

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860630

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症の新規バイオマーカー、メガリンの尿中逸脱機序の検討

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism underlying urinary excretion of megalin, a novel biomarker of diabetic kidney disease

研究代表者

細島 康宏 (Hosojima, Michihiro)

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症における近位尿細管エンドサイトーシス受容体メガリンの尿中排泄機序について検討した。2型糖尿病患者のアルブミン尿の増加に伴って、尿中細胞外小胞の排泄およびそのエクソソーム分画の全長型メガリン(C-メガリン)量が増加していた。培養近位尿細管細胞において、C-メガリンの排出は糖化終末産物の取り込みによるリソソーム負荷に関連しエクソサイトーシスを介して増加した。メガリンを介する腎症モデルである高脂肪食負荷マウスにおいても、尿中C-メガリン排泄は細胞外小胞を介して増加していた。以上より、尿中C-メガリン排泄はメガリンを介する糖尿病性腎症の発症・進行機序と関連していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I studied the mechanism underlying urinary excretion of megalin, a multiligand endocytic receptor in the proximal tubules, in diabetic kidney disease (DKD). Urinary extracellular vesicle (UEV) excretion and full-length megalin (C-megalin) content in UEVs or in their exosomal fraction increased along with the progression of the albuminuric stages in patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM). C-megalin excretion from cultured immortalized rat proximal tubule cells via extracellular vesicles was increased via lysosomal dysfunction in association with megalin-mediated cellular uptake of advanced glycation endproducts, which is significantly blocked by an exosome-specific inhibitor, GW4869. In a high-fat diet-induced, megalin-mediated DKD model in mice, urinary C-megalin excretion also increased via UEVs. Collectively, exocytosis-mediated urinary C-megalin excretion is linked with the megalin-mediated mechanism underlying the development and progression of DKD in T2DM.

研究分野：医歯学系

キーワード：糖尿病性腎症 バイオマーカー メガリン 近位尿細管 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病性腎症は慢性腎不全(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値(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、それらが糖尿病性腎症の病態を把握し、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、その発症および進展機序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。

(2) 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(PTEC)の管腔側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。PTEC は糸球体とともに糖尿病性腎症において早期より障害され、そのことがアルブミン尿出現の一因となる。新潟大学機能分子医学講座の斎藤亮彦教授は、世界で初めてメガリンのクローニングをして以来、この分野の研究を精力的に行ってきた。私は斎藤教授の指導のもと、メガリンの発現とエンドサイトーシス機能が、インスリン-IRS/PI3K シグナルによって刺激されるとともに、アンジオテンシン II-ERK1/2 シグナルによって拮抗的に抑制されることを明らかにした。さらに、糖尿病における“metabolic endotoxemia”に関連して、エンドトキシン(LPS)刺激に伴うTNF α -ERK1/2 シグナルによってもメガリンが抑制されることを報告した。以上より、糖尿病性腎症において、腎臓内のアンジオテンシン II、インスリン、炎症性サイトカインによるシグナルの優位性が、メガリンの発現や機能を調節している可能性を明らかにした。さらに申請者は、メガリンが細胞内アダプター分子 disabled-2 (Dab2)を介してモーター分子 myosin heavy chain 9 (MYH9)およびアクチンと連結することを明らかにした。ゲノムワイド関連解析によれば、Dab2 遺伝子(SNPs)は慢性腎臓病(CKD)の発症と関連するとされ、MYH9 遺伝子は糖尿病性腎症の進展との関連が報告されている。さらに最近、同解析からメガリン遺伝子自体が腎機能低下と関連することが明らかになった。すなわち、PTEC におけるメガリンおよびその関連分子の発現や機能が、糖尿病性腎症を含む CKD の発症・進展に深く関与していると考えられる。

そこで我々は、直接尿中メガリン排泄の動態を計測することにより、PTEC 傷害のより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 ELISA 系を世界で初めて開発した(国内外の特許取得)。現在、PTEC 傷害マーカーとして臨床的に使用されている分子のほとんどは、メガリンを介して PTEC に再吸収さ

