

平成21年5月18日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590941
 研究課題名(和文) 近位尿細管エンドサイトーシス受容体メガリンと関連分子の発現調節および相互作用機序
 研究課題名(英文) Regulation of expression and interaction of megalin, a proximal tubular endocytic receptor, and its related molecules
 研究代表者
 齊藤 亮彦 (SAITO AKIHIKO)
 新潟大学・大学院医歯学総合研究科・特任教授
 研究者番号：80293207

研究成果の概要：

近位尿細管エンドサイトーシス受容体メガリンは糸球体濾過蛋白の再吸収と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分子である。私たちはアンジオテンシン II やインスリンによるメガリンの発現調節機構や、細胞内のアダプター分子やミオシンなどとの相互作用機序を明らかにした。さらに糸球体濾過蛋白による近位尿細管上皮細胞傷害(アポトーシスなど)にメガリンが重要な役割を担うことを見出すとともに、メガリンの新規リガンドの同定を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：メガリン、近位尿細管上皮細胞、アポトーシス、アンジオテンシン II、インスリン、分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

近位尿細管エンドサイトーシス受容体メガリンは糸球体濾過蛋白の再吸収と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分子である。

糖尿病性腎症の診断に用いられる微量アルブミン尿の発生において、近位尿細管上皮細胞の機能異常に伴うアルブミンの再吸収の低下が重要な役割を担うことが示唆されている。しかしアルブミンの再吸収にかかわるメガリンの機能調節や分子機構については不明な点が多い。

2. 研究の目的

メガリンの発現調節機構、特にアンジオテンシン II やインスリンによる影響や、細胞内のアダプター分子や他の分子などとの相互作用機序を明らかにする。さらに糸球体性蛋白尿を引き起こす動物モデルにおいて近位尿細管上皮細胞傷害にメガリンが果たす役割を解析する。

3. 研究の方法

- (1) ラットアンジオテンシン II 受容体 (AT_{1A}R) 遺伝子を導入した培養近位尿細管上皮 OK 細胞を用いて、メガリンの発現調節機構を検討した。
- (2) 近位尿細管上皮細胞のエンドサイトーシス障害をきたす Dent 病患者において、クロライドチャンネル *CLC5* 遺伝子異常に伴うメガリン、キュビリン、Dab2 (細胞内アダプター分子) などの発現異常について解析する。
- (3) メガリンノックアウトマウスを用いて、糸球体濾過蛋白の増加により引き起こされる近位尿細管上皮細胞傷害にメガリンが関与するか検討した。
- (4) 免疫沈降反応や質量分析法を用いて、近位尿細管上皮細胞において、メガリンが細胞内アダプター分子 Dab2 を介してどのような分子と相互作用を及ぼし合うか検討した。
- (5) メガリンの新規リガンド分子を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) ラットアンジオテンシン II 受容体 (AT_{1A}R) 遺伝子を導入した培養近位尿細管上皮 OK 細胞を用いて、メガリンの発現調節機構を検討した結果、メガリンは AT_{1A}R を介するシグナルによって発現が減弱し、アルブミンなどの取り込みが減少した。さらに、その作用は ERK シグナル経路によって制御されることを明らかにした。また逆にインスリンはメガリンの発現を維持する働きがあり、それは IRS/PI3K シグナル経路を介することを明らかにした。さらに AT_{1A}R を介する ERK シグナルはインスリンにより拮抗され、また逆にインスリン-IRS/PI3K シグナルはアンジオテンシン II によって拮抗される関係にあることを明らかにした。糖尿病性腎症などにおいては腎内のアンジオテンシン II 活性が高まると同時にインスリンシグナル異常が起こることが示唆されており、本成果は、そのような病態におけるメガリンの機能異常や蛋白尿・アルブミン尿発症機序を理解するうえで意義がある。(論文 2)
- (2) クロライドチャンネル *CLC5* 遺伝子異常症患者におけるメガリン、キュビリン、Dab2 が腎組織において発現低下することを明らかにした。さらに遺伝子異常に伴って糖鎖修飾不全をきたすことを示した。(論文 6)
- (3) メガリンノックアウトマウスを用いて、糸球体濾過蛋白の増加により引き起こされる近位尿細管上皮細胞傷害はメガリンを介して病的シグナルが伝達されることを明らかにした。すなわちメガリンが発

