

特集：ネフローゼ症候群

# 糸球体上皮細胞障害機序の解明 —小胞体ストレスの観点から—

楊 國昌

## はじめに

硬化性病変を基盤とする糸球体障害の進行過程に、その原病の如何に関わらず、糸球体上皮細胞(以下、ポドサイト)障害が重要な位置を占めることが明らかになりつつある。しかし、そのポドサイト障害の実体、病因についての明確な証拠を示すことはいまだなされていない。ところが最近、小胞体ストレス(endoplasmic reticulum stress: ER stress)という概念が、神経疾患や循環器疾患、悪性腫瘍の領域で提唱されてきている。これは、ER内での蛋白合成系の異常というミクロレベル(細胞内小器官)の現象と、各疾患のフェノタイプ(臨床症状)の発現、すなわちマクロレベルの現象(臓器障害)とをクロストークさせることができると実に魅力的な概念と言える。腎糸球体疾患の病因に関するER stressの関与の可能性については、最近、われわれを含めていくつかのグループが提唱してきた<sup>1-4)</sup>。

本稿ではまず、現在理解されているER stressの概念について解説する。次に、ポドサイト障害を蛋白尿というキーワードに置き換えて、ER stressにより惹起される蛋白尿発現の病態の可能性を、スリット膜主要構造蛋白・ネフリンの細胞内 trafficking の制御系を解析することにより考察する。

## ER stress と ER quality control system

### 1. ER stress の定義

ERは蛋白質と脂質の生合成において中心的役割を担う。特に、ERを含めたゴルジ体、エンドソーム、リソソーム、細胞膜などの細胞内小器官を構成する膜貫通蛋白

*The role of the endoplasmic reticulum stress in podocyte injury*

杏林大学医学部小児科

の合成はすべてER膜で行われる。また、細胞外すなわち基底膜や液相中に存在する免疫グロブリンやラミンなどの分泌性蛋白の半数以上も、同様にERで合成される。これらER内で合成された蛋白は、mRNAの翻訳と同時に(co-translationally)、あるいは翻訳後に(posttranslationally)行われる多くの修飾システムとの共同作業により、ERを出てゴルジ体へ輸送され、そこで更なる修飾を受けた後に、各分子の適切な最終機能発現の場への到達が可能になる。この各オルガネラ間の輸送は分泌小胞によりなされ、この全体の輸送システムをいわゆる classical secretary pathway という。一方、例えば、最近われわれが nephrin の extracellular ligand であることを見出した糖鎖結合蛋白である galectin 群<sup>5)</sup>は、この輸送経路に依存せず、リソソームで合成された後、細胞質へ移動し細胞外へ分泌されるが、その詳細は解明されていない。いずれにせよ、ER内の蛋白合成およびその修飾システムには、各蛋白の折りたたみを担うERシャペロン分子群の存在と、その分子機能の発現に必要なカルシウム、ATP、糖(特にグルコース)など多くの補助分子間の共同作業が必須である。このERに果たされた蛋白合成の需要度(要求度)にその合成能力が追いつかない状態がER stressと定義される。

### 2. ER stress inducer と ER quality control system の意義

上述のような精緻なER内での蛋白の折りたたみ機構は、ER内の遺伝子変異によるミュータント蛋白の存在、ATP欠乏、グルコース欠乏、レドックスやカルシウムのホメオステシスの不均衡など、いわゆるER stress inducerにより容易に破綻する(図1)<sup>6)</sup>。この破綻により最もER stressの影響を受けやすい蛋白分子は糖蛋白である。糖蛋白は糖質が蛋白質に共有結合した生体高分子であり、動物細胞で合成される蛋白質のうち約50%を占め、ほとんどの分泌性蛋白や膜蛋白はこの糖蛋白と考えられる。現

