

令和 4 年 10 月 25 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09690

研究課題名(和文)肥満・メタボリックシンドローム関連腎障害の病態にリンクした尿中メガリン排泄の意義

研究課題名(英文)Significance of urinary megalin excretion linked to the pathophysiology of obesity- or metabolic syndrome-related nephropathy

研究代表者

細島 康宏 (Hosojima, Michihiro)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：50464003

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓の近位尿細管に存在するメガリンは腎毒性物質の「入り口」を司ることによって肥満・メタボリックシンドロームに関連した腎症や糖尿病性腎症といった病態を引き起こす。

本研究により、新規に、マウスにおける尿中A-メガリン(細胞外ドメイン型)およびC-メガリン(全長型)測定用ELISA系を構築したことから、今後、メガリンに関連した研究への本技術の貢献が大いに期待される。また、2型糖尿病患者における検討から、尿中A-およびC-メガリンは既存のものとは異なる新規のバイオマーカーであることが示された。糖尿病性腎症患者において、尿中メガリンを測定することにより、将来の腎症進展を予測できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

透析患者の増大は個々の患者の生活レベルの低下をもたらすだけでなく、医療経済上も重大な課題となっている。特に、糖尿病性腎症は透析療法導入の原因疾患の第一位を占めており、社会的にも喫緊の対応が求められている。中でも、その早期診断や重症度判定は重要な課題の1つであるが、病因や病態に基づいた新しいバイオマーカーの開発が求められていた。本研究では、尿中A-およびC-メガリンは既存のものとは異なる新規のバイオマーカーであることが示され、将来の糖尿病性腎症の進展を予測できることが明らかになった。今回開発したマウス尿中メガリン測定系を用いた今後の更なる研究の進展も期待される。

研究成果の概要(英文)：Megalín, which is expressed in proximal tubular cells of the kidney, constitutes a renal "gateway" for nephrotoxic substances, being involved in the development of obesity- or metabolic syndrome-related nephropathy and diabetic nephropathy. In this study, we have established novel ELISA systems to measure urinary A- (extracellular domain type) and C-megalín (full-length type) in mice. In the future, these technologies will contribute greatly to the basic research on megalín. In addition, our study in patients with type 2 diabetes has shown that urinary A- and C-megalín are novel biomarkers different from existing ones. Measuring both forms of urinary megalín in patients with diabetic nephropathy would enable us to predict future progression of the disease.

研究分野：腎臓病学 糖尿病学 病態栄養学

キーワード：メガリン 糖尿病性腎症 肥満関連腎症 バイオマーカー

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症(腎症)は透析療法導入原疾患の第1位(約16,000人/年の導入)を占めており、その早期診断、特に重症化ハイリスク群の把握が重要な課題である。さらに最近では肥満・メタボリックシンドローム(MetS)患者が増加し、それが糖尿病性腎症の増悪要因になっているとともに、肥満・MetS自体に関連した腎症(肥満関連腎症)も注目されている。しかし、肥満・MetSという病態がどのように腎症の発症・増悪に関連し、どのようなバイオマーカーを用いて臨床的にそれを検知し治療に反映させるかという戦略は確立していない。

メガリンは近位尿細管細胞に発現し、糸球体濾過タンパク質の再吸収・代謝に関わるとともに、細胞内シグナル伝達にも関与するエンドサイトーシス受容体である。本研究分担者の斎藤亮彦教授はメガリンのクローニング以来20年以上この分子の研究を続けてきたが、本研究申請者の細島は斎藤教授と共に、デンカ生研(株)との産学共同研究により、ヒト尿中メガリン Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA)測定系を世界で初めて開発した[1](国内外の特許取得)。現在、近位尿細管障害マーカーとして臨床的に使用されている分子のほとんどは、メガリンを介して再吸収される低分子量蛋白質であり、これらはメガリンの機能低下によって間接的に尿中に増加するものである。尿中メガリン測定はそれらのマーカーが変動する以前からの近位尿細管細胞の形質変化をより鋭敏かつ直接的に反映するマーカーとして期待されている。

