
シンポジウム

糖尿病の合併症

Complications of Diabetes Mellitus

第 699 回新潟医学会

日時 平成 26 年 7 月 19 日 (土) 午後 2 時から
会場 新潟大学医学部 有壬記念館

司会 曾根博仁教授 (血液・内分泌・代謝内科)
演者 長谷部 日 (眼科), 斎藤亮彦 (機能分子医学講座), 下畑享良 (神経内科)
渡辺賢一 (新潟薬科大学臨床薬理学), 山崎和久 (口腔保健学講座)
堀川千嘉 (新潟県立大学健康栄養学科)

1 糖尿病網膜症治療における現在の課題

長谷部 日
眼科

2 糖尿病性腎症の病態と治療

齋藤亮彦

新潟大学大学院医歯学総合研究科
機能分子医学講座

Pathogenesis and Treatment of Diabetic Nephropathy

Akihiko SAITO

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

要 旨

糖尿病性腎症の発症・進展において、近位尿細管上皮細胞障害は重要な役割を担う。メガリンは近位尿細管において糸球体濾過分子（主にタンパク質）の再吸収に関わるエンドサイトーシス受容体である。近年、その発現調節機構、新規リガンドの同定、リガンド結合機序、他分子との相互作用の解析などが進んでいる。またメガリンとその関連分子は、アルブミン尿の出現や腎機能障害の進展機序において重要な役割を担っていることが明らかになってきている。さらに尿中メガリンの測定系の開発が行われ、それが糖尿病性腎症における新規バイオマーカーとなる可能性が示されている。またメガリンおよびその関連分子の genome-wide association study による解析、腎内レニン・アンジオテンシン系活性化機序におけるメガリンの役割、経口抗酸化薬 bardoxolone methyl とメガリンの関わりなど、注目される知見が相次いでいる。今後、メガリンを標的とした腎臓病性腎症の新しい診断・治療法の開発が期待される。

キーワード：糖尿病性腎症、メガリン、バイオマーカー、近位尿細管細胞障害

はじめに

糖尿病性腎症は末期腎不全に至る最大の原因疾患である。透析療法は未だ不完全な代償治療であり、患者のQOLのうえでも大きな課題があるだけでなく、1兆円を超える医療費が投入されていることから医療経済的な問題も見逃せない。したがって、透析導入患者数を減少させることは重要な医学的課題である。

糖尿病性腎症をめぐってもうひとつ特記すべきことは、心血管病の合併率（心腎連関）、死亡率が

高いことである。1型および2型糖尿病患者において、腎症を合併しない患者の死亡率は健常人と遜色なく¹⁾²⁾、その点からも、糖尿病性腎症の予防と治療は重要である。

糖尿病性腎症を予防するうえでは、糖尿病自体の発症率を下げることで、糖尿病の検診率を上げること、糖尿病患者の受診中断を避けることが重要であることは言うまでもない。さらに、糖尿病患者の血糖、血圧、脂質の管理が重要であると云われている。しかし、それらの管理だけでは十分ではなく、新しいバイオマーカーや治療法・治療薬

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

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科 機能分子医学講座
齋藤亮彦

の開発が望まれている。

私たちはこれまで、糖尿病性腎症の発症・進展において、近位尿細管上皮細胞障害の関わりが重要であるという視点³⁾⁴⁾から、研究を行ってきた。特に以下に述べる近位尿細管上皮細胞のエンドサイトーシス受容体メガリンを中心に検討を行ってきた。

メガリンの構造, 機能, 発現調節

メガリン (LRP2) は当初、ラット膜性腎症モデル、Heymann 腎炎の責任抗原 (gp330) として同定されたが、私たちは 1994 年に cDNA クローニングから全構造を決定した⁵⁾。メガリンは、糖鎖修飾を加味すると分子量が約 600 kDa に及ぶ巨大タンパク質である。メガリンは腎臓において、近位尿細管の管腔側膜に局在し、糸球体から濾過された様々なリガンド (主にタンパク質) を細胞内に取り込む (エンドサイトーシス)。また、他のトランスポーターや受容体と共役し、様々な機能に関与している⁶⁾⁷⁾。さらに、自身の細胞内領域が切断され、シグナル伝達に関与することも示唆されている⁸⁾。

