

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17734

研究課題名(和文)メガリンによる腎内レニン アンジオテンシン系調節機構の分子機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the role of megalin in the renal renin-angiotensin system

研究代表者

後藤 佐和子 (Goto, Sawako)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：10832884

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)：腎臓近位尿細管エンドサイトーシス受容体メガリンと腎内レニン-アンジオテンシン(Ang)系(RAS)の関係を解明するため、腎特異的メガリンknockout(KO)とコントロール(Ctl)にアンジオテンシノーゲン(AGT)を投与し、質量分析による生体試料のAngペプチドの新規定量法を用いて腎内RASを評価した。KOではAGT投与による腎内Angの増加、ERK1/2及びNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換体3の活性化が抑制されていたが、Ang1-7はCtlと同等で、尿中Na<sup>+</sup>排泄が保持されていた。KOの腎臓のAng変換酵素(ACE)は低下、ACE2は上昇しており、メガリン調節は腎内RAS活性化を抑制する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンジオテンシン(Ang)ペプチドはこれまで抗体を使用するenzyme-linked immuno sorbent assayやradioimmunoassayで測定されることが一般的であり、抗体の交差反応などが問題となっていたが、質量分析計を用いた生体試料中のAngペプチドの新規定量法においては抗体に関連する問題が解消され、高感度かつ特異的に様々な生体試料のAngペプチドを定量することが可能となった。さらに、本研究の成果からはメガリンのダウンレギュレーションが腎内RASの活性化を抑制することがわかり、メガリンは腎内RASを調整する新たな治療標的となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Megalin, a proximal tubular endocytosis receptor, internalizes molecules involved in the renal renin-angiotensin (Ang) system, however, how megalin regulates the system remains elusive. We evaluated Ang peptides in the biological samples of kidney-specific megalin knockout (MegKO) mice and controls (Ctl) by using a novel mass spectrometry-based, parallel reaction monitoring assay for absolute quantification of Ang peptides. MegKO mice administered recombinant mouse angiotensinogen (rec-mAGT) suppressed the increase in the renal Ang, the activation of renal ERK1/2 and proximal tubular Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger 3, with comparable renal Ang1-7 to that of Ctl mice. Urinary Na<sup>+</sup> excretion of MegKO administered rec-mAGT was well maintained. Renal Ang-converting enzyme (ACE) and ACE2 were down- and up-regulated, respectively, in MegKO mice. Megalin downregulation may alleviate the pathological consequences of glomerular AGT hyperfiltration by shifting the ACE/Ang axis to the ACE2/Ang1-7 axis.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：メガリン レニン-アンジオテンシン系 アンジオテンシンペプチド 質量分析法

### 1. 研究開始当初の背景

レニン-アンジオテンシン系(renin-angiotensin system: RAS)は生体の血圧調節に重要な役割を担い、なかでもアンジオテンシン(Ang)ペプチドはこの系の中心的役割を果たす。腎臓等の臓器局所のRASは、全身のRASとは異なる機序で制御されることが知られている。これまでの研究から、腎臓の近位尿細管の管腔側膜に高発現するエンドサイトーシスレセプターのメガリンは、RASの中心的役割を担うAngペプチドの産生基質であるアンジオテンシノーゲン(AGT)や、Angペプチド産生に関わる重要な酵素の一つであるレニンの近位尿細管上皮細胞内への取り込みに関わることが明らかになっている<sup>1</sup>。また、腎臓局所のRASの制御に関わるのは腎臓由来のAGTではなく、肝臓由来のAGTであること<sup>2</sup>、ポドサイト障害を引き起こして糸球体を濾過するAGTを増加させた場合、腎臓内のAng IIはメガリン依存性に増加することがわかっている<sup>3</sup>。しかし、メガリンがどのように腎臓内のAngペプチド産生に関わり、腎臓内のRASを制御するかの詳細に関しては不明である。また、これまでAngペプチドは抗体を使用するradioimmunoassay、enzyme-linked immunosorbent assayといった免疫測定法で測定されることがほとんどであったが、各Angペプチドはアミノ酸配列の相同性が高いため、抗体の交差反応により正確な定量が困難である可能性が指摘されていた。そこで申請者は、ターゲットペプチドを質量数とイオン化荷電に基づいて識別し選択的かつ一斉に定量できる液体クロマトグラフィー/質量分析(LC/MS)を用いて、生体試料中のAngペプチドの定量法を独自に開発した(2017年6月30日、特許出願:「質量分析計による腎臓、血液、尿のアンジオテンシンペプチドの定量法の開発」、発明者:後藤佐和子 他、特願2017-128700)。この新規定量法により、腎臓をはじめとする実質臓器や血漿・尿などの体液試料に含まれるAngペプチドを高感度で絶対定量することが可能となった。

