

Introduction

The renin–angiotensin system (RAS) not only plays an essential role in the regulation of blood pressure and electrolyte balance [1–3], but is also involved in cell growth, fibrosis, and inflammation in cardiovascular and renal tissues by producing paracrine factors [1–3]. Prorenin, a precursor of renin, is elevated up to several hundred folds in patients with diabetes [4] and is a predictive marker of the onset of microvascular damage. In particular, young diabetic patients with high serum prorenin levels are at an increased risk of developing retinopathy and microalbuminuria [5, 6]. The (pro)renin receptor [(P)RR], a specific receptor for renin and prorenin, was identified as a member of the RAS by Nguyen et al. [7, 8]. (P)RR is a 350-amino-acid protein with a single transmembrane domain and is widely expressed in various tissues, including the brain, heart, and kidney [8]. When bound to prorenin, (P)RR activates the angiotensin I (AT-I)-generating activity of prorenin without cleavage of the prosegment, and directly stimulates the mitogen-activated protein kinase ERK1/2 pathway independent of the RAS [8, 9]. However, despite recent elucidation of the disconnected ligand binding sites of (P)RR and their presence in serum and urine as soluble (P)RR, the pathophysiology and clinical significance of serum prorenin and soluble (P)RR in patients with chronic kidney disease (CKD) are unclear.

Here, we examined the pathophysiological roles of serum prorenin and soluble (P)RR in CKD by investigating the influence of renal function, age, hypertension and/or diabetes mellitus, and soluble prorenin and α -Klotho levels on serum soluble (P)RR.

Materials and methods

The study protocol was approved by the institutional review boards of Kochi University Hospital (approve #22–78), Kochi-Takasu Hospital, and Kochi Red Cross Hospital, and all patients gave written informed consent for their participation in this study. A total of 374 patients with CKD and no history of renal replacement therapy were recruited from the aforementioned institutions from November 2010 to September 2012. All patients had proteinuria (>300 mg/g creatinine [Cr]), in accordance with the CKD criteria. The glomerular filtration rate (GFR) was calculated using the new Japanese equation [10]—estimated GFR (eGFR) in $\text{mL min}^{-1} 1.73 \text{ m}^{-2} = 194 \times \text{serum creatinine}^{-1.094} \times \text{age}^{-0.287} \times 0.739$ (for women). Serum Cr, blood urea nitrogen (BUN), uric acid (UA), albumin (Alb) and hemoglobin (Hb) levels, and the urine protein/Cr ratio were measured at SRL Inc. (Japan) by using standard methods. Furthermore, these clinical parameters were also evaluated using serum and urine sample

collected after 1 year ($n = 204$). The rate of change of Cr (ΔCr) and eGFR (ΔeGFR) were calculated as [(followed Cr after 1 year – initial Cr)/initial Cr] and [(followed eGFR after 1 year – initial eGFR)/initial eGFR], respectively.

Serum soluble (P)RR and prorenin levels were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Immuno-Biological Laboratories Co., Tokyo, Japan), consisting of a solid-phase sandwich ELISA with 2 kinds of highly specific antibodies [11, 12].

The relationships between initial data of serum soluble (P)RR, prorenin, and initial and followed data of clinical parameters on kidney function were then evaluated.

All data are presented as mean \pm standard deviation (SD). Single linear univariate correlations were evaluated using Pearson's correlation coefficient. Groups were compared using 1-way analysis of variance, Dunnett's test, and chi-squared test, as appropriate. Multiple regression analysis with serum prorenin and soluble (P)RR levels as dependent variables was conducted using a stepwise forward selection method. The F value for the inclusion and exclusion of variables was set at 4.0. Statistical significance was defined as $P < 0.05$. All statistical analyses were performed using the JMP (Ver. 6) statistical program.

Results

Patient characteristics

Patients were subdivided into 5 stages according to their eGFR, and their characteristics are presented in Table 1. The age of the patients ranged from 15 to 93 years (mean age 61.6 ± 17.5 years). The mean serum Hb level was 12.0 ± 2.1 g/dL, Cr 1.9 ± 1.6 mg/dL, BUN 27.0 ± 16.8 mg/dL, UA 6.5 ± 1.9 mg/dL, eGFR 45.4 ± 30.2 $\text{mL min}^{-1} 1.73 \text{ m}^{-2}$, and the urine protein/Cr ratio was 1.3 ± 2.1 mg/g Cr. The causes of CKD were primary chronic glomerulonephritis in 27.8 % of the patients, nephrosclerosis in 21.1 %, and diabetic nephropathy in 14.2 %; other types of diseases or unknown cause constituted 36.9 %.

