

エンドサイトーシス受容体メガリン：糖尿病性腎症・
メタボリック症候群関連腎症および
尿毒症病態における役割

齋藤 亮彦・竹田 徹朗

新潟大学大学院医歯学総合研究科
機能分子医学寄附講座

**Megalín, a Multiligand Endocytotic Receptor: The Role in the Development
of Diabetic Nephropathy, Metabolic Syndrome - related
Nephropathy and Uremia**

Akihiko SAITO and Tetsuro TAKEDA

*Department of Applied Molecular Medicine,
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences*

Abstract

Megalín is a multiligand endocytotic receptor expressed in the proximal tubule cells and play a major role in the renal protein metabolism. It was found to interact with intracellular adaptor proteins for endocytotic signaling, and other membrane proteins such as cubilin and Na⁺-H⁺ exchanger isoform 3 for cooperative functions. We found that megalín regulates the endocytosis of advanced glycation end products which are involved in the pathogenesis of diabetic nephropathy. We also found that it mediates the proximal tubular uptake of leptin, an adipocytokine, and liver - type fatty acid binding protein, which may play a role in the development of “metabolic syndrome - related nephropathy”. Further studies on the molecular mechanisms of megalín - mediated renal protein metabolism are needed to develop novel therapeutic strategies for the diseases. Megalín also mediates the renal metabolism of uremic toxin proteins such as β_2 - microglobulin that accumulates in dialysis patients and causes amyloidosis. Using subcutaneous implantation of megalín - expressing cells, we developed a cell therapy model to remove circulat-

Reprint requests to: Akihiko SAITO, M.D., Ph.D.,
Department of Applied Molecular Medicine
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1 - 757 Asahimachi - dori,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先: 〒951 - 8510 新潟市旭町通 1 - 757
新潟大学医歯学総合研究科機能分子医学寄附講座
齋藤 亮彦

ing β_2 -microglobulin in the experimental renal failure. We are currently under study for the future clinical application.

Key words: megalin, diabetic nephropathy, metabolic syndrome, ure - mia, endocytosis

はじめに

近年、糖尿病性腎症によって腎不全に至る患者が増加するとともに、透析療法による尿毒症治療の限界も問題となっている。メガリンはLDL受容体ファミリーに属し、近位尿細管上皮細胞において糸球体濾過蛋白を再吸収・代謝する受容体であるが(図1)、私たちは、その機能が糖尿病性腎症や尿毒症の病態に関係することを見出している。

私たちは、生体機能分子を臨床医学の診断・予防・治療に応用するためのトランスレーショナルリサーチをめざしているが、メガリンをそのような分子のひとつとしてとらえて検討を行っている。本稿ではその研究の一端を紹介したい。

エンドサイトーシス受容体メガリン

実験膜性腎症モデルである Heymann 腎炎の病因抗原の探索の結果、1982年、Kerjaschki と Farquhar は、細胞膜糖蛋白 gp330 を同定した¹⁾。1994年、著者らは gp330 の完全一次構造を決定し、脊椎動物でクローニングされた最大の細胞膜糖蛋白であることにちなんでメガリン (megalyn) と改名した²⁾。

メガリンは、ラットでは4660アミノ酸、ヒトでは4655アミノ酸から成る巨大な細胞膜糖蛋白であり、そのアミノ酸配列から予想される分子量は約520kDaで、糖鎖を加えると約600kDaに及ぶ²⁾。メガリンはLDLレセプター遺伝子ファミリーに属し、その巨大な細胞外領域は4つの機能的ドメインを有し、単一の細胞膜貫通領域を介して短い細胞内領域へ続く(図2)。メガリンは糸球体(ラット)、近位尿細管、肺胞II型細胞、副睾丸腺、甲状腺、副甲状腺、卵黄囊膜、内耳、小腸、脈絡膜などの上皮細胞膜の管腔側(糸球体上皮細胞では管腔側と基底膜側の両方)の clathrin-coated pit に