れる低分子量蛋白質であり、これらはメガリンの機能低下によって間接的に尿中に増加するものである。尿中メガリン測定はそれらのマーカーが変動する以前からの PTEC の形質変化をより鋭敏かつ直接的に反映するマーカーとして期待される。

(3) そして、このヒト尿中メガリン測定 ELISA 系の検討により、尿中メガリン逸脱様式には細胞外ドメイン切断型と全長型の2つのパターンがあることがわかった。それぞれをアミノ末端側およびカルボキシル末端側を認識するモノクローナル抗体による ELISA で測定することから、A-メガリンおよびC-メガリンと呼称した。さらに糖尿病性腎症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を明らかにした。また、尿中全長型メガリンは、エクソサイトーシスに伴って尿中に逸脱する構造体であるエクソソームに関連して存在する可能性が示唆された。近年、尿中エクソソームの解析が腎疾患の診断と治療に有効である可能性が示唆されているが、糖尿病性腎症における検討やメガリンとの関連についての詳細は不明である。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症の早期診断と予後予測においては尿中アルブミンの測定が重要であるが、様々な問題点も指摘されており、新しいバイオマーカーの開発が求められている。メガリンは近位尿細管腔側に高発現し、多種の糸球体濾過蛋白質の再吸収・代謝と細胞内シグナル伝達に関わるエンドサイトーシス受容体である。我々はメガリンの発現調節機構、他分子との相互作用に関する基礎研究を行うとともに、ヒト尿中メガリン ELISA 測定系を開発した。その結果、メガリンの尿中排泄量の測定が、糖尿病性腎症患者の重症度や病態評価に有用であり、既存のバイオマーカーとは異なる新しいマーカーになり得る可能性を示した。そこで本研究では、未だその詳細が不明であるメガリンの尿中逸脱機序について、糖尿病性腎症の発症および進展機序との関連性を含めて検討する。

3. 研究の方法

(1) 同意が得られた健常者 19 名および外来通院中の 2 型糖尿病患者 56 名の尿を採取し、遠心後に得られた検体からナノ粒子解析装置(ナノサイト)を用いて尿中細胞外小胞の検討を行った。また、ウエスタンブロットなどによる解析から、尿中細胞外小胞およびエクソソームとメガリンの関連を検討した。また、糖尿病腎症患者および健常者のメガリン含有エクソソームに含まれる miRNA に違いがあるか検討した。

(2) ラット由来不死化培養近位尿細管細胞(IRPTC)を用いて、ウエスタンブロットなどによる解析から AGE 化アルブミンの添加に

よる細胞外小胞およびエクソソームとメガリンの関連を検討した。

(3) メガリンを介する糖尿病性腎症モデルである高脂肪食負荷マウスにおいて、ナノサイトおよびウエスタンブロットなどによる解析から、尿中細胞外小胞とメガリンの関連を検討した。

4. 研究成果

(1) ナノサイトを用いた解析を行ったところ、2型糖尿病患者の尿中細胞外小胞は健常者の尿に比較してその総数が増加しており、また尿中アルブミン排泄量と正の相関を、eGFRとは負の相関を認めた。尿中細胞外小胞には130nm以下の比較的小さいものと、130nm以上の比較的大きいものが存在するためそれぞれで同じ解析を行ったが、上記と同様の結果であった。以上より、2型糖尿病患者では健常者と比較し、尿中細胞外小胞排泄が多いことが示された。

(2) ウエスタンブロットによる解析から、C-メガリンは17,000gで15分、200,000gで1時間遠心後の尿中細胞外小胞が多数認められる分画に存在していた。そして、2型糖尿病患者の尿中細胞外小胞中に含まれるC-メガリンは健常者の尿に比較して増加しており、また尿中アルブミン排泄量と正の相関を、eGFRとは負の相関を認めた。同様の検討を他の尿細管セグメントマーカー蛋白であるCubilin、NaPi2a、NKCC、NCC、AQP2でも行ったが、糖尿病性腎症の進展との関連は認められなかった。以上より、尿中細胞外小胞を介したC-メガリンの排泄は2型糖尿病における糖尿病性腎症の発症および進展に伴い増加することが示された。

