

特集：ネフローゼ症候群

ミトコンドリア異常からみた糸球体係蹄上皮細胞障害の基礎と臨床

山縣邦弘 萩原正大

はじめに

ミトコンドリアはエネルギーを産生する細胞内小器官であり、全身のあらゆる細胞に存在する。特に、細胞活動の活発なエネルギー依存度の高い細胞では、多くのミトコンドリアを保有している。ミトコンドリアはエネルギー産生以外にも、アポトーシスの制御を介して細胞の生死の決定、さらには生殖細胞の形成の決定¹⁾など、生命活動の維持にとってきわめて重要な役割を担っている。このようにミトコンドリア機能の多様な側面が明らかとなるに従い、近年、ミトコンドリア異常とさまざまな疾患の病態との関連が精力的に研究され、その成果が報告されてきている²⁾。特に糖尿病、神経変性疾患、心臓の虚血再灌流障害、敗血症性ショックに加え、加齢にも中心的な役割を担っていることが知られている³⁾。また、これまでミトコンドリアの酸化的リン酸化障害により発症するミトコンドリア病(ミトコンドリア脳筋症)では、神経・筋疾患を主病座とする疾患として認識されてきた。しかしながらミトコンドリア病においても、神経・筋疾患だけでなく多臓器に多様な障害を惹起することが明らかとなった⁴⁾。なかでも腎臓はしばしば障害を受け、ファンコニー症候群などの尿細管障害やネフローゼ症候群などの糸球体障害をきたすことが知られていた⁴⁾。さらに最近では、家族性巣状糸球体硬化症(FSGS)の患者のなかにミトコンドリア遺伝子異常を伴う患者が多数存在することが明らかとなり⁵⁻⁷⁾、FSGS病変形成における糸球体上皮細胞を場としたミトコンドリア異常の関与が指摘されている⁸⁾。また、神経・筋症状を欠き、糖尿病、難聴や腎障害により発症するミトコンドリア病が多く発見されるようになり、ミトコンドリア病の多

様性が知られるようになった^{10,11)}。

本稿では、腎病変、特にFSGS病変形成におけるミトコンドリア異常の関与について、最近の知見を中心に概説する。

ミトコンドリアの機能と特徴

1. ミトコンドリアの構造と機能

ミトコンドリアはすべての真核生物に存在する細胞内小器官である。ミトコンドリアの構造は外膜と内膜の2層の膜構造を有し、その間の膜間腔および内側のマトリックスの4つのコンパートメントから成る(図1)。外膜にはミトコンドリア内への蛋白輸送のコントロールを行うポーリンが存在し、1,500 Da程度の小分子物質を非選択的に透過させる。また、ポーリンはアポトーシス誘導分子であるbaxと直接相互作用し、cytochrome Cの放出を引き起こしアポトーシス誘導にも重要な役割を演じている¹²⁾。内膜はクリステとよばれる複雑な折りたたみ構造をもち、酸化的リン酸化により細胞内におけるエネルギー源であるATPの産生を行う。酸化的リン酸化ではミトコンドリア内に取り込まれた脂肪酸とピルビン酸をもとに、TCA回路と酸素を利用してATPが合成される。この過程には、5つの電子伝達系の酵素複合体(複合体I~V)がミトコンドリア内膜に組み込まれ、一連の電子の流れによりミトコンドリア内膜の内外に水素イオンの勾配が形成される(図2)。電子伝達系酵素複合体のサブユニットを形成する酵素は、ミトコンドリアのマトリックス内にある高等生物における唯一の核外ゲノムであるミトコンドリアDNA(mtDNA)と、核DNAの双方から翻訳、転写されて形成される。したがってミトコンドリア病では、この電子伝達系酵素複合体の異常をきたす原因となりうる核DNA異常、あるいはmtDNA異常によるものが存在する。

