

特集：ネフローゼ症候群

## スリット膜関連分子の解明と臨床病態

河内 裕

### はじめに

ネフローゼ症候群の発症機序はいまだ不明な点が多いが、最近、多くの病態における蛋白尿は、糸球体上皮細胞足突起間に存在するスリット膜と呼ばれる構造の機能不全により起こっているのではないかと考えられてきている。

本稿では、スリット膜の構造、構成分子の性状についての最近の知見を紹介し、スリット膜の機能低下が蛋白尿発症に関与していると考えられる病態について概説する。

### スリット膜の構造

従来、糸球体血管壁の蛋白透過を防ぐメインバリアーは糸球体基底膜とする考え方が一般的であったが、近年、糸球体上皮細胞がバリアーとして重要な働きをしていることを示唆する多くの報告がなされている。糸球体上皮細胞はきわめて高度に分化した細胞で、足突起と呼ばれる構造を持つ特徴的な形態をしており、足細胞、タコ足細胞とも呼ばれている。この足突起は、同じ胞体から出た突起同士で絡み合うことなく、常に隣り合った細胞の突起と絡み合って基底膜の外側を覆っている。この足突起と足突起の間には25~60 nmの間隙があり、基底膜から約60 nm離れた部位にスリット膜と呼ばれる電子密度の高い線状の物質が張られている。この構造物をスリット膜と呼んでいる。強調しておきたいことは、スリット膜は、隣り合った細胞から出た突起間に存在する構造で、細胞間接着装置の一種であるということである。スリット膜は、約14×4 nmの大きさの孔をもつ“ジッパー”様の構造をしており、アルブミンなどの血清蛋白の透過を防ぐバリアーとしての機能にふさわしい構造であると報告されている<sup>1)</sup>。

#### Function of the podocyte slit diaphragm

新潟大学大学院医歯学総合研究科附属腎研究施設分子病態学分野

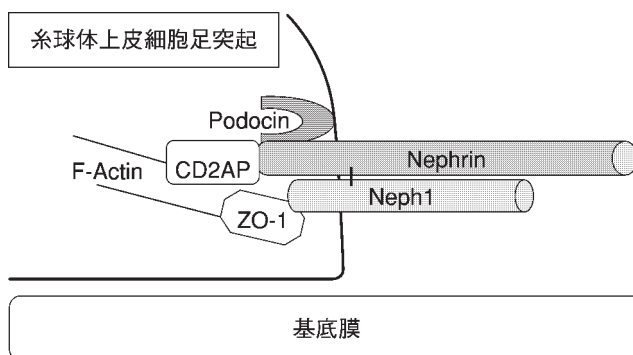


図 スリット膜構成分子の局在、位置関係

ネフリンはポドシン、CD2AP、Neph1と結合性を持つと考えられている。

### スリット膜構成分子の性状

スリット膜の分子構造は長らく不明であったが、この数年いくつかのスリット膜関連分子が同定されてきた。これらの分子の局在、位置関係を図に示した。以下にこれらスリット膜関連分子の性状について解説する。

#### 1. ネフリン(nephrin)

ネフリンは、フィンランド型の先天性ネフローゼ症候群の責任遺伝子(*NPHS1*)の遺伝子産物として同定された。ヒトネフリンは、1,241個のアミノ酸残基から成る分子量約180 kdの糖蛋白で、8個のIg-likeドメインと1個のfibronectin type III-likeドメイン、ならびに1つの膜貫通部を持つ接着分子様の構造をしている<sup>2)</sup>。免疫電顕での検討で、ネフリンは糸球体上皮細胞足突起間のスリット膜部の細胞外部を構成する分子であることが確認されている<sup>3)</sup>。Tryggvasonらは、足突起の両側から互い違いに出ているネフリン分子が先端の6個のIg-like moduleの部分で結合し、スリット膜のフィルター構造を形成しているとするモデルを提唱している<sup>4)</sup>。Orikasaらは、1980年代にラットに静注すると著明な蛋白尿を誘導する抗体の分離に成功し

ており、その抗体がスリット膜を認識することを報告している<sup>9)</sup>。最近の研究でこの抗体はネフリンの細胞外部を認識していることが明らかになっている<sup>6,7)</sup>。ネフリン分子の機能についてはまだ不明な点が多いが、抗ネフリン抗体が蛋白尿惹起能を持つことは、ネフリン分子がスリット膜のバリアー構造維持に直接関与していることを示している。また、ネフリンは、スリット膜の構成分子としてだけでなく、細胞外の情報を細胞内に伝えるシグナル分子としても機能していると考えられてきている<sup>8,9)</sup>。

