

特集：腎臓学この一年の進歩

腎疾患の基礎研究

Basic research advances 2012

柳田 素子

Motoko YANAGITA

はじめに

2012 年は腎臓病学にとりわけ大きな進展があった 1 年である。

生命科学はこれまで「複雑な生命現象を単純な素過程に分解し、それを構成する要素を理解する」還元的アプローチと、「その要素を組み合わせて、現象を再構成する」構成的アプローチにより急速に発展してきた。その方法論をわれわれの領域にあてはめると、構成要素である液性因子や細胞のふるまいを理解し、素過程である糸球体硬化や尿細管障害、炎症や線維化といった現象を再構成することが、慢性腎臓病に対する理解を深めると期待される。2012 年はその構成要素および素過程への理解が深まり、それを基に新しい概念が提唱された年であり、基礎研究の発見が臨床家の長年の謎に応えた年でもあった。

本稿ではこの 1 年の進歩を基礎研究の立場から概説する。

CKD の可逆性

ここ数年で最も大きな注目を集めた腎臓病関連の論文とえば、進展した CKD の回復の可能性を示した Bardoxolone methyl に関する論文であろう。2011 年の報告ではあるが、2 型糖尿病に関連する CKD (eGFR が 20~45 mL/min/1.73 m²) の成人患者 227 例に対して経口薬 Bardoxolone methyl を投与したところ、24 週時点での eGFR がプラセボ群と比して有意に高く、その上昇は 52 週まで維持された¹⁾。

Bardoxolone methyl が腎機能を回復させるメカニズム

は、転写因子 Nrf 2 を活性化することで炎症および酸化ストレスを軽減させることと考えられている。Zheng らは、2 種類の Nrf 2 活性化薬を STZ 糖尿病モデルマウスに投与し、糖尿病のプロファイルおよび尿中アルブミン排泄や糸球体肥大が解消すること、Nrf 2 欠損マウスではその効果がみられないことを証明している²⁾。

一方、Bardoxolone methyl を投与された症例では、腎機能の改善とは裏腹にアルブミン尿の増加が報告され懸念されていた。Reisman らは Bardoxolone methyl をカニクイザルに投与し、同薬剤が尿細管でアルブミン再吸収を行うメガリンの発現低下をきたすこと、アルブミン尿の増加はその結果であり、腎障害の悪化を示すものではないことを示した³⁾。

新しい AKI モデルの解析

2012 年は古典的な AKI モデルに加えて、新しい AKI モデルでも解析が進められた。

Myeloma kidney/cast nephropathy は骨髓腫の主たる合併症であり、ときに AKI に至ることもある。Immunoglobulin free light chain (FLC) は糸球体で濾過された後に近位尿細管で再吸収されるが、大量に産生・排泄される場合には遠位ネフロンに到達し、そこで Tamm-Horsfall glycoprotein (THP) と結合して円柱形成することでネフロンを閉塞する。従来 cast nephropathy の治療法は骨髓腫の治療によって FLC の産生を減らすことであったが、Ying らは FLC と THP の結合部位を明らかにし、その結合を阻害するような合成ペプチドを cast nephropathy モデルに投与すると円柱形成と腎機能低下が抑制されることを証明した⁴⁾。この報告は、骨髓腫の治療反応性に依存しない新たな治療の可能性を示している⁵⁾。

敗血症に関連する AKI に関しても進展があった。重症の敗血症では約半数で AKI に陥ること、敗血症と AKI を合併すると敗血症のみの場合に比して致死率が倍加することが知られているが、いまだ有効な治療法は報告されていない。2011 年の報告ではあるが、Tran らは、敗血症に伴う AKI ではミトコンドリア機能が低下し、酸化リン酸化にかかわる遺伝子の発現が低下していることを報告した。特にミトコンドリア新生や代謝に重要な役割を果たす PGC-1 α は、腎機能低下に伴ってその発現が低下し、PGC-1 α 欠損マウスでは敗血症による腎機能低下が遷延することを報告している。PGC-1 α の活性化は敗血症による AKI からの回復を促進する可能性があり、治療への応用が期待される⁶⁾。

腎臓病におけるミトコンドリアは今後さらに注目されると思われるが、Hall らは、本年、多光子レーザー顕微鏡を用いて AKI に伴う近位尿細管のミトコンドリアの形態・機能変化をリアルタイムに可視化することに成功した⁷⁾。

