

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：34414

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790514

研究課題名（和文）タンパク尿におけるアンジオテンシンⅡとメガリンの関係

研究課題名（英文）The relationship between angiotensin II and megalin in proteinuria

研究代表者

山形 雅代（YAMAGATA MASAYO）

大阪大谷大学・薬学部・講師

研究者番号：50454583

研究成果の概要（和文）：

我々が作製した 5/6 腎摘出慢性腎不全モデルラットにおいて、経時的にタンパク尿が認められた。この認められたタンパク尿は、ロサルタン投与により有意ではないが減少していた。また、この慢性腎不全モデルラットの腎臓より作製した切片を用いた検討では、メガリンの発現が、低下していた。メガリンは、近位尿細管管腔側に発現しており、糸球体を濾過した低分子タンパクを再吸収する機能を持つ。ロサルタンを投与したモデルラットの腎組織において、メガリンの発現は回復していた。このことより、メガリンの発現の回復が、タンパク尿の改善に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We examined the improvement of proteinuria in the 5/6 nephrectomy model (Nx) and the effect of an association between an AT-1 receptor blocker, losartan (L), and megalin. The proteinuria insignificant decreased to Nx model rat treated with L as compared with Nx model rats. We demonstrated that megalin reduced in Nx model rat kidney by immunohistochemistry using anti-megalin antibody. On the other hands, expression of megalin recovered to sham level in Nx model rat treated with L. Megalin is a multiligand endocytotic receptor involving in the reabsorption of low molecular weight proteins in renal proximal tubule. Accordingly, this data suggest that rescue of megalin expression were contributed to improvement of proteinuria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	900,000	270,000	1,170,000
平成23年度	900,000	270,000	1,170,000
平成24年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬学

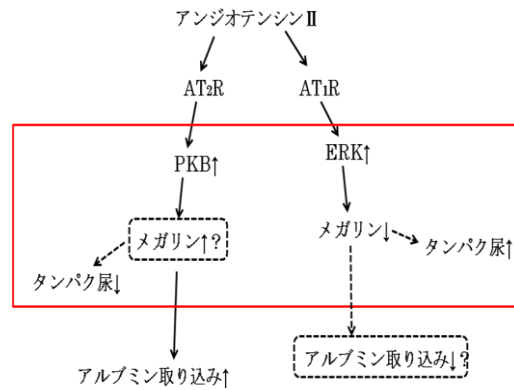
キーワード：メガリン、タンパク尿、アンジオテンシンⅡ

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease:CKD) の診断基準の一つであるタンパク尿は、腎機能障害進行の重要な危険因子であり、尿タンパクを減少させることで、CKD の予後を改善できると考えられている (CKD 診療ガイド 2009)。CKD の治療薬として、ARB や ACE 阻害薬が知られている。これらの薬物は、尿タンパクを減少することが知られており (Kanno Y et al, Clin J Am Soc Nephrol, 2006)、他の降圧薬に比して尿タンパク減少効果に優れている。ARB や ACE 阻害薬による CKD の進行抑制は、尿タンパク減少効果に依存している。また、ARB や ACE 阻害薬により、微量アルブミン尿やタンパク尿を改善することで、心血管系の事故を減らすとされている (CKD 診療ガイド 2009)。

