

特集：腎臓学この一年の進歩

# 腎疾患の基礎研究

山本 格

## はじめに

医学における基礎研究とは、慢性腎臓病の基礎研究者は何を目指すか。

研究とは、好奇心を原動力としてわからないことを明らかにすることである。医学においては、人類の健康、生命に結びつく生物、人間の基礎原理、疾患原理を明らかにすることである。医学研究に臨床研究と基礎研究があるとしたら、臨床研究はベッドサイドで患者を対象にした研究、基礎研究は実験室のベンチで動物、細胞、分子などを対象にした研究と認識されているかもしれない。本稿では大学や研究所における腎臓に関する基礎研究についてこれまでの研究の軌跡を概観し、今後の研究の目指す方向を考えてみたい。

われわれ基礎医学研究者が陥りやすい落とし穴は、好奇心だけを満足させる自己中心的な研究になったり、人類の健康に結びつく視点からではなく、論文を書くことが目的となるような研究になりがちなところである。

医学における基礎研究では、人類の健康に直接関わらない研究であっても、臓器、細胞、分子の役割、機能などを明らかにする研究は間接的に関わる研究としてのその価値は社会から認められている。地質学、数学、歴史学、政治学なども人類への貢献という意味では関連している。天文学などは人類への貢献という意味からはかなり距離を置いているが、多くの人々の好奇心を満足させてくれるので、その研究は社会から支持され基礎研究として成り立っている。

本稿では、これまでの腎臓の基礎研究をこのような視点から分析し、これからの腎疾患の基礎研究者にその海図を示すことを試みてみたい。

## 腎疾患の基礎研究の変遷(図1)

### 1. 病理形態学による腎疾患の解析：臨床病理解剖からの研究の流れの始まり

1827年、浮腫、蛋白尿などで死亡したヒトの病理解剖で腎臓の異常が確認され、腎臓病はその発見者にちなんでブライト病と呼ばれた<sup>1)</sup>。その後、腎臓病を光学顕微鏡で調べ、さらに1950年頃から始められた腎生検<sup>2)</sup>による病理組織検索、そして、免疫蛍光顕微鏡、電子顕微鏡の利用も加わり、現在の腎疾患の分類の骨格が作られていった。この時期は、これら顕微鏡的検索によりヒトの腎疾患を理解しようというのが研究で、まだ、今日で言う臨床医学研究の時代であった。

### 2. 動物モデルの開発と解析：基礎研究としての実験的免疫病理学

臨床病理学的研究と炎症学の発展が相俟って、1933年にはわれわれが世界に誇る馬杉復三先生の抗糸球体基底膜抗体型糸球体腎炎モデルが報告された<sup>3)</sup>。この成功はヒトの腎炎の一つの起こり方をネフロトキシンという現在では抗腎臓抗体(抗糸球体基底膜抗体)の投与により起こることを実証したことで価値が高く、また、腎疾患の基礎研究がここから始まったと言ってもよいものである。

その後、1960年代から当時発展した細胞免疫学、細胞生物学と相俟って、数多くの腎疾患のモデルが開発され、その発症機序が解析されていった<sup>3)</sup>。なかでも、血清病型腎炎モデルは免疫複合体が糸球体に沈着して炎症が起こることを示し、ヒトの急性溶血性連鎖球菌感染後糸球体腎炎はその機序で起こり、溶血性連鎖球菌を抗生物質で除くことで発症率の減少に貢献した。溶血性連鎖球菌以外にもいくつかの感染症、感染源により糸球体腎炎が起こることが示された。そして、その感染源を除くことでそれらの発症は解決できると考えられている。