主に存在し、多様なリガンドの細胞内への取り込み・代謝に関係している³⁾⁴⁾。メガリンのノックアウトマウスでは、低分子量蛋白尿、骨代謝異常、呼吸不全、脳奇形などが起こる⁵⁾。メガリンのホモログは線虫 (*C. elegans*) にも存在し、生物学的重要性も示唆されている⁶⁾。

私たちは、Heymann 腎炎の病的エピトープ⁷⁾⁸⁾ やリガンド結合ドメイン⁹⁾ の解析などを手がけたが、その後、メガリンが最も豊富に発現する近位尿細管上皮細胞における機能の研究に移行した。

近位尿細管上皮細胞におけるメガリンの機能

生体内でメガリンは近位尿細管上皮細胞の管腔側に最も豊富に発現している。ヒト腎では、近位尿細管上皮細胞以外は、糸球体を含め、発現は認められない。メガリンは、糸球体を濾過する様々なリガンド(低分子量蛋白や薬剤など)(表1)をエンドサイトーシスによって細胞内にとりこみ、それらをライソゾームへ運搬した後、自身はリサイクリングによって細胞表面に再び現れる³⁾⁴⁾(図2)。あるいは管腔側から基底膜側へのトランスサイトーシスにも関係している。ビタミンA, B₁₂, Dなどの結合蛋白の取り込み・代謝にも関係する⁴⁾。私たちは最近、後述するように、脂肪細胞から分泌され、肥満患者で血液中に増加するレプチンが、メガリンのリガンドとして近位尿細管上皮細胞に取り込まれ、代謝されることを明らかにした¹⁰⁾。

メガリンと関連分子の相互作用

細胞内でのメガリンの輸送機序を明らかにするために、メガリンの細胞内ドメインに結合するアダプター分子が探索され、様々な蛋白が同定された^{11)–16)}(図2)。このような分子を介して、メガリンはエンドサイトーシスあるいはトランスサイ

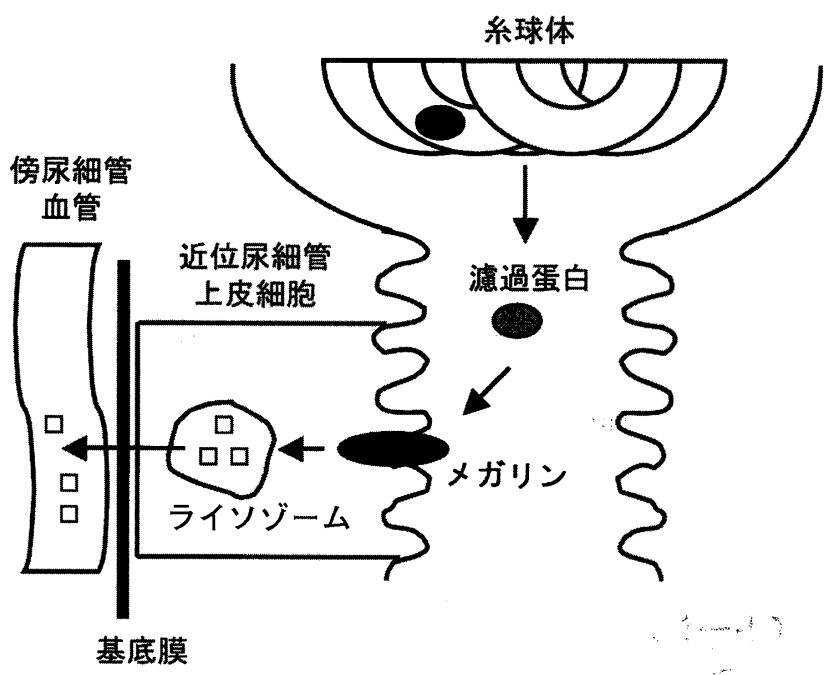


図1 腎ネフロンにおけるメガリンを介する蛋白代謝機序
糸球体を濾過する蛋白の多くは近位尿細管上皮細胞においてメガリンを介して再吸収され、ライソゾームに運搬され代謝される。その後、その代謝産物は傍尿細管毛細血管に取り込まれる（あるいは、ある蛋白は代謝されず、トランスサイトーシスによって運搬される）。