尿中メガリン排出様式には全長型(C-メガリン)と細胞外ドメイン切断型(A-メガリン)の2つのパターンがあるが、本研究申請者らは腎症患者の横断的解析から、尿中全長型メガリンは病初期から感度良く増加するとともに、病期の進行に伴ってさらに増加することを明らかにした[1]。さらに腎症では全長型メガリンはリソソームの病的蛋白質(終末糖化産物)代謝負荷に伴ってエクソソームに搭載されて尿中排泄が増加することを明らかにした[2]。さらに、腎特異的メガリンノックアウトマウスを用いた高脂肪食負荷によるMetS型糖尿病モデルにおいて、メガリンが腎毒性物質(脂肪酸高含有蛋白質など)の「入り口」として働き、近位尿細管細胞に過酸化脂質反応を介してリソソーム異常を引き起こし、それが引き金となって間質・糸球体障害に発展する機序を明らかにした[3]。細胞外ドメイン型メガリン(A-メガリン)の尿中排出機序は未だ不明であるが、近位尿細管への病的蛋白質代謝負荷によるメガリンのリサイクリングの亢進に関与することが予備的解析で示唆されている。すなわちメガリンは、潜在的なネフロン予備能等を基盤として、MetS関連要素(肥満・高血糖・高血圧・脂質異常・酸化ストレス等)にリンクして、腎症の発症・進展に関わると共に、腎臓の代謝性負荷を反映して尿中に排出されると考えられる。しかし、糖尿病性腎症あるいは肥満関連腎症において、全長型・細胞外ドメイン型メガリンが、具体的にどのような病態に応じて、どのようにして尿中に増加するのか、その詳細は明らかではない。

### 2. 研究の目的

潜在的な機能ネフロン数や糖尿病性腎症あるいは肥満関連腎症の病態にリンクした尿中メガリン(全長型・細胞外ドメイン型)の排出動態を明らかにし、その臨床的意義を検証することを目的とした。

(目的1) マウス尿中メガリン測定用ELISAの開発すること

(目的2) MetSおよび肥満関連腎症、糖尿病腎症における腎生検病理組織像および臨床データと尿中メガリンの動態についての関連性に関する検討を行うこと

(目的3) 2型糖尿病患者コホートにおけるMetS関連要素と尿中メガリンの関係およびその予後との関連性を明らかにすること

### 3. 研究の方法

(1) 抗ヒトメガリンマウスモノクローナル抗体の中から、A-メガリンELISAは細胞外ドメインを認識する抗体2種類、C-メガリンELISAは細胞内領域を認識する抗体2種類を選択し、固相・検出抗体の組み合わせ等の条件検討を経て、化学発光系のELISA法を開発した。

(2) 申請者は本研究開始以前に予備的な調査を行い、これまでに新潟大学腎・膠原病内科および新潟県内の関連施設において腎生検を受けた患者で肥満関連腎症もしくはそれを強く疑われると診断された症例を約70例程度、確認していた。また、申請者らはMetS型糖尿病モデルである高脂肪食負荷マウスの腎障害はメガリンを介すること明らかにしたが、その腎臓で観察される所見としては近位尿細管細胞のリソソーム異常に関連する空胞所見、間質線維化、糸球体肥大、メサンギウム基質の増加などであった。そこで、上記の肥満関連腎症や糖尿病腎症患者においてもそれらの所見に対応するものが認められるか検証を行う(糸球体数すなわちネフロン数も解析対象とする)。さらに、尿中メガリンや臨床データ(特にMetS関連要素)との関連について横断的に解析を行う。

また、申請者らは年間約20~30人程度の腎移植患者の診療を泌尿器科と共同で行っているが、近年、臨床腎移植学会のマージナルドナー基準には合致するが2型糖尿病やMetSを合併している生体腎移植ドナー患者(片腎であり機能的ネフロン数が減少している)も増加している。そこで、2型糖尿病やMetSを合併したドナー患者の予後調査を行い、その腎病理所見および尿中メガリンとの比較検討から、その腎病理所見における重症度と尿中メガリン量の相関および、尿中

メガリンが2型糖尿病やMetSを合併したドナー患者の腎予後を予測できるかについての検証を行う。

いずれの検討においても患者コホートの構築が必要であり、当院において腎生検が行われた症例もしくはこれから行われる症例を対象にした研究を計画立案し、それぞれを新潟大学倫理委員会に申請した。

(3) 本研究申請者および分担者は2003年以降、「臨床検査データおよび残余検体の保存とそれを使用した内科的研究および教育活動」(2003年 新潟大学医学部倫理委員会承認)に基づき、新潟大学腎・膠原病内科に通院中の患者の残余尿検体を保管してきた。さらに、新潟大学腎・膠原病内科もしくは機能分子医学講座に残余尿検体が保管されている2型糖尿病患者を対象とし、その残余尿検体において尿中メガリンおよび既存の尿中バイオマーカーを測定した。さらに、対象の症例の患者背景および腎機能の推移などの経過に関するデータを検索した。

