蛋白尿発症機序解明に向けた研究の流れと今後の展望 —糸球体上皮細胞におけるシグナル伝達系の役割—

張田 豊^{*1*2}

(受付日：平成19年 8 月29日)

採用日：平成19年 9 月 3 日)

要 旨

糸球体性蛋白尿は糸球体基底膜と糸球体上皮細胞のフィルター作用が破綻することにより生じる。近年、糸球体上皮細胞間のスリット膜の構造が明らかにされ、この細胞接着構造によるサイズバリア機能の解明が急速に進んでいる。中でもスリット膜のリン酸化やカルシウムシグナルなど、糸球体上皮細胞での細胞内シグナル伝達系の変化が蛋白尿の発症と深く関連していることが次々と明らかになってきた。蛋白尿の発症機序を分子レベルで明らかにし、ターゲットを絞った治療法の開発が急がれる。

はじめに

蛋白尿が腎疾患において診断的意味を持つだけでなく、そのものが腎組織にとって傷害因子であることは広く認められている。蛋白尿の発症機序の解明は腎臓病学において最も大きな命題の一つであり、古くから研究が盛んな分野であるが、未だに決定的な原因の解明には至っていない。私たちは糸球体上皮細胞のシグナル伝達系の観点からこの分野の研究を始めており、これらの若干のデータを含めたこの領域での最近の知見について紹

^{*1}東京大学医科学研究所細胞ゲノム動態解析寄付研究部門
(ビー・エム・エル)

(〒108-8639 東京都港区白金台4-6-1)

^{*2}東京大学小児科

The Mechanisms of proteinuria

—The role of signaling in podocytes—

Yutaka Harita^{*1*2}

^{*1} Division of Cellular Proteomics (BML), Institute of Medical Science, The University of Tokyo

^{*2} Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo

介し、同時に蛋白尿研究の流れと今後の展望について概説する。

蛋白尿—糸球体基底膜と糸球体上皮細胞の役割

半世紀以上前に電子顕微鏡レベルでの糸球体の構造が明らかになって以来、糸球体における限外濾過の本質を担っている構造が何か、という問題に多くの研究者が取り組んできた。糸球体係蹄壁は、i) 糸球体内皮細胞、ii) 糸球体基底膜、そしてそれを取り巻く、iii) 糸球体上皮細胞の三層の構造からなっているが、糸球体内皮細胞は小孔 (fenestration) と呼ばれる直径50~100nmという巨大な孔構造をもつため、血球成分が直接フィルターと接触しないようにする役割は持っているものの、限外濾過には直接関与していないと考えられている。1960年代にはアルブミンよりも分子量の大きなフェリチンやデキストランなど投与するトレーサー実験が盛んに行われ、これらの分子が基底膜の内層においてブロックされており、基底膜外層および上皮細胞には到達しないことから、糸球体基底膜が限外濾過における主要な役割を占めていると考えられていた¹⁾。1970年代にKarnovskyらが電子顕微鏡でスリット膜がジッパー状の構造をとっていること、また、ある種のトレーサー (カタラーゼ, HRP) を使用した実験ではスリット膜がそのフィルターとして働いていることを発表した²⁾が、同時にこれらの実験方法などについて疑問視する意見もあり、また、十分な追試実験の報告がなく、基底膜説を覆すには至らなかった。1970~1980年代には糸球体基底膜の成分が解明され、特に基底膜における強く陰性に荷電した分子 (ヘパラン硫酸プロテオグリカン)³⁾や糸球体