トーシスに関わるとともに、何らかのシグナル伝達にも関与することが考えられる。そのような分子機構は、後述するような病態にも関連すると考えられる。

メガリンはまた、近位尿細管上皮細胞において、キュビリンという細胞膜受容体と共役的に働くことによって、さらに多様なリガンドの細胞取り込みに関与する²⁾ (図2)。たとえばキュビリンは、トランスフェリン、アルブミン、内因子-ビタミンB₁₂などに直接結合する受容体であるが、それらのエンドサイトーシスにメガリンが間接的に関与している。尿中のアルブミン排泄量は広く用いられている腎障害マーカーであるが、それは糸球体から濾過される量と近位尿細管で再吸収される量の差し引きを評価している。特に糖尿病性腎症では、糸球体と尿細管の異常が初期から併存するので、その評価には注意を要する。今後は、糸球

体のアルブミン濾過と、近位尿細管キュビリン-メガリン系によるアルブミン取り込みシステムの評価を分けて行えるようになることが望ましい。

またメガリンは、近位尿細管上皮細胞の、Na⁺-H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3) と相互作用を及ぼしあうことも知られている¹⁷⁾ (図2)。NHE3はNa⁺再吸収に重要な役割を演ずるアンチポーターであるが、メガリンによるリガンド取り込みにも影響を与えている¹⁸⁾。メガリンはまたNHE3の不活性化・代謝に関与している可能性がある。これは後述するように、糖尿病性腎症(およびメタボリック症候群関連腎症)の発症機序を考えるうえで重要である。