Pathological roles of mitochondrial dysfunction in podocyte injury

筑波大学大学院人間総合科学研究科臨床医学系腎臓内科

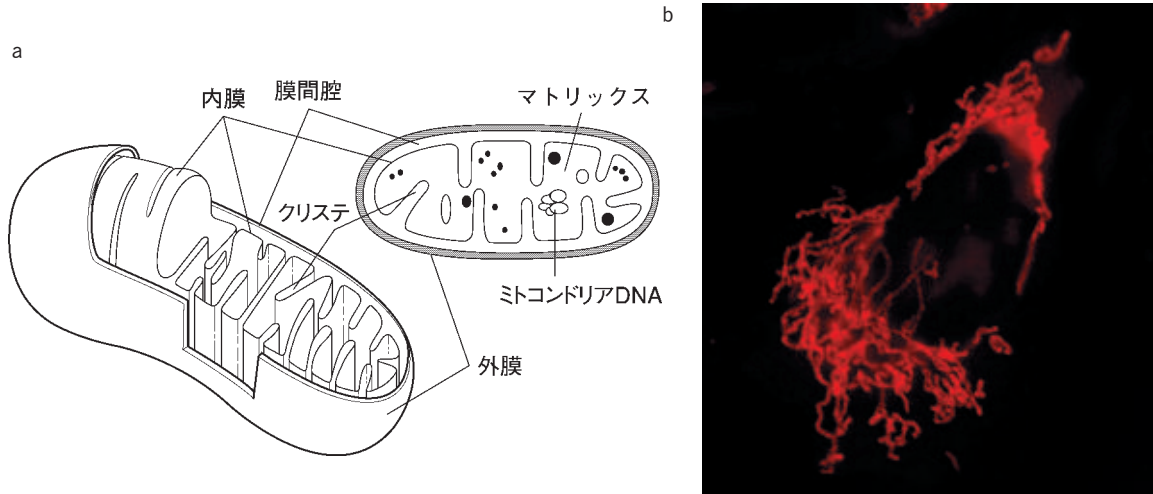


図 1 ミトコンドリアの形態

- a : 細胞内のミトコンドリアは外膜と内膜の2層の膜構造を有し、その間の膜間腔および内側のマトリックスの4つのコンパートメントから成る。細胞内のミトコンドリアの実際の形態はbに示すごとくで、細胞周期によっても動的に形態が変化することが知られている。
- b : MitoTracker Red による osteosarcoma cells でのミトコンドリア

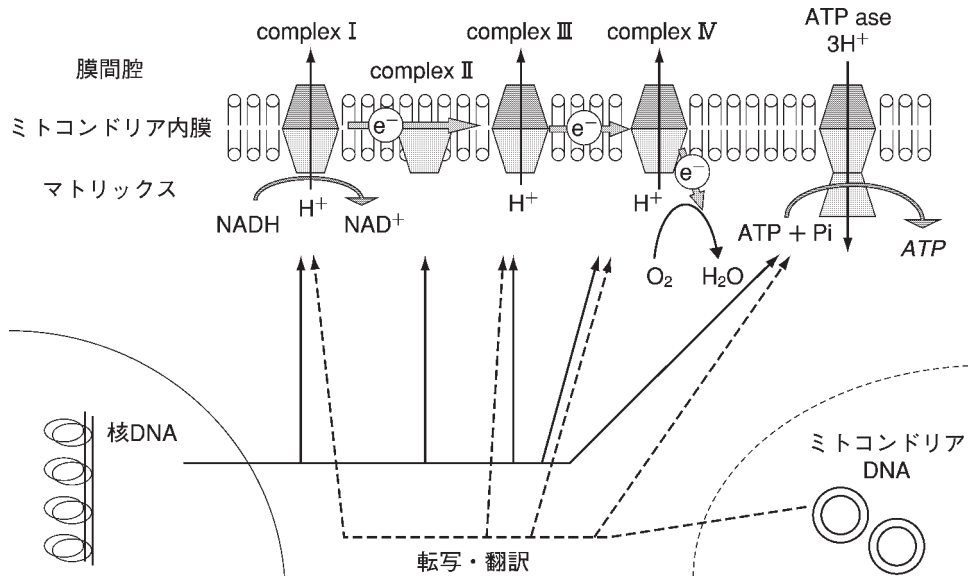


図 2 電子伝達系酵素複合体によるミトコンドリアにおける ATP 合成機構

2. MtDNA の特徴

mtDNA は 16569 塩基対の環状 DNA で、1 細胞当たり数十から数千コピー存在する (図 3)。mtDNA にコードされている蛋白質は電子伝達系酵素複合体の 13 の蛋白質と 22 種の tRNA、2 種の rRNA にすぎず、ミトコンドリアに存在する 500 種以上の蛋白質の大部分は核 DNA にコードされており、電子伝達系酵素複合体の構成蛋白質も大半が核 DNA にコードされている。しかしながら、この電子伝達系の副産物として、多量の活性酸素が放出され、