AKI の診断にはさまざまなバイオマーカーの有用性が示されてきたが、画像診断には大きな進展がみられていなかった。Clatworthy らは、2012 年、¹³C magnetic resonance spectroscopic imaging (MRSI) を用いて非侵襲的に急性尿細管壊死 (ATN) を急性腎炎と区別し、早期に診断可能であることを報告している⁸⁾。

Podocyte biology の進歩

近年のポドサイトに関する研究の進展は目覚ましいが、この 1 年も重要な知見が立て続けに報告された。

ポドサイトは終末分化した細胞であり、増殖・再生しないと考えられていたが、HIV 関連腎症などで観察される collapsing glomerulopathy では例外的にポドサイトの増殖が認められる。Shkreli らは、テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) を過剰発現するとポドサイトが細胞周期に入り、collapsing glomerulopathy に類似した糸球体の形態を呈すること、Wnt シグナルを抑制するか、または TERT を発現抑制すると、いったん細胞周期に入ったポドサイトが周期から出て再分化することを報告している。この報告はポドサイトの可塑性を示すとともに、collapsing glomerulopathy の治療の可能性を示した画期的な報告である⁹⁾。

一方 Jin らは、VEGF 受容体 FLT の可溶性 sFLT がポドサイトのガングリオシド GM3 に結合し、オートクラインに働くことで細胞内シグナルを活性化し、ポドサイトのアクチン再構成を制御していることを報告した。このシグナ

ルがないとポドサイトの形態が維持されず、蛋白尿の原因になる¹⁰⁾。

AKI の項でもミトコンドリアの重要性について触れたが、ポドサイト研究でもミトコンドリアの重要性が注目された。高血糖下ではミトコンドリアの reactive oxygen species (ROS) 産生が増加し、ミトコンドリア機能障害がアポトーシスを誘導すると考えられているが、それらの現象を繋ぐシグナルは明らかにされていなかった。Wang らは、糖尿病性腎症モデルではポドサイトのミトコンドリアが断片化していること、この断片化は Rho A のエフェクターである ROCK1 が Drp1 のリン酸化を介して誘導するものであることを証明した¹¹⁾。

近年、ボウマン嚢上皮 (parietal epithelial cell : PEC) がポドサイトのリザーバーとして働くという説が注目を集めている。Moeller らは以前より PEC の系譜追跡を行い、同細胞が急速進行性糸球体腎炎モデルの半月体や巣状糸球体硬化症の硬化部位の形成に重要な役割を果たすことを示してきた¹²⁾。同グループの Sicking らは、2012 年、PEC の一部に細胞死を誘導すると残った PEC が増殖し、半月体を形成することを証明した¹³⁾。

糸球体バリア構造の可視化がもたらすもの

近年のイメージング技術の発展は目覚ましく、この技術を用いて従来の仮説やモデルを検証する試みが始まっている。

2010 年、スリット膜の構造が高感度走査電顕によって可視化され、従来想定されていたようなジッパー状の構造ではなく、有孔性の構造であることが報告された¹⁴⁾ ことはいまだに記憶に新しいが、本年は初めてポドサイトの足突起の一つ一つまでもが可視化された¹⁵⁾。今後本システムを用いて足突起維持メカニズムに関する更なる発展が期待できる。

イメージング技術は定量的な解析にも耐えるようになってきた。腎臓病では尿中アンジオテンシノーゲン排泄が増加するが、これが循環血中のアンジオテンシノーゲンの濾過排泄によるのか、尿細管からの分泌によるのかは明らかでなかった。Nakano らは、多光子レーザー顕微鏡を用いて糸球体で濾過されるアンジオテンシノーゲンはわずかであり、尿細管からの分泌が主体であることを証明した¹⁶⁾。

さらに 2011 年の仕事ではあるが、2 つのグループより、ポドサイトのプロレニン受容体がオートファジーとライソゾームの pH 調節を介してポドサイトの機能・形態維持に

重要な役割を果たしていることが報告された^{17,18)}。

線維化の起源ときっかけ、その制御因子

線維化をきたす細胞の由来については長年議論があったが、われわれは2011年、胎生期に胎児腎に移入する細胞が線維芽細胞とエリスロポエチン(EPO)産生細胞へと分化すること、その細胞が腎臓病の過程で、EPO産生能が低下し、細胞外マトリックスを産生する形質に転換することが腎性貧血と線維化の原因であることを明らかにした¹⁹⁾。さらにわれわれは、その形質転換は選択的エストロゲン受容体調節薬(selective estrogen receptor modulator: SERM)投与である程度回復可能であることを証明した。