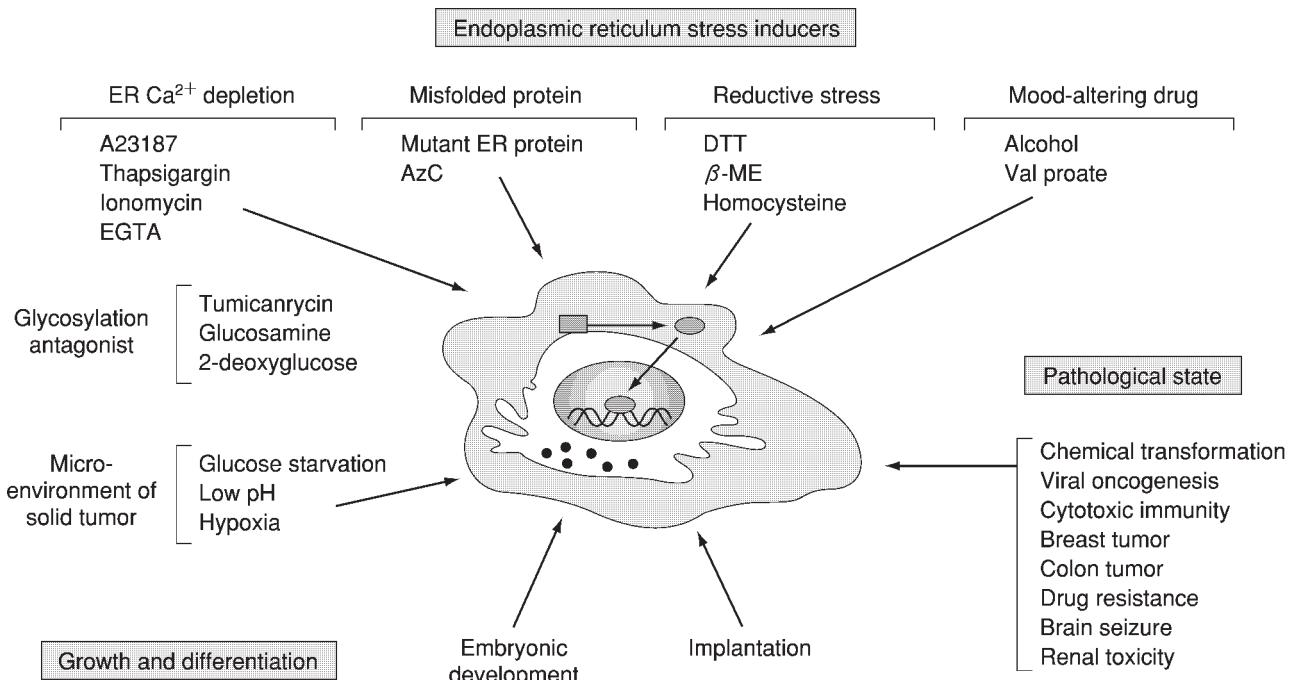


図 1

在、糖蛋白は *N*-結合型(Asn 結合型)と *O*-結合型(Ser 結合型)の 2 種類に分類されているが、*O*-結合型の糖鎖結合様式の詳細はいまだ明らかではない。