Key words : 蛋白尿

糸球体上皮細胞

スリット膜

細胞内シグナル伝達

表 先天性ネフローゼ症候群／家族性巣状分節性糸球体硬化症の疾患遺伝子

蛋白	遺伝子座	遺伝子	遺伝形式	OMIM	腎組織	特徴	糸球体上皮細胞での役割
Nephrin	19q13.1	NPHS 1	AR	602716	FSGS/MSNS	先天性ネフローゼ症候群	スリット膜成分
Podocin	1 q25-31	NPHS 2	AR	604766	FSGS/MSNS	小児期発症ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群	スリット膜成分
Phospholipase C, ϵ 1	10q23-24	NPHS 3, PLCE 1	AR	608414	DMS/FSGS	小児期発症 (可逆性?) ネフローゼ症候群	?
Laminin β 2	3 p21	LAMB 2	AR	609049	DMS/FSGS	Pierson 症候群	基底膜成分
α -actinin-4	19q13	ACTN 4	AD	604638	FSGS	成人発症 FSGS	足突起—細胞骨格
TRPC 6	11q21-22	TRPC 6	AD	603652	FSGS	成人発症 FSGS	スリット膜成分
CD 2 AP	6 p12	CD 2 AP	AD	604241	FSGS	成人発症 FSGS	スリット膜成分
WT 1	11p13	WT 1	孤発性/AD	194080	DMS	Denys-Drash 症候群	転写因子
				136680	FSGS	Fraiser 症候群	
LMX 1 B	9 q34.1	LMX 1 B	AD	161200	FSGS	Nail-Patella 症候群	転写因子

AR: 常染色体劣性遺伝, AD: 常染色体優性遺伝, MCNS: 微小変異型, DMS: びまん性メサンギウム硬化症, FSGS: 巣状分節性糸球体硬化症

上皮細胞の細胞表面に存在する陰性荷電した膜蛋白質（後に podocalyxin と同定されている）の存在が明らかとなり、これらが形成するチャージバリアが陰性に荷電したアルブミン等の高分子の物質を尿中に漏出するのを防止していると考えられるようになった。しかし、次項に述べる通り1990年台後半から、先天性ネフローゼ症候群あるいは家族性巣状分節性糸球体硬化症の原因遺伝子の同定が相次ぎ、これらのほとんどが糸球体上皮細胞のスリット膜、あるいは足突起の構造蛋白質であり（表）、さらにスリット膜の詳細な分子構造が明らかとなった結果、蛋白尿発症機序の焦点は糸球体上皮細胞、さらにスリット膜によるサイズバリアに大幅に転換している⁴⁾。現在においても糸球体基底膜の濾過機構、あるいはチャージバリアの存在は否定されるものではないが、現状では基底膜と糸球体上皮細胞がそれぞれどのような働きを持っているのか、そしていかに協調して濾過障壁を形成しているのかについては情報が極めて乏しい。

スリット膜の分子構造

スリット膜は糸球体上皮細胞の足突起間に形成される幅約40nmの細胞間接着装置である。1998年に Tryggvason らがフィンランド型先天性ネフローゼ症候群において Nephrin 遺伝子 (NPHS 1) の変異を見だし⁵⁾、また、スリット膜を構成する膜蛋白質であることが明らかになった。Nephrin は、免疫グロブリンファミリーに属する膜蛋白質であり、細胞間接着装置として機能している。近年、高解像度の電子顕微鏡トモグラフィを用いて、このスリット膜が実際にとっている孔状のフィルター構造の詳細な解析が行われた。Wartiowaara らは、Nephrin の細胞外領域を認識する金標識した抗体を用いて、標識された約35nmの鎖状の構造が足突起から生じており、それがスリット膜構造の中央で接している構造をとっていること、さらに Nephrin 鎖の間にアルブミン径より若干小さい孔構造が形成されることを示し、Nephrin によるスリット膜のサイズバリアを構造上証明した⁶⁾。そのほかにも Nephrin, Podocin, FAT 1, CD 2 AP, TRPC 6 などが Nephrin と結合、あるいは近傍に位置し、スリット膜複合体を構成していることなど、スリット膜構造の詳細な分子構造が明らかとなった（図）。とくに Podocin の変異では家族性ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群、 α -actinin-4では成人発症の常染色体優性巣状分節性糸球体硬化症、WT 1はびまん性メサンギウム硬化症 (DMS) などを引き起こすことが報告され、これらの分子群がいずれも糸球体濾過にとって欠かせない構成成分であることが明らかとなっ