この活性酸素がミトコンドリアマトリックス内にある mtDNA に直接障害を与えることにより、mtDNA はしばしば損傷を受けることが知られている。

mtDNA の特徴としては次のような点があげられる。

- 1) 核 DNA と異なり、ヒストンで保護されたクロマチン構造を欠く。
- 2) 遺伝様式が母系遺伝であり、父親の mtDNA は次世代に関与しない。
- 3) ミトコンドリアは細胞当たり数百から 1,000 個ほど

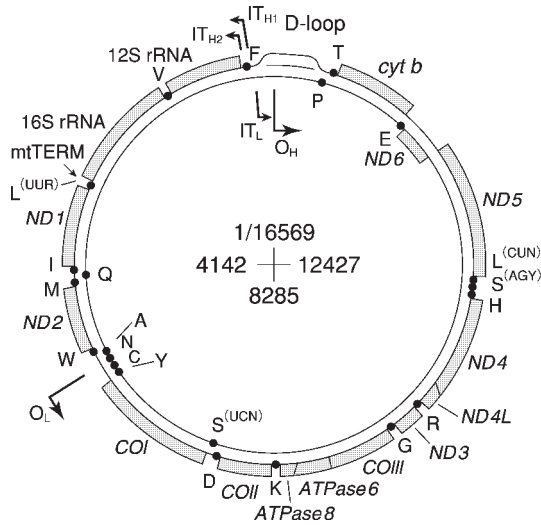


図3 ミトコンドリア DNA の構造

ミトコンドリア DNA は電子伝達系酵素複合体 I の遺伝子 (ND1~6), 複合体 III (cyt b), 複合体 IV (COI, COII, COIII), 複合体 V (ATPase 6, ATPase 8) と 2 個の rRNA (12 S と 16 S), 22 種類の tRNA 遺伝子がコードされる二重鎖環状の構造となっている。

存在し、1つのミトコンドリア当たり mtDNA は数コピーから数十コピー存在し、したがって1個体では膨大な量の mtDNA 分子が存在する。

4) DNA の修復機構が不完全で、核 DNA に比べ mtDNA は突然変異を非常に起こしやすい。

5) 胎生期には細胞分裂やミトコンドリアの分裂に比べ、mtDNA の分裂が遅れ、ミトコンドリア当たりの mtDNA コピー数がわずかに数個になる時期(ボトルネック期)があり、この時期に変異 mtDNA が偏在することにより、特定の臓器、組織に変異 mtDNA が集積する可能性がある。

6) 健常人ではすべての mtDNA が同一の塩基配列である(ホモプラスミー)。しかしミトコンドリア病では正常型と変異型の mtDNA が混在し(ヘテロプラスミー)、この変異 mtDNA の混在比率が細胞間、臓器間で異なり、変異 mtDNA 量がある程度以上蓄積することによって初めて、ミトコンドリア機能異常が発現する(閾値効果)。

したがって、mtDNA については先天性異常以外に加齢に伴う mtDNA 変異の蓄積や癌細胞内の変異 mtDNA の存在が知られており、ボトルネック効果、ヘテロプラスミーや閾値効果がミトコンドリア病の患者間での表現型の違いや多様性の原因になっていると考えられている。さらに mtDNA はその構造的な特徴、ならびに局在部位の影響

により、先天的異常だけでなく、後天的に遺伝子異常をきたし、その遺伝子異常が経年的に蓄積していくことが知られている¹³⁾。このような mtDNA 異常の蓄積をきたしやすい細胞としては、分裂終末細胞である筋細胞や神経細胞が有名である。

ミトコンドリア異常と糸球体上皮細胞障害

1. 糸球体上皮細胞とミトコンドリア機能

糸球体上皮細胞は糸球体構造維持ならびに蛋白漏出障壁としてのスリット膜の維持、基底膜との足突起による接着などさまざまな機能を持ち、エネルギー需要の多い細胞でミトコンドリアを豊富に保有している。また、新たな細胞分裂や増殖を起こさない分裂終了細胞としても知られており¹⁴⁾、ミトコンドリア遺伝子異常の蓄積をきたしやすい筋細胞、神経細胞、心筋細胞と共通の特徴を持っている。