次に、慢性に進行して今日の慢性腎臓病へと進行する

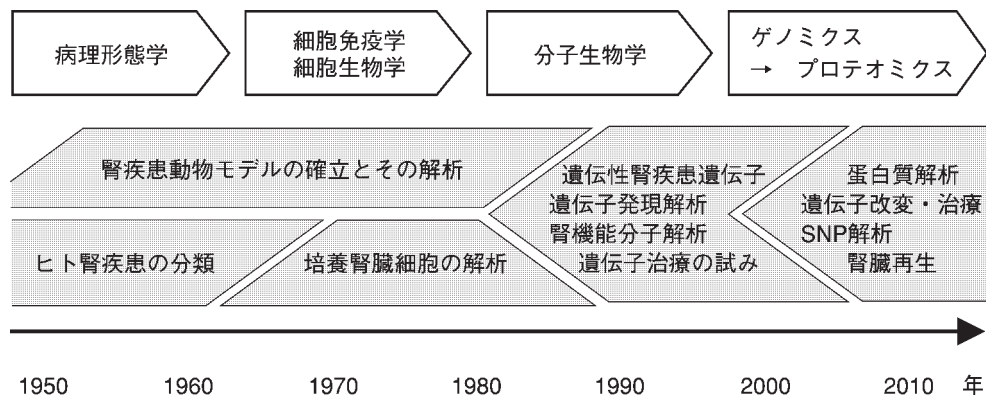


図 1 腎疾患の基礎研究の変遷

IgA 腎症などメサンギウム増殖性糸球体腎炎の発症機序を解明、解析するためのモデルが求められ、Heymann 腎炎、Thy-1 腎炎(抗メサンギウム細胞抗体腎炎)、糸球体上皮細胞傷害モデル(抗ネフリン抗体腎症など)、5/6 腎摘モデル、尿管結紮モデルなどが作られたが、それらは慢性腎臓病のモデルとしては不完全であり、現在でも真の慢性腎臓病のモデルの開発が望まれている。

これらのモデルは、ヒトではできない確認実験のために現在でも使われているが、モデルの解析だけを目的にした研究は論文のためだけの研究になりがちな点にわれわれ基礎研究者は留意すべきと考える。

### 3. 腎疾患の細胞生物学的病態解析：免疫学的解析

1970 年代になり、免疫学は血清免疫学から細胞免疫学へと発展し、免疫現象が細胞間の相互作用で、さらには分子間相互作用で理解できるようになった。また細胞培養も盛んになり、細胞生物学が隆盛を極めた。そのトレンドから、腎疾患モデルが細胞免疫学、細胞生物学的手法で解析され、その病態形成の細胞、分子機構が明らかにされた。免疫反応が関与する腎疾患モデルにおいて、免疫細胞、サイトカイン、接着分子といった免疫学から明らかになった炎症や免疫反応に関与する細胞、分子の腎疾患発症進展における役割も解明された<sup>4)</sup>。

一方、細胞生物学の発展により培養細胞を利用する研究が進み、腎臓疾患の研究でも糸球体のメサンギウム細胞、内皮細胞、上皮細胞、さらに近位尿管から集合管細胞が培養され、それぞれの細胞機能が培養系で研究された。その結果、数多くの研究成果が一流誌に報告された。確かに、培養尿管細胞などで生体内と同様な生理機能が研究されたが、一方、培養系では細胞は分裂を繰り返す、その細胞の形状も生体内の細胞とは大きく異なり、その性状の差異が次第に認識され、それらの細胞を使った研究の意義

は疑問視されるようになった。この過程で、われわれ基礎研究者が教訓とすべきは、培養細胞がどこまでヒト生体内の腎臓細胞と同じであるのか、その成果は人類にどれだけ貢献するものかをよく考えるべきであるということである。

### 4. 腎疾患の分子生物学的解析：遺伝子発現、遺伝子クローニング、遺伝性腎疾患の責任遺伝子の解析から遺伝子治療を目指した研究へ

1980 年代に入り、医学の研究に分子生物学が導入され、腎疾患の病態解析を遺伝子発現で解析する研究に関心が高まり、遺伝性の腎疾患の遺伝子が追及されていった。遺伝子を増幅し、検出する RT-PCR 法などが開発され、DNA sequencer によりヒトの全ゲノムが解読され<sup>5)</sup>、全遺伝子の発現を検出できるマイクロアレーが利用可能になった。

近年の腎臓学において最も高く評価される研究は、腎臓で機能する分子をコードする遺伝子が特定され、翻訳蛋白質の機能解析が進んだことである<sup>6)</sup>。フィンランド型の先天性ネフローゼ症候群は、糸球体上皮細胞のスリット膜を構成するネフリンの遺伝子異常であることが示され、ネフリンが糸球体での蛋白質漏出の重要なバリアーを構成していることが明らかになった<sup>7)</sup>。このように、糸球体上皮細胞の重要な機能分子がいくつも明らかになっている。尿管でも水チャネルをはじめ、さまざまなトランスポーター遺伝子が疾患と関連していることが明らかになり、病態解析が飛躍的に進んだ<sup>8)</sup>。これらの研究において日本人研究者の活躍は目覚ましかった<sup>9)</sup>。ヒトの腎疾患、腎臓生理を問題意識として、基礎的分子生物学的手法をその解析に利用したものであり、臨床研究と基礎研究が融和した研究とも言えるものである。