2012年、Grgicらはネフロン上皮にジフテリア毒素受容体を発現させるマウスを作製し、少量のジフテリア毒素を繰り返し投与することで近位尿管障害を惹起できること、その結果、線維芽細胞の形質転換が誘導されることを証明した²⁰⁾。この論文は線維芽細胞の形質転換のきっかけを明らかにした点で優れている。

Jinらは、システムバイオロジーの手法を用いて線維化に重要な役割を果たすHIPK2(homeo-domain interacting protein kinase 2)を同定した²¹⁾。彼らは間質の線維化と糸球体硬化を呈するHIVトランスジェニックマウス(Tg26)と野生型マウスの遺伝子発現比較を行い、発現が変化している遺伝子群の上流に想定される転写因子を同定、さらにそれらをリン酸化するキナーゼとしてHIPK2を同定した。HIPK2はTg26マウスの腎臓やヒト腎臓病で発現増加している。HIVに感染すると酸化ストレスが誘導され、HIPK2の分解が抑制されることによって蛋白が蓄積する。さらにわれわれは、HIPK2がさまざまな経路を介して尿管上皮のアポトーシスや脱分化を促進すること、HIPK2欠損Tg26マウスでは腎機能低下、蛋白尿、線維化が軽減されることを証明した。

新たな疾患関連遺伝子の同定

1. ポドサイトと基底膜をつなぐインテグリンへの注目
巣状分節性糸球体硬化症(FSGS)は移植後も再発することから、何らかの液性因子が病因にかかわっていると考えられてきた。2011年Weiらは、原発性FSGS患者の2/3で血中可溶性ウロキナーゼ受容体(soluble urokinase receptor: suPAR)濃度が上昇していること、移植前に血中suPARが高値であることが移植後のFSGS再発のリスクとなること

を報告した。さらに、高濃度の血中suPARは単なるマーカーではなく、ポドサイトと糸球体基底膜をつなぐβ3インテグリンを活性化することで足突起融合、蛋白尿およびFSGS様の病変を惹起することを証明した。この結果は、血漿交換によるsuPARの低下の治療効果や、suPARおよびβ3インテグリンを標的とした薬剤の可能性を示したものであり、今後の展開が期待される²²⁾。本報告は、ポドサイトと基底膜をつなぐシグナルの重要性を示した点でも意義深い。

2012年にも引き続き、ポドサイトと基底膜をつなぐインテグリンの変異が報告され、大きな注目を集めた。Hasらはインテグリンα3変異によるネフローゼ症候群、間質性肺炎と表皮水疱症を呈する新たな先天性疾患を報告した²³⁾。Nicolaouらは、インテグリンα3変異によるネフローゼ症候群と間質性肺炎を伴う症例を報告し、その遺伝子変異がインテグリンα3に新たな糖鎖修飾を付与することでインテグリンβ1との二量体形成を妨げることで、その結果α3がユビキチン化され分解されることを報告した²⁴⁾。同グループは、テトラスパニンCD151がインテグリンα3β1を介したポドサイトと基底膜の接着を増強していること、ポドサイト特異的CD151欠損マウスでは糸球体硬化をきたすが、その病像は血圧によって大きく影響されることも報告している²⁵⁾。インテグリンを介したポドサイトと基底膜の相互作用には今後も注目が集まると期待される。

2. DNA damage response: DDR 経路への注目

2012年は間質性腎炎に関する新しい遺伝子異常も報告された。Karyomegalic interstitial nephritis (KIN)は稀な遺伝性の尿管間質性腎炎で、その特徴はネフロン癆に類似しているが、巨大核が散見される点が異なっている。Zhouらは、KINのエキソーム解析によってFAN1遺伝子の変異を同定した。FAN1はヌクレアーゼ活性を有し、ファンコニー貧血DNA損傷応答(DNA damage response: DDR)経路においてDNAの二重鎖間架橋(interstrand cross-link: ICL)を修復する過程にかかわっており、FAN1遺伝子変異を持つ患者の細胞はマイトマイシンCなどのICL誘導薬に感受性が高いことが明らかになった。さらにわれわれは、*fan1*遺伝子をゼブラフィッシュでノックダウンするとDDRとアポトーシスが増加し、腎嚢胞を形成することを証明した。腎臓はさまざまな毒物に曝される解毒臓器でもあるが、今回の知見は、遺伝子毒性を発揮するような薬物への曝露や不十分なDNA修復が腎線維化やCKDの発症に関与することを示した画期的な報告である²⁶⁾。