図

ている⁷⁾。

糸球体上皮細胞におけるシグナル伝達系

1. シグナル複合体としてのスリット膜

近年、Nephrin, Podocin などから形成されるスリット膜が、単なる接着構造としてのみでなく、多くのシグナル分子と細胞内で結合することで糸球体上皮細胞の形態、分化、生存などさまざまな機能を修飾していることが明らかになってきた⁸⁾。

複数のグループにより Nephrin にアクチンを制御する蛋白質群 (IQ motif-containing GTPase activating protein 1 (IQGAP1), α -actinin, membrane-associated guanylate cyclase inverted-1/2 (MAGI-1/2), calcium/calmodulin-dependent serin protein kinase (CASK)) が結合することが報告されており、Nephrin の下流で糸球体上皮細胞特有の微細なアクチン骨格構造が直接制御されている可能性が示されている。

また、Nephrin の結合蛋白質としてはほかに PI3 キナーゼの p85 があり、その下流でセリン/スレオニンキナーゼの Akt が活性化されることで、アポトーシスからの回避を促すと報告されている⁹⁾。実際、Nephrin が変異した糸球体上皮細胞ではアポトーシスの割合の上昇が見られる。糸球体上皮細胞数の減少 (podocyteopenia) は直接糸球体硬化症の原因になることがし

られているため、この Nephrin の下流の抗アポトーシスシグナルと糸球体硬化症との関連、その治療応用などが注目されている。その後、CD2AP が Nephrin や Podocin と結合し、Nephrin と協調してやはり PI3 キナーゼ、Akt の活性を制御すること、この分子が同様のキナーゼ経路を介して TGF- β シグナルによるアポトーシスから回避する作用を持つことが報告され、スリット膜シグナルの糸球体上皮細胞機能全体への影響が示唆されている。

2. スリット膜複合体のチロシンリン酸化 (図)

上皮細胞間に形成される tight junction などの細胞接着分子はさまざまな刺激により修飾を受け、透過性を変化させることが広く知られている。これには転写の段階での制御により蛋白の発現が減少することも一つであるが、もう一つの機序として転写後の修飾、特にリン酸化を受けることにより junction を介した透過性を短時間に変化させる機序が知られている。例えば、tight junction を形成する分子のうち最も重要な分子の一つである occludin はリン酸化により細胞内での局在を変化させることで、全体の蛋白質量を変化させることなく瞬時に透過性を低下させる¹⁰⁾。このような接着分子のリン酸化による修飾が糸球体でのバリア機能にも影響を与えているのではないかということを示唆する報告が90年代よりあり、これまでに ZO-1, Nephrin のリン酸化が報告されてきた。

(i) ZO-1 のチロシンリン酸化

スリット膜の構成成分のチロシンリン酸化は1995年に栗原らにより初めて報告された。分子量225kDa, 180kDa, 100kDa の蛋白質が糸球体上皮細胞傷害モデルであるプロタミン還流ラットモデルにおいて特異的にチロシンリン酸化をうけ、このうち225kDa の蛋白質は ZO-1 と同定された¹¹⁾。この結果は糸球体上皮細胞の形態の急速な変化 (足突起の癒合、新たな tight junction の形成) に伴ってスリット膜複合体がリン酸化を受けることを初めて報告した画期的なものであった。後に MDCK などの培養細胞をもちいた実験により ZO-1 のチロシンリン酸化が接着構造のリモデリングに関与し、透過性を亢進させることも知られるようになっていく。

(ii) Nephrin のチロシンリン酸化—Src ファミリーチロシンキナーゼの役割

Src ファミリーチロシンキナーゼはラウス肉腫ウィルスの発見を契機に単離されたキナーゼであり、多くの癌細胞でその活性が増加していることにとどまらず、その働きがT細胞受容体シグナル、増殖因子受容体シグナル、さらにシナプスの可塑性などの制御においても欠か

