

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07944

研究課題名(和文)尿細管メガリン発現の変動に着目した糖尿病性腎症の新規尿中バイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Development of novel urine biomarkers for diabetic kidney disease by focusing on the regulation of renal megalin expression.

研究代表者

黒崎 祥史 (Kurosaki, Yoshifumi)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：20602030

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)：酸化ストレスで誘導されるメガリン発現はメガリン自身の制御的膜内切断(RIP)にて負に制御されることが明らかになった。またメガリンRIPによって生じるメガリンの細胞内C末端ドメイン(MCTF)が、過酸化水素処理により細胞上清中に排泄された。さらに、このMCTFは1型糖尿病モデルラット尿中にも排泄された。腎皮質メガリン発現の上昇に伴いそのネガティブフィードバック機構としてRIP亢進が起こることが示唆される。さらに、メガリン発現を抑制的に制御すると考えられるマイクロRNA(miRNA)-148bの関与を検討したが、miRNA-148bは酸化ストレス誘導megalin発現上昇に影響を及ぼさなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究で、糖尿病性腎症の初期に腎尿細管におけるメガリンの発現が上昇することを明らかにしてきた。本研究では、このメガリンの上昇に対して抑制的に作用するメガリン制御的膜内切断(RIP)に関連する分子MCTFが、尿中に早期に検出される可能性を見出した。糖尿病性腎症は透析患者の原因疾患で最も多いため、MCTFを活用した糖尿病性腎症の早期診断は透析患者減少に寄与し、患者QOLの向上や透析に要する医療費の削減などに寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Present study clarified the increase in megalin expression induced by oxidative stress was negatively regulated by megalin regulated intramembrane proteolysis (RIP). Interestingly, intracellular megalin COOH-terminal fragment (MCTF) excretion in medium was increased by hydrogen peroxide treatment in a dose-dependent manner. Furthermore, megalin MCTF excretion in the urine of STZ-induced diabetes was significantly increased compared to sham rats. Next, we evaluated if micro RNA (miRNA) related to the megalin negative feedback system. Although miRNA-148b is known to be one of the regulator for megalin expression, hydrogen peroxide treatment did not affect the expression of miRNA-148b. Then we conducted a comprehensive miRNA array to find megalin-related and oxidative-induced miRNA. Two miRNA was picked up for candidates for megalin regulator. We would expect those miRNA could be useful as urine biomarker for diabetes nephropathy.

研究分野：臨床化学

キーワード：糖尿病性腎症 メガリン バイオマーカー 酸化ストレス マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は、重篤化すると血液透析を行わなくてはならない。血液透析は患者の肉体的・経済的負担が甚大であり、また多額の国費（医療費）を要する。そのため、透析に至る前段階で腎不全の進行を留めることは国策としてますます重要な課題であると考えられる。現在、糖尿病性腎症のマーカーとして微量アルブミンが広く利用されている。しかしながら、透析患者数は増加の一途をたどっており、尿中アルブミンが正常なステージにおける腎障害マーカーの探索は、透析患者の減少のために最も重要な課題である。

腎尿細管において、エンドサイトーシス受容体メガリンはタンパク質の再吸収に重要な役割を担う。いくつかの研究グループによって、糖尿病性腎症などの慢性腎臓病の進行に伴いメガリン発現が低下し、タンパク尿の原因となることが報告されている。一方で、申請者らは糖尿病性腎症の初期（正常アルブミン尿ステージ）に、酸化ストレスの亢進がメガリン発現を上昇させることを見出した（Am J Physiol Renal Physiol, 314;F462-F470, 2018）。また、近年メガリンは尿細管障害を進展させる腎傷害性物質の「入り口」分子として同定され、その発現上昇が病態に関連する可能性も指摘されている。このように、メガリン発現の動態と腎症進展の関係を明らかにすることは、新規治療標的やバイオマーカーの探索に重要と考えられるが、それらは未だ明確にされていない。

