

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	DE Shankhajit
学位	博士 (医学)
学位記番号	新大院博 (医) 第773号
学位授与の日付	平成29年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Exocytosis-Mediated Urinary Full-Length Megalin Excretion is Linked With the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. (エクソサイトーシスを介した全長型メガリンの尿中排出は糖尿病性腎症の病因と結びついている)
論文審査委員	主査 教授 曾根 博仁 副査 教授 河内 裕 副査 教授 成田 一衛

### 博士論文の要旨

メガリンはlow-density lipoprotein 受容体ファミリーに属する1回膜貫通型の巨大タンパク質である。特に腎近位尿細管細胞の管腔側膜に高発現し、糸球体を濾過するタンパク質や薬剤などの再吸収・代謝に関わるエンドサイトーシス受容体として機能している。申請者らは、メガリンが、細胞外領域の切断により、あるいは全長型として、近位尿細管細胞から逸脱し、尿中に排出されることを明らかにした (Ogasawara S, et al. *Diabetes Care* 2012)。前者はアミノ末端側の、後者はカルボキシル末端側のサンドイッチ ELISA を用いて測定されることから、それぞれをA-メガリン、C-メガリンと呼称した。さらに申請者らは、2型糖尿病患者における横断的解析において、尿中C-メガリンは正常アルブミン尿期から病期の進行に応じて増加することを明らかにしたが、縦断的解析においても、尿中C-メガリン測定は糖尿病性腎症の進展予測に有用であることを見いだしている。また申請者らは、尿中C-メガリン測定はIgA腎症の重症度判定 (Seki T, et al. *PLOS ONE* 2014) や小児の尿路感染症に伴う腎癒痕の診断にも有用であることを明らかにした。しかしC-メガリンの尿中排出機序の詳細は不明である。

### 目的

全長型メガリン (C-メガリン) の尿中排出機序、特に糖尿病性腎症に進行に伴ってそれが増加する機序を明らかにすることを目的とした。

### 方法

C-メガリンの尿中排出機序を解明するため、申請者らは尿中細胞外小胞に着目した。超遠心法を用いて2型糖尿病患者から尿中細胞外小胞を分離し、腎症の病期 (アルブミン尿期) に応じた動態をナノ粒子解析装置により評価し、尿中細胞外小胞中の各種マーカーの含有量をウエスタンブロットによって評価した。また、尿中細胞外小胞からエクソソーム分画を単離し、そのなかの全長型メガリン含有量を評価した。さらに、培養近位尿細管細胞 (immortalized rat proximal tubule cells, IRPTCs) にメガリンのエンドサイトーシスリガンドであるアルブミンあるいは終末糖化産物 (advanced glycation endproduct, AGE) 化アル

ブミンを与え、細胞外小胞およびエクソソームの排出機構を検討した。さらに、メガリンを介する腎障害モデルである高脂肪食負荷マウスにおける尿中細胞外小胞とそれに含有される全長型メガリン量の解析を行った。

#### 結果

2 型糖尿病患者において、腎症の病期（アルブミン尿期）の進行に応じて尿中細胞外小胞・エクソソームおよびその中の全長型メガリン含有量が増加することが分かった。さらに IRPTC におけるアルブミン、さらに AGE 化アルブミンの取り込みによってエクソソームに搭載された全長型メガリンの排出が増加した（エクソソーム阻害薬によって阻害）。特に AGE 化アルブミンによっては明らかなリソソーム障害が認められた。また、高脂肪食負荷マウスにおいても尿中細胞外小胞数およびその中の全長型メガリン含有量が増加した。これらのことから、尿中全長型メガリン（C-メガリン）は、糖尿病性腎症の病態と進行にリンクして、残存機能ネフロン（Nephron）の近位尿細管のエンドソーム-リソソーム系におけるメガリンを介するタンパク質代謝の質的・量的負荷に応じて、エクソソームに搭載されて尿中排出が増加することが明らかになった。

#### 考察

申請者らは既に、マウス高脂肪食負荷モデルにおいて、メガリンを「入り口」として脂肪酸高含有タンパク質などの病的物質が近位尿細管細胞に取り込まれることを起点として、尿細管から糸球体障害に至る腎障害が引き起こされる機序を明らかにしている（Kuwahara S, et al. *J Am Soc Nephrol* 2016）。また、メガリンはアミノ配糖体、バンコマイシン、コリスチン、シスプラチンなどの腎毒性薬剤と結合し、それらを近位尿細管細胞に取り込む「入り口」として急性腎障害の発症に関わることも明らかにした（Hori Y, et al. *J Am Soc Nephrol* 2017）。そのような「入り口」分子メガリンの尿中の動態を調べることが、腎臓病の病態の把握や重症度・予後の判定に有用であろうことが期待される。

尿アルブミンなど、従来の「ネフロン障害の程度」を表すバイオマーカーに対して、尿中 C-メガリンは残存機能ネフロン（Nephron）のタンパク質代謝の質的・量的負荷に反応して増加することから、「残存ネフロン（Nephron）の負荷・予備能」を検知する新しいマーカーになりうる可能性がある。たとえばネフロン数には個人差があるが、元々ネフロン数が少ない人が糖尿病に罹患すると腎症のリスクが高まることが予想され、そのようなリスクの判定に尿中 C-メガリン測定が有用であることが期待される。実際に申請者らは、尿中 C-メガリン測定が正常アルブミン尿期の 2 型糖尿病患者が微量アルブミン尿期に進展するリスクの予測に有用であるというデータを得ている。

#### 結論

糖尿病性腎症の発症・進展機序を司るひとつの「入り口」分子であるメガリンは、腎症の病態や進展機序にリンクして、残存機能ネフロン（Nephron）の近位尿細管のエンドソーム-リソソーム系におけるタンパク質代謝の質的・量的負荷に応じて、エクソソームに搭載されて尿中排泄が増加することがわかった（全長型 C-メガリン）。今後、尿中 C-メガリンは従来のバイオマーカーとは異なる新規のマーカーになることが期待される。

#### 審査結果の要旨

メガリンは 1 回膜貫通型の巨大タンパク質で、腎近位尿細管細胞の管腔側膜において糸球体を濾過するタンパク質や薬剤などの再吸収・代謝に関わるエンドサイトーシス受容体として機能する他、細胞外領域の切断（A-メガリン）、あるいは全長型（C-メガリン）として、近位尿細管細胞から逸脱し、様々な病態と関連して尿中に排出されることが分かっている。申請者らは C-メガリンの尿中排出機序を解明するため、超

遠心法を用いて2型糖尿病患者から尿中細胞外小胞を分離し解析した。結果、腎症病期の進行に応じて尿中細胞外小胞・エクソソームおよびその中の全長型メガリン含有量が増加することが示された。さらに培養細胞においてアルブミン、AGE 化アルブミンの取り込みによってエクソソームに搭載された全長型メガリンの排出が増加した。高脂肪食負荷マウスにおいても尿中細胞外小胞数およびその中の全長型メガリン含有量が増加した。これらのことから、糖尿病性腎症の発症・進展機序を司るひとつの分子であるメガリンは、腎症の病態や進展機序にリンクして、残存機能ネフロン近位尿細管のエンドソーム-リソソーム系におけるタンパク質代謝の質的・量的負荷に応じて、エクソソームに搭載されて尿中排泄が増加することがわかった（全長型C-メガリン）。今後、尿中C-メガリンは従来のバイオマーカーとは異なる新規のマーカーになることが期待される。

以上をもって学位論文としての価値を認める。