せない役割を担っている¹²⁾。

近年, Neph1 がこの Src ファミリーチロシンキナーゼ (Src, Fyn, Yes) によりチロシンリン酸化を受けるということが明らかになった。HEK293細胞に発現させた Neph1 をその細胞外領域に対する抗体でクロスリンクすることにより Neph1 が Src ファミリーチロシンキナーゼによりリン酸化され、また、Neph1 が Fyn と結合し、Fyn により直接 Neph1 がリン酸化を受ける⁷⁾。興味深いことに Fyn および Yes のノックアウトマウスでは部分的ではあるものの足突起の癒合 (effacement) がみられるため、糸球体上皮細胞の特徴的な細胞骨格の形成や維持に Src ファミリーキナーゼが大きな役割を果たしていることが示唆されている。

さらに、リン酸化した Neph1 にアダプター蛋白質の Nck が結合し、これにより Neph1 直下のアクチンの重合が促進されることから Neph1 のリン酸化が糸球体上皮細胞の特徴的な足突起のアクチン細胞骨格系を制御している可能性が示唆されている¹³⁾¹⁴⁾。実際に発達時および糸球体上皮細胞傷害モデル (ラットプロタミン還流モデル) において Neph1 がリン酸化されており、足突起の形態形成と Neph1 のリン酸化が *in vivo* で関連することも示されている。これらの結果から傷害を受けた足突起の癒合した上皮細胞や、発達腎における足突起の形成段階にある上皮細胞がアクチン構造を再構成する際に Neph1 のリン酸化による Nck のスリット膜へのリクルートが必要なのではないかと議論されている。

私達も Neph1 のリン酸化の生理学的／病理学的な意味を解明するためにリン酸化 Neph1 に特異的に結合する蛋白質を Nck を含めて複数同定した (投稿準備中)。今後これら解析により Neph1 のリン酸化が持つさまざまな働きが明らかになると期待している。

(iii) Neph1 のチロシンリン酸化とその意義

また、私達は Neph1 も Neph1 や ZO-1 と同様にリン酸化を受けるのではないかと仮定し、ラットプロタミン還流モデルの単離糸球体での Neph1 のリン酸化を調べた。その結果、Neph1 がこのモデルでチロシンリン酸化を受けていることが明らかになったため、Neph1 のチロシンリン酸化についてより詳細な検討を行った。まず、Neph1 は Neph1 同様 Fyn によりリン酸化を受け、さらに Neph1 と Fyn が Neph1 のリン酸化依存的に結合することを明らかにした。Neph1 には細胞内領域に20ものチロシン残基が存在するが、このうちどのチロシンがリン酸化されるかを調べるため、質量分析器を用いた解析を行い、リン酸化を受けるチロシン残基を複数同定した。リン酸化 Neph1 をもちいた pull-down

アッセイの結果、Neph1 の Y637, Y638 のリン酸化に伴ってアダプター蛋白質の Grb2 が Neph1 に結合した。Grb2 は ERK の上流でシグナル伝達に関与することが報告されているため、Neph1 と ERK の活性化について検討したところ、培養細胞内で Neph1 が Fyn による ERK の活性化を抑制する作用を持つことを見だし、さらにこの作用が Neph1 の Y637, Y638 のリン酸化に依存することから、これらのチロシン残基のリン酸化が Grb2 の結合を介して ERK に対して抑制的に作用すると考えられた。さらに Y637 のリン酸化を特異的に認識する抗体を作成し、これにより糸球体傷害モデル (PAN 腎症、プロタミン硫酸還流モデル) で *in vivo* においても Y637 のリン酸化が起こっていることも明らかになった。糸球体上皮細胞傷害時における MAP キナーゼの役割については未だ不明な点が多いが、細胞接着分子である Neph1 のリン酸化が上皮細胞傷害において *in vivo* で細胞内シグナルを修飾している可能性が示された (論文投稿中)。上皮細胞における病態進展や形態形成での Neph1 のリン酸化の役割について現在検討を進めている。