現する近位尿細管上皮細胞において、HO-1 や MCP-1 が優位に発現するとともにアポトーシスが進行することを明らかにした。(論文 3)

- (4) 免疫沈降反応や質量分析法を用いて、近位尿細管上皮細胞においてメガリンが細胞内アダプター分子 Dab2 を介して nonmuscle myosin heavy chain IIA (NMHC IIA) と分子間相互作用を及ぼしあい、それがエンドサイトーシス機能に関係することを明らかにした。NMHC II の遺伝子異常は腎障害の進展に関連することが知られており、本知見が腎機能障害の新しいメカニズムの解明につながる可能性がある。(論文 1)
- (5) シスタチン C がメガリンの新規リガンドであることを明らかにした。(論文 7)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) Hosaka K, Takeda T, Iino N, Hosojima M, Sato H, Kaseda R, Yamamoto K, Kobayashi A, Gejyo F, Saito A: Megalin and nonmuscle myosin heavy chain IIA interact with the adaptor protein Disabled-2 in proximal tubule cells. *Kidney Int.* (査読有) in press
- 2) Hosojima M, Sato H, Yamamoto K, Kaseda R, Soma T, Kobayashi A, Suzuki A, Kabasawa H, Takeyama A, Ikuyama K, Iino N, Nishiyama A, Thekkumkara TJ, Takeda T, Suzuki Y, Gejyo F and Saito A: Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor- and insulin-mediated signaling cross-talk. *Endocrinology* (査読有), 150: 871-878, 2009
- 3) Motoyoshi Y, Matsusaka T, Saito A, ...他 4 名 (3 番目): Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria. *Kidney Int.* (査読有) 74:1262-1269, 2008
- 4) Hosaka K, Kazama JJ, Yamamoto S, Ito Y, Iino N, Maruyama H, Saito A, Narita I and Gejyo F: Alterations in serum phosphate levels predict the long-term response to intravenous calcitriol therapy in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *J Bone Metab.* (査読有) 26: 185-190, 2008
- 5) Arai M, Mizuta K, Saito A, ...他 4 名 (3 番目): Localization of megalin in rat vestibular dark cells and endolymphatic sac epithelial cells. *Acta Otolaryngol.* (査読有) 128: 627-633, 2008
- 6) Tanuma A, Sato H, Takeda T, Hosojima M, Obayashi H, Hama H, Iino N, Hosaka K,