メガリン発現の制御は、メガリン切断機構である regulated intramembrane proteolysis (RIP) によって制御されている（図1）。メガリンにリガンドが結合すると、各種プロテアーゼ（MMP, プレセニリン）により、メガリンの細胞内ドメインが切断される。この切断されたメガリン細胞内ドメインは、核内に移行して転写因子として働き、メガリン自身の発現を負に制御すると報告されている。そのため、RIP はメガリン発現を調整するネガティブフィードバック機構であると考えられる。申請者は、不死化した近位尿細管上皮細胞において、酸化ストレスによりメガリン発現が上昇し、一方でこのメガリン発現の上昇は 24 時間で急速に低下することを明らかにしている（Am J Physiol Renal Physiol, 314;F462-F470, 2018）。腎症初期における酸化ストレスの亢進が、メガリン発現の上昇とそのネガティブフィードバックである RIP を活性化させることを示し、これらメカニズムに関連する分子の探索が、早期診断マーカーの探索に繋がるものとする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病性腎症におけるメガリン発現の動態を明確にし、糖尿病性腎症初期における尿中の尿細管障害マーカーを探索することである。各種疾患モデルにおいて、近位尿細管障害によるメガリン発現の減少が微量アルブミンの原因であることが報告されている。一方で、申請者はこれまでの解析結果から、腎症初期では軽度な酸化ストレスがメガリン発現の一時的な上昇および RIP の亢進が起こり、進行した腎症では重度な酸化ストレスがメガリン発現を減少させるという仮説を考えている（図1）。現在、腎症進展のマーカーとして尿中全長型メガリンの有用性がいくつかの研究グループにより検討されている。しかしながら、前述したメガリン発現の動態を鑑みると、メガリン RIP の亢進によるメガリン断片の尿中排泄は、全長型メガリンの尿中排泄よりも早期に起こりうるものとする。

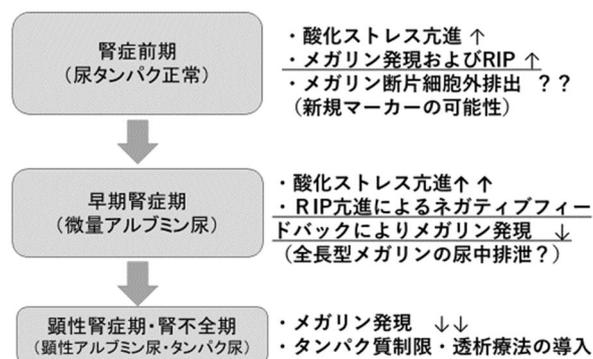


図1 糖尿病性腎症の進展とメガリン発現動態（仮説）

3. 研究の方法

1. RIP によるメガリン発現調節機構の解析

酸化ストレスによるメガリン発現の変動と RIP の関連

- ・使用細胞：ヒト近位尿細管上皮細胞 HK-2 細胞
- ・RIP 阻害剤（プレセニリン阻害 Comp E, MMP 阻害剤, PKC 阻害 Go6983）の影響
- ・プレセニリンの siRNA ノックダウンによる RIP 阻害
 - ・RIP に伴うメガリン断片の細胞外排出の解析
 - ・酸化ストレス負荷時における培養上清中メガリン断片の解析（WB）

2. 糖尿病モデルラットにおける尿中メガリン断片の解析

1 型糖尿病モデルラット作製

- ・ストレプトゾトシン(STZ)にて誘導 (Clin Sci (Lond) 124; 543-52, 2013)。

測定項目

- ・尿；尿中全長型メガリンおよびメガリン断片、エクソソーム解析（WB）
- ・腎皮質；メガリンと関連タンパク質(キュビリン、AMN、NHE3、等)（WB, qPCR）