3. 糸球体上皮細胞におけるカルシウムシグナル

糸球体上皮細胞に存在するいくつかの Ca シグナルに関わる分子の異常によりネフローゼ症候群、家族性 FSGS を来することが近年相次いで報告され、にわかに糸球体上皮細胞における Ca シグナルの重要性に注目が集まっている。

(i) TRPC6 チャンネル (TRPC: transient receptor potential cation channel)

2005年、ニュージーランドの常染色体優性家族性 FSGS の原因が、TRPC6 遺伝子の変異 (P122Q) であることが報告された¹⁵⁾。この家系では30~40代で高度の蛋白尿を来し、その60%で末期腎不全に至るといった。また、他の地域でも複数の家族性 FSGS の家系で TRPC6 の変異がみられている¹⁶⁾。TRPC6 チャンネルは、通常、PLC (Phospholipase C) に由来する DAG (diacylglycerol) によりチャンネルの活性が制御されているが、患者でみられる変異 (P112Q) では変異体蛋白が膜表面へ発現しやすく、Ca イオンの流入が野生型に比べて増大した結果、疾患が引き起こされると考えられている。この発見はあるカルシウムチャンネルの活性が増加することのみにより蛋白尿、FSGS が発症することを初めて明らかにした画期的なものであった。また、TRPC6 チャンネルは電顕上糸球体上皮細胞のスリット膜に集積し、さらに Podocin と結合することでチャンネル活性が増強することも知られてきており、スリット膜複合体の機能と密接

な関わりがあることが明らかになっている¹⁷⁾。最近では、より一般的な膜性腎症や FSGS で TRPC 6 の発現が亢進していることも報告され、糸球体疾患の病態生理に広くこのチャネルの活性の変化が関与している可能性が示唆されている¹⁸⁾。TRPC 6 チャネルが糸球体上皮細胞の機能、特にスリット膜のバリア機能にどのように関わっているのかについては現在のところ不明である。

(ii) PLCε

Hinkes らは、トルコの家族性ネフローゼ症候群の 6 家系において 12 人の PLC ε の変異を見だし、この遺伝子を原因遺伝子として同定、*NPHS3* (nephrotic syndrome type 3) と名付けている¹⁹⁾。PLC ε は PLC ファミリーの中では比較的最近同定され、他の PLC とは異なり、phospholipase 活性と独立して RasGEF 活性 (GEF: GDP/GTP exchange factor: Ras を活性化させる) と Ras と結合する領域 (RA ドメイン) を持っており、Ras-ERK 経路との関連が指摘されている。また、PLC ε は IQGAP と結合するが、IQGAP は糸球体上皮細胞において Neph- rin の細胞内領域とも結合することが判明しているため、PLC ε とスリット膜との関連も推察されている。

この遺伝子の変異を持つ患者では生後数ヵ月から幼児期にかけて発症するが、興味深いことに複数の症例で (ナンセンス変異であるにもかかわらず) ステロイドや免疫抑制剤に反応し、寛解する例もあるという。可逆性という特徴は他のネフローゼの原因遺伝子 (Nephrin, Podocin) の変異ではみられない点である。可逆的なネフローゼを起こす分子異常の解明は成熟した糸球体上皮細胞の傷害機序とその特徴的な形態の修復機序の解明において多くの示唆を与えると予測され、注目されている。

おわりに

蛋白尿を制御するメカニズムについては決定的な因子については依然わかっていない。特に後天的なネフローゼ症候群や糸球体硬化症の原因についての情報はきわめて限られている。しかし、最近の糸球体上皮細胞研究により細胞内シグナル伝達系等の新たなメカニズムがバリア機能に大きな役割を果たしていることが次々と明らかになってきた。蛋白尿の分子機序の解明さらにターゲットを絞った治療法の開発に向けて今後更なる研究の発展が期待される。

文 献

- 1) Farquhar MG. : The primary glomerular filtration barrier—basement membrane or epithelial slits? *Kidney Int.* 8: 197–211, 1975.