糖尿病ラットでは近位尿細管のメガリンの発現が低下し、それに伴ってアルブミン尿が増加するが、ACE 阻害薬や ARB でそれらが回復することが報告されていた⁹⁾。私たちはその機序の一端として、アンジオテンシン II が AT₁ 受容体およびその下流の ERK1/2 シグナル系を介してその発現を低下させること、高糖条件あるいはインスリンはその発現を増強させること、アンジオテンシン II とインスリンの間には互いに拮抗的なクロストークの関係があることを明らかにした¹⁰⁾。また私たちは、LPS 刺激による TNF α の発現増加から ERK1/2 シグナル系を介してメガリンの発現が抑制されることを明らかにした¹¹⁾。

メガリンのリガンド

メガリンのリガンドには、アルブミンの他、様々な低分子量タンパク質が知られている⁷⁾。ま

たビタミン A, ビタミン B₁₂, ビタミン D, 葉酸などビタミン類の結合タンパク質もリガンドであり、それらの代謝に関与している。その他、近年同定されたりガンドに、セレノプロテイン P, ジメルカプトコハク酸テクネチウム (^{99m}Tc-DMSA), フェチュイン A などがある。

メガリン関連分子

a. キュビリン, アムニオンレス

キュビリンはアミノ酸 3,597 個 (ヒト) から構成される 460 kDa ほどの糖タンパク質であり、近位尿細管の管腔側膜に存在している。キュビリンは膜貫通領域を持たず、アムニオンレスと呼ばれる 1 回膜貫通型の膜タンパク質と複合体 (cubam) を形成することにより膜上に係留されている¹²⁾。もともとキュビリンは回腸末端におけるビタミン B₁₂-内因子複合体の受容体として同定された。近位尿細管においてはアルブミンをはじめ様々なタンパク質の再吸収に関与しており、エンドサイトーシスにおいてキュビリンはメガリンと共役する。さらに、キュビリン遺伝子のミスセンス変異 (I2984V) が genome-wide association study (GWAS) による解析で、一般集団の尿中アルブミン量および糖尿病患者の微量アルブミン尿レベルに関連することが確認された¹³⁾。これはアルブミン尿の機序のうえで、近位尿細管のはたす役割が重要であることを表している。

b. その他

その他メガリンは、近位尿細管細胞膜に発現する Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3) やリン酸輸送体 NaPi2a (SLC34A1) などのトランスポーターの機能に影響を与える⁶⁾。またメガリンは JIP1/2, GIPC, ANKRA, Dab2, ARH などの様々な細胞内アダプター分子と結合し、その機能を発揮している⁶⁾。メガリンによるエンドサイトーシスには、モータータンパク質 myosin IV の Dab2 ならびに GIPC との結合が関与することが明らかにされているが、私たちも Dab2 に結合する他のモータータンパク質として、nonmuscle

heavy chain IIA (NMHCIIA) を同定した¹⁴⁾。

近位尿細管におけるアルブミンの処理機構と アルブミン尿・蛋白尿の関係

近位尿細管におけるアルブミンの処理には、メガリン・キュピリンの他に neonatal Fc receptor (FcRn) や CD36 などにも関与すると考えられる。FcRn はポドサイトと近位尿細管細胞に発現し、リソソームでの分解を回避したアルブミンの回収に関与する¹⁵⁾。CD36 は class B scavenger receptor であり、蛋白尿が増加する病態で近位尿細管に発現が増加し、アルブミンの再吸収に関わるとされる¹⁶⁾。今後、これらの分子とメガリン・キュピリンの関係についての検討が期待される。

