

遺伝性巣状糸球体硬化症の関連分子の解明

塚口裕康* 北村明子**

はじめに

巣状分節性糸球体硬化症(focal segmental glomerulosclerosis: FSGS)は、病理学的に巣状かつ分節状に分布する硬化像を特徴とする。FSGS病変は感染、免疫・代謝異常、血行動態の異常などのさまざまな糸球体障害に共通して生じる終末病変と解されるが、分子機序に関してはいまだ不明な点が多い。臨床的にはステロイド抵抗性ネフローゼ症候群を呈し、難治性で進行性の経過をとる。小児領域では腎不全の原因の20%を占め、先天性尿路奇形に次いで、末期腎不全に至る難治性疾患である。また成人においては、高血圧、肥満、糖尿病、高脂血症など一般成人病に続発する代表的糸球体病変であり、腎不全の発症・進展に大きく関わっている。

2003年4月にヒトゲノムの完全解読が宣言され、その全容が明らかになるなか、各種公共データベースが急速に整備されつつある。腎臓病研究においてもヒトゲノム情報を利用したアプローチが盛んになり、多くの成果をあげている。FSGSは、さまざまな感受性遺伝子と環境要因との複合的な組み合わせで発症する複合遺伝疾患である。FSGS症例の大部分は孤発性であるが、一部には家族集積性を示す症例がある。そして一部の家族性FSGS症例は、1つの遺伝子変異が疾患の遺伝的要因の大半を規定し、メンデル遺伝様式を示す(単一遺伝病)。このように複合遺伝疾患であるFSGSでも、より単純化したメンデル遺伝様式を示す家系を対象に連鎖解析を行うと、疾患遺伝子を突き止めることが可能である(ポジショナルクローニング法)。本稿では、家族性FSGS症例の遺伝学的解析で得られた最近の知見について概説する。

The genetic basis of familial focal segmental glomerulosclerosis and related nephrotic syndrome

* 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 病態情報医学,

** 同 小児医学

遺伝性 FSGS の分子病態

家族性 FSGS は、腎外病変(眼、骨関節、聴力、中枢神経など)の合併の有無により、原発性と症候性 FSGS に分類できる。

1. 家族性原発性 FSGS

優性遺伝と劣性遺伝の2つの遺伝様式が観察される。優性遺伝子である α -アクチニン4(*ACTN4*, ポドサイト足突起の細胞骨格蛋白, 19q13)¹⁾とTRPC6(非選択性陽イオンチャンネル 用語1, 11q22-23)²⁾によるFSGSは、20歳頃より尿蛋白が出現し、30~50歳で腎不全に至る遅発性で緩徐進行性の経過をとる。これらの優性遺伝子を有していても、FSGSを発症しない場合があり(不完全浸透率)、疾患責任遺伝子というより感受性遺伝子に近い特性を示す。これに対し、ポドシン(*NPHS2*, ストマチン関連蛋白 用語2, 1q25-31)³⁾やホスホリパーゼC ϵ 1(*PLCE1*, イノシトールリン酸代謝酵素 用語3, 10q23.32-q24.1)⁴⁾は劣性の家族集積性を示す。これらの疾患遺伝子の浸透率は一般に高く、蛋白の機能喪失(loss of function)に陥るため、症例は3カ月~5、6歳の早期に発症し、10歳前後で腎不全に至る症例が最も多く観察される。両親は変異アレルのキャリアーであるが、尿所見異常を示さない。

2. 家族性症候性 FSGS

優性遺伝様式で、爪や骨格の形成不全を伴う nail-patella 症候群は、*LMX1B* 変異(LIM ホメオボックス転写因子 用語4, 9q34)が原因である⁵⁾。また劣性遺伝様式で、小瞳孔症をはじめとする眼科的異常を伴う Pierson 症候群は、ラミニン β 2 鎖変異が原因である⁶⁾。また最近、難聴と FSGS を合併する優性・劣性遺伝の家系で、それぞれ新たな遺伝子座 11q24, 14q24.2 が報告されているが、現在のところ責任遺伝子は同定されていない^{7,8)}。