- 2) Rodewald R. and Karnovsky M. J. : Porous substructure of the glomerular slit diaphragm in the rat and mouse. *J. Cell Biol.* 60: 423–433, 1974.
- 3) Kanwar Y. S. and Farquhar M.G. : Isolation of glycosaminoglycans (heparan sulfate) from the glomerular basement membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 4493–4497, 1979.
- 4) Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. : Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 354: 1387–1401, 2006.
- 5) Wartiovaara J, Ofverstedt LG, Khoshnoodi J, et al. : Nephrin strands contribute to a porous slit diaphragm scaffold as revealed by electron tomography. *J Clin Invest.* 114: 1475–1483, 2004.
- 6) Kestila M, Ienkeri U, Mannikki M, et al. : Positionally cloned gene for a novel glomerular protein—Nephrin— is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1: 575–582, 1998.
- 7) Johnstone DB, Holzman LB. : Clinical impact of research on the podocyte slit diaphragm. *Nature Clin Practice* 2: 271–282, 2006.
- 8) Huber TB, Banzing T. : The slit diaphragm : a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertension* 14: 211–216, 2005.
- 9) Huber TB, Hartleben B, Kim J, et al. : Nephrin and CD2AP associates with phosphoinositide 3-OH kinase and stimulate AKT-dependent signaling. *Mol Cell Biol* 23: 4913–4928, 2003.
- 10) Harhaj NS, Antonetti DA. : Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 1206–1237, 2004.
- 11) Kurihara H, Anderson JM, Farquhar MG. : Increased Tyr phosphorylation of ZO-1 during modification of tight junctions between glomerular foot processes. *Am J Physiol.* 268: F514–524, 1995.
- 12) Martin GS. : The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 467–475, 2001.
- 13) Verma R, Kovari I, Soofi A, et al. : Nephrin ectodomain engagement results in Src kinase activation, Nephrin phosphorylation, Nck recruitment, and actin polymerization. *J Clin Invest.* 116: 1346–1359, 2006.
- 14) Jones N, Blasutig IM, Eremina V, et al. : Nck adaptor proteins link Nephrin to the actin cytoskeleton of kidney podocytes. *Nature.* 440: 818–823, 2006.
- 15) Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. : A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 308: 1801–1804, 2005.
- 16) Reiser J, Polu KR, Moller CC, et al. : TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 37: 739–744, 2005.
- 17) Huber T, Schermer B, Muller RU, et al. : Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *Proc Natl Acad Sci.* 103: 17079–17086, 2006.
- 18) Moller CC, Wei C, Altintas MM, et al. : Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 18: 29–36, 2007.
- 19) Hinkes B, Wiggins RC, Gbadegesin R, et al. : Positional cloning uncovers mutations in PLCE1 responsible for a nephrotic syndrome variant that may be reversible. *Nat Genet* 38: 1397–1405, 2006.

The Mechanisms of proteinuria —The role of signaling in podocytes—

*¹Division of Cellular Proteomics (BML), Institute of Medical Science,
The University of Tokyo, Tokyo, Japan

*²Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Yutaka Harita *¹*²

The mechanisms of glomerular filtration have been a matter of controversy, but recent data have revealed the molecular details about the size selective barrier formed by the podocyte slit diaphragm. Recent studies have also emphasized the critical role of the intracellular signaling of podocyte, and revealed novel aspects of the mechanism that lead to proteinuria. Extensive research will explain the mechanisms of glomerular filtration and development of diseases.

Key words : proteinuria, podocyte, slit diaphragm, intracellular signaling