

ミニレビュー

腎臓内科学分野ハイライト

No. 1

アルブミン尿の新機序～カベオラ介在性糸球体内皮・上皮細胞内通過経路の可能性～

A New etiology of albuminuria～The possibility of caveolae pathway through glomerular endothelial and epithelial cells～

東京医科大学腎臓内科学分野
森山能仁Department of Nephrology, Tokyo Medical University,
Takahito MORIYAMA

はじめに

わが国で1960年代に始まった透析療法は、当初医療費が自己負担であり限られた患者のみ行える医療であった。しかし、1967年に医療保険の適用、1972年に身体障害者福祉法の対象となり自己負担額に更生医療が適用され、患者負担が減るとその数は右肩上がりに上昇し続け、2020年末の透析患者数は約35万人となり医療経済を圧迫し続けている¹⁾。また、成人の8人に一人が末期腎不全の予備軍である慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease, CKD）患者であり、CKDは高率に脳心血管イベントを合併することからCKDの予防及び進行抑制が急務である。CKDの原因である慢性糸球体腎炎や糖尿病性腎症の進行危険因子として重要なもののひとつに蛋白尿（アルブミン尿）があげられる。アルブミンは糸球体内皮細胞、基底膜、糸球体上皮細胞の3層構造からなる濾過障壁に守られ通常尿中に漏出することはない²⁾。しかし、糸球体腎炎や糖尿病性腎症などのCKDにより糸球体係蹄の機能異常や構造破壊により尿中にアルブミンは漏出する。アルブミン尿の発現機序は諸説報告されているが、このミニレビューではアルブミン尿の新たな機序として糸球体内皮細胞、上皮細胞の細胞内通過経路とその経路阻害による新規治療法の可能性に関して概説する。

糸球体係蹄の構造とアルブミン尿の発現機序

糸球体係蹄の濾過障壁の最内層である糸球体内皮細胞は糸球体血管腔を筒状に取り囲み、フェネストラと呼ばれる60～100 nmの小孔を有する有窓の毛細血管を形成している。通常の血管内皮細胞のフェネストラには薄い膜が存在しているが、糸球体内皮細胞には存在せずこの小孔を血漿成分などは通過し原尿となる。

糸球体内皮細胞はグライコカリックスなどの陰性荷電を有する糖蛋白に覆われており、同じ陰性荷電を有するアルブミンはチャージバリアの影響で反発し合うためこの小孔を通過することはできない。その外側には基底膜が存在しており、IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンで構成される細線維状の立体的網目構造のグライコプロテインから成るサイズバリアを形成し一定の分子量を超える蛋白成分が漏出することはない。また、ヘパラン硫酸プロテオグリカンは陰性荷電を有しておりチャージバリアとしても機能している。この基底膜の外側に糸球体上皮細胞（ポドサイト）が存在する。糸球体上皮細胞はたこ足細胞とも呼ばれ、細胞核を中心とする本体部から数本の一次突起が伸びその突起は枝分かれを繰り返していき、最終的に足突起と呼ばれる長い突起となり毛細血管を覆っている。足突起同士の間には25～60 nmの間隙があり、5～6 nmの電子密度の高いスリット膜が存在し濾過障壁の役割を担っている。スリット膜はネフリン、ポドシンといった蛋白から構成され、分子量60 kDaのアルブミンは通さず、それ以下の分子量の物質は通過できるサイズバリアの役割を担っている²⁾。アルブミン尿が出現する機序は、内皮細胞は陰性荷電を失った際にフェネストラをアルブミンが通過し、上皮細胞ではスリット膜の異常により濾過障壁の機能を失った際に細胞間ギャップを通過する細胞外を通過する古典的経路が通説となっていた³⁾。

しかし、この20年でレーザーや光学技術、コン

ピュータシステムの発展によって、multi-photon microscopy の感度と速度が格段に進歩し、生体内の細胞や分子の可視化と定量化が可能となり、in vivo で糸球体のアルブミンの通過と尿細管での再吸収が4次元データとして観察され⁴⁾、その結果大量のアルブミンが通常状態で糸球体糸嚢を通過し尿細管でそのほとんどが再吸収される可能性が示唆される、いわゆる leaky glomerular barrier theory が提唱された⁵⁻⁷⁾。この説は否定的な意見も多く⁸⁾、そもそもアルブミンの糸嚢の通過が正常ではほとんど認められないと定義する従来の古典的経路では説明が困難であり懐疑的な側面もあるが、これまでの固定的な概念を超えてその他の経路、例えば細胞内通過経路の可能性⁹⁻¹¹⁾ など新たなアルブミン尿の病因に関する議論も活性化した。