3. 酸化ストレス誘導メガリン上昇に関連するマイクロ RNA (miRNA) の探索

miRNA-148b がメガリン発現に及ぼす影響

- ・酸化ストレス負荷による miRNA-148b 発現の変化
- ・miRNA 特異的阻害剤のトランスフェクションによる影響

miRNA アレイを用いたメガリン発現関連 miRNA の探索

- ・過酸化水素負荷 HK-2 細胞内で変化するメガリン関連 miRNA の網羅的解析

4. 研究成果

1. RIP によるメガリン発現調節機構の解析

近位尿管上皮細胞 HK-2 を酸化ストレス（過酸化水素）にて処理したとき、短期的にはメガリン発現が上昇し、一方で長期的にはメガリン発現がベースラインよりも低下した。メガリン発現の制御は、メガリン切断機構 RIP によって制御されているため（図 2）RIP を阻害剤および活性化剤で変化させたときのメガリン発現の変化を観察した。RIP においてメガリンを切断する酵素 γ -secretase を阻害した際に、長期的なメガリン発現の減少が抑制された。一方で PKC 活性化により RIP を促進したとき、短期的なメガリン発現の上昇が抑制された。同様の傾向が、メガリン mRNA レベルにおいても見られた（図 3）。また、 γ -secretase の構成タンパクである Presenilin-1 (PSEN-1) および PSEN-2 を siRNA にてノックダウンすると、長期的なメガリン発現減少を抑制する傾向にあった。これらのことより、メガリン RIP は酸化ストレスによるメガリン発現の上昇に対するメガリン自身のネガティブフィードバック機構であることを示唆する。興味深いことに、メガリン RIP によって生じるメガリンの細胞内 C 末端ドメイン (MCTF) が、過酸化水素処理により細胞上清中に排泄されることが明らかになった。培養上清中の MCTF 増加は、酸化ストレスが付加されていることを示すため、上清中 MCTF は糖尿病における尿管障害マーカーとなる可能性が示唆された。

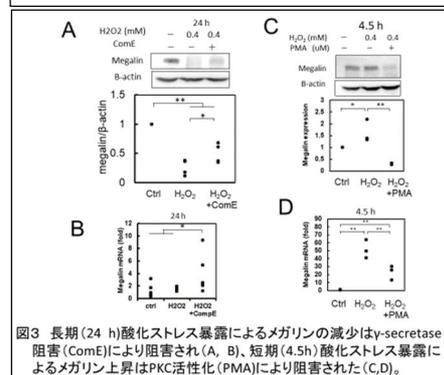
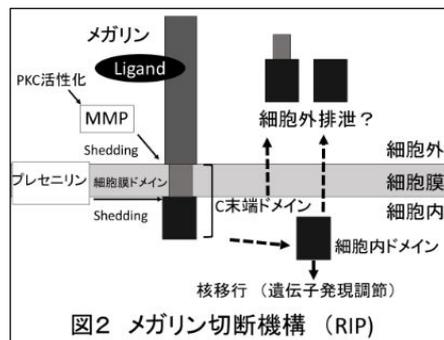


図3 長期 (24 h)酸化ストレス暴露によるメガリンの減少は γ -secretase 阻害 (ComE)により阻害され(A, B)、短期 (4.5h)酸化ストレス暴露によるメガリン上昇はPKC活性化 (PMA)により阻害された(C, D)。

2. 糖尿病モデルラットにおける尿中メガリン断片の解析

続いて、MCTF が尿中に排泄される可能性を in vivo で検証するため、ストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットを用いて、腎皮質メガリン発現の解析と尿中 MCTF 排泄を確認した。正常アルブミン尿期において、糖尿病ラット腎皮質メガリンが上昇し、同時期に尿 MCTF 排泄の亢進を認めた（図 4）。このことより、腎皮質メガリン発現の上昇に伴いそのネガティブフィードバック機構として RIP 亢進が起こっていることが示唆される。これらの結果は、2020 年ヨーロッパ腎臓学会にてポスター発表した（57th ERA-EDTA 2020, Milan, Italy (Virtual-meeting)）。

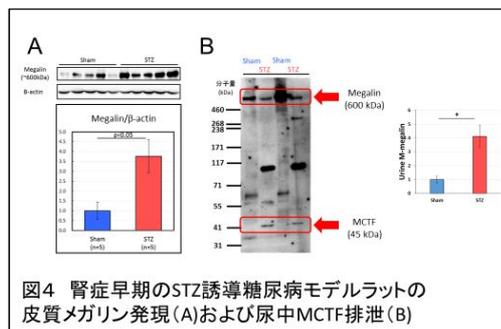


図4 腎症早期のSTZ誘導糖尿病モデルラットの皮質メガリン発現(A)および尿中MCTF排泄(B)

3. 酸化ストレス誘導メガリン上昇に関連するマイクロ RNA (miRNA) の探索

メガリンネガティブフィードバック機構にマイクロ RNA が関連することを予測し、メガリン発現を抑制的に制御すると考えられるマイクロ RNA (miRNA) -148b の関与を検討した。miRNA-148b は酸化ストレス負荷により上昇傾向にはあったが有意な上昇は見られず、また miRNA-148b ノックダウンはメガリン発現に有意な影響を示さなかった。そのため、酸化ストレス負荷した HK-2 において変化する miRNA をマイクロアレイにて網羅的に探索したところ、数種類のメガリン制御 miRNA が上昇することが確認された。この中で特に発現量の多い miRNA の 2 種類について、定量法を確立しようと試みたが、年度内には検出方法が確立できなかった。今後、これら miRNA の定量法を確立し、尿中バイオマーカーとしての臨床応用に発展させていくつもりである。