一方、腎疾患の古典的基礎研究は動物実験モデルを使い、それを分子生物学的に解析することでさまざまな遺伝

子発現がその病態形成に関与していることが示された。しかし、動物実験モデルとヒトの腎疾患の相違は大きく、動物実験モデル解析研究がヒトの腎疾患の解析に貢献した程度はかなり低いと評価せざるをえない。さらに、RT-PCR法、DNAマイクロアレー法などでヒトの腎臓組織での遺伝子発現を検討し、病態解析を行おうとしても、遺伝子発現でどれだけ病態が把握できるかということも問題である。すべての生物反応は必ずしも遺伝子発現を介しているわけではないし、遺伝子発現と蛋白質の量は必ずしも相関しないことも示されている<sup>10)</sup>。しかし、網羅的に遺伝子発現を検討してさまざまな遺伝子の変動からその病態形成の分子機構を把握しようとする流れは、バイオインフォマティクス(生物情報学)という学問の進歩を促し、これまでの研究から明らかになった分子間相互作用などの多くの情報をつなぎ合わせて、全体的パスウェイを描き出す分野を急速に進歩させている。

さらに分子生物学は遺伝子改変動物の作製を可能にし、遺伝子治療への期待を高め、幹細胞から組織、臓器を再生しようという夢をもたらした。腎臓学でも遺伝子改変動物を用いた特定分子の機能解析がなされ、腎臓の再生も研究の対象として考えられるようになった。しかし、腎臓病に関しては遺伝子治療、腎臓再生はまだともに難しいと思われる。腎臓は複雑な構造の臓器で、標的細胞に遺伝子を到達させることや、何よりまだ、どの遺伝子を治療に使うべきかが明らかになっておらず、腎臓の複雑な構造を再生することも至難と推定される。腎臓の発生学の研究の進歩により、腎臓は誘導因子などで複雑に制御されて構築されることがわかっており<sup>9)</sup>、その複雑な制御を容易に制御できるとは思えないのである。確かに、筋肉細胞や膵臓の $\beta$ 細胞など単一細胞は再生医学としての実用の可能性が高いが、腎臓のような複雑な臓器の構築、特に腎動脈、腎静脈、尿管を供えた腎臓の再生は、現在の科学では達成できる範囲を越えている感がある。腎臓の再生は他の動物の体中で特定個人の腎臓を発生、分化させるようなことで可能なかもしれない。また、腎臓全体ではなく、その一部の再生は可能かもしれない。腎臓再生の研究はまだ未熟であるが、確かに臨床応用を見据えた研究で、社会の期待も大きく研究の意義も高い。この分野でもわが国の研究者の昨今の活躍はすばらしいものである。Yokooらはラットの胎児の体内にヒトの骨髄液由来の幹細胞を埋め込み、ヒトの腎臓の一部(糸球体と尿細管)を作り、さらに、その組織を別のラットの腹部に移植し、移植されたラットの血管がつながった小さな腎臓(正常の約1/10の大きさ)を作る

ことに成功した<sup>11)</sup>。異種の動物が持つウイルスの感染を防ぐことや正常の腎臓と同じ構築と大きさ、機能をもち、ヒトに移植可能な腎臓にすることなど解決すべき課題は多いが、実用を目指したその研究の発展に期待がかかる。

### 5. ゲノミクスからプロテオミクスへの期待

ヒトゲノムの解読からヒト遺伝子の数は約2.2万と推定され<sup>9)</sup>、ヒトの生命現象や疾患の理解が深まるとの期待が膨らんでいる。単一遺伝子の異常による遺伝子病、さらには多遺伝子の発現が関与する多くの疾患解析にDNAマイクロアレーやSNP解析などが行われ、疾患と遺伝子発現、制御の理解が急速に進んでいる。いまだ病因や病態の分子レベルの理解が乏しい慢性腎臓病でも、腎臓組織をDNAマイクロアレーで解析し病態を理解しようとする試みも報告されている<sup>12)</sup>。

しかし、慢性腎臓病の多くはさまざまな病因に遺伝的要因や生活習慣が関与する病気と推定され、さらに、その病態形成の反応は必ずしも遺伝子発現を介さないことから、遺伝子発現だけでは腎疾患の病因、病態を理解することは難しいと推定される。そこで、近年注目されているのが個体、組織、細胞などの全蛋白質(プロテオーム)を網羅的に解析しようという科学、プロテオミクスである。網羅的に蛋白質を解析すると言っても、推定されている約2.2万のヒト遺伝子から作り出される蛋白質、ペプチドの種類は遺伝子のアイソフォーム、蛋白質の翻訳後修飾、切断などで、その多様性が増し、その数は遺伝子の10~100倍にも及ぶともいわれているので、容易ではない。