*N*-結合型糖鎖修飾は、ER 膜内腔に存在する 14 糖の基本オリゴ糖(Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>)が膜結合型リボソームで翻訳され、ER 内腔に伸張してきた新生ポリペプチドの特異的アミノ酸配列部位(Asn-X-Ser/Thr; X は Pro 以外のアミノ酸)の AsnNH<sub>2</sub> 基に転移されることから始まる。この基本オリゴ糖転移過程はすべての *N*-結合型糖鎖に共通である。しかし、このような特異的 AsnNH<sub>2</sub> 基のすべてに糖鎖が転移するわけではなく、実際に糖鎖付加を受けるのはそのうちの約 30 %と考えられている<sup>7)</sup>。基本オリゴ糖の転移を受けたコア蛋白は、ER 内のグルコシダーゼによりそのオリゴ糖部位の 2 個のグルコースが切断され Glc<sub>1</sub> Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> になる。この末端側にある 1 個のグルコースに ER 内膜および内腔に存在する ER シャペロンであるカルネキシン(CNX)/カルレティクリン(CRT)が結合し、ATP 依存性にその蛋白質フォールディング(シャペロン)機能を発揮する(図 2)<sup>8)</sup>。正常に折りたたまれた蛋白は、その後さらにグルコシダーゼとマンノシダーゼによりグルコースとマンノースが 1 個ずつ切断され、漸くゴルジ体へ小胞輸送され、最終的な目的地すなわち細胞膜や細胞外へ輸送される。一方、正しい立体構造を取らない misfolded protein はグルコースを切断された後に、UDP-グルコ-

ス転移酵素により 1 個のグルコースを再び転移された後に CNX/CRT 系に戻り、矯正可能であれば本来の最終目的地へ輸送される。もし矯正に耐えることができなければ一方のシャペロン glucose regulated protein78(GRP78)にトラップされ細胞質内へ排出され分解過程に輸送される(ER associated degradation)。大部分の ER stress inducer によりこの GRP78 の upregulation がみられることから、現在、GRP78 は ER stress の主要マーカーとされている(図 3)。

一方、一度 ER 内に misfolded protein が貯まると、その処理が完了するまではリボソームレベルでの mRNA の翻訳を抑制し、蛋白合成という ER の仕事量(負荷量)を減少させる、いわば ER survival ひいては cell survival の反応(unfolded protein response)が始動する。このように、ER 内では適切な蛋白の折りたたみ機能を常に維持することにより misfolded protein を貯め込まない機構が働いており、この過程には糖鎖合成系、糖鎖転移酵素系、糖鎖切断酵素系、さらにこの糖鎖、特にグルコースをセンサーとする ER シャペロン系も相まつたきわめて精緻な機構が存在している。これを蛋白質フォールディングの品質管理機構(ER quality control system)と呼ぶ<sup>8,9)</sup>。重要なことは、unfolded protein response あるいは ER stress という現象はいまだ可逆性の変化であり、何らかの救済措置が得られれば正常の細胞(ER)内環境に回復できることである。不可逆性に陥った場合にはアポトーシスの系へ誘導される。