2. ミトコンドリア異常による FSGS 病変

FSGS 病変は糸球体上皮細胞の伸展刺激、ウイルス感染、血清因子、遺伝的要因などの障害による機能的・形態的变化と、それに引き続く糸球体糸球体壁からの脱落により、露出した糸球体糸球体とポウマン囊との癒着をきたすことにより形成されると考えられている¹⁵⁾。したがって FSGS 病変の形成には、何らかの原因による糸球体上皮細胞障害が直接の引き金となると考えられている¹⁶⁾。また、ミトコンドリア病と腎障害との関連では、特に mtDNA の leucine^{UUR} tRNA 遺伝子内の 3243 位のアデニン(A)からグアニン(G)への点突然変異(A3243G)による FSGS 例⁵⁻⁹⁾が有名である。

A3243G による FSGS 例の腎組織所見では、糸球体上皮細胞の2核化、過形成、足突起癒合、さらには糸球体上皮細胞内のミトコンドリアの形態異常などの糸球体上皮細胞の形態異常が報告されている(図4)^{7,9)}。A3243G を伴う FSGS 例では、変異型 mtDNA の比率は血球の mtDNA が 60%程度であるのに対し、腎生検組織抽出 mtDNA では 85%以上を占め、腎における変異型 DNA の集積が示唆された⁸⁾。したがって、A3243G による FSGS 例においては、変異型 mtDNA の加齢やボトルネック効果による糸球体上皮細胞内の蓄積増加から、ミトコンドリア機能障害を惹起し FSGS 病変形成をきたしていることが示唆される。さらにミトコンドリア遺伝子の 4698 bp 欠失を導入したマウスは、その変異遺伝子含有量が増加すると FSGS 病変と同時に腎不全により死亡することが明らかとなった^{17,18)}。FSGS 病変は A3243G に特異的なものではなく、加齢でし

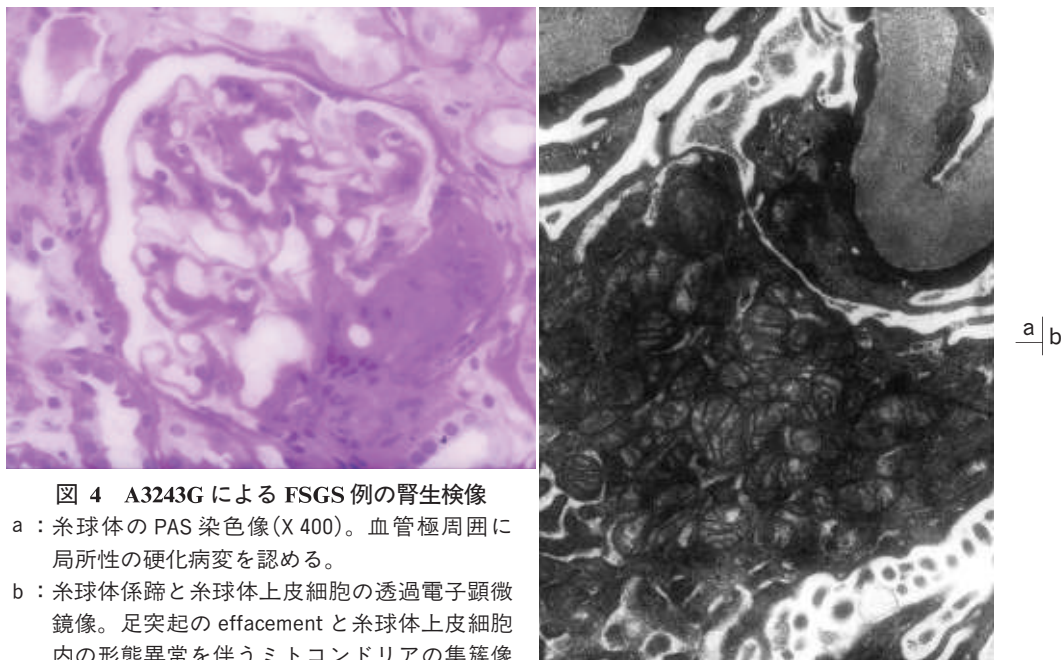


図 4 A3243G による FSGS 例の腎生検像

- a : 糸球体の PAS 染色像 (X 400)。血管極周囲に局所性の硬化病変を認める。
 b : 糸球体係蹄と糸球体上皮細胞の透過電子顕微鏡像。足突起の effacement と糸球体上皮細胞内の形態異常を伴うミトコンドリアの集簇像を認める。