## 腎疾患の基礎医学の方向性

筆者は現在の腎疾患の基礎研究を2つの視点からその方向性を転換すべきであると考えている。少なくとも、その方向に研究の主軸を移すべきであると思っている。その一つは「動物モデルの解析からヒト腎疾患の理解へ」から「ヒト腎疾患の解析から動物モデルによる確認へ」である。もう一つは、「個々の分子の研究」から「多分子、全分子の研究へ」の転換である。

### 1. 「動物モデルの解析からヒト腎疾患の理解へ」から「ヒト腎疾患の解析から動物モデルによる確認へ」

これまでの腎疾患、特に腎炎の研究は主に動物モデルを解析することによりヒトの腎疾患を理解、類推しようとするものであった。しかし、動物モデルはあくまで動物固有の疾患であったり、人為的に誘導したものであるため、その発症、病態形成機序をヒトの疾患と同一視することはで

## The Blind Researchers and the Elephant

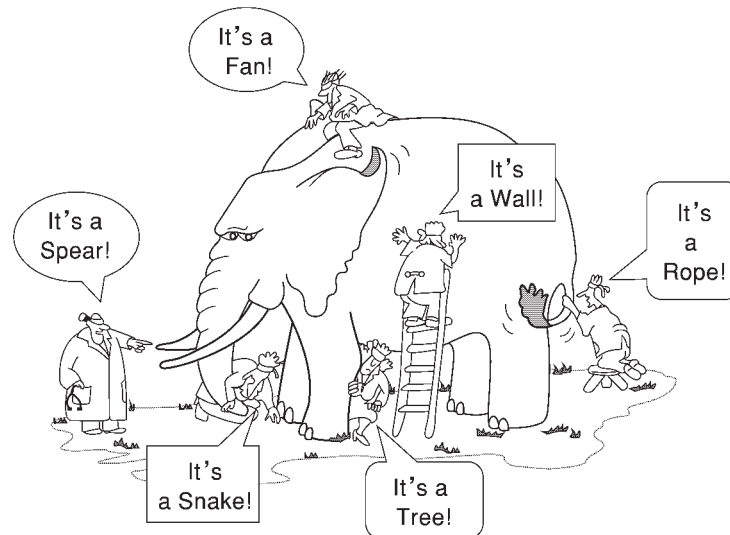


図 2 研究者は細部にとらわれすぎず、全体を見なくてはならない

きない。培養細胞も生体内の細胞との差異をよく考えて利用する必要がある。とはいえ、腎細胞の生理学的研究などではヒトと哺乳類動物などでの共通性が高いと考えられるので、動物を使った基礎医学研究は当然行われるべきものである。腎疾患の基礎医学研究者は少なくとも今、ヒトの腎疾患を真剣に解析することが求められている。そして、そこで得られた結果、分子機能の確認などにこそ、動物実験モデルや培養細胞を用いた研究はなされるべきと考える。

## 2. 「個々の分子の研究」から「多分子、全分子の研究へ」

これまでの多くの研究でさまざまな分子が実験モデルやヒトの腎疾患に関与していることが示されている。しかし、膨大な研究成果にも関わらず、ヒトの慢性腎臓病などの腎疾患の分子機構が明らかになったとは言えない。どの分子が、他の分子と比較してどれほど重要なのか、まだ、未確認の分子の関与はないのかなど、依然として不明である。それは、研究者が盲目で、ある腎疾患の一部を研究するだけで全体を見ていなかったと譬えられる(図 2)<sup>13)</sup>。この辺で、それらをすべて一括して比較してみたらどうだろう。それは、すべてのヒト遺伝子が明らかになった現代であるからこそできるのである。遺伝子発現を網羅的に調べる DNA マイクロアレー法はその始まりであった。

ポストゲノム科学としての全蛋白質を対象にしようというプロテオミクスは、始まったばかりであるが急速に発展し驚くほどのスピードで研究が進んでいる。当初は蛋白質の分離、検出器の感度、正確さなどもそう高くなく、二次

元ゲル電気泳動法で蛋白質を数千スポットに分離してそれぞれを質量分析計で同定するには、蛋白質が総量 100  $\mu\text{g}$  (組織量にして約 10 mg) ほど必要であった。しかし、現在ではその 1/100 ほどで十分といわれるところまでできている。特に、質量分析計の進歩は目覚ましく、現在では蛋白質の検出感度は fM(フェムトモル,  $10^{-15}$  M)~aM(アットモル,  $10^{-18}$  M)とされる。細胞や組織にある蛋白質の平均分子量を 50 kDa, その種類を 1 万, 存在量のレンジを  $10^4$  と想定すると 1  $\mu\text{g}$  程度の蛋白質があればよいことになる。ちなみに、ヒトの腎臓より単離した糸球体 1 個からは約 1  $\mu\text{g}$ , レーザーマイクロダイセクションで切片から切り出した糸球体の場合は約 20 ng の蛋白質が得られるので、腎生検から得られる糸球体のプロテオミクスも可能になりつつある<sup>14)</sup>。