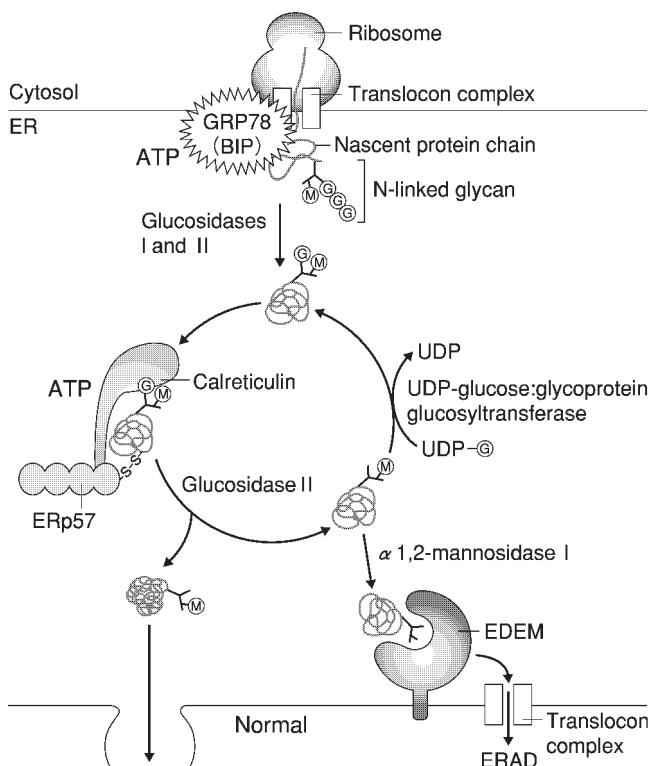


図 2

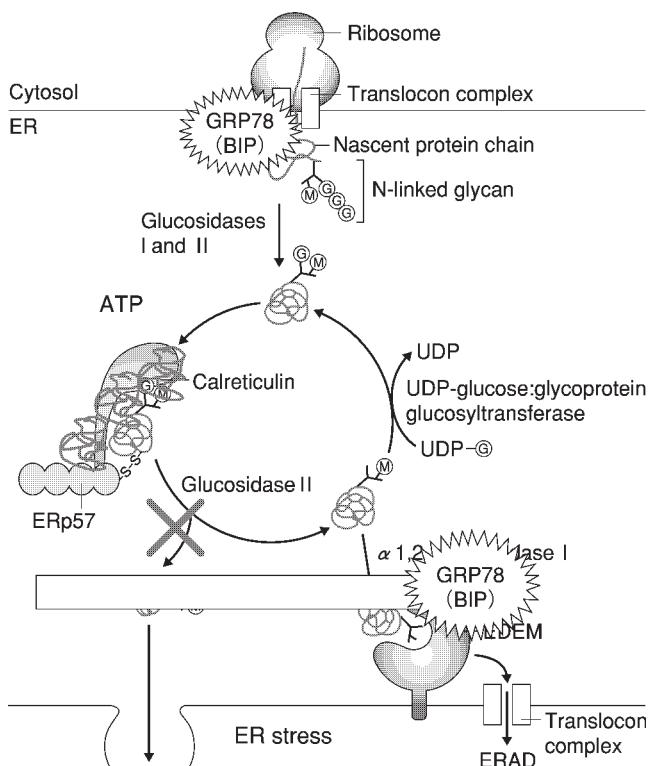


図 3

### ポドサイトのエネルギー産生系の障害による N-結合型糖膜蛋白(neprin・ $\beta$ 1-integrin)の 糖鎖付加障害

#### 1. Neprin と $\beta$ 1-integrin の細胞内輸送における N-結合型糖鎖の役割

上述のように、N-結合型糖膜蛋白の輸送システムが ER quality control system により制御されていることは明らかであるが、その糖鎖修飾が障害されても本来の細胞内輸送系に影響を受けない分子も数多く知られている<sup>10~12)</sup>。ネフリンについてわれわれは、ヒトネフリンを human embryonic kidney cell (HEK 細胞)に強制発現させた株化細胞に N-結合型オリゴ糖転移阻害剤(tunicamycin)を加えた系を樹立し、糖鎖の付加されない core ネフリンだけでは ER からゴルジ体への輸送が完全に阻害されることを明らかにした<sup>13)</sup>。すなわち、スリット膜構築というネフリンの分子機能の発現には、ポドサイト足突起細胞でのネフリンの膜貫通という機序が必須であることから、ネフリンの蛋白機能発現において N-結合型糖鎖が重要な役割を果たすことが判明した。ネフリンの細胞外ドメインのアミノ酸シーケンスには、10 カ所の N-結合型糖鎖結合可能部位

が存在する。最近、共同研究者の Khoshnoodi (Vanderbilt University Medical Center) が、リコンビナントネフリンとマススペクトロメトリーを用いて、9 カ所の結合可能部位に N 型糖鎖が結合すること、その糖終末部位は高マンノース、シアル酸、 $\beta$ -D-ガラクトースで構成される複合糖鎖であることを明らかにした<sup>14)</sup>。ここで重要なことは、HEK 細胞や培養環境下でネフリンを喪失したマウスポドサイトおよびヒトポドサイトにヒトネフリンを遺伝子導入すると、ヒト単離糸球体と同様に 2 種類の分子量のネフリンが同定されることである。このうち、分子量の小さい約 175 kDa ネフリンは糸球体を含めすべての材料で同様に認められるが、大きい分子量のネフリンは、ヒト単離糸球体とヒトポドサイトで 200 kDa、マウスポドサイトで 190 kDa、HEK 細胞で 185 kDa と異なり、これは各細胞における糖鎖修飾過程の違いによるものであることが明らかである<sup>13)</sup>。このなかで大きい分子量のネフリンは細胞膜、小さい分子量のそれは ER のネフリンと考えられるが、糸球体においても ER のネフリンが存在することは、*in vivo*においてもネフリンの合成・分解や細胞内輸送系が実際はダイナミックである可能性を示唆している。

