

令和元年6月10日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19481

研究課題名(和文)近位尿細管におけるメガリンを介したリン代謝調節機構とリン関連腎障害機序の解明

研究課題名(英文)A novel megalin mediated phosphate metabolism in proximal tubule and elucidation of phosphate related kidney injury mechanism.

研究代表者

桑原 頌治 (Kawahara, Shoji)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：70645209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は腎臓における新規リン代謝調節機構の解明を目的として行った。リン恒常性維持に腎臓が重要であり、糸球体で濾過されたリンを近位尿細管で再吸収する。近位尿細管にはリンの輸送体があり、それにより再吸収が制御される。老化関連因子klothoは遠位尿細管に発現しておりリン代謝調節に関与するがその詳細な機序は不明な点が多い。本研究では近位尿細管のメガリンを介してklothoがリン輸送体発現に関与する新たな機序の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性腎臓病患者や透析患者は心血管疾患を原因とする死亡リスクが高い。心血管疾患のリスク因子の1つが高リン血症であるが、現状の透析や食事療法、薬剤療法では適切なリン管理は困難である。また腎機能の低下を早期に発見するマーカーも確立されておらず、リン管理の早期介入が困難な原因となっている。本研究では老化関連因子klothoがメガリンを介して近位尿細管で直接リン調節に関与する新規メカニズムの一端を明らかにし、新たな治療戦略の基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The kidney has a pivotal role for phosphate homeostasis. Glomerular filtered phosphate is reabsorbed in the proximal tubule. The phosphate transporters are expressed at the proximal epithelial cells, and they regulate phosphate reabsorption. Klotho is expressed in distal tubule and is involved in the regulation of phosphate metabolism, but its detailed mechanisms are unclear. In this study, we revealed a novel mechanism that klotho directly regulates phosphate transporter at proximal tubule via megalin.

研究分野：腎臓内科 栄養

キーワード：リン代謝調節 近位尿細管 メガリン エンドサイトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本の慢性腎臓病患者数は約 1,300 万人おり、慢性腎臓病患者の血中リン濃度管理は生命予後に大きな影響を与える重要な因子である。なお、血中リン濃度は高すぎても低すぎても死亡リスクが増加することが知られている。しかしながらリン代謝調節機構には依然として不明な点が多く、医学的に重要な研究課題となっている。現在行われている血液透析や食事療法、薬物療法では十分な血中リンコントロールが出来ておらず、新たな治療法やその基盤となる研究が期待されている。

(2) 腎臓はリン代謝調節に主要な役割を果たす重要な臓器であり、特に近位尿細管上皮細胞の管腔側膜に発現するナトリウム依存性リン輸送体 (NaPi2a) によるリン再吸収がその恒常性維持に重要な役割を担う。NaPi2a によるリン輸送活性は、副甲状腺ホルモン (PTH)、活性型ビタミン D、線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) 及び老化関連因子 alpha-klotho などの因子による複雑な相互関係によって調整されている。摂取した食事からのリンは小腸で吸収され、血中へ移行して、さらに血中から各臓器へ移行し、骨に貯蔵される。腎臓におけるリン代謝調節は調節因子の多様性に加えて、他臓器連関による調節も受けている。

(3) 我々の研究グループは新潟大学機能分子医学講座の斎藤亮彦教授を中心に、近位尿細管管腔側膜に発現するエンドサイトーシス受容体メガリンの研究を行ってきた。メガリンは糸球体を濾過する低分子量タンパク質や薬物などの再吸収と代謝に関与するが、NaPi2a などの膜上に発現する他の分子の細胞内移行にも関わっている。

(4) 本研究ではこれまでに、血中に細胞外領域全長型の alpha-klotho が 2 つに切断された形態 (KL1、KL2) で存在しており、その形態で糸球体を濾過し、それらがメガリンに結合して近位尿細管細胞に取り込まれる可能性を見出している。alpha-klotho は遠位尿細管に発現しており、リン利尿因子である FGF23 作用において遠位尿細管に発現する受容体 (FGFR) の共受容体として機能することが明らかにされている。しかし FGF23 が遠位尿細管に作用した結果、どのような機序で近位尿細管の NaPi2a を制御するか不明であった。alpha-klotho の細胞外領域が直接 NaPi2a に作用する報告もあるが、細胞外領域全長では糸球体を濾過するには分子量が大きいと考えられた。これらから、alpha-klotho が KL1、KL2 の形態で糸球体を濾過し、メガリンを介してリン代謝調節に関与する可能性の着想に至った。