いずれにせよ、アルブミン尿は、糖尿病性腎症をはじめとする CKD の進展や心血管系疾患の危険因子として重要なマーカーと考えられているが、その機序として、近位尿細管における再吸収の障害が関与することを忘れてはならない。このことに関連して、私たちは、近位尿細管障害がいわゆる「心腎連関」の機序に関与するという仮説を提唱した¹⁷⁾。

メガリンを介する尿細管障害

大量の糸球体濾過タンパク質を伴うネフローゼ症候群のような病態においては、非選択的な濾過タンパク質の量的な負荷が、メガリンを介する近位尿細管障害につながる¹⁸⁾。また、糖尿病においては正常アルブミン尿や微量アルブミン尿の発症早期から、終末糖化産物 (advanced glycation end-products) などの修飾を受けた質的異常を伴うタンパク質やその分解産物の負荷により、腎障害が惹起されるのではないかという推察もある¹⁹⁾。すなわち、メガリンを介して近位尿細管に取り込まれるタンパク質の質的な問題が重要である可能性があり、今後の更なる検討が期待される。私たちは、マウスにおいて高脂肪食負荷 (メタボリックシンドローム型の2型糖尿病モデル) に伴って発症する腎障害は、メガリンを介する脂肪毒性因

子の取り込みによって引き起こされることを明らかにしている (論文投稿中)。

尿細管障害マーカー関連

従来より近位尿細管障害マーカーとして知られているもののほとんどが、糸球体を濾過し、メガリンによって近位尿細管に再吸収・代謝される低分子量蛋白質である—たとえば α_1 -microglobulin²⁰⁾, β_2 -microglobulin¹⁷⁾, liver-type fatty acid binding protein (LFABP)²¹⁾, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)²²⁾ など。したがってそれらは主にメガリン機能の低下を間接的に反映して尿中に増加すると考えられる。あるいはそれらの尿中排泄量は、その他に、それらの血中濃度、糸球体透過性、尿細管からの逸脱・産生などの因子に左右される。

ちなみに私たちは、メガリンの尿中排泄様式は regulated intramembrane proteolysis に由来する細胞外ドメイン逸脱型とエクソソームに由来する全長型に分けられ、後者の排泄量が糖尿病性腎症の早期診断あるいは重症度を示す1つのバイオマーカーになりうる可能性を明らかにしている²³⁾。

メガリンをめぐるその他の話題

a. Genome-wide association study (GWAS)

ヒトゲノム解読の終了に伴い、ゲノムを網羅的に解析し、疾患と関連する遺伝子を同定する方法 GWAS が開発された。この方法を用いて、前述の Dab2 や NMHCIIA (*MYH9*)²⁴⁾ の遺伝子が eGFR に関連することが明らかにされたことに続いて、メガリン遺伝子 (*LRP2*) も eGFR に関連することが報告された²⁵⁾。*MYH9* については、さらにその遺伝子の近傍に存在する *APOL1* 遺伝子の寄与が検討されている²⁶⁾。また前述のように、キュピリン遺伝子がアルブミン尿と関連することが報告されており¹³⁾、メガリンやキュピリンを介する近位尿細管のエンドサイトーシス機構が腎機能の保持やアルブミン尿の制御に重要な役割を担っていることがゲノム解析からも示された。

b. レニン・アンジオテンシン系 (RAS) との 関わり

糖尿病性腎症においては腎内で RAS が活性化すると考えられており、その機序の解明が期待されている。私たちの研究グループは、肝臓で産生されたアンジオテンシノゲンがメガリンを介して近位尿細管上皮細胞に取り込まれ、その過程で腎内 RAS 活性化に関わっていることを明らかにした²⁷⁾。今後は、肝臓から分泌されるアンジオテンシノゲンがどの段階でレニン活性による作用を受けているかなどを明らかにする必要がある。