糖尿病性腎症とメガリン

糖尿病性腎症の発症機序として、メイラード反

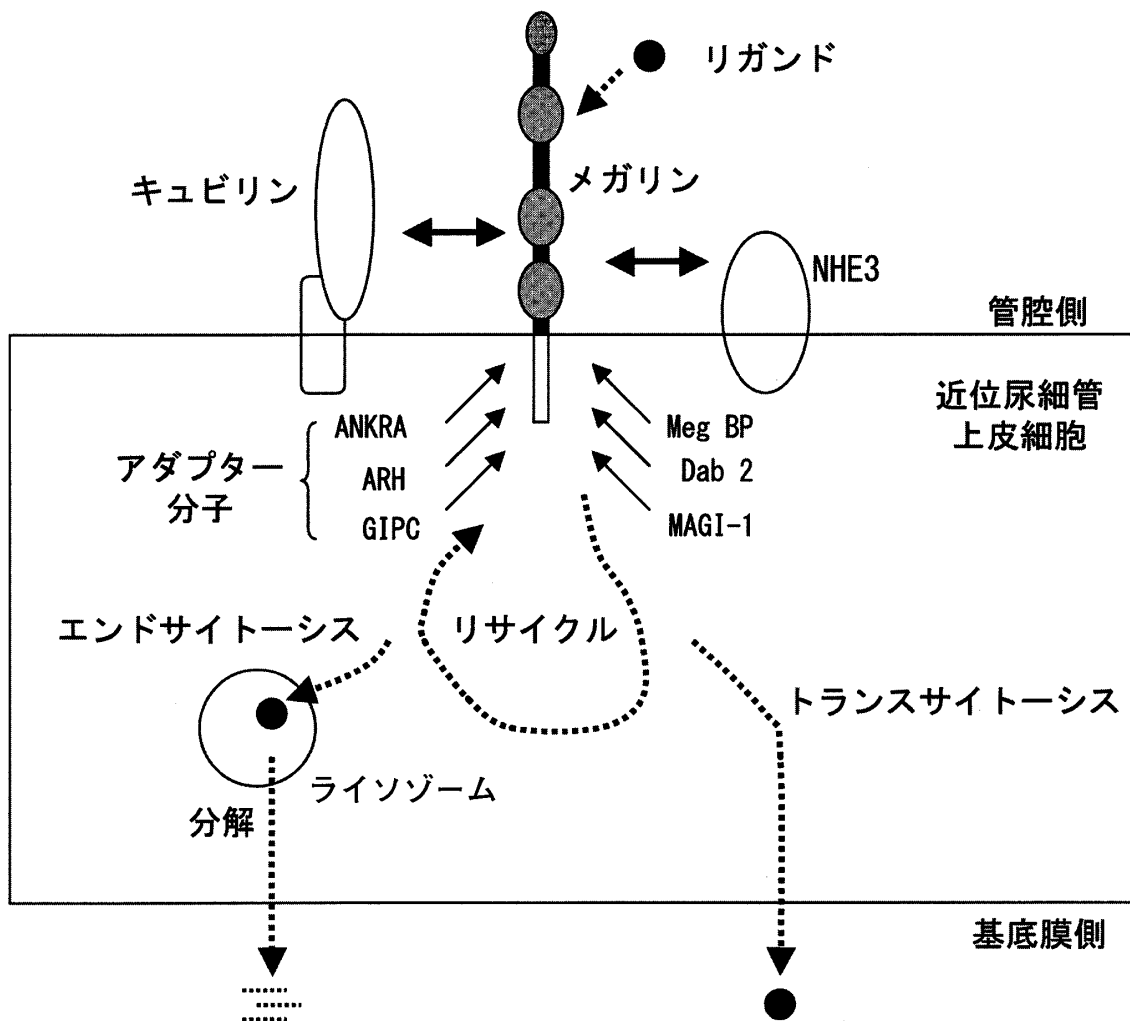


図2 近位尿細管上皮細胞におけるメガリンを介するリガンドの取り込み・代謝、および他の膜蛋白、細胞内アダプター分子との相互作用

メガリンのリガンドはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後、ライソゾームに運搬され代謝をうける(一部はトランスサイトーシスされる)。メガリンはキュベリンおよび N^+-H^+ exchanger isoform (NHE3)と相互作用を及ぼしあう。また細胞内では様々なアダプター分子と結合し、シグナル伝達に関わる可能性がある。

応による糖化修飾蛋白 advanced glycation end products (AGE) の関与が指摘されている。血液中に存在する低分子量のAGEは糸球体を濾過し、近位尿細管上皮細胞によって再吸収・代謝される。さらに腎症が進行すれば、より高分子量のAGEも糸球体を濾過し、近位尿細管上皮細胞に蓄積し、過剰な代謝負荷となる。私たちは、メガリンを高発現するラット卵黄嚢上皮由来細胞(L2細胞)を用いた実験において、 ^{125}I 標識AGE

(グルコース由来)-BSAの取り込みが、抗メガリン抗体によって有意に抑制されることから、その取り込み経路にメガリンが関与することを明らかにした¹⁹⁾。さらに最近、グルコース以外にも、メチルグリオキサールやグリセルアルデヒド由来のAGE-BSAの細胞取り込みにもメガリンが関与することを明らかにしている。今後は、メガリンのAGE取り込みに伴う細胞内シグナルの解析を進めていきたい。