4. まとめ

本研究では、酸化ストレスによるメガリン発現の上昇は、RIPによるネガティブフィードバック機構によって負に制御されること、およびそれに伴いMCTFが尿中に排泄されること、を見出し、尿中MCTFが糖尿病性腎症の早期診断マーカ―あるいは腎の酸化ストレスマーカ―となる可能性を示した(図5)。さらに、メガリンのネガティブフィードバック機構に関連すると思われるmiRNAが探索されたため、今後さらなる解析を行っていきたい。

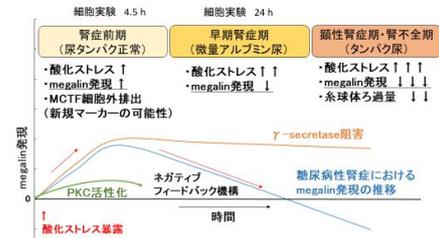


図5 酸化ストレスによるmegalín発現動態と糖尿病性腎症ステージの関係(仮説)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsukushi Tomoaki, Shinohara Ryota, Adachi Yuzuru, Kurosaki Yoshifumi, Ishii Naohito, Katagiri Masato, Munekata Shinichi, Kanoh Yuhsaku	4. 巻 59
2. 論文標題 Air contamination of therapeutic drug monitoring assay reagents results in falsely high plasma ammonia levels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine	6. 最初と最後の頁 193 ~ 198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00045632221074508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurosaki Yoshifumi, Imoto Akemi, Kawakami Fumitaka, Ouchi Motoshi, Morita Asuka, Yokoba Masanori, Takenaka Tsuneo, Ichikawa Takafumi, Katagiri Masato, Nielsen Rikke, Ishii Naohito	4. 巻 477
2. 論文標題 In vitro study on effect of bardoxolone methyl on cisplatin-induced cellular senescence in human proximal tubular cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 689 ~ 699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-021-04295-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Imai Motoki, Kawakami Fumitaka, Kubo Makoto, Kanzaki Makoto, Maruyama Hiroko, Kawashima Rei, Maekawa Tatsunori, Kurosaki Yoshifumi, Kojima Fumiaki, Ichikawa Takafumi	4. 巻 43
2. 論文標題 LRRK2 Inhibition Ameliorates Dexamethasone-Induced Glucose Intolerance <i>via</i> Prevents Impairment in GLUT4 Membrane Translocation in Adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1660 ~ 1668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kurosaki Y, Nielsen R, Ouchi M, Morita A, Imoto A, Kawakami F, Iizuka Y, Geraldine Mollet, Ichikawa T, Yokoba M, Katagiri M, Takenaka T, Ishii N.
2. 発表標題 Fatty acid-associated albumin induces proliferation and senescence of proximal tubular cells.
3. 学会等名 59th European Renal Association ERA 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田亜州華、大内基司、黒崎祥史、若新英史、大庭建三、安西尚彦、清水章、藤田朋恵
2. 発表標題 ヒト尿細管細胞HK-2を用いたN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ放出機構
3. 学会等名 第21回氷川フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ishii N, Carmines PK, Kurosaki Y, Imoto A, Takahashi H, Ikenaga H, Yokoba M, Ichikawa T, Takenaka T, Katagiri M.
2. 発表標題 Mitophagy-related renal and proximal tubular protection during the normoalbuminuric stage of diabetes mellitus.
3. 学会等名 Kidney Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田亜州華、大内基司、黒崎祥史、若新英史、大庭建三、藤田朋恵
2. 発表標題 ヒト尿細管上皮細胞株におけるN-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ放出評価実験
3. 学会等名 第32回糖尿病性腎症研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒崎祥史、土筆智晶、鈴木英明、市川尊文、片桐真人、石井直仁
2. 発表標題 脂肪酸結合アルブミンはPKC活性化を介して近位尿細管上皮細胞の細胞増殖および細胞老化を誘導する
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木英明, 小菅優子, 小林浩二, 黒崎祥史, 石井直仁, 市川尊文, 志村浩己
2. 発表標題 ヒートショックプロテイン72はADPおよびコラーゲンによる血小板凝集を亢進させ血栓形成に関与する