### 2. 研究の目的

本研究では、前述のLC/MSによるAngペプチドの新規定量法を用いて、タモキシフェン誘導型の腎近位尿細管特異的メガリンノックアウト(MegK0)マウス [*megalin* (*lox/lox*); *Ndr1-CreERT2*] およびそのコントロール(Ct1)マウス [*megalin* (*lox/lox*); *Cre* (-)]<sup>4,5</sup>の腎臓、血漿、尿中のAngペプチドを定量し、さらに、尿中Na<sup>+</sup>排泄、血圧などの表現型の評価を組み合わせることで、腎内RASの制御へのメガリンの関与の詳細を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

LC/MSによるAngペプチドの新規定量法では安定同位体ラベルの各種Angペプチドをサンプル精製の初期段階で加え、定量の内部標準とすることで絶対定量を行い、選択的反応モニタリング(multiple reaction monitoring: MRM)という手法を用いて周囲のノイズを抑え、選択性を高めることで微量なターゲットも選択・定量することができる。また、試料に含まれるRAS系に影響を与える酵素の影響を排除するため、実質臓器は冷却メタノールの中でホモジナイズし、各種酵素の阻害剤を使用するなど、独自の工夫を行った。さらに体液試料に関しては、differential solubilization (DS) method<sup>6</sup>を用い、強い変性条件下でペプチド分画を調製することにより、血漿タンパク質に結合しているペプチド等の回収率が高いことが特徴である。

本研究では、腎内RAS調節におけるメガリンの役割を解明するため、既に確立しているタモキシフェン誘導型の腎近位尿細管特異的MegK0マウスとそのCt1マウスを用いて、腎臓・血漿・尿のAng II、Ang-(1-7)の定量評価(上述のLC/MSによるAngペプチドの新規定量法による)および表現型の評価を行った。

- (1) 定常状態における腎臓・血漿・尿のAng II、Ang-(1-7)の定量評価を行った。さらにテレメトリー法による血圧測定、尿中Na<sup>+</sup>排泄、Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger 3 (NHE3)の発現と近位尿細管上皮細胞のbrush border上の分布の評価、細胞内シグナル変化(腎臓内のERK1/2 phosphorylation)、および腎臓のアンジオテンシン変換酵素(ACE)、ACE2の発現の評価を行った。
- (2) 上述のMegK0マウスおよびそのCt1マウスにリコンビナントマウスAGT(rec-mAGT)を投与し、AGTの糸球体過剰濾過の病態を模倣した状態において、腎臓・血漿のAng II、Ang-(1-7)の定量評価を行った。さらにテレメトリー法による血圧測定、尿中Na<sup>+</sup>排泄、Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger 3 (NHE3)の発現と近位尿細管上皮細胞のbrush border上の分布の評価、細胞内シグナル変化(腎臓内のERK1/2 phosphorylation)を評価した。

定量の結果は平均±標準偏差(SD)で示し、独立した2群間の比較についてはStudent's *t*-test、2群以上と2因子以上の解析の際は、交互作用および主効果を二元配置分散分析で評価し、有意な交互作用が認められた場合、Tukeyの多重比較検定で各群間の比較を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 定常状態の血漿、腎臓の Ang II の定量値は MegKO マウスと Ctl マウスにおいて明らかな差は認めなかった (図 1A, B)。Ang-(1-7) については定常状態において血漿、腎臓では定量下限未満であった。尿中の Ang ペプチドは Ctl マウスでは定量下限未満であったが、MegKO マウスの尿中では Ang II、Ang-(1-7) 共に高値であった (図 1C, D)。Ang II、Ang-(1-7) は共にメガリンのリガンドである

ことが知られている<sup>7,8</sup>。腎臓の Ang II、MegKO の尿中の Ang II の濃度は血漿中の Ang II よりも高値であり、この所見からは腎臓の Ang II および Ang-(1-7) は主に尿細管管腔内で産生され、メガリンで近位尿細管上皮細胞内に取り込まれることが示唆された。定常状態における血圧、尿中 Na<sup>+</sup>排泄は Ctl マウス、MegKO マウスで明らかな差は認めなかった。腎臓内の ACE、ACE2 について、定常状態で ACE は Ctl マウスで MegKO マウスに比して有意に発現量が多く、ACE2 は MegKO マウスで Ctl マウスに比して有意に発現量が多いという結果であった。