- Kaseda R, Imai N, Ueno M, Yamazaki M, Sakimura K, Gejyo F and Saito A: Functional characterization of a novel missense *CLCN5* mutation causing alterations of proximal tubular endocytic machinery in Dent's disease. *Nephron Physiol.* (査読有) 107: 87-97, 2007
- 7) Kaseda R, Iino N, Hosojima M, Takeda T, Hosaka K, Kobayashi A, Yamamoto K, Suzuki A, Kasai A, Suzuki Y, Gejyo F and Saito A: Megalin-mediated endocytosis of cystatin C in proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 357: 1130-1134, 2007
- 8) Saeki T, Saito A, ... 他 7 名 (2 番目): Tubulointerstitial nephritis associated with IgG4-related systemic disease. *Clin Exp Nephrol.* (査読有) 11: 168-173, 2007
- [学会発表] (計 32 件)
- 1) 齊藤亮彦: 糖尿病性腎症の発症・進展機序: 近位尿細管機構以上をひとつの起点として. 第 16 回明日の腎臓病糖尿病を考える若手の会 2009.3.7 神奈川 横浜
 - 2) 竹田徹朗, 山本佳子, 細島康宏, 竹山綾, 蒲澤秀門, 飯野則昭, 齊藤亮彦, 鈴木芳樹, 下条文武: 肥満者に対する減量プログラムは尿中アルブミンを減少させる. 日本糖尿病性腎症研究会 2008.12.6 東京
 - 3) 飯野則昭, 成田一衛, 下条文武, 齊藤亮彦: 慢性腎臓病の新規発症に関わる危険因子の検討. 日本糖尿病性腎症研究会 2008.12.6 東京
 - 4) Iino N, Narita I, Saito A and Gejyo F: Predictive factors of development of CKD in the general Japanese population. The American Society of Nephrology Renal Week 2008 2008.11.4-9 Philadelphia, USA
 - 5) 竹田徹朗, 山本佳子, 細島康宏, 竹山綾, 蒲澤秀門, 下条文武, 飯野則昭, 齊藤亮彦, 鈴木芳樹: 肥満者に対するフォーミュラ食を用いた低エネルギー食による尿中アルブミン排泄量の減少効果. 第 19 回新潟糖尿病臨床研究会 2008.9.27 新潟 新潟市
 - 6) 山本佳子, 細島康宏, 倅田亮平, 飯野則昭, 田中純太, 竹田徹朗, 齊藤亮彦, 鈴木芳樹, 下条文武, 荒川正昭: 有酸素およびレジスタンス運動療法を含む生活習慣指導による尿中アルブミン排泄量の減少効果. 第 19 回新潟糖尿病臨床研究会 2008.9.27 新潟 新潟市
 - 7) 飯野則昭, 山本佳子, 竹田徹朗, 成田一衛, 鈴木芳樹, 下条文武, 齊藤亮彦: 大規模疫学データを用いた慢性腎臓病の新規発症に関わる危険因子の検討: 第 15 回新潟糖尿病性腎症研究会 2008.9.11 新潟 新潟市
 - 8) 齊藤亮彦: 糖尿病性腎症と高血圧の発症機序: 近位尿細管機能異常をひとつの起点として. Hypertension Forum 2008.8.28 埼玉 川越市
 - 9) Hosojima M, Iino N, Kobayashi A, Soma T, Sato H, Takeda T, Nishiyama A, Thekkumkara TJ, Suzuki Y, Gejyo F and Saito A: Angiotensin II and insulin-mediated signaling pathways that regulate the expression of megalin in cultured proximal tubule cells. ISN Nexus-Linking Research to Practice Diabetes and the Kidney 2008.6.26-29 Dunlin Ireland.
 - 10) 飯野則昭: 慢性腎臓病の新規発症に関わる危険因子の検討. 新潟県医師会生涯教育講座/大学院特別講義 第 21 回新潟臨床腎セミナー 2008.6.7 新潟 新潟市
 - 11) 山本佳子, 細島康宏, 佐藤博慶, 蒲澤秀門, 竹山綾, 飯野則昭, 竹田徹朗, 鈴木芳樹, 下条文武, 齊藤亮彦: Angiotensin II および Insulin による近位尿細管上皮細胞機能分子群の細胞内輸送機序の解析. 第 51 回日本腎臓学会学術総会 2008.5.30-6.1 福岡 福岡市
 - 12) 飯野則昭, 成田一衛, 下条文武, 齊藤亮彦: 慢性腎臓病を発症する危険因子を大規模検診データから明らかにする横断研究. 第 51 回日本腎臓学会学術総会 2008.5.30-6.1 福岡 福岡市
 - 13) 佐藤博慶, 田沼厚人, 竹田徹朗, 細島康宏, 鈴木哲世, 山本佳子, 飯野則昭, 下条文武, 齊藤亮彦: Dent 病責任遺伝子(*CLCN5*)G333R ミスセンス変異による糖鎖修飾異常. 第 51 回日本腎臓学会学術総会 2008.5.30-6.1 福岡 福岡市
 - 14) 竹田徹朗, 山本佳子, 細島康宏, 竹山綾, 蒲澤秀門, 飯野則昭, 齊藤亮彦, 鈴木芳樹, 下条文武: 肥満者に対するフォーミュラ食を用いた減量によるアディポサイトカイン・尿中アルブミンの変動. 第 51 回日本腎臓学会学術総会 2008.5.30-6.1 福岡 福岡市
 - 15) 齊藤亮彦: メタボリック症候群による尿細管障害機序. 第 51 回日本腎臓学会学術総会 2008.5.30-6.1 福岡 福岡市
 - 16) 竹田徹朗, 山本佳子, 細島康宏, 竹山綾, 蒲澤秀門, 飯野則昭, 齊藤亮彦, 鈴木芳樹, 下条文武: 肥満者に対する