では、生理的条件下ではいかなるネフリンの N-糖鎖付加障害が考えられるであろうか。図 1 に示したような多く

の ER stress inducer が存在するなかで、われわれはまずネフリン発現細胞に、この中の細胞内グルコース欠乏による ER stress を与えてネフリンの trafficking system を解析した<sup>1)</sup>。細胞内グルコースの低下は、糖鎖含量の減少した約 155 kDa の低グリコシル化体として同定された。この低グリコシル化ネフリンは、CRT との結合体として ER 内に停滞し、細胞膜への集合は完全に阻害された。種々の検討から、この ER 停滞の機序は、材料であるグルコース欠乏によるミトコンドリアでのエネルギー産生障害(ATP 産生障害)が原因となった CNX/CRT 系のシャペロン機能不全が、ネフリンの折りたたみ障害を惹起したと考えられた。これにより、unfolded nephrin は ER からの出向ができず、ゴルジ体での最終的な糖鎖付加を受けることができなかつたわけである。

このような現象は、実は  $\beta 1$ -integrin についても認められる。ネフリンと同様に、 $\beta 1$ -integrin でも 2 つの isoform がみられ、これもやはり糖鎖修飾の違いであることが判明している<sup>15)</sup>。 $\beta 1$ -integrin は、ポドサイト足突起細胞膜の基底膜側に貫通し、その結合リガンドであるラミニンと基底膜において結合することにより、ポドサイト接着を維持している重要な N 型糖蛋白である。ヒトポドサイト株化細胞はこの分子を野生型として維持しているが、このポドサイトを同様に低グルコース条件で培養すると、大きい分子(細胞膜型)の isoform が減少し、小さい分子(ER 型)が消失し、代わりに分子量の小さい低グリコシル化体の強い発現が誘導される<sup>2)</sup>。すなわち、これらの分子量の変化はネフリンのそれと全く同様であった。これらのことから、ポドサイト内のグルコースの低下による糖鎖付加障害は、ネフリンと  $\beta 1$ -integrin に特異的な現象ではなく、neph1/2, FAT1/2, dystroglycan やラミニンなど、他のポドサイト関連 N 型糖蛋白においても存在する可能性がきわめて高い。

## 2. ポドサイトエネルギー制御系とネフリンの細胞内輸送

前述のように、低グルコース条件がミトコンドリアでの ATP 産生を減少させることは明らかである。しかし、この ATP 欠乏が実際のポドサイト障害の本体の一つになりうるであろうか。そうならば、ネフリンの trafficking 異常を惹起するポドサイト内 ATP 欠乏の責任部位(系)は、実際にミトコンドリア(だけ)なのであろうか。また、ほかにエネルギー系の維持に関与する分子は何であろうか。この疑問を解く鍵として、ポドサイト内 ATP 欠乏→ネフリン糖鎖化障害→スリット膜発現低下→蛋白尿というストーリーに、われわれが蛋白尿を消失させるために通常使用し