c. Bardoxolone methyl

経口抗酸化薬である bardoxolone methyl は Nr2f2 の活性化を介して細胞障害保護作用を発揮すると考えられ、2型糖尿病患者における臨床試験から GFR の改善効果が報告されている²⁸⁾。興味深いことに、bardoxolone methyl を投与したサルで、腎臓においてメガリン発現が低下することが報告された²⁹⁾。これは臨床試験で bardoxolone methyl を使用した際、アルブミン尿の増加が確認されたことと一致する。おそらくメガリンの減少が近位尿細管におけるエンドサイトーシス低下を招き、アルブミン尿を誘発したものと推察されるが、本薬剤による GFR の改善効果が、メガリンの減少に伴う近位尿細管細胞のタンパク質代謝負荷軽減作用による可能性も考えられる。本薬剤は心不全の副作用のために第3相試験が中断されたが、本邦においては心不全の既往のない2型糖尿病患者において第2相試験が再開される予定である。

おわりに

エンドサイトーシス受容体メガリンについて、特に糖尿病性腎症との関わりから概説した。今後メガリン関連研究から糖尿病性腎症の新しい診断・治療法の開発を目指したい。

参考文献

- 1) Groop PH, Thomas MC, Moran JL, Waden J, Thorn LM, Makinen VP, Rosengard - Barlund M, Saraheimo M, Hietala K, Heikkila O and Forsblom C: The presence and severity of chronic kidney disease predicts all-cause mortality in type 1 diabetes. *Diabetes*, 58: 1651 - 1658, 2009.
- 2) Afkarian M, Sachs MC, Kestenbaum B, Hirsch IB, Tuttle KR, Himmelfarb J and de Boer IH: Kidney disease and increased mortality risk in type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 24: 302 - 308, 2013.
- 3) Thomson SC, Vallon V and Blantz RC: Kidney function in early diabetes: the tubular hypothesis of glomerular filtration. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286: F8 - 15, 2004.
- 4) Thomas MC, Burns WC and Cooper ME: Tubular changes in early diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis*, 12: 177 - 186, 2005.
- 5) 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 U S A*, 91: 9725 - 9729, 1994.
- 6) Saito A, Sato H, Iino, N and Takeda T: Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium. *J Biomed Biotechnol*, 2010: 403272, 2010.
- 7) De S, Kuwahara S and Saito A: The endocytic receptor megalin and its associated proteins in proximal tubule epithelial cells. *Membranes (Basel)*, 4: 333 - 355, 2014.
- 8) Shah M, Baterina OY, Jr Taupin V and Farquhar MG: ARH directs megalin to the endocytic recycling compartment to regulate its proteolysis and gene expression. *J Cell Biol*, 202: 113 - 127, 2013.
- 9) Tojo A, Onozato ML, Kurihara H, Sakai T, Goto A and Fujita T: Angiotensin II blockade restores albumin reabsorption in the proximal tubules of diabetic rats. *Hypertens Res*, 26: 413 - 419, 2003.
- 10) Hosojima M, Sato H, Yamamoto K, Kaseda R, Soma T, Kobayashi A, Suzuki A, Kabasawa H, Takeyama A, Ikuyama K, Iino N, Nishiyama A,