(5) 我々は腎臓特異的メガリンノックアウトマウスをその対照マウスに高脂肪食を付加する実験を行い、脂肪酸含有タンパク質などの腎傷害性タンパク質がメガリンを入口として腎臓内に取り込まれる結果、慢性腎臓病 (尿細管 - 糸球体傷害) が引き起こされる機序を明らかにした。高リン血症に伴い生成される腎毒性物質として、リン酸カルシウム微小結晶 (calciprotein particle, CPP) が注目されている。CPP が腎臓に取り込まれる機序は不明であるが、CPP の核となるタンパク質 (フェチュイン A) はメガリンリガンドであることから、高脂肪食負荷実験と同様にメガリンを入口とした CPP による腎傷害発症機序を想定した。

2. 研究の目的

(1) 腎近位尿細管細胞における新規リン代謝調節機構としてメガリンを基盤とした、メガリン/alpha-klotho/NaPi2a の相互作用について解析する。alpha-klotho によるリン代謝調節機序は不明な点が多く、特に近位尿細管に発現する NaPi2a に対する作用機序が十分には解析されていない。本研究では独自の発想として、糸球体を濾過したタンパク質の受容体であり近位尿細管に発現するメガリンに alpha-klotho が結合した結果、NaPi2a の制御に関与するという仮説を立て、これを検証する。また強力なリン利尿因子である FGF23 も糸球体を濾過することが想定されるため、同様の作用機序があるか検討する。この機序の証明により、これまで明らかにされていなかった alpha-klotho による近位尿細管での直接的な作用機序が明らかとなることが期待される。

(2) 高リン血症に伴い引き起こされる腎臓尿細管・間質傷害におけるメガリンの役割を検討する。慢性腎臓病患者における高リン血症状態は異所性石灰化を引き起こし、腎臓では血管石灰化に加えて、尿細管・間質傷害を惹起する。メガリンを基盤とするリン代謝調節機構を想定しており、高リン血症時におけるメガリンの役割を検討する。また高リン血症時のリン毒性に CPP が関与することが示唆されており、CPP による腎毒性とメガリンの関係を検討することで CPP 毒性に対する治療基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) alpha-klotho ノックアウトマウスに対する外因性 alpha-klotho タンパク質投与によるリン利尿レスキュー実験。血中の alpha-klotho が糸球体を濾過し、近位尿細管でメガリンを介した作用をすることを検討する。この仮説が正しい場合、投与した外因性 alpha-klotho タンパ

ク質は血中から濾過され尿細管へ到達し、リン利尿効果を発揮するため、これを証明する。野生型マウスと購入した alpha-klotho ノックアウトマウスに各形態の klotho α (細胞外領域全長、KL1 領域、KL2 領域) を腹腔内投与した。投与前と投与後に蓄尿を行い、尿中リン排泄を評価した。

(2) メガリン/alpha-klotho/NaPi2a の相互作用の解析。alpha-klotho ノックアウトマウスに各形態の alpha-klotho タンパク質を投与し、腎臓を摘出・可溶化し、メガリンと NaPi2a の相互作用を免疫沈降反応により評価を試みた。同様にラット腎管腔側膜を精製し、メガリンと NaPi2a の相互作用に各形態の alpha-klotho タンパク質が与える影響を検討した。また、メガリンと NaPi2a の相互作用に alpha-klotho が与える影響と FGF23 の存在が関与する可能性を FGF23 存在下と非存在下で検討した。