腎近位尿細管細胞刷子縁に発現しているメガリンは、Low Density Lipoprotein-Related Protein(LRP)ファミリーの一員で、糸球体をろ過したビタミン D 結合蛋白(DBP)、トランスコバラミン(ビタミン B<sub>12</sub> 輸送担体)、アルブミン等様々な分子と結合し、細胞内に取り込むエンドサイトーシス受容体である。このメガリン遺伝子欠損マウスは、低分子量タンパク尿を呈することが示されており (Nykjear A, et al, Cell, 1999)、メガリンの発現の変化は、タンパク尿の程度を決定する要因となると考えられる。2009 年の Hosojima M らは、フクロネズミの腎尿細管細胞株 OK 細胞にアンジオテンシン II type1A 受容体 (AT<sub>1A</sub>-R) を発現させた細胞株を用いて①アンジオテンシン II (Ang II) は、AT<sub>1A</sub>-R、ERK を介してメガリンの発現を減少させること、②インスリンは、PI3K を介してメガリンの発現を減少させること、③Ang II は、インスリンを介した PI3K の活性化を抑制することを報告した。また、2005 年に LLC-PK1 細胞を用いたアルブミンの細胞内取り込みは、Ang II の添加により増加すること、それはアンジオテンシン II type2(AT<sub>2</sub>R)受容体を介して PKB の活性化により増加することが報告された (Caruso-Neves C, et al, Proc Natl Acad Sci USA, 2005)。これら二報の報告より、Ang II により AT<sub>1</sub>R を介して ERK のリン酸化によりメガリンの発現が低下すること、AT<sub>2</sub>R を介して PKB の活性化によりアルブミンの細胞内取り込みが促進することの二通りの制御によりメガリンの発現が調節されていると考えられる (図)。

図に示すように、ERK のリン酸化の結果、メガリンの発現量が減少することによりリガンドの取り込みも抑制されるか、さらに生体内において腎近位尿細管腔側からのリガンドの再吸収も抑制され、タンパク尿を増悪させるか明らかではない。また、PKB の活性化により、アルブミンの細胞内取り込みが



促進されたが、これにメガリンの発現増加が伴っているか明らかではなく、生体においても PKB の活性化によりメガリンの発現が変化し、タンパク尿が改善されるか明らかではない。さらに Ang II 以外にもインスリンやサイトカインのような Akt / PKB を活性化する分子によって、メガリンの発現が増加するか明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、①Ang II 添加により PI3K-Akt/PKB を介してメガリンの発現増加するか、②MEK-ERK を介してメガリンの発現減少によって、メガリンリガンドの細胞内取り込みが抑制されるか、③ロサルタン(ARB)を投与した腎障害モデル動物において、タンパク尿を改善させるか、その時の腎組織から得た総蛋白中の ERK のリン酸化は変化しているか、また PI3K-Akt/PKB の活性化が認められるか、さらにメガリンの発現が対照に比して増加しているか、発現部位は変化しているか、を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 慢性腎不全のモデル動物として、5/6 腎摘したラットを作製する (Plett R, et al, Clin. Sci. 1952)。まず、左腎を腎両端から重量のほぼ 1/3 に相当する部分をそれぞれ切り落とし、2 週間後、右腎を全摘出する。その後 12 週間飼育すると慢性腎不全のモデル動物となる。慢性腎不全に至る過程 (5/6 腎摘後、4、6、8、12 週間目) において、採尿、採血を行う。得られた血液・尿を用いて、後述のように腎機能マーカーを測定する。5/6 腎摘後、4、6、8、12 週間後、腎臓を摘出し、ホルマリン固定を行い、組織切片を作製し、後述のように組織学的検討を行う。

(2) タンパク尿、腎機能および腎障害の評価

これらモデルラットより得られた血液、尿を用いて、血中尿素窒素(BUN)、クレアチニンクリアランス(Ccr)、尿中蛋白質を測定し、腎障害の指標とする。また摘出した腎組織をホルマリン固定後、組織切片を作製し、ヘマトキリンーエオジン染色により、腎障害の程度

を観察する。同時に、抗メガリン抗体を用いた免疫染色化学を行い、メガリンの発現部位、発現量について検討を行う。ここで用いる抗メガリン抗体については、マウスのメガリン遺伝子のC末端領域(細胞内ドメイン)を遺伝子クローニングし、N末端側にHisタグを付加したベクターを用いてリコンビナントタンパク発現ベクターを作成し、大腸菌を用いて発現、精製し、ウサギに免疫することにより、これを認識するポリクローナル抗体を作成した。このポリクローナル抗体は、ラットのメガリンも認識することは、確認済みである。

### (3) ARBの影響

さらにロサルタンカリウム(低用量:20mg/L, 高用量:200mg/L)を飲水投与することにより、タンパク尿が是正されるか、またメガリンの発現量が増加するか、発現部位が変化するか検討を行う。