3. FSGS 遺伝子改変マウス

遺伝子改変マウスが偶然にも FSGS 病変とネフローゼ

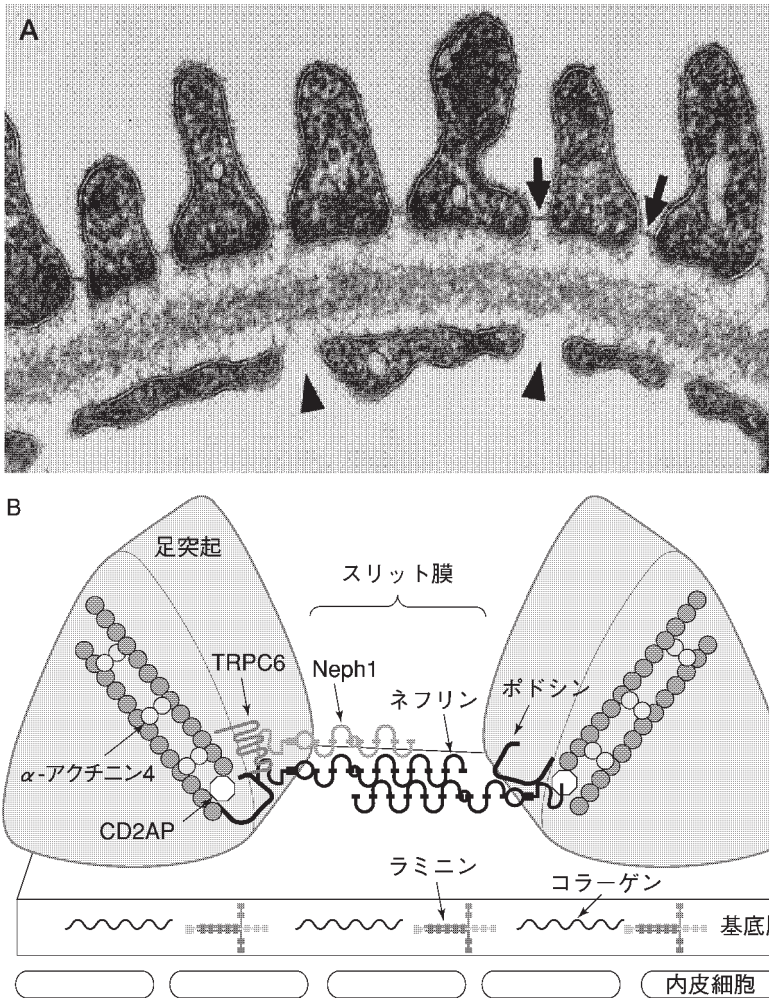


図 濾過障壁の構造と FSGS 遺伝子

- A. 糸球体の係蹄壁：血管内皮細胞、基底膜 (GBM)、糸球体上皮細胞(ポドサイト)の3要素より構成され、血液濾過装置として機能する。血管内皮は有窓性構造をもつ(矢頭)。ポドサイトは細胞体から一次・二次突起を分岐し、さらに終末部は足突起(foot process)となり、近接するポドサイトの足突起が互いに陥入して特殊な濾過膜構造を構築する。また、足突起は20-50 nmの間隙にスリット膜と呼ばれる特殊な細胞間接着装置を形成し、血中成分の濾過障壁として働く(矢印)。ポドサイトは神経細胞と同じく終末分化細胞であり、再生しない。ポドサイト間の細胞接着、あるいはポドサイトを支持する基底膜の異常はポドサイト傷害の引き金になるが、一度細胞傷害を生じると修復されず、GBMから脱落し、不可逆性のFSGS病変を生じる。
- B. ネフローゼ症候群を起こす責任分子：ネフリンは、8つの免疫グロブリン(Ig)モチーフから成る免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子である。向かい合う双方の足突起から伸びるN端側6つのIgモチーフが互いに結合し、足突起間のスリットを連結している。ポドシンは足突起でネフリンが挿入されるスリット膜基部の細胞質内において、アダプター蛋白やアクチン結合蛋白などの集積を促し、ネフリンの細胞接着装置の安定な足場を形成する。CD2APはネフリンのC端部分と会合して、アクチン細胞骨格に連結し、細胞間接着を補強する。またエンドサイトーシスにも関与している。Neph1は、ポドサイトスリット膜近傍に発現する免疫グロブリンスーパーファミリー接着分子であるが、Igモチーフが5つでネフリンより小さい。TRPC6はポドサイトに発現するTRPチャネルで、働きは不明である。 α アクチニン4はアクチン連結蛋白で、足細胞の細胞質でアクチン束の安定化に働いている。成人の糸球体基底膜は、IV型コラーゲン($\alpha 3, 4, 5$)とラミニンII($\alpha 5, \beta 2, \gamma 1$)から構成される。

症候群、腎不全を呈することから、ネフローゼ症候群責任遺伝子が見つかることがある。その例として *CD2AP*⁹⁾ や *NEPH1*¹⁰⁾ がある。

興味深いことに、これらの最近の家族性ネフローゼ症候群例の解析や遺伝子改変マウスの研究で発見されたFSGS遺伝子は、すべてポドサイトに発現している(図)。ポドサイト関連蛋白の遺伝子変異の結果、ポドサイトが脱落する現象(podocytopenia)が糸球体硬化症の発症において重要な要因と考えられる。このようにFSGS発症にはポドサイト傷害が重要であり、FSGSの病因を“podocytopathy”という視点から捉える新たな疾患概念の再編成が進みつつある。

家族性 FSGS と遺伝子変異

家族性FSGS症例の遺伝子解析により、基底膜に加えて足突起間スリット膜が濾過障壁の維持に重要であること

がわかり、FSGS発症の分子レベルでの病態理解は大きく前進した。遺伝性FSGS責任遺伝子群は、発症の分子順序より5つに分類できる(表)。

1. スリット膜蛋白複合体の機能・構造異常

ポドシン *NPHS2*

フランスのAntignacらのグループは、小児ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群のなかに、常染色体劣性遺伝型の家族内発症例があることに着目しその疾患遺伝子を探索した。診断基準を、①常染色体劣性遺伝型、②生後3カ月から6歳未満で発症し、速やかに腎不全となる、③組織像はFSGSあるいは微小変化型、④ステロイド治療に抵抗性、⑤移植後再発を認めない、とし、欧州、北アフリカから症例を集めて連鎖解析を行った。その結果、疾患遺伝子は染色体1q25-31にマップされ¹¹⁾、2.5 Mbの候補領域のなかから、責任遺伝子 *NPHS2* を同定した³⁾。