カベオラの構造と役割

細胞内通過経路の検討において糸球体上皮・内皮細胞においても細胞膜上のカベオラがエンドサイトーシスの役割として重要であることが報告されている。カベオラは 50-80 nm の丸フラスコの形をした細胞膜上に存在する陥入構造である¹²⁻¹⁴⁾。人体の多くの細胞に存在し、主に血管内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、および脂肪細胞に存在する。腎臓においてもメサングウム細胞¹⁵⁻¹⁷⁾、糸球体内皮細胞¹⁸⁾、

糸球体上皮細胞¹⁹⁾、近位²⁰⁾²¹⁾ 及び遠位尿細管上皮細胞に存在することが報告されている (図 1a, b)。脂質系であるコレステロール、スフィンゴミエリン、糖脂質が豊富なドメイン (cholesterol/sphingolipid-rich domain) と称され、カベオリン (Caveolin: Cav)-1 が主要な構成蛋白として同定されているほか、Cav-2、Cav-3 として独立した遺伝子でコードされる蛋白質が存在する²²⁾²³⁾。Cav-1 と Cav-2 は様々な細胞において共発現するのに対して Cav-3 は骨格筋、横隔膜、横紋筋細胞などに主に存在する。Cav-1 は α 、 β のアイソフォームがあり、Cav-1 α は 178 のアミノ酸から成り、Cav-1 β は 147 のアミノ酸から成る。カベオラの役割は多岐に渡り、一酸化窒素の産生、カルシウムイオン濃度の調節、コレステロールや蛋白質、インスリン、毒素などの大小分子の内在化と輸送を行い、G-protein coupled receptor、epidermal growth factor、platelet-derived growth factor receptor、vascular endothelial growth factor, insulin receptor などの受容体を含み、transforming growth factor β 、ras-mitogen activated protein kinase、Src family tyrosine kinase などの細胞内シグナル伝達の調節を行う¹²⁻¹⁴⁾²²⁻²⁵⁾。そして癌、ウイルス感染、心血管疾患、アテローム性動脈硬化、糖尿病、ミオパシーなどの多くの疾患で重要な役割が報告されているが、腎細胞におけるカベオラの特定の役割は未だ

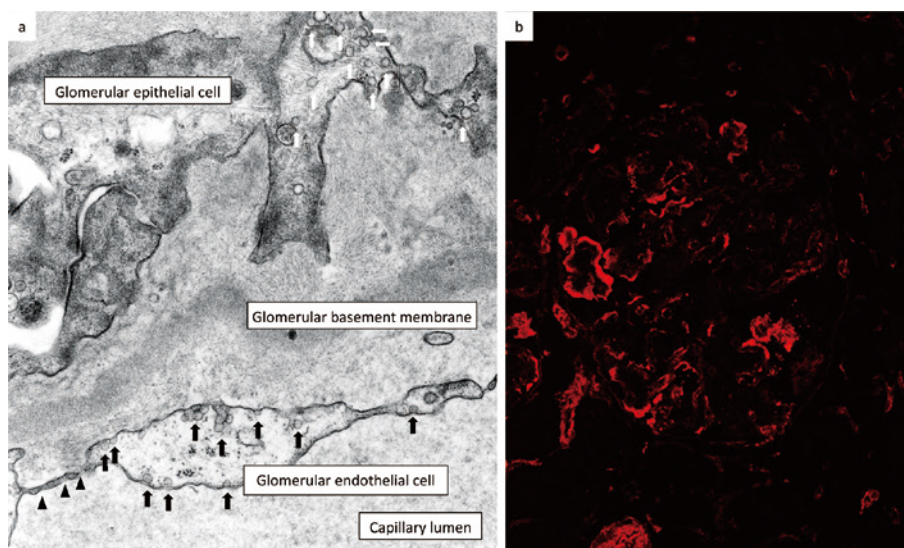


図 1. 糸球体糸嚢の細胞に発現するカベオラ及び Cav-1

a) AL アミロイドーシスの電子顕微鏡所見において、糸球体内皮細胞の細胞質内及び、細胞の糸嚢内腔側・基底膜側の両方に面した細胞表面にフラスコ型のカベオラが観察される。(黒矢印: カベオラ、矢頭: フェネストラ)。また、糸球体上皮細胞においても細胞質内、尿管腔に面してカベオラが観察される (白矢印)。

b) 膜性増殖性腎症の免疫染色所見において Cav-1 が主に糸嚢に沿って高度に発現している。
(文献 37 より引用改変)