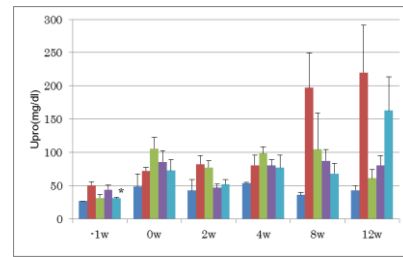
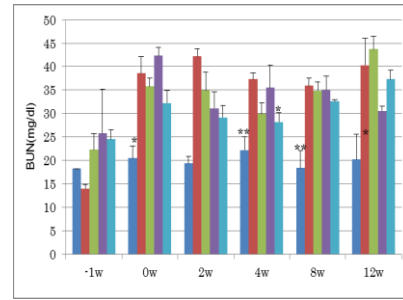
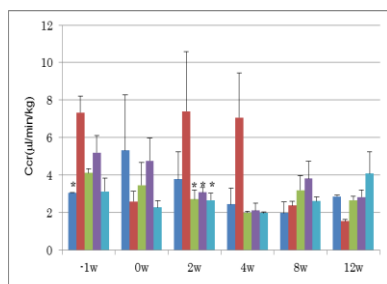
### (4) メガリンの機能に関する効果

メガリン機能を確認するため、ブタ腎近位尿管由来の細胞株 LLC-PK1 細胞にPI3K阻害薬である wortmannin(100nM)を前日に添加し、メガリンリガンドの一つであるRAP(Receptor associated protein)を添加することにより、RAPの細胞内取り込みが抑制されるかを検討した。LLC-PK1を滅菌したカバーガラス上に撒き、ウォルトマン前処置24時間後、メガリンのリガンドとして用いられている His-RAP 添加後、抗メガリン抗体、抗His抗体を用いた細胞2重免疫染色を行い、2次抗体(メガリン: anti-rabbit-Alexa 594、His-RAP: anti-goat-Alexa 488)を用いて共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

メガリンのリガンドであるRAPは、N末端側にある分泌シグナルとC末端側にある小胞体保持シグナルを除き、N末端にHisタグを付加した分泌型 His-RAP の大腸菌のタンパク発現システムを構築し、発現、精製した。このリコンビナント分泌型 His-RAP をマウスに投与すると、DBPの尿中への漏出が認められ、メガリンによるDBPの細胞内取り込みが抑制された。この手法は、すでに報告しており(Yamagata M, et al, J Am Soc Nephrol 2005)、メガリンリガンドの細胞内取り込みを攪乱させる手段として有用である。

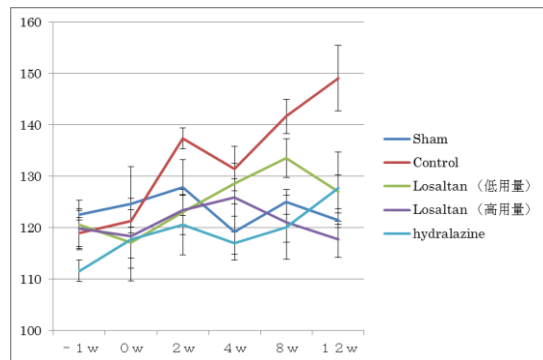
## 4. 研究成果

(1) 慢性腎不全モデルラットにおける腎機能評価



\* vs control  
 Sham (blue), Control (red), Losaltan (low dose) (green), Losaltan (high dose) (purple), hydralazine (cyan)

慢性腎不全モデルラットにおいて、-1週と12週を比較すると control 群では、sham 群に比べ、BUNの上昇、Ccr値の低下、尿中タンパクの増加が認められた。この control 群にロサルタン低用量、高用量投与群共にCcr、尿中タンパクの改善が認められた。このことより、ロサルタン投与により、腎機能改善効果が認められた。対照として、ヒドララジンを投与したモデルラットでは、尿中タンパクの改善効果は認められなかった。