NPHS2 は383個のアミノ酸残基から成る細胞膜貫通型の蛋白ポドシンをコードする。ポドシンはヘアピンループ

表 家族性 FSGS の疾患遺伝子

分類	蛋白	遺伝子座	遺伝子	遺伝形式	OMIM	腎組織	臨床特徴	文献
スリット膜蛋白複合体の機能・構造異常	Podocin	1q 25-31	<i>NPHS2</i>	AR	604766	FSGS/MCNS	小児期発症ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群：先天性または早期発症(3カ月~5歳)し、10歳までに末期腎不全に至る。移植後再発は稀である。	3
基底膜構造の異常	Laminin β 2	3 p 21	<i>LAMB2</i>	AR	609049	DMS/(FSGS)	Pierson 症候群/腎症単独： 先天性ネフローゼ症候群で、急速に末期腎不全に至る。多くは眼科的異常(小腫孔症)を伴う。	6 15
ポドサイト細胞骨格の異常	α -actinin-4	19 q 13	<i>ACTN4</i>	AD	604638	FSGS	成人発症 FSGS：	1
ポドサイト細胞膜輸送機能の障害	TRPC 6	11 q 21-22	<i>TRPC6</i>	AD	603652	FSGS	20 歳代で発症, 30~40 歳代で末期腎不全に至る。 成人発症 FSGS：	2
糸球体・ポドサイトの発育不全	Phospholipase C, Epsilon-1	10q 23.32 -q24.1	<i>NPHS3</i> <i>PLCE1</i>	AR	608414	DMS/(FSGS)	30 歳代で発症, 40 歳代で末期腎不全に至る。 小児期発症ステロイド抵抗性(反応性)ネフローゼ症候群： 重症型(DMS)は、4歳までに(平均0.8歳)発症し、5歳までに(平均0.9歳)末期腎不全に至る。一部にステロイド剤またはシクロスポリンに反応する症例もある。軽症例(FSGS)は発症が遅く、緩徐に末期腎不全へ進行する。	4
	WT 1	11 p 13	<i>WT1</i>	孤発性/ AD	194080	DMS	Denys-Drash 症候群： 出生直後~数カ月以内に発症し、2~3年以内に末期腎不全に至る。DMS, 内外性器異常(46 XY), Wilms 腫瘍を三徴とする。男児(46 XY)は、内外性器異常(尿道下裂・停留精巣・男性仮性半陰陽など)を合併する。エクソン8-9のミスセンス変異が多い(エクソンの R 394 W がホットスポット)。	24
	LMX 1 B	9 q 34.1	<i>LMX1B</i>	AD	161200	FSGS	Frasier 症候群： 幼児期以降に発症し、20代以降に末期腎不全に至る。FSGS, 男性仮性半陰陽(46 XY)を呈する。男児(46 XY)は、男性仮性半陰陽, 索状性腺, 性腺芽腫を合併する。イントロン9のスプライストナ一部位の点変異が多い。 Nail-patella 症候群： 爪形成不全と、膝蓋骨低形成を代表とする骨関節障害を主徴とし、約1/3の症例に糸球体硬化をはじめとする腎臓の病変を合併する。発症年齢は早期発症から、晩発性のものまで幅が広いが、30%は平均30歳前後に腎不全に至る。	5

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

状構造をとり、中央の疎水性の部分で細胞膜に会合する膜蛋白質で、ポドサイトのスリット膜挿入部に分布し、ネフリンの基部を支えている。この特徴的な膜トポロジーと局在から考えると、ポドシンはスリット膜蛋白質複合体の足場蛋白質(scaffolding protein)として機能するものと推測される。ポドシンのC末端にはネフリンが結合し、ポドシンはスリット膜においてネフリンを中心とする細胞接着蛋白質複合体の形成に関与している(図)。この際ポドシンはラフト(用語5)に存在する接着因子やシグナル伝達因子を効率よく集積し、スリット膜のシグナリングや構造保持のオーガナイザーとしての役割を担う。ポドシン変異はこのスリット膜蛋白質複合体の形成を阻害し、ポドサイト傷害を引き起こすため、FSGS病変を生じる。

欧州を中心とした家族性ステロイド抵抗性ネフローゼ338症例の解析では、40%にポドシン変異が関与している。しかしわが国におけるFSGS症例の検討では、ポドシン変異が主たる病因ではなく^{12,13)}、アジア人特有の病因遺伝子が存在することを示唆している。

2. 基底膜構造の異常

糸球体基底膜構造異常でFSGSを呈する代表的な例が、GBMを構成するIV型コラーゲン $\alpha 3, 4, 5$ 鎖変異によるアルポート症候群である。 $\alpha 5$ 鎖変異はX連鎖、 $\alpha 3, 4$ 鎖の変異は常染色体優性や劣性遺伝を呈する。本症の分子病態は古くから研究されており、詳細は他の総説を参照されたい。

ラミニン $\beta 2$ *LAMB2*

1963年にPiersonらは先天性ネフローゼ症候群と眼症状を呈する同胞を初めて報告した。その後Zenkerらが、同様の症例を集積して早期発症のびまん性メサンギウム硬化症DMSと眼症状(小瞳孔、白内障を伴うレンズの変形、網膜の異常)を特徴とする劣性遺伝の疾患群の存在を提唱した(Pierson症候群, OMIM 609049)¹⁴⁾。2004年、これらのPierson症候群家系の連鎖解析により、ラミニン $\beta 2$ 遺伝子*LAMB2*変異が原因であることが報告された^{6,14)}。ラミニン $\beta 2$ は、 α, β, γ の3つの鎖から成る細胞外基質糖蛋白質で、GBMコラーゲンとインテグリンやジストログリカン複合体と会合し、ポドサイト基底面をGBMに連結する。成人GBMはラミニン11($\alpha 5, \beta 2, \gamma 1$)が主成分であり、*LAMB2*変異によりGBMの構造障害を生じると考えられる。またラミニン $\beta 2$ は、前眼房の虹彩の毛様体や乳頭筋・水晶体、骨格筋の筋神経接合部に豊富にあるため、変異により眼症状や筋症状を合併する。実際にラミニン $\beta 2$ 欠損マウスでも、ヒトとよく似た表現型を呈すること

が確認されている。早期終始コドンに伴うtruncating変異を有するPierson症候群は、小瞳孔や、それ以外にも何らかの眼症状(斜視、眼振、低色素網膜)を示す。しかし、蛋白質機能の障害が軽微なミスセンス変異の場合は、稀に眼症状を伴わない家族性あるいは孤発性先天性ネフローゼ症候群の臨床像を呈する¹⁵⁾。したがって、*LAMB2*は先天性ネフローゼ症候群の候補遺伝子の一つとして念頭に置くべきである。