(3) 尿中細胞外小胞より抗CD63および抗CD81抗体を用いたビーズを使用しエクソソーム分画を精製した。ウエスタンブロットによる解析で、C-メガリンはエクソソームに含まれていた。健常者に比較して糖尿病性腎症患者の尿中エクソソームはメガリン含有量が多く、病期の進行とともに増加した。C-メガリンは130nm以下の比較的小さい尿中細胞外小胞に含まれていた。また、C-メガリンを含有しているエクソソームにはmiRNA-192を認めた。健常者に比較し正常アルブミン尿を呈している2型糖尿病患者におけるエクソソーム内のmiRNA-192量が少なかったことから、近位尿細管細胞内でのmiRNA-192減少による細胞保護効果が予想された。一方で、糖尿病性腎症の病期の進行にともなってエクソソームに含まれるmiRNA-192が増加したことから、miRNA-192産生増加によるものが考えられた。以上より、C-メガリンはエクソソームを介して尿中排泄され、糖尿病性腎症の発症および進展に伴い増加することが示された。

(4) 糖尿病ではタンパク質の非酵素的糖化反応によるadvanced glycation endproduct (AGE)が産生され、それが様々な細胞の傷害に関係するが、ラット由来不死化培養近位

尿細管細胞(IRPTC)に対してAGE化アルブミンを添加すると、脱脂アルブミンの添加に比較して、培養液中の細胞外小胞が増加した。130nm以下の比較的小さいものと、130nm以上の比較的大きい細胞外小胞に分けての解析も行ったが同様の結果であった。以上より、高タンパク質負荷およびAGE化アルブミンは近位尿細管細胞において細胞外小胞の排泄を増加させることが示された。

(5) IRPTCにおいてAGE化アルブミンの添加により、メガリン含有エクソソームの排泄が増加していた(この時、細胞内のメガリン発現に増加はなかった)。このメガリン含有エクソソームの排泄増加はエクソソーム阻害剤であるGW4869により明らかに減少した(この時、細胞内のメガリン発現に減少はなかった)。細胞障害時に増加するPDGF-B、MCP-1は、AGE化アルブミンの添加により増加したが、GW4869による低減効果は認められなかった。以上より高タンパク質負荷およびAGE化アルブミンは近位尿細管細胞においてエクソソームを介したC-メガリンの排泄を増加させることが示された。

(6) IRPTCにおいてAGE化アルブミン添加により、LAMP-1の増加とLysotrackerによって示されるリソソームの巨大化(リソソーム障害所見)を認めた。さらにエクソソームマーカーであるTSG101およびAlixの増加からmultivesicular body (MVB)が増加していることが分かった。以上より、AGE化アルブミンは近位尿細管細胞においてリソソーム障害を来し、MVB産生を増加させることが示された。

(7) 培養近位尿細管細胞においてbafilomycin A1およびchloroquineの添加によりTSG101およびAlixが増加していた。さらにメガリン含有エクソソームの排泄が増加していた(この時、細胞内のメガリン発現に増加はなかった)。以上より、近位尿細管細胞におけるリソソーム障害はMVB産生に影響を及ぼし、エクソソームを介したC-メガリンの排泄を増加させることが示された。

(8) メガリンを介する糖尿病性腎症モデルである高脂肪食負荷マウスにおいて、尿中細胞外小胞の増加と尿中細胞外小胞のメガリン含有量が増加していたことから、尿中C-メガリン排泄は細胞外小胞を介して増加していることが示された。

(9) 以上より、尿中C-メガリン排泄はメガリンを介する糖尿病性腎症の発症・進行機序と関連していることを明らかにした。また尿中C-メガリンは残存機能ネフロンにおけるタンパク質代謝負荷状態を反映するマーカーであることが示唆された。これは既存の尿中バイオマーカーとは異なる新しいタイプのバイオマーカーであり、今後の更なる詳細な検討を行いたいと考えている。