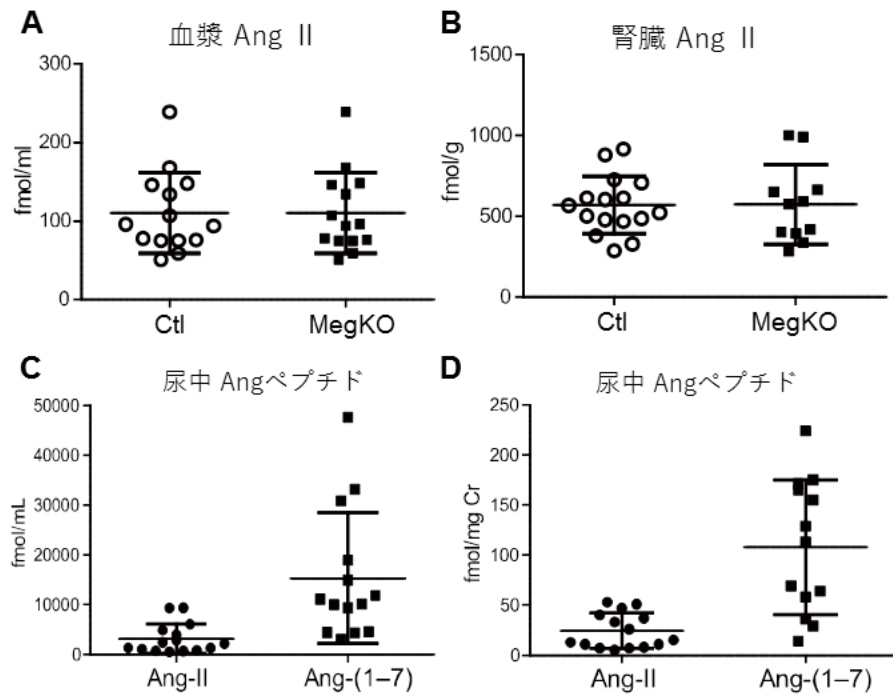


図1: 定常状態の各種生体試料中のAngペプチドの定量値

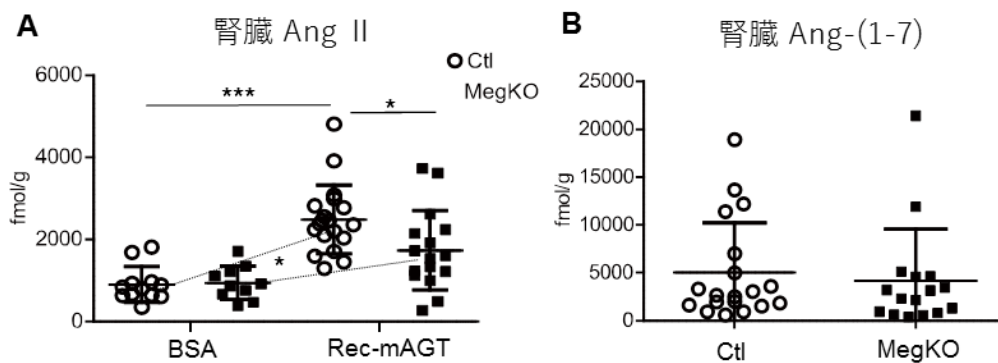


図2: Rec-mAGT投与時の腎臓のAng IIおよびAng-(1-7)の定量値. \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$

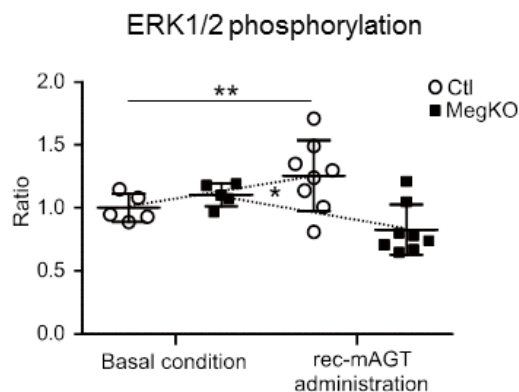


図3: 腎内Ang II上昇によって引き起こされるERK1/2 phosphorylationの評価. \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$