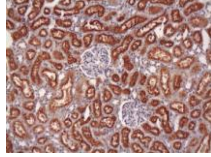
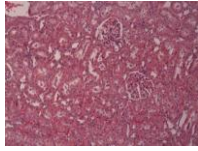
(2) 慢性腎不全モデルラットにおける血圧の経時的変化

control 群において、2週目より血圧の上昇が認められ、12週目までその上昇は維持された。ロサルタン投与群では、血圧の低下は認められ、低用量群ではその血圧下降効果は緩やかであった。対照として投与したヒドララジン群は血圧下降効果を示した。

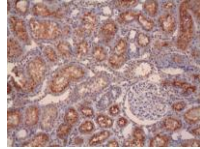
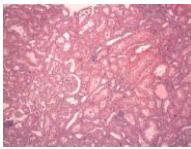
(3) 慢性腎不全モデルラットの腎組織におけるメガリンの発現

HE 染色                      抗メガリン抗体

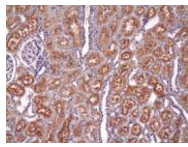
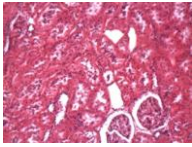
Sham 群



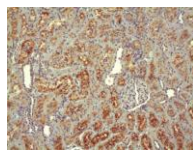
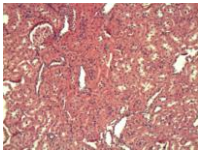
Control 群



ロサルタン 高用量

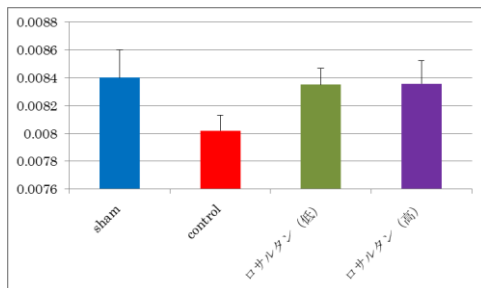


ロサルタン低用量



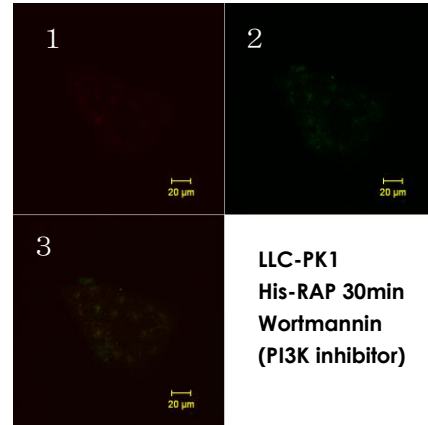
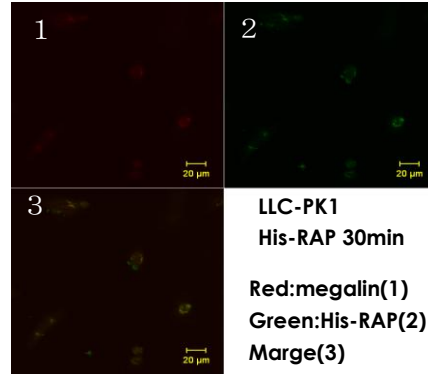
腎不全モデルラットの 12 週目の腎組織切片を用いて、抗メガリン抗体を用いた免疫染色化学を行った。sham 群と比較して、control 群において、腎髄質内層外帯でメガリンの発現が低下していた。しかし、ロサルタン投与することによりメガリンの発現が回復していた。

(4) 慢性腎不全モデルラットにおけるメガリン発現の半定量化



抗メガリン抗体を用いた免疫染色の写真を撮り、win roof ソフトを用いて半定量化したところ、sham 群に比較して、control 群では低下しており、ロサルタン投与群では、sham 群と同程度まで発現が回復していた。