不明な点も多い。

糸球体腎炎における糸球体係蹄上のカベオラ発現

カベオラの糸球体での発現は、正常腎である腎移植のドナーの腎摘出時の生検検体において糸球体の Cav-1 の発現はごく軽度であるのに対して、IgA 腎症や膜性腎症、巣状糸球体硬化症や糖尿病性腎症などの各種の腎障害では Cav-1 の発現が増強する¹⁸⁾。また、興味深いことにこの Cav-1 の発現はアルブミン尿の程度と相関し、ステロイド治療を行い蛋白尿が改善した後に腎生検をした症例では低下していた。また、この係蹄上の Cav-1 の発現は糸球体内皮細胞のマーカーである pathologische anatomie leiden-endothelium (PAL-E) と共染色されたことより、アルブミン尿の漏出において糸球体内皮細胞に強発現するカベオラが関与することが示唆され、アルブミン尿の新機序としてアルブミンが糸球体内皮細胞内へカベオラ依存性のエンドサイトーシスを介して通過する細胞内通過経路の可能性が示唆された。

アルブミンの糸球体内皮細胞内通過経路

ヒト糸球体内皮細胞 (Human renal glomerular endothelial cells: HRGECs) を用いた in vitro の研究において、培養 HRGECs 上における Cav-1 は標識アルブミンと共染色するのに対して、同じ膜ドメインであるクラスリンとは共染色しない。またカベオラ阻害効果のある薬剤である Methyl- β -cyclodextrin (MBCD) や nystatin の前投与や siRNA による Cav-1 mRNA の knockdown にてアルブミンの細胞内への進入が阻害されることから、アルブミンのカベオラ依存性のエンドサイトーシスが明確となっている²⁶⁾。更に標識アルブミンと細胞内のオルガネラとの二重染色にて、アクチンや微小管などの細胞骨格に沿って異動はせず、初期エンドソームに到達し、その後ライソソームやプロテオソームでの分解やゴルジ体、小胞体で修飾を受けることなくトランスサイトローシスし、直接細胞の反対側にエキソサイトローシスされる可能性が示唆された (図 2)²⁷⁾。また、ピューロマイシンの腹腔内投与とネフローゼ症候群モ