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7件)

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: Exocytosis-Mediated Urinary Full-Length Megalin Excretion Is Linked With the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. Diabetes. 査読有 2017 May 66(5):1391-1404. DOI: 10.2337/db16-1031

Kuwahara S*, Hosojima M*, Kaneko R, Aoki H, Nakano D, Sasagawa T, Kabasawa H, Kaseda R, Yasukawa R, Ishikawa T, Suzuki A, Sato H, Kageyama S, Tanaka T, Kitamura N, Narita I, Komatu M, Nishiyama A, Saito A: Megalin-Mediated Tubuloglomerular Alterations in High-Fat Diet-Induced Kidney Disease. J Am Soc Nephrol. 査読有 2016 Jul 27(7):1996-2008. *equal contribution DOI: 10.1681/ASN.2015020190.

桑原頌治, 細島康宏, 悴田亮平, 斎藤亮彦: 近位尿細管細胞と蛋白尿. 腎と透析. 査読無、Vol.81 No.1: 54-58, 2016 東京医学社

細島康宏, 桑原頌治, Sankhajit De, 悴田亮平, 斎藤亮彦: メガリン研究に基づく糖尿病性腎症の新しい診断および治療法の開発. 新潟県医師会報. 査読無、No.791 平成28年2月

悴田亮平, 細島康宏, 桑原頌治, 斎藤亮彦: タンパク質代謝臓器としての腎. Annual Review 腎臓 2015、査読無、131-136, 2015 中外医学社

細島康宏, 悴田亮平, 桑原頌治, 斎藤亮彦: 肥満関連腎症における脂肪毒性と尿細管障害. 肥満研究. 査読無、Vol.20 No.3 49-153, 2014 日本肥満学会

細島康宏, 桑原頌治, 斎藤亮彦: メガリンとその関連分子をめぐる最近の話題. Annual Review 腎臓 2014、査読無、175-181, 2014 中外医学社

〔学会発表〕(計14件)

飯田倫理, 細島康宏, 蒲澤佳子, 桑原頌治, 石川友美, 悴田亮平, 中村和利, 鈴木芳樹, 成田一衛, 平山吉朗, 斎藤亮彦: 2型糖尿病患者における尿中メガリンの腎予後予測能の検討 第28回日本糖尿病性腎症研究会 2016.12.3-4 都市センターホテル(東京都・千代田区)

Iida T, Hosojima M, Kabasawa K, Nakamura K, Kuwahara S, Ishikawa T, Kaseda R, Suzuki Y, Kurosawa H, Hirayama Y, Narita I, Saito A: Two Forms of Urinary Megalin Excretion Are Novel Predictors of the Progression of Early-Stage Diabetic Nephropathy in Type 2 Diabetes Mellitus. American Society of Nephrology 49th Annual Meeting. 2016.11.15-20 Chicago, IL USA

Kuwahara S, Hosojima M, Kaseda R, Goto S, Iida T, Saito A: Megalin Blockade with Cilastatin Suppresses Drug-Induced Nephrotoxicity. American Society of Nephrology 49th Annual Meeting. 2016.11.15-20 Chicago, IL USA

飯田倫理, 細島康宏, 蒲澤佳子, 桑原頌治, 石川友美, 悴田亮平, 中村和利, 鈴木芳樹, 成田一衛, 黒澤寛之, 平山吉朗, 斎藤亮彦: 2型糖尿病患者における尿中メガリンの腎予後予測能の検討 第59回日本腎臓学会学術総会 2016.6.17-19 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

De S, Kuwahara S, Hosojima M, Ishikawa T, Kaseda R, Yoshioka Y, Suzuki Y, Narita I, Ochiya T, Kurosawa H, Hirayama Y, Saito A: Mechanisms underlying urinary excretion of full-length and extracellular domain forms of megalin 第59回日本腎臓学会学術総会 2016.6.17-19 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