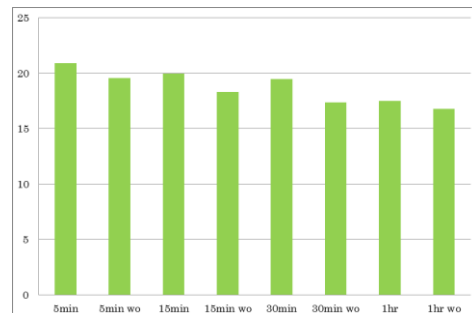
(5) メガリンの機能に関する効果



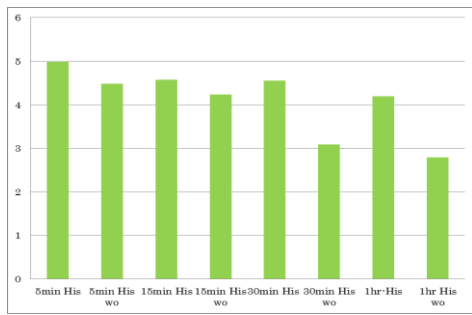
LLC-PK1 に His-RAP を添加することで、メガリンと細胞膜上で共局在することが示された。そこに、PI3K の阻害薬である wortmannin を前処置することによりメガリンと His-RAP の共局在が減少した。

(6) PI3K 阻害薬によるメガリン発現量と His-RAP の細胞内取り込み

メガリンの発現量



## His-RAP の細胞内取り込み量



LLC-PK1 に wortmannin を前処置し、24 時間後 His-RAP を継時的に添加した。メガリンの発現量はほとんど変化していないにもかかわらず、His-RAP の取り込み量は His-RAP 添加 30 分以降に減少していた。このことは、wortmannin 添加によりメガリンの発現量の減少以上に His-RAP の取り込みが減少していることを示し、メガリンの機能も低下していることを示唆する。

### 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 3 件)

① Sodium-coupled neutral amino acid transporter 4 functions as a regulator of protein synthesis during liver development.

Kondou H, Kawai M, Tachikawa K, Kimoto A, Yamagata M, Koinuma T, Yamazaki M, Nakayama M, Mushiake S, Ozono K, Michigami T.

Hepatol Res. 2013 Jan 14. [Epub ahead of print]

② Role of megalin and the soluble form of its ligand RAP in Cd-metallothionein endocytosis and Cd-metallothionein-induced nephrotoxicity in vivo.

Onodera A, Tani M, Michigami T, Yamagata M, Min KS, Tanaka K, Nakanishi T, Kimura T, Itoh N.

Toxicol Lett. 2012 Jul 20;212(2):91-6

③ Protective effect of 17 $\beta$ -estradiol on ischemic acute kidney injury through the renal sympathetic nervous system

Tanaka R, Tsutsui H, Kobuchi S, Sugiura T, Yamagata M, Ohkita M, Takaoka M, Yukimura T, Matsumura Y.

Eur J Pharmacol. 2012 May 15;683(1-3):270-5

[学会発表] (計 5 件)

① 山形雅代、今西康雄、永田友貴、筒居秀伸、稲葉雅章、雪村時人

メガリンは病的副甲状腺で発現が低下する  
第 29 回日本骨代謝学会学術集会 (2011)

② Masayo Yamagata, Yasuo Imanishi, Yuki Nagata, Hidenobu Tsutsui, Masaaki Inaba, Tokihito Yukimura

Attenuated megalin expression in hyperfunctioning parathyroid tumors  
第 2 回 IOF/ANZBMS/JSBMR (国際骨粗鬆症財団、オーストラリア・ニュージーランド骨代謝学会・日本骨代謝学会合同学会) (2011)

③ 今西康雄、山形雅代、永田友貴、筒居秀伸、道上敏美、雪村時人、稲葉雅章

2 次性副甲状腺機能亢進症では、副甲状腺のメガリン発現が低下する  
第 23 回日本腎性骨症研究会 (2012)

④ 永田友貴、今西康雄、山形雅代、道上敏美、雪村時人、稲葉雅章副甲状腺機能亢進症の進展に伴い副甲状腺メガリン発現は低下する  
第 30 回日本骨代謝学会 (2012)

⑤ Nagata Y, Imanishi Y, Yamagata M, Kobayashi I, Ishii A, Michigami T, Yukimura T, Arnold A, Inaba M

Attenuated megalin expression in hyperfunctioning parathyroid glands - possible role of vitamin D signaling  
1st Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting with the ANZBMS 22nd Annual Scientific Meeting (2012)

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山形 雅代 (YAMAGATA MASAYO)

大阪大谷大学・薬学部・講師

研究者番号：50454583

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：