ている薬剤の作用機序をクロストークさせることができれば、逆説的に ATP 産生障害のポドサイト内部が判明する可能性がある。

グルココルチコイドは過去 40 年以上にわたり、特にネフローゼ症候群患者の高度蛋白尿の救済を目的に使用されてきたが、その薬理作用機序はいまだ解明されていない。われわれは、その受容体(グルココルチコイド受容体)とグルココルチコイド不活化酵素  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 がポドサイトに存在し、おのの蛋白機能の発現を行うことを明らかにした<sup>16,17)</sup>。これらのこととは、グルココルチコイドはポドサイトに直接的な薬理作用を及ぼすことを示唆する。そこで、前述のグルコース欠乏により誘導された低糖鎖化ネフリンにデキサメタゾンを加えた系で検討した。驚いたことに、デキサメタゾンは低糖鎖化ネフリンの誘導を阻止し、本来の ER 型ネフリンの発現と細胞膜型ネフリンの回復を部分的に誘導できた。このデキサメタゾンの作用は、ミトコンドリアのグルココルチコイド受容体を介した ATP 合成酵素などのミトコンドリア DNA および蛋白レベルの upregulation が、結果的に細胞内 ATP 産生を促進させたことによるものであることが判明した<sup>1)</sup>。さらに、同様の系についてミゾリビンの効果を検討した。興味深いことに、ミゾリビンは細胞膜型ネフリンの回復をほぼ完全に誘導した<sup>2)</sup>。しかし、この効果はミトコンドリアへの作用によるものではなく、細胞質内の核酸(プリン)代謝系酵素 inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (IMPDH) への競合阻害による二次的な ATP 産生の亢進作用によるものであることが明らかになった<sup>2)</sup>。重要なことは、この ATP 産生促進効果は細胞内 ATP が低下している状態でのみ有効だということである。また、マウスポドサイトには IMPDH type 1 と type 2 の両方があり、エネルギー低下によりその mRNA の発現が変わり、これにミゾリビンが作用することも判明した<sup>2)</sup>。

以上の結果から得られる逆説的考察は、ポドサイトのエネルギー代謝系は、現時点ではミトコンドリアでの呼吸鎖系と細胞質でのプリン代謝系に大別して考える必要があるということである。しかし、実際の疾患において細胞内のグルコースそのものが劇的に減少することはきわめて考えにくい。むしろ、虚血(低酸素)やウイルス感染などによるミトコンドリアダメージによる二次的 ATP 産生低下のほうが考えやすい。さらには、プリン代謝系を構築する多くの酵素群の発現異常も可能性がある。実際にネフローゼ症候群のラットモデルを誘導する puromycin aminonucleoside は、プリン代謝系に作用することが知られている<sup>18)</sup>。

われわれは、このラットのネフローゼ期の糸球体内ネフリンに正常ではみられない低分子量ネフリンを同定し、その局在は強発現している GRP78 と同様に ER であることを確認した<sup>2)</sup>。したがって、puromycin aminonucleoside の蛋白尿の成因は、ポドサイト内のプリン代謝系の機能不全による ATP 減少がネフリンなどのポドサイト膜・分泌蛋白の糖鎖化障害を惹起し、ER stress を誘導したことによる可能性が強い。

### おわりに

ER stress の観点からのポドサイト障害の病態の推測を試みた。ポドサイト内 ATP 産生障害と蛋白尿のクロストークを考えた場合、ミトコンドリア腎症は実に参考になるモデルである。一方、後天性ネフローゼ症候群を考えた場合、その ATP 産生障害の原因はおそらく多様である。ER stress や ATP 産生障害はポドサイト障害の原因だけではなく結果でもあることを強調したい。その inducer が本当のポドサイト障害惹起因子である。