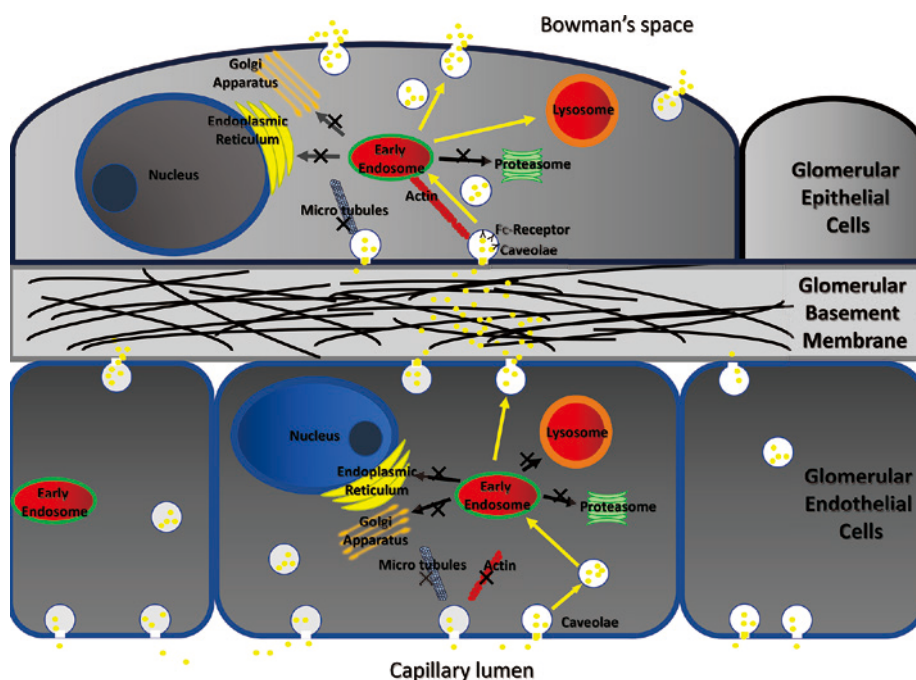


図 2. アルブミンのカベオラ介在性糸球体上皮・内皮細胞通過経路

糸球体内皮細胞においてアルブミン (黄色) はフラスコ型のカベオラにとりこまれた後、フラスコの首の部分で切断されたカベオラ小胞内で細胞内にエンドサイトーシスする。カベオラ小胞はアクチンや微小管に沿うことなく細胞内をトランスサイトローシスし初期エンドソームで小胞体、ゴルジ体、ライソソーム、プロテオソームはバイパスするように選別され、細胞の反対側にエキソサイトローシスする。基底膜を通過した後、糸球体上皮細胞ではカベオラに存在する Fc-レセプターの役割でカベオラ内に取り込まれる。アルブミンを取り込んだカベオラ小胞はアクチンに沿って細胞内を移動し、初期エンドソームで一部ライソソームに、残りは細胞の反対側から排出するように選定されるが、小胞体、ゴルジ体、プロテオソームはバイパスする。

(文献 37 より引用改変)

デルマウスにおいて MBCD の投与が糸球体糸蹄の Cav-1 の発現を低下させアルブミン尿の減少が確認されたことより、*in vivo study* においてもアルブミンのカベオラ依存性の細胞内通過経路が示唆された²⁷⁾。Guan TH らの報告においても Cav-1 ノックアウトマウスにストレプトゾトシン腹腔内投与で糖尿病モデルマウスを作成するとワイルドタイプと比較してアルブミン尿が減少したと報告している。この研究では、糸球体の collagen 1、fibronectin、connective tissue growth factor (CTGF) や TGF β の発現を抑制することにより細胞外マトリックスの upregulation、糸球体硬化を抑制した可能性の他にも、Cav-1 の発現を downregulate させる 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) の活性が Cav-1 ノックアウトマウスで増強し、アルブミンの HRGECs へのエンドサイトーシスに影響している可能性が示唆されている²⁸⁾。また Wu D らも adenosine triphosphate (ATP) の産生に関わる高山植物のロディオラ・ロゼアから抽出される Salidroside による、AMPK の活性化と Cav-1 の増強に関わる Src tyrosine kinase の抑制による糖尿病性腎症モデルマウスのアルブミン尿減少効果を報告しており、アルブミン尿の新機序としてのカベオラ依存性のアルブミンの糸球体内皮細胞内通過経路の可能性が考えられる²⁹⁾。

アルブミンの糸球体上皮細胞内通過経路

前述の糸球体腎炎における Cav-1 の糸球体糸蹄の発現には PAL-E と二重染色されない部位も散見されることから¹⁸⁾、同じく糸蹄細胞である糸球体上皮細胞のカベオラもアルブミンの通過経路にかかわる可能性が考えられる。実際に *in vitro* の糸球体上皮細胞の研究において、細胞内への進入は MBCD にて阻害され、カベオラ介在性のエンドサイトーシスが示唆されており、細胞内へのエンドサイトーシスには Fc レセプターが関与し、更にトランスサイトーシスとしてアクチンに沿って移動するが微小管には沿うことなく初期エンドソームに到達し、一部ライソソームで分解をされるものの、プロテアソームでの分解や小胞体、ゴルジ体での修飾はなくトランスサイトーシスし反対側からエキソサイトーシスすることが明確になっている³⁰⁾。近年アルブミンの糸球体上皮細胞内通過の可能性³¹⁾³²⁾ と、その通過経路に Fc レセプター¹⁹⁾³³⁾、カベオラ¹⁹⁾、前期エンドソーム¹⁹⁾ 及びライソソーム¹⁹⁾³⁴⁾ の関与が報告されてお