(3) 高リン血症に伴う腎障害機序におけるメガリンの役割を検討するため、腎特異的メガリンノックアウトマウスとその対照マウスに短期的、長期的な高リン食負荷を行い、腎臓の組織学的な評価を行った。通常リン含有食 (0.6%) と高リン含有食 (1.2%) のそれぞれを短期間および長期間、自由摂食で与えた。マウス腎臓の評価は HE 染色とマッソントリクローム染色にて行った。この結果を踏まえて、CPP の人工的な合成とメガリンの結合を水晶発振子マイクロバランス法により評価する予定を立てた。CPP がメガリンと結合する結果が得られた場合、メガリンを発現する培養近位尿細管細胞上皮細胞を用い、メガリンノックダウンによる CPP 取り込みへの影響を評価する計画であった。

4. 研究成果

(1) メガリンノックアウトマウスを用いた高リン食負荷実験。メガリンを基盤とするリン代謝調節機構の解明と高リン血症時のメガリン抑制による腎保護効果の検討を目的に、まず高リン食負荷モデルマウスを作製した。主な評価項目はマウス腎臓傷害の組織学的評価である。はじめに短期間の高リン食負荷モデルを検討したが、メガリンノックアウトマウス、対照マウスそれぞれで 0.6% リン (コントロール) 食と 1.2% リン (高リン) 食負荷群を比較した結果、HE 染色やマッソントリクローム染色で顕著な傷害所見の差を認めなかった。尿中リン排泄の増加を認めたが、血中リン濃度をメガリンノックアウトマウスと対照マウスで検討した結果、1.2% リン群の血中リン濃度上昇は認められなかった。この結果から、腎機能が正常なマウスへの短期間の 1.2% リン食負荷では、慢性腎臓病患者でみられるほどの高リン血症状態を引き起こすことが出来ないこと、そしてこの条件下ではメガリンノックアウトによるリン代謝に与える影響が小さいため評価が困難であることが示された。

そこで続いて計画通り長期間の 0.6%、1.2% リン食負荷実験を行った。長期間の負荷モデルでは 0.6% 群と比較し、1.2% 群の腎臓で明確な腎障害所見を HE 染色、ならびにマッソントリクローム染色で認めた。研究計画時の予想では、高リン血症に伴い血中で増加した CPP がメガリンを介して腎機能低下に関与すると仮説を立てた。しかし、1.2% リン負荷を行ったメガリンノックアウトマウスと対照マウスを比較したところ、明らかに腎障害所見はメガリンノックアウトマウスで悪く、予想と真逆の結果であった。この結果から、CPP がメガリンを介して腎障害を引き起こすという仮説の検証は一時中断することとした。一方、高リン食負荷に伴う腎障害の発症・進展にメガリンが関与する可能性が証明されており、リン代謝調節にメガリンが重要な役割を担う可能性が示された結果でもあった。また本研究で用いたメガリンノックアウトマウスは高脂肪食負荷モデルにおけるメガリンの役割を評価した研究 (Kawahara et al. JASN 2016) と異なり、腎臓特異的にほぼ 100% のノックアウト効率である。腎臓のメガリンが完全に欠損した環境では他のタンパク質発現量または機能に変化が起きている可能性もあるため、高脂肪食負荷モデルで利用した 60% 程のノックアウト効率動物を用いることも検討している。

ただし、本研究課題が動物実験施設の改築に伴うノックアウトマウスの受精卵からの起こし直しと同時期になってしまった結果、十分な n 数の確保が出来ておらず条件検討の余地があるため、詳細な検討や再現性確認は引き続きの検討課題である。

(2) 各種リコンビナント klotho とメガリンとの結合性の検討。我々はメガリンとリガンドの結合を水晶発振子マイクロバランス法 (QCM 法) でこれまで評価してきた。本研究課題でも同様に各種 klotho タンパク質とメガリンの結合を QCM 法で評価した。QCM 法による解析に利用するリコンビナント klotho タンパク質は哺乳類培養細胞系を