(2) rec-mAGT を投与した場合、血漿 Ang II の有意な上昇は伴わず腎臓の Ang II は Ctl マウス、MegKO マウス共に上昇を認め、その上昇の程度は MegKO マウスで Ctl マウスに比して有意に抑制されていた (図 2A)。一方で、rec-mAGT を投与した場合、Ang II に拮抗的に働く腎臓の Ang-(1-7) は Ctl マウス、MegKO マウス共に上昇し、その程度は Ctl マウス、MegKO マウスで同等であった (図 2B)。次に Ang II 上昇によって引き起こされる細胞内シグナルの活性化を評価したところ、腎臓内の ERK1/2 phosphorylation は MegKO マウスで Ctl マウスに比して有意に抑制されていた (図 3)。ERK1/2 phosphorylation は腎臓近位尿細管の NHE3 の発現量を増加させ、さらに brush border 上で基部に分布している NHE3 を先端部に移動させることでその機能は活性化

され、Na<sup>+</sup>再吸収が促進することが報告されている<sup>9,10</sup>。NHE3の発現量、および分布を評価したところ、rec-mAGTを投与した際、NHE3の発現量の増加、およびbrush border先端部への移動はMegKOマウスで抑制されていた。表現型については、血圧はCt1マウス、MegKOマウスで有意差は認めなかったものの、MegKOマウスでは尿中Na<sup>+</sup>排泄がCt1に比して保たれるという結果であった(図4)。

以上の結果から、メガリンをダウンレギュレーションすることで、ACE/Ang-II軸からACE2/Ang-(1-7)軸優位となり、rec-mAGT投与による糸球体AGT過剰濾過状態の結果引きこされる腎臓内Ang IIの上昇が抑制される一方でAng-(1-7)は保たれ、ERK1/2活性化、NHE3の活性化が抑制され、Na<sup>+</sup>排泄が保たれることがわかった。メガリンは腎内RASの活性化を調整する新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

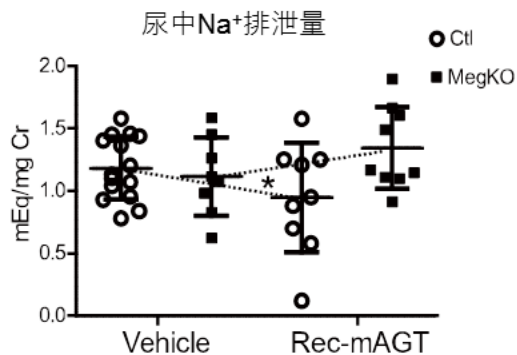


図4:腎内Ang II上昇によって引き起こされる尿中Na<sup>+</sup>排泄量変化の評価 \*P<0.05

#### 引用文献

1. Pohl M, Kaminski H, Castrop H, et al. Intrarenal renin angiotensin system revisited: role of megalin-dependent endocytosis along the proximal nephron. *J Biol Chem.* 2010;285(53):41935-41946.
2. Matsusaka T, Niimura F, Shimizu A, et al. Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(7):1181-1189.
3. Koizumi M, Ueda K, Niimura F, et al. Podocyte Injury Augments Intrarenal Angiotensin II Generation and Sodium Retention in a Megalin-Dependent Manner. *Hypertension.* 2019;74(3):509-517.
4. Leheste JR, Rolinski B, Vorum H, et al. Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am J Pathol.* 1999;155(4):1361-1370.
5. Leheste JR, Melsen F, Wellner M, et al. Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J.* 2003;17(2):247-249.
6. Kawashima Y, Fukutomi T, Tomonaga T, et al. High-yield peptide-extraction method for the discovery of subnanomolar biomarkers from small serum samples. *J Proteome Res.* 2010;9(4):1694-1705.
7. Gonzalez-Villalobos R, Klassen RB, Allen PL, Navar LG, Hammond TG. Megalin binds and internalizes angiotensin II. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288(2):F420-427.
8. Gonzalez-Villalobos R, Klassen RB, Allen PL, et al. Megalin binds and internalizes angiotensin-(1-7). *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006;290(5):F1270-1275.
9. Riquier-Brison AD, Leong PK, Pihakaski-Maunsbach K, McDonough AA. Angiotensin II stimulates trafficking of NHE3, NaPi2, and associated proteins into the proximal tubule microvilli. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2010;298(1):F177-186.
10. Yang LE, Maunsbach AB, Leong PK, McDonough AA. Differential traffic of proximal tubule Na<sup>+</sup> transporters during hypertension or PTH: NHE3 to base of microvilli vs. NaPi2 to endosomes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;287(5):F896-906.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤 佐和子, 吉田 豊, 細島 康宏, 蒲澤 秀門, 忰田 亮平, 成田 一衛, 斎藤 亮彦
2. 発表標題 メガリンを介する腎内レニン-アンジオテンシン (Ang) 系 (RAS) の動的均衡化制御機構
3. 学会等名 第63回 (令和2年度) 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年 ~ 2021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
---------	---------