り、一連のカベオラ介在性のアルブミンの糸球体上皮細胞内通過経路が明確となっている (図 2)。

カベオラ経路阻害によるアルブミン尿減少効果 ～新たな慢性糸球体腎炎の治療の探索～

更に新たなステップとして、このカベオラ介在性細胞内通過経路の阻害による治療薬の探索が求められる。酸化ストレスや高濃度の糖刺激により AMPK の活性が抑制されることにより Cav-1 のリン酸化とカベオラのエンドサイトーシスが引き起こされる。また、酸化ストレス下の reactive oxygen species の産生は Src tyrosine kinase の活性を引き起こし Cav-1 のリン酸化、カベオラのエンドサイトーシスへとつながる¹⁰⁾。前述の salidroside のアルブミン尿減少効果もこの AMPK の活性や Src の制御によりアルブミン尿の減少につながる²⁹⁾。また、カベオラが細胞膜から切り離され小胞としてエンドサイトーシスする際に、フラスコの首にあたる部位に guanosine triphosphate (GTP) アーゼである dynamin と Bin/Amphiphysin/Rvs (BAR) ドメインをもつ蛋白質である Amphyphysis が複合体を形成し、GTP 加水分解に伴う構造変化が起こることが関与している³⁵⁾。この dynamin の阻害薬である sertraline の投与にて糸球体上皮、内皮細胞の細胞内へのアルブミンの取り込みが阻害され、ピューロマイシン腹腔内投与によるネフローゼ症候群モデルマウスのアルブミン尿は減少する。このマウスの腎組織では興味深いことに免疫染色においてネフローゼモデルで増強する Cav-1 の発現は sertraline の投与にて低下することなく (図 3a, b, c)、電子顕微鏡にてエンドサイトーシスされず細胞膜表面に連続して並ぶカベオラが観察され (図 3d)、カベオラの発現自体が抑制されているのではなく、Sertraline による dynamin の阻害効果によりカベオラの膜からの切断を妨げていることが確認された³⁶⁾。選択的セロトニン再取り込み阻害薬である Sertraline は実臨床では抗うつ薬として使用されており、腎炎における臨床展開は難しい可能性があるが、このカベオラ経路阻害によるアルブミン尿の改善効果の方向性は新たな治療のターゲットの可能性がある。

ま と め

アルブミン尿の発現機序に関してはまだ不明な点が多く、本稿で概説したカベオラ通過経路も確実と

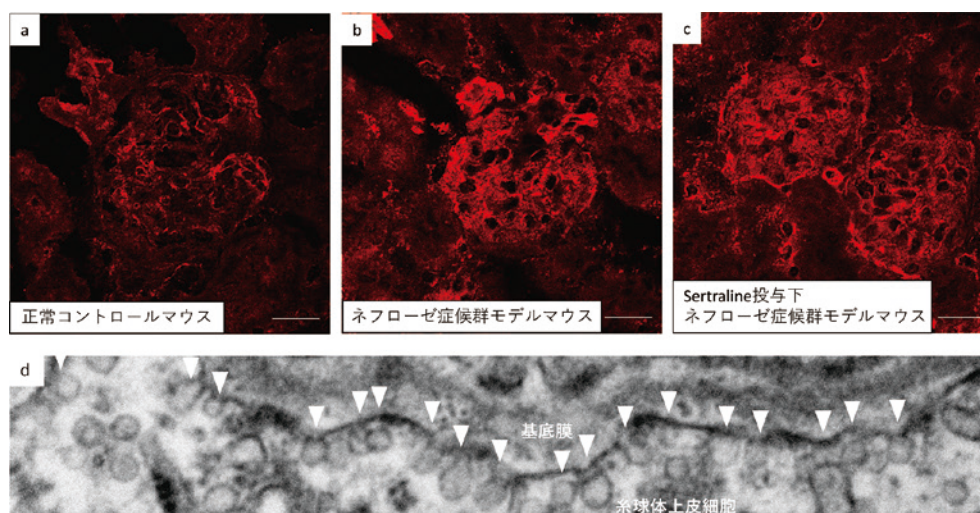


図 3. ネフローゼ症候群モデルマウスの sertraline 投与による Cav-1、カベオラの発現
免疫染色による糸球体の Cav-1 の発現は正常コントロール (a) と比較し、ネフローゼ症候群モデルマウス (b) で
は増強し、その程度は sertraline 投与により減弱しない (c)。また、sertraline 投与下のネフローゼ症候群モデルマ
ウスでは糸球体上皮細胞上のカベオラの発現が増加し、かつ基底膜側の細胞膜に局在化している。
(文献 36 より引用改変)