ばしばみられる mtDNA の欠失変異を含めたさまざまな mtDNA 異常によっても惹起しうることが明らかとなった。

3. さまざまな糸球体障害におけるミトコンドリアの関与

近年、糸球体上皮細胞内の分子機構の詳細が明らかになるに従い、スリット膜や足突起の形態・機能維持に関わる多くの分子群が同定され、糸球体上皮細胞の活発な代謝・調節機能が明らかにされつつある¹⁹⁾。

電子伝達系酵素複合体の阻害薬である rotenone や antimycin-A を腎灌流すると、即座に蛋白尿が認められることが知られていた²⁰⁾。このような尿中への蛋白尿漏出を防止する機構として、糸球体上皮細胞のスリット膜の重要性が指摘されている。糸球体上皮細胞のスリット膜蛋白のなかでもネフリンの異常は、フィンランド型先天性ネフローゼ症候群の原因²¹⁾としてだけでなく、糸球体基底膜における蛋白透過性を制御するための重要な役割を持つと考えられている(詳細は他稿に譲る)。このネフリンの異常により発症するフィンランド型先天性ネフローゼ症候群において、腎の mtDNA にコードされる COX I の活性が核 DNA にコードされる COX IV よりも明らかに低下していること²²⁾、腎の mtDNA 量が、正常コントロールと比較して 17~40%まで低下していること²³⁾が明らかとなり、nephrin を介した蛋白尿の出現、ポドサイトの機能維持にミトコンドリア機能の関与を示唆する知見がある。

また、このネフリンの糸球体上皮細胞の小胞体における N-結合型糖鎖付加による折りたたみ構造形成が、ネフリンのスリット膜への分布には必要不可欠で、小胞体内での正常な糖鎖修飾にはミトコンドリアからの十分な ATP 産生が必要であるとの指摘もある²⁴⁾。さらに加齢に伴い増加することが知られている mtDNA の欠失型突然変異が、FSGS 患者の腎臓において年齢とは相関せずに増加しており、FSGS 患者糸球体内に欠失型突然変異を持つ mtDNA が集積していた⁸⁾。また、FSGS のモデル動物である Fawn-hooded ラットにおいて、FSGS 病変の形成に合わせ、DNA の酸化刺激の結果形成される 8OHdG 化した mtDNA の糸球体上皮細胞内での集積が認められた²⁵⁾。ラットのネフローゼ、FSGS 動物モデルであるピューロマイシニアミノヌクレオチド (PAN) 腎症において、糸球体上皮細胞内の mtDNA の量的質的变化を検討し、糸球体内の細胞当たりの mtDNA 量のネフローゼ期における増加と、FGS 期における減少を認めた(図 5)²⁶⁾。PAN 腎症における mtDNA 量の変化は糸球体上皮細胞数の変化を凌駕するもので²⁶⁾、mtDNA の減少、ミトコンドリア機能の低下が糸球体係蹄からの糸球体上皮細胞脱落に先立つ変化であった。しかしながらこの mtDNA の異常は、糸球体病変を惹起するさまざまな因子、特に活性酸素による二次的な変化なのか、mtDNA 異常に起因する ATP 産生障害がポドサイト異常をきたし FSGS 病変を形成するのか