3. ポドサイト細胞骨格の異常

アクチニン4 *ACTN4*

Kaplanらは、米国オクラホマ州(FS-A)とスペイン・カナリー諸島(FS-X)の優性遺伝のFSGS2大家系を解析し、疾患遺伝子を染色体19q13にマップした。そして、3.5 Mbの候補領域から責任遺伝子*ACTN4*を同定した¹⁾。*ACTN4*は α -アクチニン4をコードするが、この α -アクチニン4はF-アクチンとクロスリンクするポドサイトの細胞骨格蛋白質の一つである。興味あることに、19q13にマップされた3家系(FS-A, FS-X, FS-CI)で α -アクチニン4のミスセンス変異は、アクチン結合領域(actin binding domain)から最初の桿状領域(first rod domain)をコードするエクソン8に集中していた。*In vitro*発現実験では、患者の変異型*ACTN4*は野生型より強固にF-アクチンと結合しており、アクチン結合領域近傍のアミノ酸置換が生物学的に細胞構造・機能に影響することがわかった。後述する典型的なポドシン変異の患者は小児発症のネフローゼ症候群を呈するが、アクチニン4変異患者はなぜ成人発症で緩徐な臨床経過をとるのだろうか。おそらくアクチニンのミスセンス変異では糸球体構築に与える影響は比較的軽いがゆえに、成人になるまで症状が顕性化しないと考えられる。このように、アクチニン4の優性ミスセンス変異は軽微な足突起構造異常を生じ、晩発性の糸球体硬化症の原因になる。わが国の症例では、いまだ*ACTN4*変異は同定されていない。

4. ポドサイト細胞膜輸送機能の障害

TRPC6 *TRPC6*

Winnらは、成人発症の常染色体優性遺伝型の英国人を起源とするニュージーランドの大家系を解析し、疾患遺伝子を染色体11q21-22にマップした¹⁶⁾。そして2005年、この家系においてイオンチャネル蛋白質TRPC6をコードする*TRPC6*遺伝子のミスセンス変異(P112Q, アミノ酸配列112番目のプロリンがグルタミンへ置換)を同定した²⁾。同時に、他の研究グループによる欧州・中米・アフリカ系米人優性遺伝FSGS5家系の変異スクリーニングでも、C端

58 アミノ酸が欠失するナンセンス変異やミスセンス *TRPC6* 遺伝子変異が報告された¹⁷⁾。 *TRPC6* 変異が独立した複数の家系で同定されたことは、 *TRPC6* 変異が家系特異的な単なる多型ではなく、本質的に FSGS の病因であることを示している。

TRPC6 チャネルは、transient receptor potential (TRP) ファミリー(用語 1)に属するカルシウム透過型・非特異的陽イオンチャネルである。TRP 蛋白は、一般に膜電位変化以外の種々の物理化学的刺激(受容体刺激、化学物質、温度、脂質メディエーター、機械刺激)によって開口し、温度圧覚味覚伝導、体液調節、血圧、免疫炎症に至るまで、さまざまな生命現象に関与している¹⁸⁾。 *TRPC6* は肺における発現が最も強いが、さまざまな臓器に発現し、主として血管平滑筋細胞に豊富にある。腎臓では糸球体(ポドサイト)と尿細管に発現している。免疫電顕でポドサイトスリット膜基部に存在すること、さらにポドシンと会合することがわかっている。 *TRPC6* チャネル機能は、細胞膜のイノシトールリン酸代謝産物であるジアシルグリセロールにより活性化されるほか、細胞膜の伸張刺激によっても亢進する。Huber らは、ポドシンが *TRPC6* と会合しチャネル活性を亢進させることを示した¹⁹⁾。このことは、線虫におけるポドシン相同性蛋白である *mec-2* 蛋白(用語 6)が、触覚受容体を構成する Na チャネルの作用を増強する現象と類似している。ポドシン様蛋白は広く膜蛋白機能調整に重要であり、進化の過程で多様な生体のニーズに対応するため機能分化を果たしたものと思われる。

TRPC6 P112Q 変異体を HEK293 細胞に発現させると、野生型に比べて細胞表面への発現が亢進しており、アンジオテンシン II などのアゴニスト刺激によってカルシウム流入シグナルは増強する機能亢進状態(gain of function)にあることが示された²¹⁾。これらの所見から、 *TRPC6* 遺伝子変異によって過剰な陽イオン流入が生じ、ポドサイト傷害を引き起こすことによって FSGS の病像を呈すると考えられる。ポドサイトにおける *TRPC6* の生理機能やポドシンの役割については今後検討を要する。

CD2AP(CD2 adaptor protein) *CD2AP*

CD2AP は、リンパ球の表面接着蛋白である CD2 の細胞内アダプター蛋白として同定されたものである。*CD2AP* は、当初、T 細胞と抗原提示細胞間が接着した際、接着面の細胞極性の維持を担う免疫機能が主と考えられていた。ところが、*CD2AP* KO マウスは蛋白尿を呈し、生後 6~7 週で腎不全にて死亡することから、*CD2AP*

の糸球体硬化症における重要性が脚光を浴びることとなった⁹⁾。*CD2AP* 欠損ヘテロ接合体マウスでは 9 カ月を過ぎると糸球体メサンギウムに増殖反応と内皮・上皮下に免疫複合体の沈着が見られるようになる。電顕で見ると、ポドサイト細胞質内に細胞内消化障害の結果とみられる小胞構造が目立つようになる。このマウスにフェリチンを投与し腎糸球体での取り込みを観察すると、ポドサイト足突起細胞内におけるフェリチン取り込み小胞の数が低下していた。このことから、*CD2AP* が欠失するとエンドサイトーシスが低下し、通常細胞内で処理されるべき物質の沈着を招き、腎障害をきたすという機序が考えられる²⁰⁾。*CD2AP* と同じ蛋白ファミリーに属する Cin-85 も、エンドサイトーシスやライソゾーム機能を担うことが示されている。また、*CD2AP* はアクチン結合能を有することから、細胞骨格機能の維持にも重要と思われるが、ヒトポドサイトにおける *CD2AP* の役割は、今後検討を要する²¹⁾。

Kim らは 30 例のアフリカ系アメリカ人孤発性 FSGS 症例と 15 例のアフリカ系アメリカ人 HIV 関連 FSGS 症例を対象に、*CD2AP* 変異をスクリーニングし、2 例にヘテロ接合体のエクソン 7 のスプライスアクセプターコンセンサス配列部位を巻き込む 2 塩基置換変異を見出した。Kim らは、この変異を有するリンパ球では *CD2AP* の発現が低下することから、*CD2AP* の haploinsufficiency(用語 7)がヒトにおいても責任変異となりうると推定している²⁰⁾。しかし、その他の民族での *CD2AP* 変異の報告はなく、ポドサイトに及ぼす影響も不明であり、ヒト FSGS における *CD2AP* の役割は検討が必要である。