遺伝子数に比べ蛋白質数はさらに多いため、ヒト遺伝子解析と同様にヒトの全蛋白質を解析しようとする国際連携が必要になり、それを主導する組織が 2001 年に Human Proteome Organization (HUPO)<sup>15)</sup> として設立された。われわれもその傘下で、Human Kidney and Urine Proteome Project (HKUPP)<sup>16)</sup> チームを組織し、ヒトの腎臓と尿の全蛋白質のデータベースの構築などを目指して活動をしている。

DNA マイクロアレーにしろプロテオミクスにしろ、得られる情報は膨大で、その情報をどのように生かすかが今問われている。そこで生まれてきたのがバイオインフォマティクスで、さまざまなデータベースから情報を取り出

し、さらに関連させる科学である。遺伝子発現や蛋白質の変動を正常群と疾患群などで比較し、優位に変化しているものを多変量解析などで検定し、それらを疾患ごと、進行程度ごとなどで比較し、特徴的にクラスターするものを選び、それらの分子の機能や分子反応系などを推定することで、疾患病態を解釈するにはバイオインフォマティクスを駆使する必要がある。特にパスウェイ解析は、それらの分子間にどのような関連性があるかを示す解析ツールで、今後、この分野が発展することにより、これまで行われてきた個々の分子の研究がある反応系の一部として生かされることになるのである。また、プロテオミクスでは病態解析だけではなく、病因が明らかになる可能性も期待できる。

しかし、このようにして得られた結果はあくまで推定にすぎない。それを動物実験などに戻って実証することが必要になり、そこで動物実験モデルや培養細胞がまた利用されることになる。それにより、ある病態形成に最も関連した分子反応が把握されれば、将来の医薬ターゲット、医薬開発へと進むことが期待される。

### おわりに

腎疾患の基礎医学研究者はヒトの腎疾患の病因と病態を解明し、その予防や治療法の開発につながる研究を目指したいものである。そして、慢性腎臓病で透析や腎移植を受けなくてはならないヒトの数を減少させることにつながる研究をしたいものである。このようなことはすでに先人がどこかで考え、述べていたに違いない。腎疾患の古典的な基礎研究者としてそれを十分認識できず、長年、モデルの解析、培養細胞の研究などを行ってきた筆者としては、その視野をもっと早くもつべきだったと省りみて、今後の基礎研究の方向性について私見を述べてみた。

### 文 献

- Bright R. Medical cases, selected with a view of illustrating the symptoms and cure of diseases by a reference to morbid anatomy. 2 vol.(in 3), London : Longmans, 1827.
- Perez-Aza A. La biopsia-puncatural del rinon no megalicoconsideraciones generales y aportacion de un nuevo metodo. Boln Liga Cancer 1950 ; 25 : 121.
- Glasscock RJ. The emergence of the discipline of renal immunopathology. Am J Nephrol 2002 ; 22 : 248-253.
- 浦 信行, 他編. 腎臓ナビゲーター. 東京:メディカルレビュー社, 2004.
- International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 2004 ; 431 : 931-945.
- 宮田敏夫編. 分子腎臓学: 分子生物学的アプローチと分子病態生理学. 日本臨牀 2006 ; 64(増刊号 2).
- Kestila M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein—nephrin—is mutated in congenital nephrotic syndrome. Mol Cell 1998 ; 1 : 575-582.
- Preston GM, et al. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. Science 1992 ; 256 : 385-387.
- Fushimi K, et al. Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. Nature 1993 ; 361 : 549-552.
- Cardozo AK, et al. Gene microarray study corroborates proteomic findings in rodent islet cells. J Proteome Res 2003 ; 2 : 553-555.
- Yokoo T, et al. Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. J Am Soc Nephrol 2006 ; 17 : 1026-1034.
- Susztak K, Bottinger EP. Diabetic nephropathy : a frontier for personalized medicine. J Am Soc Nephrol 2006 ; 17 : 361-367.
- Schwartz MM. The blind men and the elephant. Kidney Int 2005 ; 68 : 1894-1895.
- Yoshida Y, et al. Two-dimensional electrophoretic profiling of normal human kidney glomerulus proteome and construction of an extensible markup language(XML)-based database. Proteomics 2005 ; 5 : 1083-1096.
- <http://www.hupo.org/>
- <http://www.hkupp.org/>