## 2. ポドシン(podocin)

ポドシンは、常染色体劣性の遺伝形式をもつ家族性のステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の原因遺伝子(*NPHS2*)の遺伝子産物として同定された<sup>10)</sup>。ポドシンは、383個のアミノ酸残基から成る分子量42 kd、1つの膜貫通部を持つ。ポドシンのN末部、C末部に対する抗体を用いた免疫電顕での検討で、ポドシンは糸球体上皮細胞スリット膜部近傍に限局していること、ポドシンはN末部、C末部ともに細胞質に存在することが確認されている。ポドシンは1回膜貫通型のヘアピン様の構造を持った分子と考えられている。われわれのグループは、ポドシンは、腎糸球体上皮細胞だけでなく神経組織にも局在していることを観察している<sup>11)</sup>。また、ドイツのグループは、ポドシンがネフリンと結合性を持つことを *in vitro* の強制発現系で証明している<sup>12)</sup>。また最近、ポドシンのC末部が、ネフリン、後述のCD2APと親和性を持つとする所見も報告されている<sup>13)</sup>。

## 3. CD2AP

CD2-associated protein(CD2AP)は、CD2の細胞質部と結合する蛋白として同定された蛋白で、接着分子であるCD2の機能を増強していると考えられている。CD2APノックアウトマウスは、生後1~2週で蛋白尿の出現を認め、6~7週までに腎不全により死に至ると報告されている<sup>14)</sup>。CD2APはネフリンと結合性を持つと考えられており、CD2AP分子の欠損がネフリンの機能低下をもたらし、その結果、糸球体壁のバリアー機能の低下をもたらしたものと考えられる。最近、CD2APをコードする遺伝子に異常があるとする巣状糸球体硬化症症例が報告され、CD2APの異常がヒトの疾患にも直接関わっていることが明らかになった<sup>15)</sup>。

## 4. ZO-1

ZO-1(zonula occludens-1)は、細胞間接着装置の一つであるtight junctionの構成分子として同定された225 kdの蛋白で、tight junctionの重要な構成分子である。ZO-1

は、membrane-associated guanylate kinase homologues (MAGUKs)とよばれる分子群に属する分子で、tight junctionと細胞骨格とを結合する機能に関与していると考えられている。ZO-1は糸球体上皮細胞スリット膜の起部に存在することが観察されており<sup>16,17)</sup>、ZO-1はスリット膜を構成する蛋白の一つであると考えられている。

## 5. Nephl

Neph1は、ネフリンと相同性を持つ605アミノ酸残基から成る約67 kdの分子(ヒトneph1)として報告された<sup>18)</sup>。(その後の報告では、789個のアミノ酸残基から成る分子であるとされている。)Neph1は、ネフリンと同様にIg-likeドメインを持つ1回膜貫通型の膜蛋白で糸球体上皮細胞に局在している。Neph1ノックアウトマウスは、生直後から著明な蛋白尿、上皮細胞足突起の融合が認められる。また最近Liuらは、Neph1はネフリンならびにZO-1と結合性を持つことを示しており、Neph1はネフリンと同様、スリット膜の構造、機能維持に重要な役割を果たしている分子であると考えられている<sup>19)</sup>。

## 6. $\alpha$ -actinin-4

常染色体優性の遺伝形式を持つ家族性の巣状糸球体硬化症は、 $\alpha$ -actinin-4をコードする遺伝子の変異により発症すると報告されており<sup>20)</sup>、 $\alpha$ -actinin-4の異常がこの病態の発症に強く関わっていると考えられている。actininは、細胞骨格のactin filamentと結合しactinの架橋構造を安定化させる役割を担っている蛋白である。この病態は、成人後発症しその進行も緩やかである。 $\alpha$ -actinin-4分子の異常がどのような機序で上皮細胞障害、蛋白尿をもたらすのかについての詳細は不明であるが、 $\alpha$ -actinin-4の異常が何らかの他の障害因子に対する糸球体上皮細胞の感受性を亢進させているのではないかと推測されている。*in vitro*での検討で、変異 $\alpha$ -actinin-4は通常 $\alpha$ -actinin-4に比べより強いactinとの結合能をもつことが報告されている。また、最近 $\alpha$ -actinin-4がintegrin-linked kinaseとネフリンとの結合に関与していることを示す所見が報告されており<sup>21)</sup>、 $\alpha$ -actinin-4がスリット膜構造維持に関与していると考えられてきている。