5. 糸球体・ポドサイト発育不全

ホスホリパーゼ C ϵ 1 *PLCE1*

中東(トルコ)の家族性 DMS/FSGS 症例のホモ接合体マッピング(用語 8)により新たな責任遺伝子 *PLCE1* が同定された⁴⁾。この発見により、ポドサイトの発育分化における生理活性脂質情報伝達系の重要性が初めて明らかになった。ホスホリパーゼ C ϵ 1(PLCE1)は、脂質性シグナル伝達系であるイノシトールリン酸代謝を媒介する酵素である(用語 2)。ホスホリパーゼは、細胞膜構成成分であるイノシトールリン脂を分解し、リン脂質自身やその代謝産物を、膜輸送やアクチン再構成など多岐にわたる細胞機能の発揮に活用するための重要な酵素である。哺乳類では 11 種類の PLC が同定されており、構造的に 5 つの型(β , γ , δ , ϵ , ζ)に分類されている。PLCE1 は 1998 年に、低分子量 G 蛋白(Ras, Rap Rho)や G 蛋白との結合領域をもった新しい型のアイソザイムとして同定された。

成熟糸球体においては、ポドサイト細胞体と一次突起に豊富に発現している。

PLCE1機能が強く障害される truncating 変異の患者は、糸球体毛細血管ループ期初期以降の発育をなしえず、未熟な係蹄構造を主体とする DMS の組織像を呈した。一方、機能障害が軽微なミスセンス変異の患者は、ポドサイトの発育には問題なく FSGS の病像を示した。ラットを用いた糸球体発育過程における発現検討では、S shape body 期より発現し始め、毛細血管ループ期初期に最も強く発現している。これら PLC ϵ 1 の変異解析や発現分布からすると、PLC ϵ 1 が糸球体係蹄の形成に重要な役割を演じると推測されるが、今のところ PLC ϵ 1 がポドサイトの分化発育においてどのような生理的活性を持つのかについては不明である。KO マウスが腎症を発症しないことや、ヒトにおいて同じ truncating 変異を持つ同胞の一方が腎不全に至り、もう一方がステロイドに反応する軽症の表現型を示すなど、遺伝子型と表現型に解離があることは、何らかの修飾遺伝子やゲノム多様性が関与している可能性を示している。今後、多くの症例における遺伝子-表現型相関の検討が待たれる。

Wilms 腫瘍抑制遺伝子 *WT1*

WT1 は、Wilms 腫瘍の抑制遺伝子として単離された Zinc finger 型転写因子(用語 4)で、尿路生殖器の分化にも関係する。*WT1* の発現は、糸球体形成過程の S shape body 期をピークに、成熟ポドサイトにおいても持続しており、*WT1* がポドサイトの分化、発育に深く関与している。*WT1* 遺伝子は、10 個のエクソンから構成される。腎症を示す症例の遺伝子変異は、C 端側の Zinc finger モチーフをコードするエクソン 8-9 に集中しているため、まずこの部分のスクリーニングが診断に有用である。

エクソン 8-9 のミスセンス変異(R394W はホットスポットと報告されている)は、メサンギウム基質の増殖を主体とした DMS、内外生殖器異常、Wilms 腫瘍を三徴とする Denys-Drash 症候群(DDS)をきたす。一方、イントロン 9 スプライスドナー部位の点変異による糸球体病変は DDS より軽症で遅発性の FSGS 病変を示す。内外生殖器異常はあるが、Wilms 腫瘍を生じないのが特徴で、Fraiser 症候群として取りまとめられている。DDS は *WT1* 変異が dominant negative 作用を発揮し本来の転写機能を抑制すること、すなわち *WT1* の質的異常が原因である。これに対し、Fraiser 症候群におけるスプライス変異では、生理的にも存在する *WT1* スプライス亜型(エクソン 9 の C 端

側 3 アミノ酸 リジン-スレオニン-セリンの有無で KTS+/-と略される)の量比が変化する軽微な異常であり、軽症の表現型にとどまる。

欧州の原発性、早期発症ネフローゼ症候群 89 症例(生後 1 年以内に発症)の解析では、*NPHS1* (24%)、*NPHS2* (38%)、*LAMB2* (5%)、*WT1* (3%)であった²²⁾。最近、Hildebrandt ら²³⁾ の欧州小児腎研究グループらの 115 症例の孤発例ステロイド抵抗性ネフローゼ症候群のスクリーニングの結果、*WT1* 遺伝子変異は 7% 8 症例(男性核型 3、女性核型 5)に検出された。8 症例中男児 3 例にはすべて軽度尿路・生殖器異常を認めたが、5 例の女児はすべて外見上原発性ネフローゼ症候群と区別がつかない症例であった。このように、男児の *WT1* 変異患者の大部分が何らかの尿路生殖器異常を伴っている。女児の *WT1* 変異患者では外生殖器異常はなく、外見上孤発性の FSGS とは鑑別できない。さらに性腺芽腫を合併することがあり、*WT1* 遺伝子診断が予後予測のために重要である²⁴⁾。なお、孤発例ステロイド反応性ネフローゼ症候群 110 症例には *WT1* 変異はなく、*WT1* 変異は一般にステロイド抵抗性ネフローゼ症候群の臨床像を呈することが示された。

LIM ホメオドメイン転写因子 *LMX1B*

Nail-patella 症候群は爪形成不全と、膝蓋骨低・無形成、肘関節や腸骨の異形成などの骨関節障害を主徴とし、腎・眼症状を合併する優性遺伝疾患である。発症頻度は 5 万人に 1 人といわれている(OMIM 161200)²⁵⁾。膝蓋骨と肘関節症状はほぼ必発で、爪の変化も 80~90%にみられる。約 1/3 の症例に糸球体硬化、GBM 肥厚をはじめとする糸球体病変を合併する。電顕では GBM 病変が特徴的で、緻密層を横断する線維状コラーゲン束の沈着が観察される。発症年齢は早期発症から晩発性のものまで幅広いが、30%は平均 30 歳前後に腎不全に至る。欧州の優性遺伝大家系におけるポジショナルクローニングと KO マウスの解析より、LIM ホメオドメイン転写因子である *LMX1B* 遺伝子(用語 4)が本症の原因であることが明らかとなった⁹⁾。これまでにすでに、わが国の症例を含めて 80 を超える *LMX1B* 遺伝子変異が報告されている²⁶⁾。