### 文 献

1. Fujii Y, Khoshnoodi J, Takenaka H, Hosoyamada M, Nakajo A, Bessho F, Kudo A, Takahashi S, Arimura Y, Yamada A, Nagasawa T, Ruotsalainen V, Tryggvason K, Lee AS, Yan K. The effect of dexamethasone on defective nephrin transport caused by ER stress : A potential mechanism for the therapeutic action of glucocorticoids in the acquired glomerular diseases. *Kidney Int* 2006 ; 69 : 1350–1359.
2. Nakajo A, Khoshnoodi J, Takenaka H, Hagiwara E, Watanabe T, Kawakami H, Bessho F, Takahashi S, Swiatecka-Urban A, Tryggvason K, Yan K. Mizoribine corrects nephrin biogenesis by restoring intracellular energy balance. *J Am Soc Nephrol* (in revision)
3. Inagi R, Nangaku M, Onogi H, Ueyama H, Kitao Y, Nakazato K, Ogawa S, Kurokawa K, Couser WG, Miyata T. Involvement of endoplasmic reticulum(ER) stress in podocyte injury induced by excessive protein accumulation. *Kidney Int* 2005 ; 68 : 2639–2650.
4. Cybulsky AV, Takano T, Papillon J, Bijian K. Role of the endoplasmic reticulum unfolded protein response in glomerular epithelial cell injury. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 24396–24403.
5. Shimizu M, Khoshnoodi J, Akimoto Y, Kawakami H, Hirano H, Hosoyamada M, Higashihara E, Bessho F, Sekine Y, Kurayama R, Hirabayashi J, Kasai K, Tryggvason K, Yan K. Direct galectin-1 and nephrin interaction at the slit diaphragm triggers an intracellular signaling through activation of ERK. Submitted
6. Lee AS. The glucose-regulated proteins : stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci* 2001 ; 26 : 504–510.
7. Parodi AJ. Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* 2000 ; 69 : 69–93.
8. Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003 ; 4 : 181–191.
9. Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. Posttranslational quality control : folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 1999 ; 286 : 1888–1893.
10. Samih N, Hovsepian S, Notel F, Prorok M, Zattara-Cannoni H, Mathieu S, Lombardo D, Fayet G, El-Battari A. The impact of N- and O-glycosylation on the functions of Glut-1 transporter in human thyroid anaplastic cells. *Biochim Biophys Acta* 2003 ; 1621 : 92–101.
11. Karpa KD, Lidow MS, Pickering MT, Levenson R, Bergson C. N-linked glycosylation is required for plasma membrane localization of D5, but not D1, dopamine receptors in transfected mammalian cells. *Mol Pharmacol* 1999 ; 56 : 1071–1078.
12. Leconte I, Carpentier JL, Clauser E. The functions of the human insulin receptor are affected in different ways by mutation of each of the four N-glycosylation sites in the beta subunit. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 18062–18071.
13. Yan K, Khoshnoodi J, Ruotsalainen V, Tryggvason K. N-linked glycosylation is critical for the plasma membrane localization of nephrin. *J Am Soc Nephrol* 2002 ; 13 : 1385–1389.
14. Khoshnoodi J, Hill S, Tryggvason K, Hudson B, Friedman DB. Identification of N-linked glycosylation sites in human nephrin using mass spectrometry. *J Mass Spectrom* (in press)
15. Bellis SL. Variant glycosylation : an underappreciated regulatory mechanism for beta1 integrins. *Biochim Biophys Acta* 2004 ; 1663 : 52–60.
16. Kataoka S, Kudo A, Hirano H, Kawakami H, Kawano T, Higashihara E, Tanaka H, Delarue F, Sraer JD, Mune T, Krozowski ZS, Yan K. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is expressed in the human kidney glomerulus. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 ; 87 : 877–882.
17. Yan K, Kudo A, Hirano H, Watanabe T, Tasaka T, Kataoka S, Nakajima N, Nishibori Y, Shibata T, Kohsaka T, Higashihara E, Tanaka H, Watanabe H, Nagasawa T, Awa S. Subcellular localization of glucocorticoid receptor protein in the human kidney glomerulus. *Kidney Int* 1999 ; 56 : 65–73.
18. Diamond JR, Bonventre JV, Karnovsky MJ. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1986 ; 29 : 478–483.