- フォーミュラ食を用いた低エネルギー食による尿中アルブミン排泄量の減少効果. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術会議 2008.5.22-24 東京 千代田区
- 17) 山本佳子, 細島康宏, 悴田亮平, 佐藤博慶, 蒲澤秀門, 竹山綾, 相馬多恵子, 飯野則昭, 竹田徹朗, 鈴木芳樹, 下条文武, 齊藤亮彦: Angiotensin II および Insulin による近位尿細管上皮細胞機能分子群の複合的調節機構の解析. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術会議 2008.5.22-24 東京 千代田区
- 18) Iino N, Narita I, Saito A and Gejyo F: Anemia is a predictive factor for the development of CKD only in man, but not in women, of general Japanese population. 11th Asian Pacific Congress of Nephrology. 2008.5.5-8 Kuala Lumpur Malaysia.
- 19) 飯野則昭, 竹田徹朗, 成田一衛, 鈴木芳樹, 齊藤亮彦, 下条文武: 『慢性腎臓病新規発症に関わる高血圧、糖尿病などの各種危険因子の役割—新潟県の人間ドック受診者からの解析—』新潟県医師会生涯教育講座 第二回高血圧と糖尿病研究会 2008.3.21 新潟 新潟市
- 20) 齊藤亮彦: 腎臓の蛋白代謝機構とメガリン 第 43 回信州腎セミナー 2008.3.1. 長野 松本市
- 21) 齊藤亮彦, 細島康宏, 山本佳子, 佐藤博慶, 小林麻子, 相馬多恵子, 飯野則昭, 竹田徹朗, 西山成, 鈴木芳樹, 下条文武: アンジオテンシン \square およびインスリンシグナルを介した近位尿細管エンドサイトーシス受容体とその関連分子の機能調節. 第 19 回日本糖尿病性腎症研究会. 2007.12.1-2. 東京 文京区
- 22) Iino N: Initiation of peritoneal dialysis successfully improved the quality of life in three cases of refractory congestive heart failure patients who developed end stage renal disease. The 3rd Asian chapter meeting of international society for peritoneal dialysis(第 3 回国際腹膜透析学会アジア大会). 2007.11.22-24 Hiroshima Japan.
- 23) 齊藤亮彦: メガリンの機能と腎傷害. 川島腎系球体カンファレンス. 2007.11.10-11. 岐阜 各務原市
- 24) Yamamoto K, Hosojima M, Saito M, Tanaka J, Hashiba M, Iino N, Takeda T, Suzuki Y, Gejyo F, Saito A and Arakawa M: Effects of combined aerobic and resistance exercise on albuminuria: Analysis of parameters associated with its reduction. ASN Renal Week 2007 2007.11.1-5 San Francisco USA
- 25) Hosojima M, Iino N, Kobayashi A, Kaseda R, Nishiyama A, Thekkumkara TJ, Takeda T, Gejyo F and Saito A: Angiotensin II and insulin-mediated signaling cross-talks for the expression of megalin in cultured proximal tubule cells. ASN Renal Week 2007 2007.11.1-5 San Francisco USA
- 26) 齊藤亮彦, 佐藤慶博, 相馬多恵子, 飯野則昭, 蒲澤秀門, 竹山綾, 山本佳子, 細島康宏, 竹田徹朗, 鈴木芳樹, 下条文武: 食にまつわる健康の問題: 糖尿病・メタボリックシンドロームの予防と合併症の対策. 食と花の世界フォーラム 2007 食の国際見本市. 2007.10.26-28. 新潟コンベンションセンター
- 27) 齊藤亮彦: 生活習慣病に関連する慢性腎臓病. 第 635 回新潟医学会. 2007.10.20 新潟 新潟市
- 28) 細島康宏, 飯野則昭, 小林麻子, 悴田亮平, 山本佳子, 鈴木哲世, 笠井綾香, 竹田徹朗, 西山成, 鈴木芳樹, 下条文武, 齊藤亮彦: アンジオテンシン \square およびインスリンシグナルの拮抗的クロストークを介したメガリンの発現調節機構. 第 14 回新潟糖尿病性腎症研究会. 2007.9.13 新潟 新潟市
- 29) 竹田徹朗, 山本佳子, 細島康宏, 悴田亮平, 保坂聖子, 飯野則昭, 齊藤亮彦, 鈴木芳樹, 下条文武: 新潟県下越地方における透析患者の糖尿病治療の実態. 第 52 回日本透析医学会学術集会・総会 2007.6.15-17 大阪 大阪市
- 30) 細島康宏, 飯野則昭, 小林麻子, 悴田亮平, 山本佳子, 西山成, 竹田徹朗, 鈴木芳樹, 下条文武, 齊藤亮彦: アンジオテンシン \square -AT1a 受容体を解するメガリンの発現抑制機構とインスリンによる拮抗作用. 第 50 回(平成 19 年度)日本腎臓学会学術総会. 2007.5.26 静岡 浜松市
- 31) 鈴木哲世, 竹田徹朗, 笠井綾香, 山本佳子, 細島康宏, 小林麻子, 飯野則昭, 鈴木芳樹, 下条文武, 齊藤亮彦: Amnionless の細胞膜発現に対する megalin の役割. 第 50 回(平成 19 年度)日本腎臓学会学術総会. 2007.5.25 静岡 浜松市
- 32) 齊藤亮彦: メタボリックシンドロームと腎疾患の係わり. 第 630 新潟医学会. 2007.4.21 新潟 新潟市