2012年はネフロン癆の新たな遺伝子異常がDDR異常を

きたすことも報告された。Chaki らは、ホモ接合体マッピングと全エクソーム resequencing 法を組み合わせることでネフロン癆関連繊維毛病の原因遺伝子 *MRE11*, *ZNF423*, *CEP164* を同定した²⁷⁾。これらの遺伝子はすべて DDR 経路で働き、*ZNF423*, *CEP164* をノックダウンすると DNA 損傷への感受性が上昇した。さらにわれわれは、*cep164* 遺伝子をゼブラフィッシュでノックダウンすると DDR 異常とネフロン癆を思わせる症状をきたすことを証明した。

ゼブラフィッシュからヒトへ

ゼブラフィッシュの腎臓はヒト腎臓とさまざまな点において異なることから、モデルとしての限界が懸念されてきたが、2012 年はゼブラフィッシュを用いた機能解析やスクリーニングが活躍した 1 年であった。疾患関連候補遺伝子をゼブラフィッシュでノックダウンすることでその遺伝子の機能を明らかにした例は枚挙にいとまがなく、その一部は前項に述べた通りである。

哺乳類とは異なり、ゼブラフィッシュの腎臓は死ぬまでネフロン数が増加し続ける。2011 年 Diep らは、ゼブラフィッシュの腎臓から自己複製能を持つネフロン幹/前駆細胞を同定した²⁸⁾。同グループはゼブラフィッシュを用いた high throughput screening (HTS) でこのネフロン幹/前駆細胞を増殖させる薬剤を同定し、これらの薬剤がマウス腎臓病モデルにおいて AKI や線維化を改善させることを 2012 年のアメリカ腎臓学会で報告している。この結果はまだ論文報告されていないが、ゼブラフィッシュを用いた HTS が腎臓病治療薬に応用できる可能性を示唆している。

さらに Zhou らは、ゼブラフィッシュに任意の時点でポドサイト障害を惹起することを可能にし、その結果として、糸球体から漏れた蛋白尿が尿細管で再吸収されたものを可視化することに成功した²⁹⁾。従来ポドサイト研究は培養ポドサイトかけっ歯類のポドサイト障害モデルを用いて行われていたが、本研究はその間の位置づけとしてきわめて意義が大きい。

ゼブラフィッシュは遺伝子操作が容易であること、個体のまま HTS に用いることが可能であること、透明でイメージングに向いているなどの利点があり、今後、ゼブラフィッシュを用いた腎臓病研究の発展が期待できる。

2012 年を振り返って

1 年を振り返ってみると、偶然にもいくつかの共通する

コンセプトが同時期に報告されていることに気づかされる。こういった現象はよく起こるが、ある仮説を示唆するような報告が蓄積し成熟することでそういった時期が訪れたのではないと思われる。2012 年は基礎研究の成果が臨床家の長年の疑問に応えた 1 年であった。それと同時に新しいモデルやシステムが導入され、それを基にした成果から新しい概念が提唱された 1 年でもあった。2012 年の大きな成果を受けて、今後腎臓病学の領域がさらに発展することを期待する。

