

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08629

研究課題名（和文）糖尿病性腎臓病の新規尿中マーカー、細胞外ドメイン切断型メガリンの尿中逸脱機序

研究課題名（英文）Urinary excretion mechanism of a novel urinary biomarker of diabetic kidney disease, extracellular domain type of megalin

研究代表者

細島 康宏（HOSIJIMA, MICHIMIRO）

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） 3,300,000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。我々は、マウスにおける尿中A-メガリン（細胞外ドメイン切断型）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、尿中細胞外ドメイン切断型メガリンが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。マウス尿中メガリン測定系の活用も含め、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. 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

キーワード：メガリン 近位尿細管 糖尿病 糖尿病性腎臓病 エンドサイトーシス バイオマーカー SGLT2阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

透析患者は現在 30 万人を超えてなお増加しているが、QOL の問題のみならず、年間約 2 兆円の医療費が投入されていることから、医療経済上も重大な課題となっている。糖尿病性腎臓病 (DKD) は透析導入の原因疾患の第一位を占め、その早期診断や重症度判定は重要な課題である。現時点では血清クレアチニン値を基にした推算糸球体濾過量 (eGFR) および随時尿を用いたアルブミン/クレアチニン比 (ACR) の測定が最も簡便な方法とされ、それらに基づいて病期分類が行われている。しかし、それらが腎症の病態を正確に反映し、治療の効果を判定する上で必要にして十分な検査であるとは言えず、その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る。

メガリンは LDL 受容体ファミリーに属する巨大分子であり、ヒト腎臓では近位尿細管細胞の管腔側膜に高発現するエンドサイトーシス受容体として、多種の糸球体濾過蛋白質や薬剤の再吸収・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(1)。研究代表者は以前より、尿中メガリン排泄の動態を計測することにより、近位尿細管細胞傷害の早期からの特異的な診断の実現化と病態機序の解明を試みてきた。その結果、デンカ生研株式会社との産学共同研究により、ヒト尿中メガリン測定 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 系を世界で初めて開発し、国内外の特許取得をしている(2)。さらに、この ELISA 系の検討により、尿中メガリン逸脱様式には全長型と細胞外ドメイン切断型の 2 つのパターンがあること、DKD の横断的研究において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増加すること、また尿中全長型メガリンが近位尿細管細胞のリソソームにおける病的蛋白質(終末糖化産物等)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てきた(3)。

一方で、研究代表者らは最近、2 型糖尿病患者における縦断的解析において、尿中細胞外ドメイン型メガリンが DKD の進展予測マーカーとして有用であることを見出した(4)。また、Sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) 阻害薬は様々な臨床研究において腎保護効果も報告されている新規の糖尿病治療薬であるが、メガリンの「リガンド」蛋白質の尿中排泄を増加させることが報告されていた。そこで、SGLT2 阻害薬によるメガリン発現・機能調節効果を明らかにするため、軽度～中等度腎機能障害を呈する成人 2 型糖尿病患者に対して、SGLT2 阻害薬エンパグリフロジンを投与したところ (UMIN: 000023902)、細胞外ドメイン型尿中メガリンの持続的な減少と、 α_1 -ミクログロブリン等のメガリン「リガンド」蛋白質の尿中排泄の増加をきたすことが明らかになった(論文投稿準備中)。さらに、バルドキシロンメチルは転写因子 Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) を活性化し、DKD 患者における腎機能改善効果が期待されている薬剤であるが、欧米の臨床試験では心血管イベント発症増加のため中断されたものの、日本国内で施行された第 2 相臨床試験 (TSUBAKI 試験) においてイヌリンクリアランスの改善が報告された。本薬剤はアルブミン尿の増加をきたし、動物実験で近位尿細管におけるメガリンの発現抑制効果が示唆されていることから、バルドキシロンメチルを用いた TSUBAKI 試験の残余尿検体にて尿中メガリンの動態を解析したところ、eGFR の変動を考慮しても細胞外ドメイン型尿中メガリンが増加傾向を示し (ACR は eGFR の変動を考慮すると著変なし)、また、休薬により減少することが明らかになった(論文投稿準備中)。

このように、細胞外ドメイン型尿中メガリンは新規の糖尿病関連薬の薬効を反映して増減することが明らかになってきており、デンカ株式会社とともに、まずは研究試薬として申請することが決定している。しかし、その一方で、その尿中逸脱機序の詳細は十分に明らかとはならない。その機序の 1 つとして、研究代表者らのグループはメガリンのリサイクリングの異常に伴って膜への輸送が障害されることにより、細胞外ドメイン型メガリンの尿中逸脱が低下することを明らかにしてきた(5)。さらに、細胞外ドメイン型メガリンの尿中排泄は、メガリンのリサイクリングの制御の他、膜上の発現量、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) 活性等が関係するとも考えられるが、いずれにおいても上述の薬剤の作用との関連も含め、その詳細は不明のままである。