## 7. その他のスリット膜関連分子

ヒトの疾患との関係は明らかではないが、FAT<sup>22,23)</sup>がスリット膜関連分子であると報告されている。この分子のノックアウトマウスは著明な蛋白尿を呈することから、FATもスリット膜の透過性制御に重要な役割を果たしていると考えられている。また最近、フィンランドのグループは、Densin<sup>24)</sup>、Filtrin<sup>25)</sup>と呼ばれる分子もスリット膜関

連分子であると報告している。米国の Farquhar らのグループは、MAGI-2, CASK がネフリンと親和性を持ち、スリット膜と細胞骨格との連結に関与していると報告している<sup>26)</sup>。しかし、これら分子の機能、病態における変化についてはまだ十分な検討がなされていない。

### スリット膜障害による蛋白尿

上述のようにネフリン、ポドシンなどの分子は先天性疾患の原因分子として同定された分子であるが、これらスリット膜関連分子の機能低下が臨床で多くみられる後天性の疾患の蛋白尿の発症にも関与していると考えられてきている。われわれのグループは、ネフリン、ポドシン、CD2AP のラットホモログのクローニングを行い、ラットの実験モデルを用い、蛋白尿発症時のこれら分子の動態について詳細な検討を行った<sup>6,11)</sup>。ネフリンならびにポドシンと反応する抗体を用いた二重染色蛍光抗体法での検討で、正常糸球体では、ネフリン、ポドシンはともに係蹄壁に沿った線状のパターンで観察され、両者はきわめて近傍に存在するが、微小変化型ネフローゼ症候群のモデルである PAN 腎症では、ネフリン、ポドシンの発現は、不連続な顆粒状パターンとなり、両者は必ずしも同じ局在を示さず、ネフリン、ポドシン分子が乖離して局在している所見を得ている。微小変化型ネフローゼ症候群の臨床材料においてネフリンの発現に変化があるか否かについてはまだ議論があり、定見がないのが現状である。Furness らは、ネフリンの mRNA が著明に低下していたとする報告をしており<sup>27)</sup>、Wernerson らは免疫染色でネフリンの染色パターンが不連続なパターンに変化したと報告している<sup>28)</sup>。一方 Hingorani らは、微小変化型ネフローゼ症候群 19 症例での検討で、いずれもネフリンの染色像は正常例と差がなかったと報告している<sup>29)</sup>。臨床材料での検討では、検討した材料の病期、利用した抗体の違いなどがあり施設間での検討結果の比較は難しいが、PAN 腎症モデルでの検討結果などを考え併せると、微小変化型ネフローゼ症候群の症例の少なくとも一部ではネフリン発現が低下しており、ネフリンなどのスリット膜関連分子の発現、機能低下が、微小変化型ネフローゼ症候群の蛋白尿の発症、進行に関与していると考えられる。

またわれわれの研究グループの中枝らは、膜性腎症のモデルである Heymann 腎炎におけるスリット膜関連分子の動態についての検討を行った<sup>30)</sup>。このモデルにおいても蛋白尿発症時、ネフリン、ポドシンの発現は低下し、不連続

な顆粒状パターンとなることを確認している。また、二重染色での検討で、それぞれの分子の発現低下がまだ著明でない病変誘導の早期にすでに、ネフリン-ポドシン、ネフリン-CD2AP の局在が乖離していることを観察している。また、蛋白尿が出現する前に、すでにネフリン、ポドシン mRNA 発現が著明に低下していることも観察している。また、Heymann 腎炎の尿所見を Western blot 法で検討したところ、病変初期に尿中にネフリン分子が漏出しているのが確認された。この観察は、尿中ネフリンがスリット膜障害の有無を知るための有用な診断法となりうることを示している。膜性腎症の臨床症例での検討もいくつか報告されており、ネフリン発現に変化がなかったとする報告もあるが、Doublie らは、ネフリンの染色性が著明に低下し、不連続な顆粒状のパターンに変化したと報告している<sup>31)</sup>。

スリット膜のバリアー機能維持における ZO-1 の役割についてはほとんど解明されていないが、われわれは、抗ネフリン抗体により誘導される蛋白尿発症時、ZO-1 の染色パターンが変化し、その発現量が低下していることを確認している<sup>17)</sup>。また、イタリアのグループは、Munich Wistar Fromter rat における蛋白尿発症に ZO-1 の局在の変化が関与しているとする報告をしている<sup>32)</sup>。これらの観察は、ZO-1 がスリット膜のバリアー機能維持に重要な役割を果たしていることを示している。