本稿は 2012 年の発展を示すものであるが、一部、研究の推移を示すために 2011 年以前の報告も取り上げていることをお許し願いたい。また誌面に限りがあり、多くの重要な報告を本稿で紹介できなかったことについてはこの場をお借りしてお詫び申し上げる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Pergola PE, Raskin P, Toto RD, et al. Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2011 ; 365 : 327-336.
2. Zheng H, Whitman SA, Wu W, et al. Therapeutic potential of Nrf 2 activators in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes* 2011 ; 60 : 3055-3066.
3. Reisman SA, Chertow GM, Hebbar S, et al. Bardoxolone methyl decreases megalin and activates nrf2 in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 1663-1673.
4. Ying WZ, Allen CE, Curtis LM, et al. Mechanism and prevention of acute kidney injury from cast nephropathy in a rodent model. *J Clin Invest* 2012 ; 122 : 1777-1785.
5. Leung N. Treating myeloma cast nephropathy without treating myeloma. *J Clin Invest* 2012 ; 122 : 1605-1608.
6. Tran M, Tam D, Bardia A, et al. PGC-1 alpha promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice. *J Clin Invest* 2011 ; 121 : 4003-4014.
7. Hall AM, Rhodes GJ, Sandoval RM, et al. *In vivo* multiphoton imaging of mitochondrial structure and function during acute kidney injury. *Kidney Int* 2012.
8. Clatworthy MR, Kettunen MI, Hu DE, et al. Magnetic resonance imaging with hyperpolarized [1,4- (13) C2] fumarate allows detection of early renal acute tubular necrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 13374-13379.
9. Shkreli M, Sarin KY, Pech MF, et al. Reversible cell-cycle entry in adult kidney podocytes through regulated control of telomerase and Wnt signaling. *Nat Med* 2012 ; 18 : 111-119.
10. Jin J, Sison K, Li C, et al. Soluble FLT1 binds lipid microdomains in podocytes to control cell morphology and glomerular barrier function. *Cell* 2012 ; 151 : 384-399.

11. Wang W, Wang Y, Long J, et al. Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. *Cell Metab* 2012 ; 15 : 186-200.
12. Smeets B, Kuppe C, Sicking EM, et al. Parietal epithelial cells participate in the formation of sclerotic lesions in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2011 ; 22 : 1262-1274.
13. Sicking EM, Fuss A, Uhlig S, et al. Subtotal ablation of parietal epithelial cells induces crescent formation. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 629-640.
14. Gagliardini E, Conti S, Benigni A, et al. Imaging of the porous ultrastructure of the glomerular epithelial filtration slit. *J Am Soc Nephrol* 2010 ; 21 : 2081-2089.
15. Grgic I, Brooks CR, Hofmeister AF, et al. Imaging of podocyte foot processes by fluorescence microscopy. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 785-791.
16. Nakano D, Kobori H, Burford JL, et al. Multiphoton imaging of the glomerular permeability of angiotensinogen. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 1847-1856.
17. Oshima Y, Kinouchi K, Ichihara A, et al. Prorenin receptor is essential for normal podocyte structure and function. *J Am Soc Nephrol* 2011 ; 22 : 2203-2212.
18. Riediger F, Quack I, Qadri F, et al. Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival. *J Am Soc Nephrol* 2011 ; 22 : 2193-2202.
19. Asada N, Takase M, Nakamura J, et al. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest* 2011 ; 121 : 3981-3990.
20. Grgic I, Campanholle G, Bijol V, et al. Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2012 ; 82 : 172-183.
21. Jin Y, Ratnam K, Chuang PY, et al. A systems approach identifies HIPK2 as a key regulator of kidney fibrosis. *Nat Med* 2012 ; 18 : 580-588.
22. Wei C, El Hindi S, Li J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med* 2011 ; 17 : 952-960.
23. Has C, Sparta G, Kiritsi D, et al. Integrin alpha3 mutations with kidney, lung, and skin disease. *N Engl J Med* 2012 ; 366 : 1508-1514.
24. Nicolaou N, Margadant C, Kevelam SH, et al. Gain of glycosylation in integrin alpha3 causes lung disease and nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 2012 ; 122 : 4375-4387.
25. Sachs N, Claessen N, Aten J, et al. Blood pressure influences end-stage renal disease of Cd151 knockout mice. *J Clin Invest* 2012 ; 122 : 348-358.
26. Zhou W, Otto EA, Cluckey A, et al. FAN1 mutations cause karyomegalic interstitial nephritis, linking chronic kidney failure to defective DNA damage repair. *Nat Genet* 2012 ; 44 : 910-915.
27. Chaki M, Airik R, Ghosh AK, et al. Exome capture reveals ZNF423 and CEP164 mutations, linking renal ciliopathies to DNA damage response signaling. *Cell* 2012 ; 150 : 533-548.
28. Diep CQ, Ma D, Deo RC, et al. Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebrafish. *Nature* 2011 ; 470 : 95-100.
29. Zhou W, Hildebrandt F. Inducible podocyte injury and proteinuria in transgenic zebrafish. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 1039-1047.