表1 メガリンのリガンド

Vitamin - binding proteins	Drugs and toxins
* Transcobalamin - vitamin B ₁₂	Aminoglycosides
* Vitamin -D-binding protein	* Polymyxin B
* Retinol - binding protein	* Aprotinin
	* Trichosantin
Other carrier proteins	Enzymes and enzyme inhibitors
Albumin	PAI - I
Lactoferrin	PAI - I - urokinase
Hemoglobin	PAI - I - tPA
* Odorant-binding protein	Pro - urokinase
* Transthyretin	Lipoprotein lipase
* L-FABP	Plasminogen
Lipoproteins	* β - amylase
Apolipoprotein B	* α_1 - microglobulin
Apolipoprotein E	* Lysozyme
Apolipoprotein J/clusterin	
Apolipoprotein H	Immune - and stress - response - related proteins
Hormones and hormone precursors	Immunoglobulin light chains
* Parathyroid hormone	* PAP - 1
* Insulin	* β_2 - microglobulin
* Epidermal growth factor	Others
* Prolactin	RAP
* Leptin	Ca ²⁺
Thyroglobulin	* Cytochrome c

*印はいわゆる低分子量蛋白.

糖尿病性腎症の初期には糸球体過剰濾過がおこる。これは近位尿細管のNa⁺再吸収の亢進が第一義的な原因であると推定されている（下記のメタボリック症候群関連腎症でも同様である）²⁰⁾。その際、重要な役割を演ずるのがNHE3であるが¹⁸⁾、私たちは、代謝負荷に伴うメガリンとNHE3の相互作用の何らかの問題から、NHE3の不活性化・代謝が障害されているのではないかという作業仮説を検討中である。

メタボリック症候群関連腎症とメガリン

内臓肥満、高血圧、高脂血症、耐糖能異常など

を合併し、インスリン抵抗性を基盤とする病態が、メタボリック症候群として注目されている。このような病態では、動脈硬化性疾患の発症リスクが高い。このような患者に、蛋白尿を呈し、糸球体・尿細管肥大を組織学的な特徴とする腎症が発症することがある（メタボリック症候群関連腎症とでも命名すべきである）。このような症例が明らかな糖尿病を合併すると、さらに高血糖の病像が加わり、糖尿病性腎症が顕在化するとともに、重症化する可能性がある。あるいは2型糖尿病は基本的にメタボリック症候群の病態が先行あるいは併存するので、本来その腎症の病像は、メタボリック症候群関連腎症を内包しているともいえる。

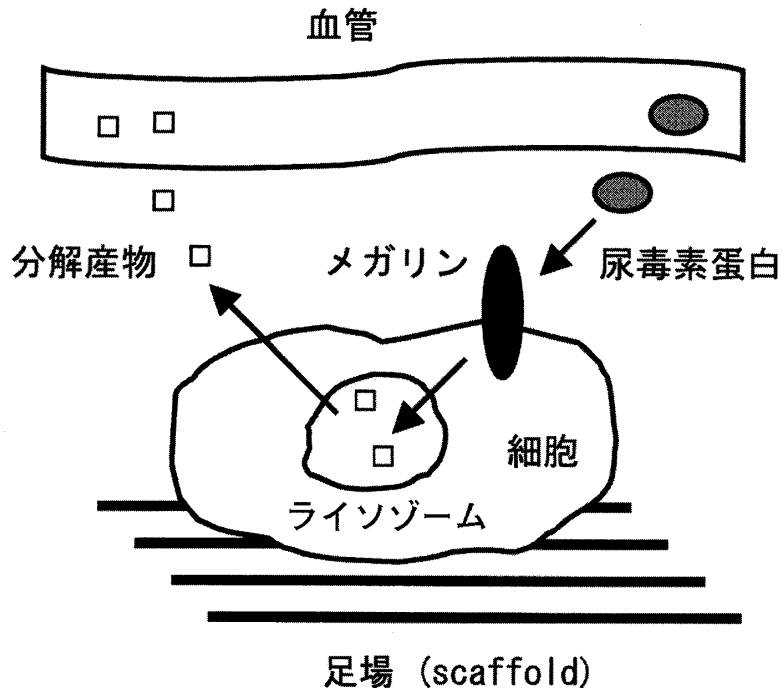


図3 メガリン発現細胞の皮下移植による尿毒素蛋白代謝モデル

腎不全個体の皮下組織において、足場蛋白(scaffold)の上にメガリン発現細胞を移植し、周囲に新生血管の増生を誘導する。血管から漏出する尿毒素蛋白をメガリンを介して取り込ませ代謝させる。