### アンジオテンシン II 作用とスリット膜

臨床研究でアンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン II (AII) 受容体拮抗薬 (ARB) など AII 作用を抑制する薬剤が蛋白尿に有用であることが示されている。また、これらの薬剤が蛋白尿改善効果を有することは多くの臨床医がすでに経験しているところである。しかしながら、その作用機序の詳細は今なお十分に解明されていないのが実情である。われわれの研究グループの鈴木らは、ネフリン分子の機能低下によりもたらされる蛋白尿モデルにおける ARB の効果の検討を行い、ARB がネフリンなどのスリット膜機能分子の発現低下を抑制し、蛋白尿を改善することを報告している。また培養細胞を用いた検討で、AII がネフリン発現を抑制すること、その抑制を ARB が改善することを確認している。これらの観察は、ARB が糸球体上皮細胞スリット膜に直接作用して蛋白尿を抑制していることを示している。局所の AII 作用と蛋白尿発症の関係、AII 作用とスリット膜機能の解析はきわめて重要な研究課題である。

## おわりに

蛋白尿発症機序の解明は、腎臓病学の最も重要な命題の一つであるが、分子レベルでの発症機序の解析は進んでいなかった。ここ数年、ようやく糸球体上皮細胞スリット膜の分子レベルでの解析が進み、スリット膜構成分子の発現、局在の変化、分子間結合の異常が、多くの病態における蛋白尿の発症の引き金になることがわかってきた。しかしながら、このようなスリット膜の機能異常が起こるメカニズムは、いまだほとんど解明されていない。われわれは、蛋白尿発症以前に変化する分子群をサブトラクションアッセイで同定する作業を行い、得られた分子群の局在、機能の解析を行っている。われわれの研究グループの宮内らは、SV2Bと呼ばれるシナプス顆粒に存在する分子が、スリット膜障害により発症する病態モデルで蛋白尿発症以前にその発現が低下していること、スリット膜機能分子が正しい位置に局在することにSV2Bが関与していることを報告している<sup>33)</sup>。本稿で紹介したスリット膜構成分子、スリット膜関連分子は今後新たな蛋白尿治療法開発のターゲットとして有望であると考えている<sup>34)</sup>。ネフローゼ症候群のより有効な治療法の開発は急を要する課題である。スリット膜関連分子を標的とした治療薬の開発が、それほど遠くない日に実現するものと考えている。

## 文 献

1. Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular slit in the rat and mouse. *J Cell Biol* 1974 ; 60 : 423-433.
2. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan C, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998 ; 1 : 572-578.
3. Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H, Holmberg C, Tryggvason K. Nephrin is specifically located at the site of the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 7962-7967.
4. Khoshnoodi J, Tryggvason K. Congenital nephrotic syndromes. *Curr Opin Genet Dev* 2001 ; 11 : 322-332.
5. Orikasa M, Matsui K, Oite T, Shimizu F. Massive proteinuria induced in rats by a single intravenous injection of a monoclonal antibody. *J Immunol* 1988 ; 141 : 807-814.
6. Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Yaoita E, Orikasa M, Shia MA, Sakai T, Yamamoto T, Salant DJ, Shimizu F.

- Cloning of rat nephrin : expression in developing glomeruli and in proteinuric states. *Kidney Int* 2000 ; 57 : 1949-1961.
7. Topham PS, Kawachi H, Haydar SA, Chugh S, Addona TA, Charron KB, Holzman LB, Shia M, Shimizu F, Salant DJ. Nephritogenic mAb 5-1-6 is directed at the extracellular domain of rat nephrin. *J Clin Invest* 1999 ; 104 : 1559-1566.
8. Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol* 2004 ; 15 : 1382-1391.
9. Tryggvason K, Pikkarainen T, Patrakka J. Nck links nephrin to actin in kidney podocytes. *Cell* 2006 ; 21 : 221-224.
10. Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nature Genet* 2000 ; 24 : 349-354.
11. Kawachi H, Koike H, Kurihara H, Sakai T, Shimizu F. Cloning of rat homologue of podocin : expression in proteinuric states and in developing glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2003 ; 14 : 46-56.
12. Huber TB, Kottgen M, Schilling B, Walz G, Benzing T. Interaction with podocin facilitates nephrin signaling. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 41543-41546.
13. Schwarz K, Simons M, Reiser J, Saleem MA, Faul C, Kriz W, Shaw AS, Holzman LB, Mundel P. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001 ; 108 : 1583-1587.
14. Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, Kanagawa O, Miner JH, Shaw AS. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999 ; 286 : 312-331.
15. Kim JM, Wu H, Green G, Winkler CA, Kopp JB, Miner JH, Unanue ER, Shaw AS. CD2-associated protein haploinsufficient is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 2003 ; 300 : 1298-1300.
16. Schnabel E, Anderson JM, Farquhar MG. The tight junction protein ZO-1 is concentrated along slit diaphragm of the glomerular epithelium. *J Cell Biol* 1990 ; 111 : 1255-263.
17. Kawachi H, Kurihara H, Topham PS, Brown D, Shia MA, Orikasa M, Shimizu F, Salant DJ. Slit diaphragm-reactive nephritogenic MAb 5-1-6 alters expression of ZO-1 in rat podocytes. *Am J Physiol* 1997 ; 273 : F984-993.
18. 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, Powell DR. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol* 2001 ; 21 : 4829-4836.
19. Liu G, Kaw B, Kurfis J, Rahmanuddin S, Kanwar YS,