Lmx1b は体肢の形成制御に働くのに加え、腎糸球体においては、ポドサイト蛋白(ネフリン、ポドシン CD2AP)や GBM 成分 IV 型コラーゲン α 3、 α 4 鎖の発現を調節している²⁷⁾。*Lmx1b* KO マウスでは、ポドサイト足突起は未熟な立方型で、スリット膜もなく発育障害を生じており、さらに基底膜にも断裂が観察される。ヒト *LMX1B* 変異

を有する患者では、ポドサイトや GBM 構造に必要な分子の発現調節に異常をきたし、濾過膜構築の乱れが糸球体硬化につながると考えられる。

欧米の FSGS 症例で報告された α -アクチニン 4, *TRPC6* の変異や、マウス FSGS 遺伝子である *CD2AP*, *NEPH1* 変異はいまだ日本人には発見されていない。後述するようにポドシン変異もきわめて稀である。今後、わが国の FSGS 症例を体系的にスクリーニングし解析を進めることが重要である。

その他の遺伝子異常による FSGS

上記の疾患遺伝子以外で、糸球体硬化症との関連が明らかになっている遺伝子として、ミトコンドリア DNA の A3243G 変異^{28,29)}などが知られている。ミトコンドリア変異には、難聴、糖尿病、てんかん、筋症状などがあり、また、母系遺伝が疑われる症例においては検討すべきであるが、合併症のない孤発 FSGS 例でも変異が報告されているので注意を要する。

今後の方向性と課題

ステロイド抵抗性 FSGS が原因で腎不全となった患者に腎移植を行うと、しばしば移植腎に FSGS が再発する(欧米では、小児での再発率は 30~50%と報告されている)こと、移植後に FSGS が再発した患者の一部では血漿吸着や血漿交換に反応して蛋白尿が減少すること³⁰⁾などから、糸球体毛細血管の透過性を亢進させる何らかの液性因子が FSGS 発症に重要な役割を演じていると考えられるが、実体は不明である。このような分子の解明が今後の大きな課題として残されている。

欧州の Weber³¹⁾, Ruf³²⁾は、ポドシン変異のホモあるいは複合ヘテロ接合体 SRN 患者の移植後再発率を 10%以下と報告している。一般に移植後再発率が 30~40%であることを考えると、ポドシン変異を有する患者には腎移植治療が有効であることを意味している。

一方、イタリアのグループは、ポドシン変異のヘテロ接合体の患者に腎移植を行うと再発率が高いこと(~60%)を報告した³³⁾。この結果がなぜ Weber, Ruf らの報告と相反するのか、原因は不明である。一部のポドシン遺伝子のミスセンス変異は一般人口に頻度が高いものがあり(遺伝子多型, P20L, R229Q など)、これらのキャリアーのなかにはネフローゼ症候群を示すケースがある。したがってイ

タリアの移植症例の移植ドナーでは、ポドシン変異キャリアー率の割合が高かった可能性がある。今後、症例数を増やして検討し、ポドシン変異と移植後再発との関係を明確にする必要がある。

アジア人の糸球体硬化遺伝子は、欧米の患者と異なっており、疾患遺伝子は多様であり、また民族により異なっている。したがって、わが国の FSGS の診断・治療を向上させるためには、欧米人とは遺伝的背景の異なるアジア人症例を母集団とした疾患遺伝子探索が必須である。国際ハップマップコンソーシアムにより、ヒトゲノム上に存在する頻度の高い一般の SNP 多型についての公共データベース・ハップマップ(HapMap)の作成が進行中である。ハップマップ計画の推進により SNP タイピング用 DNA チップの技術が飛躍的に進歩しており、従来のマイクロサテライトマーカに加え高密度 SNP マッピングアレイを併用することで、より迅速簡便に候補遺伝子の位置を決定することが可能になりつつある。今後、多型データの蓄積により、生活習慣病に代表される頻度の高い疾患(common diseases)に関与する塩基配列多型を発見できるようになり、診断ツールの開発が加速し、治療標的を選択する能力が飛躍的に向上することが期待される。

総括

今後、より多くの症例の解析を通じて、新たなポドサイトの機能や糸球体硬化症の病態が解明され、ネフローゼ症候群の病態解明の新たな展開につながると期待され、個人の遺伝子多様性に基づくオーダーメイド医療への基盤を確立することにもつながる重要な課題である。今後、遺伝子異常や分子病態を知ることで、病態をより正確に理解し、新たな診断法や治療法に結びつけていくことが大切である。

文献

1. Kaplan JM, Kim SH, North KN, et al. Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet* 2000; 24: 251-256.
2. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science* 2005; 308: 1801-1804.
3. Boute N, Gribouval O, Roselli S, et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet* 2000; 24: 349-354.