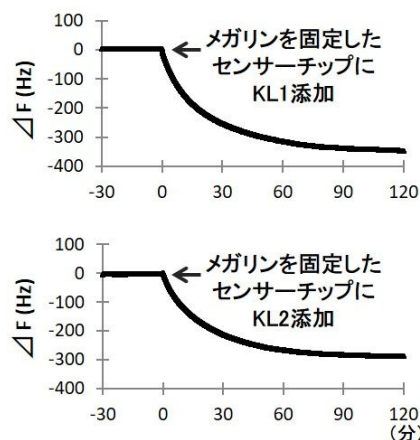


図1. 水晶振動子マイクロバランス法によるメガリンとKL1、KL2の結合反応 (数値の低下は結合を示唆する)

用いて作製し、メガリンはラット腎臓より精製した全長メガリンを利用した。メガリンとそのリガンドの結合にはカルシウム依存的に結合することが知られており、klotho タンパク質とメガリンの結合もカルシウム依存的に結合することが示された。またメガリンとの結合性を評価した、細胞外全長型 klotho、KL1 領域、KL2 領域のいずれもメガリンと結合することが明らかとなった。(図 1) この結果から、糸球体を濾過した klotho がメガリンを介して近位尿細管で作用する可能性が示唆される。

この結果を踏まえ、より詳細なメガリンと klotho の結合性を評価する予定である。具体的にはその結合性を促進または阻害するなどの影響を与える他のタンパク質、因子を検討する。

(3) alpha-klotho ノックアウトマウスへの外因性 klotho タンパク質投与によるレスキュー実験。はじめに近位尿細管のメガリンに糸球体を濾過した klotho が結合し、リン代謝調節に作用することを仮説としていることから、メガリンノックアウトマウスの尿中から検出される klotho のサイズ、すなわちその形態が細胞外全長型であるのか切断された形態であるのかをウエスタンブロットで検討した。KL1 抗体と KL2 抗体を用いたウエスタンブロットの結果、メガリンノックアウトマウスの尿中 (24 時間蓄尿) から、KL1 領域と KL2 領域の klotho タンパク質が検出された (図 2)。細胞外全長型の klotho タンパク質は約 130 kDa であり、KL1 と KL2 領域から構成される。KL1 抗体と KL2 抗体で検出された klotho タンパク質のサイズは、~70 kDa 程度でありこの結果から、KL1 領域と KL2 領域に切断された形態であることが推察された。この結果は約 130 kDa の細胞外全長型では糸球体を濾過する効率が悪いという当初からの予想と一致する結果であった。

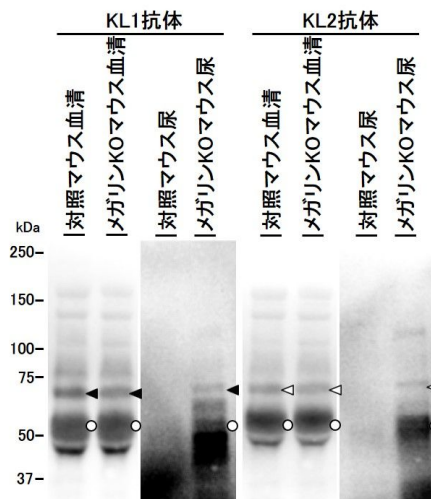


図2. 血中・尿中 α -klothoウエスタンブロット (▲KL1、△KL2、○アルブミンの交差反応)

そこで alpha-klotho ノックアウトマウスに細胞外全長型、KL1、KL2 の klotho を腹腔内投与する実験を行った。なお、alpha-klotho ノックアウトマウスは非常に小型であるため静脈内投与は困難であった。本検討の主要評価項目は各種 klotho 投与による尿中リン排泄の変化である。24 時間蓄尿は困難であるため、投与後 6 時間の蓄尿を用いて解析を行った。Vehicle コントロール (生理食塩水) は尿中リン排泄に影響を与えなかった。ポジティブ紺のコントロールとして投与した細胞外全長型 klotho 群では、明らかな尿中リン排泄の増加が認められた。しかし、KL1 と KL2 をそれぞれ単独で投与した群では尿中リン排泄の増加は確認されなかった。そこで次に、KL1 と KL2 を同時に投与する実験を行ったところ、細胞外領域全長型とほぼ同程度に尿中リン排泄を増加させることが明らかとなった (図 3)。この結果から、KL1 と KL2 の両者が存在することではじめて尿中リン排泄の増加、すなわちリン代謝調節を行うことが出来ることが示唆された。QCM 法の結果と合わせると、いずれもメガリンと結合するため、両者が結合すること、ないしは近位尿細管に取り込まれることが必要である可能性が示唆された。