- Thekkumkara TJ, Takeda T, Suzuki Y, Gejyo F and Saito A: Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor - and insulin - mediated signaling cross talk. *Endocrinology*, 150: 871 - 878, 2009.
- 11) Takeyama A, Sato H, Soma - Nagae T, Kabasawa H, Suzuki A, Yamamoto - Kabasawa K, Hosojima M, Kaneko R, Higuchi F, Kaseda R, Ogasawara S, Narita I and Saito A: Megalin is downregulated via LPS - TNF - alpha - ERK1/2 signaling pathway in proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011.
 - 12) Birn H: The kidney in vitamin B12 and folate homeostasis: characterization of receptors for tubular uptake of vitamins and carrier proteins. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291: F22 - 36, 2006.
 - 13) Boger CA, Chen MH, Tin A, Olden M, Kottgen A, de Boer IH, Fuchsberger C, O'Seaghdha CM, Pattaro C, Teumer A, Liu CT, Glazer NL, Li M, O'Connell JR, Tanaka T, Peralta CA, Kutalik Z, Luan J, Zhao JH, Hwang SJ, Akyzbekova E, Kramer H, van der Harst P, Smith AV, Lohman K, de Andrade M, Hayward C, Kollerits B, Tonjes A, Aspelund T, Ingelsson E, Eiriksdottir G, Launer LJ, Harris TB, Shuldiner AR, Mitchell BD, Arking DE, Franceschini N, Boerwinkle E, Egan J, Hernandez D, Reilly M, Townsend RR, Lumley T, Siscovick DS, Psaty BM, Kestenbaum B, Haritunians T, Bergmann S, Vollenweider P, Waeber G, Mooser V, Waterworth D, Johnson AD, Florez JC, Meigs JB, Lu X, Turner ST, Atkinson EJ, Leak TS, Aasarod K, Skorpen F, Syvanen AC, Illig T, Baumert J, Koenig W, Kramer BK, Devuyst O, Mychaleckyj JC, Minelli C, Bakker SJ, Kedenko L, Paulweber B, Coassin S, Endlich K, Kroemer HK, Biffar R, Stracke S, Volzke H, Stumvoll M, Magi R, Campbell H, Vitart V, Hastie ND, Gudnason V, Kardina SL, Liu Y, Polasek O, Curhan G, Kronenberg F, Prokopenko I, Rudan I, Arnlöv J, Hallan S, Navis G, Parsa A, Ferrucci L, Coresh J, Shlipak MG, Bull SB, et al.: CUBN is a gene locus for albuminuria. *J Am Soc Nephrol*, 22: 555 - 570, 2011.
 - 14) Hosaka K, Takeda T, Iino N, Hosojima M, Sato H, Kaseda R, Yamamoto K, Kobayashi A, Gejyo F and Saito A: Megalin and nonmuscle myosin heavy chain IIA interact with the adaptor protein Disabled - 2 in proximal tubule cells. *Kidney Int*, 75: 1308 - 1315, 2009.
 - 15) Sarav M, Wang Y, Hack BK, Chang A, Jensen M, Bao L and Quigg RJ: Renal FcRn reclaims albumin but facilitates elimination of IgG. *J Am Soc Nephrol*, 20: 1941 - 1952, 2009.
 - 16) Baines RJ, Chana RS, Hall M, Febbraio M, Kennedy D and Brunskill NJ: CD36 mediates proximal tubular binding and uptake of albumin and is upregulated in proteinuric nephropathies. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303: F1006 - 1014, 2012.
 - 17) Saito A, Kaseda R, Hosojima M and Sato H: Proximal tubule cell hypothesis for cardiorenal syndrome in diabetes. *Int J Nephrol*, 2011: 957164, 2010.
 - 18) Motoyoshi Y, Matsusaka T, Saito A, Pastan I, Willnow TE, Mizutani S and Ichikawa I: Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria. *Kidney Int*, 74: 1262 - 1269, 2008.
 - 19) Perkins BA, Rabbani N, Weston A, Ficociello LH, Adaikalakoteswari A, Niewczas M, Warram J, Krolewski AS and Thornalley P: Serum levels of advanced glycation endproducts and other markers of protein damage in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *PLoS One*, 7: e35655, 2012.
 - 20) Leheste JR, Rolinski B, Vorum H, Hilpert J, Nykjaer A, Jacobsen C, Aucouturier P, Moskaug JO, Otto A, Christensen EI and Willnow TE: Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am J Pathol*, 155: 1361 - 1370, 1999.
 - 21) 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*, 85: 522 - 531, 2005.