4. 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* 2006 ; 38 : 1397-1405.
5. Dreyer SD, Zhou G, Baldini A, et al. Mutations in *LMX1B* cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat Genet* 1998 ; 19 : 47-50.
6. Zenker M, Aigner T, Wendler O, et al. Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet* 2004 ; 13 : 2625-2632.
7. Prakash S, Chung KW, Sinha S, et al. Autosomal dominant progressive nephropathy with deafness : linkage to a new locus on chromosome 11q24. *J Am Soc Nephrol* 2003 ; 14 : 1794-1803.
8. Ruf RG, Wolf MT, Hennies HC, et al. A gene locus for steroid-resistant nephrotic syndrome with deafness maps to chromosome 14q24.2. *J Am Soc Nephrol* 2003 ; 14 : 1519-1522.
9. Shih NY, Li J, Karpitskii V, et al. Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 1999 ; 286 : 312-315.
10. Donoviel DB, Freed DD, Vogel H, et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking *NEPH1*, a novel protein with homology to *NEPHRIN*. *Mol Cell Biol* 2001 ; 21 : 4829-4836.
11. Fuchshuber A, Jean G, Gribouval O, et al. Mapping a gene (*SRN1*) to chromosome 1q25-q31 in idiopathic nephrotic syndrome confirms a distinct entity of autosomal recessive nephrosis. *Hum Mol Genet* 1995 ; 4 : 2155-2158.
12. Maruyama K, Iijima K, Ikeda M, et al. *NPHS2* mutations in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Japanese children. *Pediatr Nephrol* 2003 ; 18 : 412-416.
13. Kitamura A, Tsukaguchi H, Iijima K, et al. Genetics and clinical features of 15 Asian families with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2006 ; 21 : 3133-3138.
14. Zenker M, Tralau T, Lennert T, et al. Congenital nephrosis, mesangial sclerosis, and distinct eye abnormalities with microcoria : an autosomal recessive syndrome. *Am J Med Genet A* 2004 ; 130 : 138-145.
15. Hasselbacher K, Wiggins RC, Matejas V, et al. Recessive missense mutations in *LAMB2* expand the clinical spectrum of *LAMB2*-associated disorders. *Kidney Int* 2006 ; 70 : 1008-1012.
16. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. Linkage of a gene causing familial focal segmental glomerulosclerosis to chromosome 11 and further evidence of genetic heterogeneity. *Genomics* 1999 ; 58 : 113-120.
17. Reiser J, Polu KR, Moller CC, et al. *TRPC6* is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet* 2005 ; 37 : 739-744.
18. Gudermann T. A new TRP to kidney disease. *Nat Genet* 2005 ; 37 : 663-664.
19. Huber TB, Schermer B, Muller RU, et al. Inaugural article : Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 17079-17086.
20. Kim JM, Wu H, Green G, et al. CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 2003 ; 300 : 1298-1300.
21. Wolf G, Stahl RA. CD2-associated protein and glomerular disease. *Lancet* 2003 ; 362 : 1746-1748.
22. Hinkes B, Mucha B, Vlangos C, et al. Genetic causes and clinical outcome of children manifesting with nephrotic syndrome in the first year of life : *NPHS1*, *NPHS2*, *WT1* and *LAMB2*. (Abstract) F-PO248, the Renal Week Annual Meeting of the American Society of Nephrology 2006.
23. Ruf RG, Schultheiss M, Lichtenberger A, et al. Prevalence of *WT1* mutations in a large cohort of patients with steroid-resistant and steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2004 ; 66 : 564-570.
24. Jeanpierre C, Denamur E, Henry I, et al. Identification of constitutional *WT1* mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database. *Am J Hum Genet* 1998 ; 62 : 824-833.
25. Sweeney E, Fryer A, Mountford R, et al. Nail patella syndrome : a review of the phenotype aided by developmental biology. *J Med Genet* 2003 ; 40 : 153-162.
26. Sato U, Kitanaka S, Sekine T, et al. Functional characterization of *LMX1B* mutations associated with nail-patella syndrome. *Pediatr Res* 2005 ; 57 : 783-788.
27. Miner JH, Morello R, Andrews KL, et al. Transcriptional induction of slit diaphragm genes by *Lmx1b* is required in podocyte differentiation. *J Clin Invest* 2002 ; 109 : 1065-1072.
28. Jansen JJ, Maassen JA, van der Woude FJ, et al. Mutation in mitochondrial *tRNA(Leu(UUR))* gene associated with progressive kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1997 ; 8 : 1118-1124.
29. Hotta O, Inoue CN, Miyabayashi S, et al. Clinical and pathologic features of focal segmental glomerulosclerosis with mitochondrial *tRNA(Leu(UUR))* gene mutation. *Kidney Int* 2001 ; 59 : 1236-1243.
30. Hattori M, Chikamoto H, Akioka Y, et al. A combined low-density lipoprotein apheresis and prednisone therapy for steroid-resistant primary focal segmental glomerulosclerosis in children. *Am J Kidney Dis* 2003 ; 42 : 1121-1130.
31. Weber S, Tonshoff B. Recurrence of focal-segmental glomerulosclerosis in children after renal transplantation : clinical and genetic aspects. *Transplantation* 2005 ; 80 : S128-134.
32. Ruf RG, Lichtenberg A, Karle SM, et al. Patients with mutations in *NPHS2* (podocin) do not respond to standard

steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2004 ; 15 : 722-732.

33. Vincenti F, Ghiggeri GM. New insights into the pathogenesis and the therapy of recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Transplant* 2005 ; 5 : 1179-1185.

用語解説

1. TRP(transient receptor potential)ファミリー

ショウジョウバエで最初に Trp チャンネルが同定されて以来、線虫から哺乳類に至るまで 50 以上のメンバーが見つかる多機能チャンネルの一大ファミリーである。脂質メッセンジャーのほか、温度、浸透圧、触覚などのさまざまな刺激により活性化される多機能、非選択性陽イオンチャンネルで、7つの亜群に大別される。その一つが標準的 (canonical) サブファミリーで TRPC 1~7 の 7つのメンバーから成る。このうち TRPC 3, 6, 7 は、イノシトールリン酸代謝産物であるジアシルグリセロールで活性化される共通点があり一亜群をなす。TRPC 6 チャンネルは、N, C 端が細胞内で、6個の細胞膜貫通部のうち 5, 6 番目の部分がチャンネル孔になり、ホモあるいはヘテロ 4 量体の複合体を構成する。FSGS 家系における変異は、TRPC6 の細胞内の N, C 端領域に同定されている。