なお本検討は計画段階では長期間投与も検討していたが、リコンビナント klotho が大量に必要となることに加え、alpha-klotho ノックアウトマウスの短命などの脆弱性から、短期間の検討にとどまっている。

また本検討結果から、投与した細胞外全長型 klotho が血中で KL1 と KL2 に切断され、糸球体を濾過する可能性が示唆された。そこでタグ標識したリコンビナント klotho を用いて血中で切断される可能性の検討を試みた。リコンビナント klotho を精製する際に利用している 6xHis タグ、精製後に蛍光標識する方法の 2 種類を検討したが、いずれも検出の特異性に問題があったため、今後は標識方法をはじめとする条件検討を進める予定である。

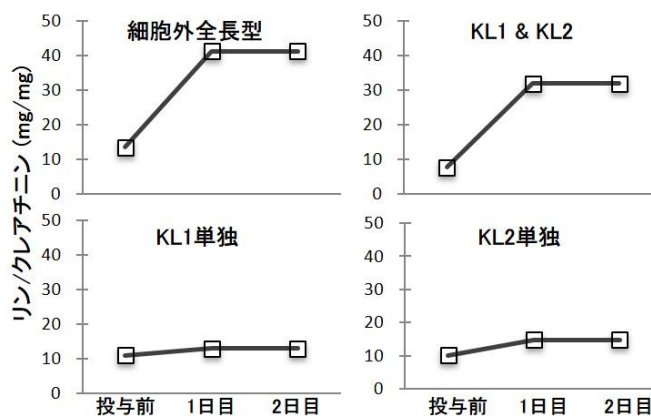


図3. 組換え体 α -klotho投与による尿中リン排泄の変化

(4) メガリン/alpha-klotho/NaPi2a の相互作用の解析。高リン食負荷実験、alpha-klotho ノックアウトマウスのレスキュー実験などから、仮説であるメガリンを基盤とするリン代謝調節機構の存在が期待された (図 4)。ラットから精製した腎臓刷子縁膜を可溶化し、そこに各種 klotho を添加して、メガリンと NaPi2a の免疫沈降法による結合性を検討した。計画段階では可溶化した腎臓刷子縁膜を用いて検討可能であると考えていたが、可溶化条件や添加する

klotho の濃度、反応時間などの条件を詳細に検討したが、メガリンと NaPi2a の結合性を評価することが困難であるという結論に至った。推定される原因として、腎臓から精製、可溶化した刷子縁膜では klotho 添加による局在や結合などダイナミックな変化を起こさないことが考えられた。そこで、腎近位尿細管由来の培養細胞に klotho を添加することでメガリンと NaPi2a の結合性を評価する方法へ変更した。現在までに実験条件は検討できたが、一部再現性の確認が出来ていない。あくまでパイロット試験の結果であるが、klotho 存在下でメガリンと NaPi2a の結合が促進される結果を得ている。今後は再現性をはじめ、どの形態の klotho が結合性に影響を与えるか、FGF23 の必要性、など詳細な検討を進める。また、メガリンと NaPi2a が結合した結果、エンドサイトーシスされているかを検討するため、免疫染色による局在の変化も検討する予定である。

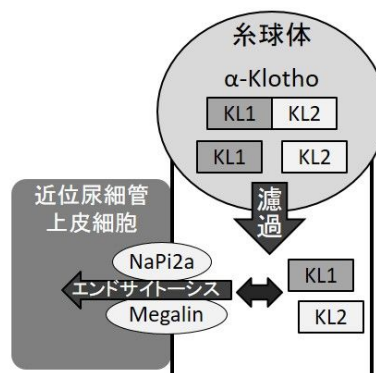


図4. メガリン/ α -klotho/NaPi2aの相互作用

5. 主な発表論文等

6. 研究組織