- 22) Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK and Borregaard N: The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil - gelatinase - associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett*, 579: 773 - 777, 2005.
- 23) Ogasawara S, Hosojima M, Kaseda R, Kabasawa H, Yamamoto - Kabasawa K, Kurosawa H, Sato H, Iino N, Takeda T, Suzuki Y, Narita I, Yamagata K, Tomino Y, Gejyo F, Hirayama Y, Sekine S and Saito A: Significance of urinary full - length and ectodomain forms of megalin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 35: 1112 - 1118, 2012.
- 24) Freedman BI, Hicks PJ, Bostrom MA, Cunningham ME, Liu Y, Divers J, Kopp JB, Winkler CA, Nelson GW, Langefeld, CD and Bowden DW: Polymorphisms in the non - muscle myosin heavy chain 9 gene (MYH9) are strongly associated with end - stage renal disease historically attributed to hypertension in African Americans. *Kidney Int*, 75: 736 - 745, 2009.
- 25) Chasman DI, Fuchsberger C, Pattaro C, Teumer A, Boger CA, Endlich K, Olden M, Chen MH, Tin A, Taliun D, Li M, Gao X, Gorski M, Yang Q, Hundertmark C, Foster MC, O'Seaghdha CM, Glazer N, Isaacs A, Liu CT, Smith AV, O'Connell JR, Struchalin M, Tanaka T, Li G, Johnson AD, Gierman HJ, Feitosa MF, Hwang SJ, Atkinson EJ, Lohman K, Cornelis MC, Johansson A, Tonjes A, Dehghan A, Lambert JC, Holliday EG, Sorice R, Kutalik Z, Lehtimäki T, Esko T, Deshmukh H, Ulivi S, Chu AY, Murgia F, Trompet S, Imboden M, Coassin S, Pistis G, Harris TB, Launer LJ, Aspelund T, Eiriksdottir G, Mitchell BD, Boerwinkle E, Schmidt H, Cavalieri M, Rao M, Hu F, Demirkan A, Oostra BA, de Andrade M, Turner, ST, Ding J, Andrews JS, Freedman BI, Giulianini F, Koenig W, Illig T, Meisinger C, Gieger C, Zgaga L, Zemunik T, Boban M, Minelli C, Wheeler HE, Igl W, Zaboli G, Wild SH, Wright AF, Campbell H, Ellinghaus D, Nothlings U, Jacobs G, Biffar R, Ernst F, Homuth G, Kroemer HK, Nauck M, Stracke S, Volker U, Volzke H, Kovacs P, Stumvoll M, Magi R, Hofman A, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Aulchenko YS, Polasek O, et al.: Integration of genome - wide association studies with biological knowledge identifies six novel genes related to kidney function. *Hum Mol Genet*, 21: 5329 - 5343, 2012.
- 26) Tzur S, Rosset S, Shemer R, Yudkovsky G, Selig S, Tarekegn A, Bekele E, Bradman N, Wasser WG, Behar DM and Skorecki K: Missense mutations in the APOL1 gene are highly associated with end stage kidney disease risk previously attributed to the MYH9 gene. *Hum Genet*, 128: 345 - 350, 2010.
- 27) Matsusaka T, Niimura F, Shimizu A, Pastan I, Saito A, Kobori H, Nishiyama A and Ichikawa I: Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II. *J Am Soc Nephrol*, 23: 1181 - 1189, 2012.
- 28) Pergola PE, Raskin P, Toto RD, Meyer CJ, Huff JW, Grossman EB, Krauth M, Ruiz S, Audhya P, Christ - Schmidt H, Wittes J and Warnock DG: Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med*, 365: 327 - 336, 2011.
- 29) Reisman SA, Chertow GM, Hebbar S, Vaziri ND, Ward KW and Meyer CJ: Bardoxolone methyl decreases megalin and activates nrf2 in the kidney. *J Am Soc Nephrol*, 23: 1663 - 1673, 2012.