3. 学会等名 第68回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒崎祥史, Rikke Nielsen, 大内基司, 森田亜州華, 井本明美, 川上文貴, 鈴木英明, 市川尊文, 横場正典, 片桐真人, 竹中恒夫, 石井直仁
2. 発表標題 近位尿細管において脂肪酸結合アルブミン負荷は過剰な細胞増殖を介して細胞老化を促進する
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井直仁, 黒崎祥史, 井本明美, 高橋博之, 池永秀樹, 土筆智晶, 小幡進, 鈴木英明, 横場正典, 市川尊文, 竹中恒夫, 片桐真人
2. 発表標題 腎症発症前糖尿病ラットにおける近位尿細管のマイトファジー誘導による腎機能保護について
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木英明, 田近洋介, 小菅優子, 小林浩二, 黒崎祥史, 井本明美, 石井直仁, 青山直善, 志村浩己, 市川尊文
2. 発表標題 ヒートショックプロテイン72はヒト血小板の凝集を促進し血栓を形成する
3. 学会等名 第61回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒崎祥史, Rikke Nielsen, 大内基司, 森田亜州華, 井本明美, 石井直仁
2. 発表標題 アルブミン負荷による尿細管上皮細胞の増殖および細胞老化
3. 学会等名 第19回氷川フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kurosaki Y, Ikarashi F, Imoto A, Kawakami F, Yakoba M, Takenaka T, Katagiri M, Ichikawa T, Nielsen R, Ishii N
2. 発表標題 Effect of regulated intramembrane proteolysis on megalin expression during oxidative stress exposure.
3. 学会等名 57th ERA-EDTA Congress, virtual (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ishii N, Pamela K. Carmines, Kurosaki Y, Imoto A, Ikenaga Hideki, Yakoba M, Ichikawa T, Takenaka T, Katagiri M
2. 発表標題 Mitochondrial quality control mechanisms in renal cortex during the normoalbuminuric stage of diabetes mellitus.
3. 学会等名 Kidney Week 2020, virtual (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒崎祥史, 井本明美, 森田亜州華, 大内基司, 川上文貴, 市川尊文, 横場正典, 片桐真人, 竹中恒夫, 石井直仁
2. 発表標題 近位尿細管上皮細胞においてバルトキソロンメチルはシスプラチン誘導細胞老化を改善する
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井本明美, 黒崎祥史, 竹中恒夫, 片桐真人, 石井直仁
2. 発表標題 グルコースとアルブミン負荷による近位尿細管上皮細胞の上皮性低下には小胞体ストレス応答が関与する
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井直仁, 黒崎祥史, 井本明美, 池永秀樹, 土筆智晶, 小幡 進, 鈴木英明, 横場正典, 市川尊文, 竹中恒夫, 片桐真人
2. 発表標題 腎症発症前糖尿病ラットの腎皮質におけるミトコンドリア品質管理機構について
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshifumi Kurosaki, Futoshi Ikarashi, Akemi Imoto, Fumitaka Kawakami, Masanori Yakoba, Tsuneo Takenaka, Masato Katagiri, Takafumi Ichikawa, Rikke Nielsen, Naohito Ishii
2. 発表標題 EFFECT OF REGULATED INTRAMEMBRANE PROTEOLYSIS ON MEGALIN EXPRESSION DURING OXIDATIVE STRESS EXPOSURE.
3. 学会等名 57th ERA-EDTA Congress, Milan, Italy
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒崎祥史、井本明美、横場正典、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人、石井直仁
2. 発表標題 megalinの制御的膜内切断(RIP)が酸化ストレスによるmegalin発現の変動に及ぼす影響
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井本明美、黒崎祥史、竹中恒夫、片桐真人、石井直仁
2. 発表標題 近位尿細管上皮細胞において酸化ストレスはミトコンドリアDNAの蓄積を引き起こす
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井直仁、井本明美、黒崎祥史、池永秀樹、土筆智晶、小幡進、鈴木英明、横場正典、市川尊文、竹中恒夫、片桐真人
2. 発表標題 腎症発症前糖尿病ラットにおけるミトコンドリアの融合・分裂とマイトファジーについて
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒崎祥史、井本明美、川上文貴、市川尊文、横場正典、片桐真人、竹中恒夫、石井直仁
2. 発表標題 糖尿病性腎症初期に酸化ストレスは近位尿細管におけるメガリン発現を上昇させる
3. 学会等名 第32回北里大学バイオサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019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

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
---------	---------