はいえない。しかしながら現状の腎炎治療では蛋白尿・アルブミン尿を寛解に持ち込めず、腎機能が悪化していく症例も未だ数多く、また、保存期の慢性腎臓病においてもレニンアンジオテンシン系阻害薬や sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) 阻害薬により治療されるが、蛋白尿・アルブミン尿がコントロールできず浮腫や腎障害の進行を防ぎえない症例も多い。このカベオラ経路はアルブミン尿のすべてを説明できるものではないが、更なる慢性腎臓病の治療へと発展していくことが期待される。

文 献

- 1) 花房規夫、阿部雅紀、常喜信彦、星野純一、菊地 勘、後藤俊介、神田英一郎、谷口正智、中井 滋、長沼俊秀、長谷川毅、三浦健一郎、和田篤志、武本佳昭：わが国の慢性透析療法の現況 (2020 年 12 月 31 日現在)。透析会誌 **54** : 611-657, 2021
- 2) Kumar V, Abbas A, Aster J : Robins & Cotran Pathologic Basis of Disease. 10th edition. Elsevier, 2020
- 3) Kaysan GA, Myers BD, Coser WG, Rabkin R, Felts JM : Mechanisms and consequences of proteinuria. Lab Invest **54** : 479-498, 1986
- 4) Molitoris BA, Sandoval RM, Wagner MC : Intravital Multiphoton Microscopy as a tool for studying renal physiology, pathophysiology, and therapeutics. Front Physiol **13** : 827280, 2022
- 5) Russo LM, Bakris GL, Comper WD : Renal handling of albumin : a critical review of basic concepts and perspective. Am J Kidney Dis **39** : 899-919, 2002
- 6) Birn H, Christensen EL : Renal albumin absorption in physiology and pathology. Kidney Int **69** : 440-449, 2006
- 7) Russo LM, Sandoval RM, Brown D, Molitoris BA, Comper WD : Controversies in nephrology : response to 'renal albumin handling, facts, and artifacts'. Kidney Int **72** : 1195-1197, 2007
- 8) Haraldsson B, Sorrensen J : Why do we not all have proteinuria? An update of our current understanding of the glomerular barrier. News Physiol Sci **19** : 7-10, 2004
- 9) Catrop H, Schiebl IM : Novel routes of albumin passage across the glomerular filtration barrier. Acta Physiol **219** : 546-555, 2017
- 10) He FF, Gong T, Li ZQ, Liang W, Jiang HJ, Su H, Zhang C, Wang YM : A new pathogenesis of albuminuria : Role of transcytosis. Cell Physiol Biochem **47** : 1274-1286, 2018
- 11) Tojo A, Hatakeyama S, Kinugasa S, Fukuda S, Sakai T : Enhanced podocyte vesicle transport in the nephrotic rat. Med Mol Morphol **50** : 86-93, 2017
- 12) Stan RV : Structure of caveolae. Biochim Biophys Acta **1746** : 334-348, 2005
- 13) Lamaze C, Tardif N, Dewulf M, Vassilopoulos S, Blouin CM : The caveolae dress code : structure and signaling. Curr Opin Cell Biol **47** : 117-125, 2017
- 14) Parton RG, Kozlov MM, Ariotti N : Caveolae and lipid sorting : shaping cellular response to stress. J Cell Biol **219** : e201905071, 2020
- 15) Tamai O, Oka N, Kikuchi T, Koda Y, Soejima M, Wada Y, Fujisawa M, Tamaki K, Kawachi H, Shimizu F, Kimura H, Imaizumi T, Okuda S : Caveolae in mesangial cells and caveolin expression in mesangial proliferative glomerulonephritis. Kidney Int