7. Hotta O, Inoue CN, Miyabayashi S, Furuta T, Takeuchi A, Taguma Y. Clinical and pathogenic features of focal segmental glomerulosclerosis with mitochondrial tRNA Lue (UUR) gene mutation. *Kidney Int* 2001 ; 59 : 1236-1243.
8. Yamagata K, Muro K, Usui J, Hagiwara M, Kai H, Arakawa Y, Shimizu Y, Tomida C, Hirayama K, Kobayashi M, Koyama A. Mitochondrial DNA mutations in focal segmental glomerulosclerosis lesions. *J Am Soc Nephrol* 2002 ; 13 : 1816-1823.
9. Guery B, Choukroun G, Noel LH, Clavel P, Rotig A, Lebon S, Rustin P, Bellane-Chantelot C, Mougnot B, Grunfeld JP, Chauveau D. The spectrum of systemic involvement in adults presenting with renal lesion and mitochondrial tRNA(Leu) gene mutation. *J Am Soc Nephrol* 2003 ; 14 : 2099-2108.
10. Kadowaki T, Kadowaki H, Mori Y, Tobe K, Sakuta R, Suzuki Y, Tanabe Y, Sakura H, Awata T, Goto Y. A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 1994 ; 330 : 962-968.
11. Majamaa K, Moilanen JS, Uimonen S, Remes AM, Salmela PI, Karppa M, Majamaa Voltti KA, Rusanen H, Sorri M, Peuhkurinen KJ, Hassinen IE. Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes : prevalence of the mutation in an adult population. *Am J Human Genetics* 1998 ; 63 : 447-454.
12. Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999 ; 399 : 483-487.
13. Fraga CG, Shigenaga MK, Park JW, Degan P, Ames BN. Oxidative damage to DNA during aging : 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Nat Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 4533-4537.
14. Pavenstadt H, Kriz W, Kretzler M. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 2003 ; 83 : 253-307.
15. Meyrier A. Mechanisms of disease : focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005 ; 1 : 44-54.
16. Kriz W, Lemley KV. The role of the podocyte in glomerulosclerosis. *Cur Opin Nephrol Hypertens* 1999 ; 8 : 489-497.
17. Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, Hayashi JI. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet* 2000 ; 26 : 176-181.
18. Nakada K, Inoue K, Ono T, Isobe K, Ogura A, Goto YI, Nonaka I, Hayashi JI, Goto Y. Inter-mitochondrial complementation : Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Med* 2001 ; 7 : 934-940.
19. Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002 ; 13 : 3005-3015.
20. Wang S, Solin M, Ahola H, Luimula P, Holthofer H. Interactions between mitochondrial proteins and lipid peroxidation products in the maintenance of the glomerular filtration barrier in the *in vitro* perfused kidney. *Exp Nephrol* 2001 ; 9 : 14-20.
21. 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, Tryggvason K. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998 ; 1 : 575-582.
22. Holthofer H, Kretzler M, Haltia A, Solin ML, Taanman JW, Schagger H, Kriz W, Kerjaschki D, Schlondorff D. Altered gene expression and functions of mitochondria in human nephrotic syndrome. *Faseb J* 1999 ; 13 : 523-532.
23. Solin ML, Pitkanen S, Taanman JW, Holthofer H. Mitochondrial dysfunction in congenital nephrotic syndrome. *Lab Invest* 2000 ; 80 : 1227-1232.
24. 楊 國昌. 後天性腎疾患におけるネフリンの役割. *腎と透析* 2003 ; 55 : 771-776.
25. Yamagata K, Muro K, Hagiwara M, Kai H, Ohteki T, Arakawa Y, Usui J, Hirayama K, Koyama A, RA C. Involvement of mitochondria in glomerular sclerotic lesions. *J Am Soc Nephrol* 2002 ; 13 : 135.
26. Hagiwara M, Yamagata K, Capaldi RA, Koyama A. Mitochondrial dysfunction in focal segmental glomerulosclerosis of puromycin aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 2006 ; 69 : 1146-1152.
27. Markowitz GS, Appel GB, Fine PL, Fenves AZ, Loon NR, Jagannath S, Kuhn JA, Dratch AD, D'Agati VD. Collapsing focal segmental glomerulosclerosis following treatment with high-dose pamidronate. *J Am Soc Nephrol* 2001 ; 12 : 1164-1172.
28. Sauter M, Julg B, Porubsky S, Cohen C, Fischereder M, Sitter T, Schlondorff D, Grone HJ. Nephrotic-range proteinuria following pamidronate therapy in a patient with metastatic breast cancer : mitochondrial toxicity as a pathogenetic concept? *Am J Kidney Dis* 2006 ; 47 : 1075-1080.
29. Ying WZ, Sanders PW. Cytochrome c mediates apoptosis in hypertensive nephrosclerosis in Dahl/Rapp rats. *Kidney Int* 2001 ; 59 : 662-672.
30. Watson B Jr, Khan MA, Desmond RA, Bergman S. Mitochondrial DNA mutations in black Americans with hypertension-associated end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis* 2001 ; 38 : 529-536.