[図書] (計 2 件)

- 1) 飯野則昭, 齊藤亮彦, 下条文武: 腎代替医療への先端技術の応用. 最新透析医学: 675-678, 2008
- 2) Saito A: Role of proximal tubule cells in the intrarenal rennin-angiotensin system. Gejyo F(Chief editor): Recent advances and new insight into the rennin-angiotensin-aldosterone system in the kidney. Koko-do, Niigata, Japan, 2007, 24-28

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 尿中タンパク質定量用の尿前処理剤、尿前処理法、及び尿中タンパク質定量方法
発明者: 齊藤亮彦、原 正則、小笠原真也、平山吉朗、黒澤寛之
権利者: 新潟大学、デンカ生研株式会社
種類: 特許
番号: 特願 2007-251707
出願年月日: 平成 19 年 9 月 27 日
国内外の別: 国内外

○取得状況 (計 1 件)

名称: 蛋白代謝機能を有する人工腎臓およびその作製方法
発明者: 齊藤亮彦、田畑泰彦、下条文武
権利者: 新潟大学、株式会社カネカ
種類: 特許
番号: 4181877
取得年月日: 平成 20 年 5 月 17 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.niigata-u.ac.jp/amm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤亮彦 (SAITO AKIHIKO)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・特任教授
研究者番号: 80293207

(2) 研究分担者

竹田 徹朗 (TAKEDA TETSURO)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号: 10361924

(3) 連携研究者

なし