#### 4. 研究成果

(1) 抗ヒトメガリンマウスモノクローナル抗体の中から、A-メガリン ELISA は細胞外ドメインを認識する抗体2種類、C-メガリン ELISA は細胞内領域を認識する抗体2種類を選択し、様々な条件検討を経て、新規のマウス尿中メガリン測定のための化学発光系 ELISA を構築した。これまで、マウスの生体試料のメガリンの評価は、ウェスタンブロッティング法にてメガリンのバンドを比較することで半定量的に行われてきたが、本研究で新規に構築したサンドイッチ ELISA 法により、マウス尿中メガリンを定量的に評価することが可能となった。定量性の観点だけでなく、ELISA 法ではA-メガリン、C-メガリンを区別して評価することができ、今後、動物モデルを用いて、糖尿病性腎症をはじめとして肥満関連腎症や薬剤性腎障害などの病態における尿中メガリンの動態を評価することで、バイオマーカーとしての尿中メガリン研究の進展に役立つものと考えられる。なお、現在、論文投稿準備中のため、論文の受理後にあらためて成果報告書の記載を行う予定である。

(2) 本研究の目的の1つとして、糖尿病性腎症および肥満関連腎症患者の臨床データ(特にMetS関連要素)および腎生検病理組織像と尿中メガリンの動態についての関連性を解析することが挙げられる。そしてこれまでに、「腎生検データベースの構築」、「腎生検データベースを用いた腎疾患患者の腎機能および死亡に関する前方視的研究」、「腎生検施行症例の予後についての後方視的研究」の3つの研究を新潟大学倫理審査委員会に申請し、承認を受けた(承認番号:2017-0105、2017-0107、2017-0108)。これを踏まえ、既に予後調査を開始、継続しており、今後、腎移植ドナー患者も含め、調査結果や腎生検結果などを基にその関連性について尿中メガリンの動態も含め解析していく予定である。

(3) 当院に通院中の188名の2型糖尿病患者のコホートにおいて、ベースラインの尿中メガリン値で2群に分け、腎機能の推移として推算糸球体濾過量(eGFR)の変化量を目的変数とし、一般化推定モデルにて解析することにより、糖尿病性腎症進展のリスクについて検討した。4年間の経過において、A-メガリン高値群およびC-メガリン高値群は、いずれもその低値群に比して、その後のeGFR低下速度が有意に増大していた。また、A-メガリン高値かつC-メガリン高値群においては、対照群に比してさらにその低下速度が増大していた。これらの結果は、他の尿中バイオマーカーで調整しても有意であったことから、尿中A-およびC-メガリンは既存のものとは異なる新規のバイオマーカーであることが示された。以上より、糖尿病性腎症患者において尿中メガリンを測定することにより、将来の腎症進展の予測することができる可能性が示唆された。現在、論文投稿準備中であり、論文の受理後にあらためて成果報告書の記載を行う予定である。

#### 引用文献

[1] Significance of urinary full-length and ectodomain forms of megalin in patients with type 2 diabetes. Ogasawara S, Hosojima M, Kaseda R, Kabasawa H, Yamamoto-Kabasawa K, Kurosawa H, Sato H, Iino N, Takeda T, Suzuki Y, Narita I, Yamagata K, Tomino Y, Gejyo F, Hirayama Y, Sekine S, Saito A. *Diabetes Care*. 2012 May;35(5):1112-8.

[2] Exocytosis-Mediated Urinary Full-Length Megalin Excretion Is Linked with the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. De S, Kuwahara S, Hosojima M, Ishikawa T, Kaseda R, Sarkar P, Yoshioka Y, Kabasawa H, Iida T, Goto S, Toba K, Higuchi Y, Suzuki Y, Hara M, Kurosawa H, Narita I, Hirayama Y, Ochiya T, Saito A. *Diabetes*. 2017 May;66(5):1391-1404.

[3] Megalin-Mediated Tubuloglomerular Alterations in High-Fat Diet-Induced Kidney Disease. Kuwahara S, Hosojima M, Kaneko R, Aoki H, Nakano D, Sasagawa T, Kabasawa H, Kaseda R, Yasukawa R, Ishikawa T, Suzuki A, Sato H, Kageyama S, Tanaka T, Kitamura N, Narita I, Komatsu M, Nishiyama A, Saito A. *J Am Soc Nephrol*. 2016 Jul;27(7):1996-2008.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomomichi Iida, Michihiro Hosojima, et al.
2. 発表標題 Two forms of urinary megalin excretion are novel predictors of the progression of early-stage diabetic kidney disease in type 2 diabetes
3. 学会等名 ISN Frontiers Meetings (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯田倫理, 細島康宏ら
2. 発表標題 早期の糖尿病腎症における腎予後予測マーカーとしての尿中メガリン測定の意義
3. 学会等名 第60回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	斎藤 亮彦  (Saito Akihiko)  (80293207)	新潟大学・医歯学総合研究科・特任教授    (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------