メタボリック症候群は上記のように複合的な病態であるが、その病因の最も上流に位置するのは、内臓脂肪の蓄積と考えられている。そのような病態では、脂肪細胞が分泌するアディポサイトカインのひとつであるレプチンが血液中に増加する。腎臓は血液中のレプチンが最も集積する臓器であるとともに、レプチンは腎障害性の役割を演ずることが示唆されている²¹⁾。前述のように私たちは、メガリンが近位曲尿細管において、糸球体を濾過したレプチンを取り込み代謝することを明らかにしている¹⁰⁾。また、いわゆるレプチン受容体は、それより下流の近位直尿細管から集合管にかけて存在することを明らかにした。このような経路を介して、メガリンはレプチンの腎臓に対する作用を制御しているとともに、その腎障害性に関係している可能性がある。

また、メタボリック症候群では脂肪肝などの肝障害を合併することが多い。肝臓内に豊富に存在する liver type fatty acid binding protein (L-FABP) は、健常者でも血液中に放出されているが、肝障害ではさらに血液中に逸脱し増加する。私たちは、血液中に存在する L-FABP も速やかに糸球体を濾過し、近位尿細管上皮細胞においてメガリンを介して再吸収されることを見いだしている²²⁾。L-FABP は、脂肪酸、ビリルビン、胆汁酸など、潜在的に腎毒性を有する分子や、ある種の薬物との高い結合性を有しており、肝臓から逸脱する際、それらを腎臓に運搬し、腎毒性を惹起する可能性がある。

いずれにせよ、このような病態の基本は腎臓における代謝の負荷であると考えられる。今後は、メガリンを中心とした腎臓の蛋白代謝機構との関

わりを掘り下げていきたい。

尿毒素蛋白代謝とメガリン

メガリンは前述のように様々な低分子量蛋白の近位尿細管上皮細胞内への取り込み・代謝に関わる。腎不全になると、そのような代謝機構が障害される結果、低分子量蛋白が、いわゆる尿毒素蛋白として、血液・組織に蓄積する。その代表例が β_2 -ミクログロブリン (β_2 -m) であり、長期透析患者で透析アミロイドーシスを引き起こす原因となる²³⁾。前述の AGE も、腎不全・透析患者で血液中に蓄積し、動脈硬化や臓器障害の病因となることが示唆されており、一種の尿毒素蛋白と考えられている²⁴⁾。さらにレプチンも透析患者で蓄積し、栄養障害や免疫低下に関係していると考えられている。腎不全においては、上記の蛋白の他に、まだ尿毒素蛋白として同定されていないものの存在や、それらの複合作用の可能性を考えると、本来生体では蓄積しない低分子量蛋白はできるだけすべて除去するような治療法を開発することが望ましい。その意味で、下記のように、メガリンのような一種のスカベンジャー受容体の機能を利用することは、有用性が高いと考えられる。

メガリン発現細胞の皮下移植モデル

私たちはメガリンの機能を利用した尿毒素蛋白代謝モデルの基礎検討を行っている。まず最も単純な系として、メガリンを発現する細胞を、生体内において、足場蛋白 (scaffold) とともに移植し、周囲の血管 (新生血管) から漏出する低分子量蛋白を、メガリンを介してその細胞にとりこませ代謝させるというモデルを案出した²⁵⁾ (図 3)。

このモデルの有効性を確かめるために、私たちは以下の実験をおこなった。まず、メガリンを高発現するラット卵黄囊上皮由来 L2 細胞が、メガリンを介して β_2 -m を細胞内にとりこみ代謝することを確認した。そして、ヌードマウスの皮下組織に、血管新生因子 basic fibroblast growth factor を局所で徐放するためのゼラチン粒子を注入