- Chugh SS. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. *J Clin Invest* 2003 ; 112 : 209-221.
20. Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Rodriguez-Perez JC, Allen PG, Beggs AH, Pollak MR. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nature Genet* 2000 ; 24 : 251-256.
  21. Dai C, Stolz DB, Bastacky SI, St-Arnaud R, Wu C, Dedhar S, Liu Y. Essential role of integrin-linked kinase in podocyte biology : Bridging the integrin and slit diaphragm signaling. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 2164-2175.
  22. Inoue T, Yaoita E, Kurihara H, Shimizu F, Sakai T, Kobayashi T, Ohshiro K, Kawachi H, Okada H, Suzuki H, Kihara I, Yamamoto T. FAT is a component of glomerular slit diaphragms. *Kidney Int* 2001 ; 59 : 1003-1012.
  23. Ciani L, Patel A, Allen ND, French-Constant C. Mice lacking the giant protocadherin mFAT1 exhibit renal slit junction abnormalities and a partially penetrant cyclopia and anophthalmia phenotype. *Mol Cell Biol* 2003 ; 23 : 3575-3582.
  24. Ahola H, Heikkila E, Astrom E, Inagaki M, Izawa I, Pavenstadt H, Kerjaschki D, Holthofer H. A novel protein, densin, expressed by glomerular podocytes. *J Am Soc Nephrol* 2003 ; 14 : 1731-1737.
  25. Ihalmo P, Palmén T, Ahola H, Valtonen E, Holthofer H. Filtrín is a novel member of nephrin-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 ; 10 : 364-370.
  26. Lehtonen S, Ryan JJ, Kudlicka K, Iino N, Zhou H, Farquhar MG. Cell junction-associated proteins IQGAP1, MAGI-2, CASK, spectrins, and alpha-actin are components of the nephrin multiprotein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 9814-9819.
  27. Furness PN, Hall LL, Shaw JA, Pringle JH. Glomerular expression of nephrin is decreased in acquired human nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 1999 ; 14 : 1234-1237.
  28. Wernerson A, Duner F, Petterson E, et al. Altered ultrastructural distribution of nephrin in minimal change nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2003 ; 18 : 70-76.
  29. Hingorani SR, Finn LS, Kowalewska J, et al. Expression of nephrin in acquired forms of nephrotic syndrome in childhood. *Pediatr Nephrol* 2004 ; 19 : 300-305.
  30. Nakatsue T, Koike H, Han GD, Suzuki K, Miyauchi N, Yuan H, Salant DJ, Gejyo F, Shimizu F, Kawachi H. Nephrin and podocin dissociate at the onset of proteinuria in experimental membranous nephropathy. *Kidney Int* 2005 ; 67 : 2239-2253.
  31. Doublier S, Ruotsalainen V, Salvidio G, et al. Nephrin redistribution on podocytes is a potential mechanism for proteinuria in patients with primary acquired nephrotic syndrome. *Am J Pathol* 2001 ; 158 : 1723-1731.
  32. Macconi D, Ghilardi M, Bonassi ME, Mohamed EI, et al. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. *J Am Soc Nephrol* 2000 ; 11 : 477-489.
  33. Miyauchi N, Saito A, Karasawa T, Harita Y, Suzuki K, Koike H, Han GD, Shimizu F, Kawachi H. Synaptic vesicle protein 2B is expressed in podocyte, and its expression is altered in proteinuric glomeruli. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 2748-2759.
  34. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology* 2006 ; 11 : 274-281.