Soluble (P)RR levels in CKD at stages 1–5

The association between serum levels of soluble (P)RR and Cr, eGFR, BUN, UA, age, CKD stage, and the urine protein/Cr ratio were analyzed. Soluble (P)RR levels were positively associated with the levels of serum Cr ($P < 0.0001$, $r = 0.262$) (Fig. 1), CKD stage ($P < 0.0001$; $r = 0.313$) (Fig. 2), BUN ($P < 0.0001$, $r = 0.264$), UA ($P < 0.005$, $r = 0.167$) and age ($P < 0.001$, $r = 0.177$) (Fig. 3), and inversely associated with eGFR ($P < 0.0001$, $r = -0.276$) (Fig. 1) and Hb ($P < 0.005$, $r = -0.159$) (Fig. 3).

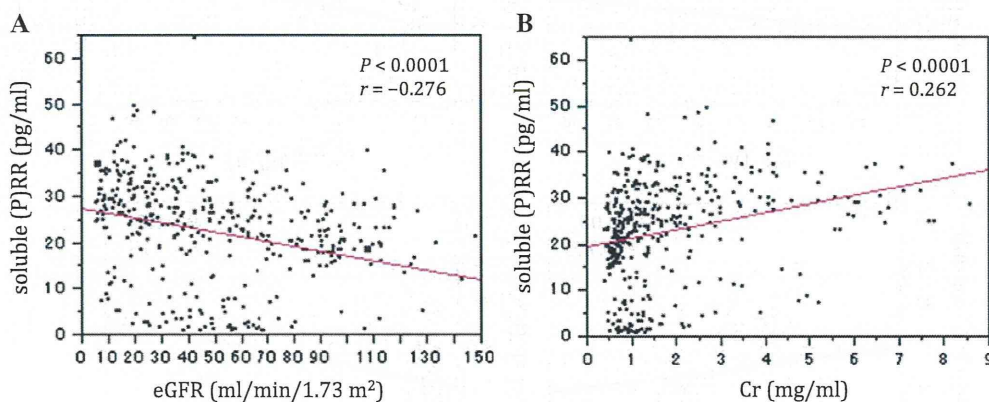
Table 1 Patient characteristics

Variables	Total	Stage 1 eGFR ≥ 90	Stage 2 90 > eGFR ≥ 60	Stage 3A 60 > eGFR ≥ 45	Stage 3B 45 > eGFR ≥ 30	Stage 4 30 > eGFR ≥ 15	Stage 5 eGFR <15
Number of patients (n)	374	35	78	50	68	83	60
Age (years)	61.6 \pm 17.5	31.9 \pm 13.4	53.4 \pm 15.9*	64.9 \pm 12.7* [#]	68.8 \pm 12.3* [#]	70.0 \pm 12.7* ^{#†}	67.0 \pm 12.7* [#]
Male (n, %)	206 (55.1)	10 (28.6)	37 (47.4)	30 (60.0)	39 (57.4)	50 (60.2)	40 (66.7)
Hypertension (n, %)	203 (54.3)	7 (20.0)	43 (55.1)	30 (60.0)	51 (75.0)	48 (57.8)	24 (40.0)
Diabetes mellitus (n, %)	53 (14.2)	2 (5.7)	13 (16.7)	5 (10.0)	14 (20.6)	14 (16.9)	5 (8.3)
ARB (n, %)	147 (39.3)	8 (22.9)	32 (41.0)	22 (44.0)	37 (54.4)	28 (33.7)	20 (33.3)
Hb (g/dl)	12.0 \pm 2.1	13.0 \pm 1.5	13.6 \pm 2.0	13.0 \pm 1.8 [#]	12.0 \pm 1.4 [¢]	11.0 \pm 1.8 [§]	10.2 \pm 1.4 [¶]
Cr (mg/dl)	1.9 \pm 1.6	0.6 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2 [¶]	1.3 \pm 0.2 [¢]	2.2 \pm 0.5 [§]	5.0 \pm 1.5 [¶]
BUN (mg/dl)	27.0 \pm 16.8	11.1 \pm 3.0	13.6 \pm 3.7	17.6 \pm 4.3 [¶]	23.9 \pm 6.9 [¢]	35.2 \pm 10.1 [§]	53.8 \pm 16.0 [¶]
UA (mg dl)	6.5 \pm 1.9	4.5 \pm 1.6	5.7 \pm 1.3*	6.1 \pm 1.6 [¶]	6.8 \pm 1.3 [¢]	7.2 \pm 1.6 [¢]	7.8 \pm 2.2 [¶]
eGFR (ml/m in/1.73 m ²)	45.4 \pm 30.2	110.0 \pm 14.4	71.3 \pm 8.3*	51.3 \pm 4.2 [¶]	37.5 \pm 4.1 [¢]	22.3 \pm 4.0 [§]	10.0 \pm 2.8 [¶]
The ratio of urine protein/urine Cr (mg/g Cr)	1.3 \pm 2.1	0.5 \pm 0.9	0.6 \pm 0.9	1.3 \pm 3.0	1.2 \pm 2.1 [#]	1.9 \pm 2.2 [¶]	2.4 \pm 2.3 ^{¶¶}
α -Klotho (pg/ml)	626.6 \pm 452.3	1153.5 \pm 1085.9	645.6 \pm 244.1*	674.5 \pm 536.6*	542.8 \pm 170.1*	513.5 \pm 153.4 [¢]	505.7 \pm 152.9 [¢]