したコラーゲンシートを移植した。その徐放によって周囲に血管新生を誘導した後、シート内に L2 細胞を移植し、それを足場として用いて細胞を局所で増殖させた。その後、両腎を摘出することによって腎不全状態を作出してから、¹²⁵I 標識 β_2 -m を腹腔内注射し、移植細胞塊および各種臓器での取り込みを測定した。また細胞を移植しない対照群と比較して、血液中の¹²⁵I 標識 β_2 -m 濃度の推移を解析した。その結果、移植細胞塊はその他の臓器に比較して優位に¹²⁵I 標識 β_2 -m を取り込むこと、その細胞内で代謝が行われ、血液中の¹²⁵I 標識 β_2 -m のクリアランスは細胞移植群で促進されることが明らかになった。現在、このモデルの臨床応用性を高めるための研究を進めている。

このような皮下組織における細胞移植療法モデルは、肝臓や膵臓 (糖尿病) 疾患の治療への応用も期待される。

疾患・病態マーカーとしてのメガリン

メガリンは尿中に排出されることが知られており、それを定量することによって、近位尿細管上皮細胞の代謝機能・病態マーカーになりうることを期待されており、そのアッセイ系の開発をすすめている。また、メガリンは肺胞 II 型細胞にも豊富に発現しており、肺胞洗浄液中にも含まれるため、その細胞障害のマーカーになることも期待される。

おわりに

以上、メガリンという生体機能分子を臨床疾患の病態解析や診断・治療に応用するための研究の一端を紹介した。

文 献

- 1) Kerjaschki D and Farquhar MG: The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush

- border. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5557 - 5561, 1982.
- 2) Saito A, Pietromonaco S, Loo AK and Farquhar MG: Complete cloning and sequencing of rat gp330/“megalin,” a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9725 - 9729, 1994.
 - 3) Farquhar MG, Saito A, Kerjaschki D and Orlando RA: The Heymann nephritis antigenic complex: Megalin (gp330) and RAP. *J Am Soc Nephrol* 6: 35 - 47, 1995.
 - 4) Christensen EI and Birn H: Megalin and cubilin: multifunctional endocytic receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 256 - 266, 2002.
 - 5) Willnow TE, Hilpert J, Armstrong SA, Rohlmann A, Hammer RE, Burns DK and Herz J: Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8460 - 8464, 1996.
 - 6) Yochem J and Greenwald I: A gene for a low density lipoprotein receptor - related protein in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4572 - 4576, 1993.
 - 7) Saito A, Yamazaki H, Rader K, Nakatani A, Ullrich R, Kerjaschki D, Orlando RA and Farquhar MG: Mapping rat megalin: The second cluster of ligand binding repeats contains a 46 - amino acid pathogenic epitope involved in the formation of immune deposits in Heymann nephritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8601 - 8605, 1996.
 - 8) Yamazaki H, Ullrich R, Exner M, Saito A, Orlando RA, Kerjaschki D and Farquhar MG: All four putative ligand binding domains in megalin contain pathogenic epitopes capable of inducing passive Heymann nephritis. *J Am Soc Nephrol* 9: 1638 - 1644, 1998.
 - 9) Orlando RA, Exner M, Czekay RP, Yamazaki H, Saito A, Ullrich R, Kerjaschki D and Farquhar MG: Identification of the second cluster of ligand - binding repeats in megalin as a site for receptor - ligand interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2368 - 2373, 1997.
 - 10) Hama H, Saito A, Takeda T, Tanuma A, Xie Y, Sato K, Kazama JJ and Gejyo F: Evidence indicating that renal tubular metabolism of leptin is mediated by megalin but not by the leptin receptors. *Endocrinology* 145: 3935 - 3940, 2004.
 - 11) Oleinikov AV, Zhao J and Makker SP: Cytosolic adaptor protein Dab2 is an intracellular ligand of endocytic receptor gp600/megalin. *Biochem J* 347: 613 - 621, 2000.
 - 12) Rader K, Orlando RA, Lou X and Farquhar MG: Characterization of ANKRA, a novel ankyrin repeat protein that interacts with the cytoplasmic domain of megalin. *J Am Soc Nephrol* 11: 2167 - 2178, 2000.
 - 13) Patrie KM, Drescher AJ, Goyal M, Wiggins RC and Margolis B: The membrane - associated guanylate kinase protein MAGI - 1 binds megalin and is present in glomerular podocytes. *J Am Soc Nephrol* 12: 667 - 677, 2001.
 - 14) Lou X, McQuistan T, Orlando RA and Farquhar MG: GAIP, GIPC and Galphai3 are concentrated in endocytic compartments of proximal tubule cells: putative role in regulating megalin's function. *J Am Soc Nephrol* 13: 918 - 927, 2002.
 - 15) Petersen HH, Hilpert J, Militz D, Zandler V, Jacobsen C, Roebroek AJ and Willnow TE: Functional interaction of megalin with the megalinbinding protein (MegBP), a novel tetratricopeptide repeat - containing adaptor molecule. *J Cell Sci* 116: 453 - 461, 2003.
 - 16) Nagai M, Meerloo T, Takeda T and Farquhar MG: The adaptor protein ARH escorts megalin to and through endosomes. *Mol Biol Cell* 14: 4984 - 4996, 2003.
 - 17) Biemesderfer D, Nagy T, DeGray B and Aronson PS: Specific association of megalin and the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in the proximal tubule. *J Biol Chem* 274: 17518 - 17524, 1999.
 - 18) Hryciw DH, Lee EM, Pollock CA and Poronnik P:

- Molecular changes in proximal tubule function in diabetes mellitus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 31: 372 - 379, 2004.
- 19) Saito A, Nagai R, Tanuma A, Hama H, Cho K, Takeda T, Yoshida Y, Toda T, Shimizu F, Horiuchi S and Gejyo F: Role of megalin in endocytosis of advanced glycation end products: implications for a novel protein binding to both megalin and advanced glycation end products. *J Am Soc Nephrol* 14: 1123 - 1131, 2003.
- 20) Vallon V, Blantz RC and Thomson S: Glomerular hyperfiltration and the salt paradox in early type 1 diabetes mellitus: a tubulo - centric view. *J Am Soc Nephrol* 14: 530 - 537, 2003.
- 21) Tarzi RM, Cook HT, Jackson I, Pusey CD and Lord GM: Leptin - deficient mice are protected from accelerated nephrotoxic nephritis. *Am J Pathol* 164: 385 - 390, 2004.
- 22) Oyama Y, Takeda T, Hama H, Tanuma A, Iino N, Sato K, Kaseda R, Ma M, Yamamoto T, Fujii H, Kazama JJ, Odani S, Terada Y, Mizuta K, Gejyo F and Saito A: Evidence for megalin - mediated proximal tubular uptake of L - FABP, a carrier of potentially nephrotoxic molecules. *Lab Invest*, 2005, in press.
- 23) Gejyo F, Yamada T, Odani S, Nakagawa Y, Arakawa M, Kunitomo T, Kataoka H, Suzuki M, Hirasawa Y, Shirahama T, Cohen AS and Schmid K: A new form of amyloid protein associated with chronic hemodialysis was identified as β_2 - microglobulin. *Biochem Biophys Res Commun* 129: 701 - 706, 1985.
- 24) Henle T and Miyata T: Advanced glycation end products in uremia. *Adv Ren Replace Ther* 10: 321 - 331, 2003.
- 25) Saito A, Kazama JJ, Iino N, Cho K, Sato N, Yamazaki H, Oyama Y, Takeda T, Orlando RA, Shimizu F, Tabata Y and Gejyo F: Bioengineered implantation of megalin - expressing cells: A potential intracorporeal therapeutic model for uremic toxin protein clearance in renal failure. *J Am Soc Nephrol* 14: 2025 - 2032, 2003.
-