2. 研究の目的

細胞外ドメイン型尿中メガリンは新規の糖尿病関連薬などにより鋭敏に増減することが明らかになってきたが、その尿中への逸脱機序の詳細は未だ十分に解明されていない。そこで本研究は、細胞外ドメイン型メガリンの尿中逸脱機序の詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- 1) 細胞内輸送実験系を用いたメガリンの細胞内リサイクリングと細胞外逸脱の関係
メガリン発現培養細胞を用いた実験系において、メガリンを特異抗体で標識した後、メガリンの細胞内リサイクリングと細胞外逸脱を亢進させる添加因子や細胞内アダプター分子の動態を検討する。細胞外逸脱の亢進に関しては MMP 活性との関連を検討する。
- 2) DKD の進展時における細胞外ドメイン型尿中メガリンの逸脱機序の解析
上記の培養実験系において終末糖化産物等を添加してメガリンの細胞内リサイクリングと細胞外逸脱への影響を検討するとともに、db/db マウス等の DKD モデル動物において腎内メガリン発現・MMP 活性と細胞外ドメイン型メガリンの尿中排泄との関連性を検討する。

3) SGLT2 阻害薬使用時の細胞外ドメイン型尿中メガリンの逸脱機序

マウスに SGLT2 阻害薬を投与し、腎内メガリン発現・MMP 活性・細胞内アダプター分子の動態等と細胞外ドメイン型メガリンの尿中排泄との関連性を検討する(特にメガリンの発現低下と関係するか?)。

4) バルドキソロンメチル使用時の細胞外ドメイン型尿中メガリンの逸脱機序

マウスにバルドキソロンメチルを投与し、腎内メガリン発現・MMP 活性・Nrf2 活性化等と細胞外ドメイン型メガリンの尿中排泄との関連性を検討する(特に MMP 活性の亢進があるか?)。

4. 研究成果

1) 「細胞内輸送実験系を用いたメガリンの細胞内リサイクリングと細胞外逸脱の関係」においては、培養細胞における細胞内リサイクリングと細胞外逸脱の関係を検討し得る実験系を確立した。これを用いた解析により、proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) 添加によりメガリンとリソソームの共局在性が増加することが明らかとなり、メガリンのリソソームへの移行と代謝を促す可能性を示す知見を得た。これまでに、研究代表者らのグループにおける検討において得られた、PCSK9 を用いた動物実験における知見も含め論文投稿を準備中である。

2) 「DKD の進展時における細胞外ドメイン型尿中メガリンの逸脱機序の解析」においては、6、8、10、12 週齢と経時的に、DKD モデル動物である db/db マウスの細胞外ドメイン型尿中メガリンの解析を行ったところ、6 週齢の時点ですでに、コントロール群に比して細胞外ドメイン型メガリンの尿中排泄量が増加している可能性が示唆された。これは、全長型メガリンの尿中排泄量とは異なる傾向であった。また、Liquid Chromatograph/Mass Spectrometry (LC/MS) を用いた細胞外ドメイン型尿中メガリンの断端解析を行える実験系を確立した。様々な酵素による消化を行うことで、細胞外ドメイン切断型メガリンの C 末端として最も可能性の高い配列を見出すことができた。現在、この断端配列のより詳細な検証を行っている。

3) 「SGLT2 阻害薬使用時の細胞外ドメイン型尿中メガリンの逸脱機序」については、上述の検討を踏まえ、6 週齢の db/db マウスに SGLT2 阻害薬(ダバグリフロジン 1mg /日、14 日間)を投与し、腎臓でのメガリン発現量および、メガリンやメガリンのリガンドである α_1 -ミクログロブリンなどの尿中排泄量の解析を行ったところ、コントロール群に比してダバグリフロジン群において、有意な尿中アルブミン排泄量の変化がない中で、明らかな細胞外ドメイン切断型尿中メガリン排泄量の減少と、尿中 α_1 -ミクログロブリン排泄量の上昇を認めた。今後は、このモデルにおける更なる詳細な検討を行う予定である。

4) 「バルドキソロンメチル使用時の細胞外ドメイン型尿中メガリンの逸脱機序」では、野生型マウスにバルドキソロンメチルを 1.25mg/kg を 3 日間、2.5mg/kg を 4 日間、5.0mg/kg を 7 日間の計 14 日間、漸増して投与する実験を行ったが、尿中メガリン排泄量のばらつきが大きく評価不十分であった。最近、糖尿病性腎臓病を対象としたバルドキソロンメチルに関する国内第 3 相臨床試験 (AYAME 試験) の結果が報告されたが、末期腎不全への進展を抑制する効果は得られなかった。今後、前述したバルドキソロンメチルによる細胞外ドメイン型尿中メガリンの増加について、論文による報告を行う予定である。

引用文献

- (1) The endocytosis receptor megalin: From bench to bedside. Goto S, Hosojima M, Kabasawa H, Saito A. *Int J Biochem Cell Biol*, 2023 Apr;157:106393.
- (2) 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.
- (3) 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.
- (4) Urinary A- and C-megalin predict progression of diabetic kidney disease: an exploratory retrospective cohort study. Iida T, Hosojima M, Kabasawa H, Yamamoto-Kabasawa K, Goto S, Tanaka T, Kitamura N, Nakada M, Itoh S, Ogasawara S, Kaseda R, Suzuki Y, Narita I, Saito A. *J Diabetes Complications*. 2022 Nov;36(11):108312.
- (5) Decreased urinary excretion of the ectodomain form of megalin (A-megalin) in children with OCRL gene mutations. Suruda C, Tsuji S, Yamanouchi S, Kimata T, Huan NT, Kurosawa H, Hirayama Y, Tsukaguchi H, Saito A, Kaneko K. *Pediatr Nephrol*. 2017 Apr;32(4):621-625.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	齋藤 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