2. ストマチン関連蛋白ファミリー

ストマチンは、遺伝性の口状赤血球症 (stomatocytosis) の赤血球において発現が低下している蛋白として同定された。電気泳動上のバンドの大きさにより Band 7.2b とも呼ばれている。ストマチンと高い相同性 (>50%) を持つ蛋白にはポドシン、MEC-2 があり、さらに低い相当性を有する flotillin, prohibitin, 細菌細胞膜蛋白 HflkK/C とともに SPFH スーパーファミリーをなす (Tavernarakis N. *Trend Biochem Sci* 1999 ; 24 : 425-427.)。これらの蛋白はヘアピンループ構造で細胞膜に会合し、N, C 端が細胞内に位置する特徴的な膜トポロジーを示す。自己重合する、複数の分子と結合能を有するなど、多機能蛋白としての特徴を持ち、細胞膜上の蛋白複合体の形成を促進する足場を提供する。

3. イノシトールリン脂質

ホルモンや神経伝達物質のなかには、イノシトールリン脂質分解産物を 2 次メッセンジャーとして活用し、多様な細胞反応を発揮するものがある。この場合、受容体刺激により、まずホスホリパーゼ C が細胞膜のホスファチジルイノシトール 2 リン酸 PI(4, 5)P2 を分解し、2 次メッセンジャーとして機能する 2 種類の脂質シグナル分子、イノシトール 1, 4, 5-3 リン酸 (IP3) とジアシルグリセロール (DAG) の産生を促す。さらに IP3 は小胞体からのカルシウム動員を促し、DAG はプロテインキナーゼ C を活性化して各種細胞応答を引き起こす。この

ようにホスホリパーゼ C 活性は、脂質代謝産物の量や PKC 活性の調節を通じてさまざまな生命機能を担っている。膜脂質シグナルを介する細胞機能調節には、イノシトールリン脂質分解産物をあくまで情報伝達的手段として利用し間接的に細胞機能に制御する系もあれば、イノシトールリン脂質そのものが直接アクチン細胞骨格、エンドサイトーシス、チャンネル活性機能を調節する系も明らかになっており、その機能は多岐に及ぶ。

4. 転写因子

細胞核内において、DNA の転写制御配列に結合し、細胞機能に必要な遺伝子群の転写を促進する蛋白で、ヒトゲノムのなかに 2,500 種存在するといわれている。DNA 結合領域のモチーフの 2 次構造より、ヘリックス-ターン-ヘリックス型 (ホメオドメイン転写因子を含む)、Zinc finger 型、ロイシンジッパー型、ヘリックス-ループ-ヘリックス型転写因子に分類されるホメオドメイン転写因子は、1980 年代にショウジョウバエの発育を制御する遺伝子群として同定された転写因子で、ショウジョウバエだけで 60 種以上、哺乳類においても同様に見つかる。ホメオドメインと呼ばれる 60 個のアミノ酸は、種を越えて保存されており、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフを構成して、標的 DNA に結合する。LMX1B は、ホメオドメイン転写因子の例に属す。一方、Zinc finger 型転写因子は DNA モチーフとしては最も多くみられるタイプである。亜鉛イオンに結合するヒスチジン、システインを含む 25 個程度のアミノ酸で構成されるループ状の Zinc finger モチーフの反復配列を介して、標的 DNA に結合する。WT1 やステロイドホルモン受容体は Zinc finger 型転写因子の代表例である。ヘリックス-ループ-ヘリックス型転写因子に属する Pod-1 欠損マウスで糸球体発育障害を呈することが知られている (Quaggin SE. *Development* 1999 ; 126 : 5771-5783.)。

5. ラフト

Simons らによって提唱されている新たな細胞膜脂質ドメインに関する概念 (Simons K. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000 ; 1 : 31-39.)。従来、細胞膜中の分子はリン脂質から構成される均一な脂質二重層の平面上に均一に分布するとされてきた (Singer and Nicolson 流動モザイクモデル)。これに対し、ラフト仮説では、シグナル分子が、スフィンゴ脂質やコレステロールから構成される特殊な脂質組成を持つマイクロドメインに特異的に局在すると考える。このラフト領域は、脂質二重層のなかで島状に散在し、流動的に融合・分離することによりシグナル伝達、細胞膜輸送などの細胞機能を媒介する (ラフト = “いかだ” の意味)。古典的にラフトは、4°C 下に非イオン性界面活性剤である triton-X で処理した不溶性成分を超遠心で浮遊させる、生化学的手法により検出される。最近、顕微鏡下でラフトを可視化する試みがなされているが、大きさが 10~200 nm と光学顕微鏡の感度以下であるとする説が有力で、ラフト

蛋白を抗体でクロスリンクして大きなパッチとして可視化することが一般的である。スリット膜蛋白の多くが、ラフトに存在することがわかっている。

6. MEC-2

1995年に線虫研究者であるChalfieらは、触覚刺激を関知しない触覚不感変異体線虫を網羅的にスクリーニングし、Mechanosensingに関与することに由来してmecと命名した(Huang M. Nature 1995; 378:292-295.)。その一つであるmec-2変異体は、MEC-2変異が原因である。MEC-2はポドシンと42%程度のアミノ酸同一性を保持し、同じストマチン様蛋白ファミリーに属する。細胞膜上において、触覚を伝達する上皮型Naチャンネル(ENaC)のサブユニットと機能すると考えられている。

7. Haploinsufficiency

変異のキャリアー(ヘテロ接合体の状態)において、疾患遺伝子の機能が、片方の残存正常アレル(相同染色体のもう一方)で代償されず、機能不全を呈すること。疾患遺伝子が正常機能を発揮するためには50%以上の遺伝子発現量を必要とすることを意味し、変異アレルは優性遺伝の遺伝様式をとる。これに対し劣性遺伝子のキャリアーは、遺伝子機能が50%になっても代償され、機能不全は生じない(無症候性キャリアー)。

8. ホモ接合体マッピング

1987年、Landerらによって考案された、近親婚を有する劣性家系の遺伝子マッピング法(Lander ES, et al. Science 1987; 236:1567-1570.)。近親婚家系内の患者では、同一祖先に生じた共通の疾患遺伝子領域がホモ接合体として観察されること(創始者効果)を指標に、疾患遺伝子の位置を決定する。