immunology*, 141: 807 - 814, 1988.
- 2) Kawachi H, Matsui K, Orikasa M, Morioka T, Oite T and Shimizu F: Quantitative studies of monoclonal antibody 5 - 1 - 6 - induced proteinuric state in rats. *Clinical and experimental immunology*, 87: 215 - 219, 1992.
 - 3) 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. *Molecular cell*, 1: 575 - 582, 1998.
 - 4) 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. *Nature genetics*, 24: 349 - 354, 2000.
 - 5) 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.
 - 6) 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. *Molecular and cellular biology*, 21: 4829 - 4836, 2001.
 - 7) Hashimoto T, Karasawa T, Saito A, Miyauchi N, Han GD, Hayasaka K, Shimizu F and Kawachi H: Ephrin - B1 localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocyte. *Kidney international*, 72: 954 - 964, 2007.
 - 8) 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. *American journal of physiology Renal physiology*, 290: F335 - 344, 2006.
 - 9) Han GD, Suzuki K, Koike H, Suzuki K, Yoneyama H, Narumi S, Shimizu F and Kawachi H: IFN - inducible protein - 10 plays a pivotal role in maintaining slit - diaphragm function by regulating podocyte cell - cycle balance. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17: 442 - 453, 2006.
 - 10) 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. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17: 2748 - 2759, 2006.
 - 11) Saito A, Miyauchi N, Hashimoto T, Karasawa T, Han GD, Kayaba M, Sumi T, Tomita M, Ikezumi Y, Suzuki K, Koitabashi Y, Shimizu F and Kawachi H: Neurexin - 1, a presynaptic adhesion molecule, localizes at the slit diaphragm of the glomerular podocytes in kidneys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300: R340 - 348, 2011.
 - 12) Ushkaryov YA, Petrenko AG, Geppert M and Sudhof TC: Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha - latrotoxin receptor and laminin. *Science*, 257: 50 - 56, 1992.
 - 13) Hata Y, Davletov B, Petrenko AG, Jahn R and Sudhof TC: Interaction of synaptotagmin with the cytoplasmic domains of neurexins. *Neuron*, 10: 307 - 315, 1993.
 - 14) Hata Y, Butz S and Sudhof TC: CASK: a novel dlg/PSD95 homolog with an N - terminal calmodulin - dependent protein kinase domain identified by interaction with neurexins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16: 2488 - 2494, 1996.
 - 15) Lehtonen S, Lehtonen E, Kudlicka K, Holthofer H and Farquhar MG: Nephrin forms a complex with adherens junction proteins and CASK in podocytes and in Madin - Darby canine kidney cells expressing nephrin. *The American journal of pathology*, 165: 923 - 936, 2004.

- 16) Fukusumi Y, Wakamatsu A, Takashima N, Hasegawa E, Miyauchi N, Tomita M and Kawachi H: SV2B is essential for the integrity of the glomerular filtration barrier. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 95: 534 - 545, 2015.
 - 17) Janz R, Goda Y, Geppert M, Missler M and Sudhof TC: SV2A and SV2B function as redundant Ca^{2+} regulators in neurotransmitter release. *Neuron*, 24: 1003 - 1016, 1999.
 - 18) Lazzell DR, Belizaire R, Thakur P, Sherry DM and Janz R: SV2B regulates synaptotagmin 1 by direct interaction. *The Journal of biological chemistry*, 279: 52124 - 52131, 2004.
 - 19) Schivell AE, Batchelor RH and Bajjalieh SM: Isoform - specific, calcium - regulated interaction of the synaptic vesicle proteins SV2 and synaptotagmin. *The Journal of biological chemistry*, 271: 27770 - 27775, 1996.
 - 20) Hayashi M, Yamamoto A, Yatsushiro S, Yamada H, Futai M, Yamaguchi A and Moriyama Y: Synaptic vesicle protein SV2B, but not SV2A, is predominantly expressed and associated with microvesicles in rat pinealocytes. *J Neurochem*, 71: 356 - 365, 1998.
 - 21) Wang MM, Janz R, Belizaire R, Frishman LJ and Sherry DM: Differential distribution and developmental expression of synaptic vesicle protein 2 isoforms in the mouse retina. *The Journal of comparative neurology*, 460: 106 - 122, 2003.
-