- 59** : 471-480, 2001
- 16) Fujita Y, Maruyama S, Kogo H, Matsuo S, Fujimoto T : Caveolin-1 in mesangial cells suppresses MAP kinase activation and cell proliferation induced by bFGF and PDGF. *Kidney Int* **66** : 1794-1804, 2004
 - 17) Liu Y, Lu S, Zhang Y, Wang X, Kong F, Liu Y, Peng L, Fu Y : Role of caveolae in high glucose and TGF- β 1 induced fibronectin production in rat mesangial cells. *Int J Clin Exp Pathol* **7** : 8381-8390, 2014
 - 18) Moriyama T, Tsuruta Y, Shimizu A, Itabashi M, Takei T, Horita S, Uchida K, Nitta K : The significance of caveolae in the glomeruli in glomerular disease. *J Clin Pathol* **64** : 504-509, 2011
 - 19) Dobrinskikh E, Okamura K, Kopp JB, Doctor RB, Blaine J : Human podocytes perform polarized, caveolae-dependent albumin endocytosis. *Am J Physiol Renal Physiol* **306** : F941-951, 2014
 - 20) Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, Sorokin A : Caveolae endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J Virol* **81** : 8552-8562, 2007
 - 21) Moriyama T, Sorokin A : Intracellular trafficking pathway of BK virus in human proximal tubular epithelial cells. *Virology* **371** : 336-349, 2008
 - 22) Kovtun O, Tillu VA, Ariotti N, Parton RG, Collins BM : Cavin family proteins and the assembly of caveolar. *J Cell Sci* **128** : 1269-1278, 2015
 - 23) Parton RG, Till VA, Collins BM : Caveolae. *Curr Biol* **28** : R367-420, 2018
 - 24) Matthaeus C, Taraska J : Energy and Dynamics of caveolae trafficking. *Front Cell Dev Biol* **8** : e614472, 2021
 - 25) Lian X, Matthaeus C, Kaßmann M, Daumke O, Gollasch M : Pathophysiological Role of caveolae in hypertension. *Front Med (Lausanne)* **6** : 153, 2019
 - 26) Moriyama T, Takei T, Itabashi M, Uchida K, Tsuchiya K, Nitta K : Caveolae may enable albumin to enter human renal glomerular endothelial cells. *J Cell Biochem* **116** : 1060-1106, 2015
 - 27) Moriyama T, Sasaki K, Karasawa K, Uchida K, Nitta K : Intracellular transcytosis of albumin in glomerular endothelial cells after endocytosis through caveolae. *J Cell Physiol* **232** : 3565-3573, 2017
 - 28) Guan TH, Chen B, Gao B, Janssen MR, Uttarwar L, Ingram AJ, Krepinsky JC : Caveolin-1 deficiency protects against mesangial matrix expansion in a mouse model of type 1 diabetic nephropathy. *Diabetologia* **56** : 2068-2077, 2013
 - 29) Wu D, Yang X, Zheng T, Xing S, Wang J, Chi J, Bian F, Li W, Xu G, Bai X, Wu G, Jin St : A novel mechanism of action for salidroside to alleviate diabetic albuminuria : effects on albumin transcytosis across glomerular endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **310** : E225-237, 2016
 - 30) Moriyama T, Hasegawa F, Miyabe Y, Akiyama K, Karasawa K, Uchida K, Nitta K : Intracellular trafficking pathway of albumin in glomerular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **574** : 97-103, 2021
 - 31) Tojo A : Mechanism Underlying Selective Albuminuria in Minimal Change Nephrotic Syndrome. *Int J Nephrol* : 5859102, 2019
 - 32) Tojo A, Kinugasa S : Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. *Int J Nephrol* 481520, 2012
 - 33) Kinugasa S, Tojo A, Sakai T, Tsumura H, Takahashi M, Hirata Y, Fujita T : Selective albuminuria via podocyte albumin transport in puromycin nephrotic rats is attenuated by an inhibitor of NADPH oxidase. *Kidney Int* **80** : 1328-1338, 2011
 - 34) Carson JM, Okamura K, Wakashin H, McFann K, Dobrinskikh E, Kopp JB, Blaine J : Podocytes degrade endocytosed albumin primarily in lysosomes. *PLoS One* **9** : e99771, 2014
 - 35) Takeda T, Kozai T, Yang H, Ishikuro D, Seyama K, Kumagai Y, Abe T, Yamada H, Uchihashi T, Ando T, Takei K : Dynamic clustering of dynamin-amphiphysin helices regulates membrane constriction and fission coupled with GTP hydrolysis. *Elife* **7** : e30246, 2018
 - 36) Moriyama T, Karasawa K, Hasegawa F, Uchida K, Nitta K : Sertraline reduces albuminuria by interfering with caveolae mediated endocytosis through glomerular endothelial and epithelial cells. *Am J Nephrol* **50** : 444-453, 2019
 - 37) Moriyama T, Karasawa K, Nitta K : The role of caveolae on albumin passage through glomerular endothelial and epithelial cells : The new etiology of urinary albumin excretion. *Contrib Nephrol* **195** : 1-11, 2018