細島康宏, Shankhajit De, 桑原頌治, 石川友美, 悴田亮平, 吉岡佑亮, 鈴木芳樹, 成田一衛, 落合孝広, 斎藤亮彦: 糖尿病性腎症患者における尿中細胞外小胞の解析: 全長型メガリンの尿中排泄機序 第45回新潟糖尿病談話会 2016.2.6 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

Shankhajit De, 桑原頌治, 細島康宏, 石川友美, 悴田亮平, 吉岡祐亮, 鈴木芳樹, 成田一衛, 落合孝広, 斎藤亮彦: 糖尿病腎症患者における尿中細胞外小胞の解析: 全長型メガリンの尿中 第27回日本糖尿病性腎症研究会 2015.12.5-6 ベルサール汐留(東京都・中央区)

De S, Kuwahara S, Hosojima M, Ishikawa T, Kaseda R, Yoshioka Y, Suzuki Y, Narita I, Ochiya T, Saito A: Mechanism of Increased Urinary Full-Length Megalin Excretion in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Nephropathy. American Society of Nephrology 48th Annual Meeting. 2015.11.3-8 San Diego, CA USA

Shankhajit De, 桑原頌治, 細島康宏,

悴田亮平, 吉岡祐亮, 落合孝広, 鈴木芳樹, 成田一衛, 齋藤亮彦: 糖尿病性腎症患者における尿中細胞外小胞の解析: 全長型メガリンの尿中排泄機序 第 22 回新潟糖尿病性腎症研究会 2015.9.17 有壬記念館(新潟県・新潟市)

桑原頌治, 細島康宏, 金子麗華, 青木弘行, 悴田亮平, 中野大介, 成田一衛, 西山成, 齋藤亮彦: メタボリックシンドロームを基盤とした 2 型糖尿病モデルにおけるメガリンを介する腎症発症・進展機序 第 22 回新潟糖尿病性腎症研究会 2015.9.17 有壬記念館(新潟県・新潟市)

Shankhajit De, 桑原頌治, 細島康宏, 悴田亮平, 吉岡祐亮, 鈴木芳樹, 成田一衛, 落合孝広, 齋藤亮彦: 糖尿病性腎症患者における尿中エクソソーム解析: 全長型メガリンの排泄機序 第 58 回日本腎臓学会学術総会 2015.6.5-7 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

桑原頌治, 細島康宏, 金子麗華, 青木弘行, 中野大介, 悴田亮平, 西山成, 成田一衛, 齋藤亮彦: 高脂肪食負荷マウスの腎臓におけるメガリンを介する老化関連物質の蓄積 第 58 回日本腎臓学会学術総会 2015.6.5-7 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Shankhajit De, 桑原頌治, 細島康宏, 石川友美, 悴田亮平, 吉岡祐亮, 落合孝広, 鈴木芳樹, 成田一衛, 齋藤亮彦: 糖尿病性腎症患者におけるエクソサイトーシスを介した尿中全長型メガリンの排泄機序 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会 2015.5.21-24 海峡メッセ下関(山口県・下関市)

細島康宏, 桑原頌治, 金子麗華, 青木弘行, 中野大介, 笹川泰司, 蒲澤秀門, 悴田亮平, 西山成, 成田一衛, 齋藤亮彦: メガリンを介する高脂肪食誘発性腎症の発症・進展機序 第六回腎疾患と高血圧研究会 2014.07.12 大手町サンケイプラザ(東京都・千代田区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細島 康宏(HOSQJIMA, Michihiro)
新潟大学 医歯学総合研究科・特任准教授・
研究者番号: 50464003

(2) 研究分担者 なし

研究者番号:

(3) 連携研究者 なし

研究者番号:

(4) 研究協力者

デ シャンカジット(DE, Shankhajit)
桑原 頌治(KUWAHARA, Shoji)
研究者番号 70645209,
蒲澤 秀門(KABASAWA, Hideyuki)
研究者番号 20794639,
齋藤 亮彦(SAITO, Akihiko)
研究者番号 80293207