Prorenin (ng/ml)	2.2 \pm 3.5	1.8 \pm 2.2	1.5 \pm 2.4	1.4 \pm 1.5	2.8 \pm 3.7	3.0 \pm 5.4	2.1 \pm 2.9
(P)RR (pg/ml)	22.8 \pm 11.2	19.3 \pm 8.4	19.3 \pm 10.4	19.0 \pm 11.3	24.7 \pm 10.7 [¢]	26.7 \pm 10.4 [¢]	27.3 \pm 9.7 [¢]

* $P < 0.05$ vs Stage 1; [#] $P < 0.05$ vs Stage 2; [†] $P < 0.05$ vs Stage 3A; [‡] $P < 0.05$ vs Stage 3B; [§] $P < 0.05$ vs Stage 4

[¶] $P < 0.05$ vs Stage 1–2; [¢] $P < 0.05$ vs Stages 1–3A; [§] $P < 0.05$ vs Stages 1–3B; [¶] $P < 0.05$ vs Stages 1–4

Fig. 1 Relationship between soluble (P)RR levels, eGFR, and serum Cr levels in CKD patients. Soluble (P)RR inversely correlated with eGFR ($P < 0.0001$, $r = -0.276$) (a) and positively correlated with serum Cr levels ($P < 0.0001$, $r = 0.262$) (b)



Interestingly, soluble (P)RR levels were significantly higher at stages 3B, 4, and 5 than at stages 1–3A ($P < 0.05$) (Fig. 2; Table 1). The urine protein/Cr ratio was positively associated with serum Cr and eGFR (data not shown). Soluble (P)RR levels were positively associated with the urine protein/Cr ratio ($P < 0.01$, $r = 0.157$) (Fig. 3).

Relationship between soluble (P)RR levels and angiotensin II (AT-II) receptor blocker (ARB) therapy

With respect to antihypertensive drugs, soluble (P)RR levels were significantly lower in patients treated with an

ARB ($n = 147$) than in those without ARB therapy ($n = 227$) ($P < 0.005$) (Fig. 4). No significant differences in soluble (P)RR levels were noted between patients with or without other antihypertensive drugs, including angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs) ($n = 19$),

calcium channel blockers ($n = 95$), β -blockers ($n = 18$), and diuretics ($n = 41$) ($P > 0.05$).

Relationship between soluble (P)RR levels and diabetes mellitus and/or primary hypertension in CKD patients

Soluble (P)RR levels were significantly lower in CKD patients with diabetes mellitus ($n = 53$) than in nondiabetic patients ($n = 321$) ($P < 0.05$) (Fig. 5a). CKD patients with primary hypertension ($n = 203$) had significantly lower levels of soluble (P)RR than those without primary hypertension ($n = 171$) ($P < 0.05$) (Fig. 5b). Moreover, CKD patients with both diabetes mellitus and hypertension had significantly lower levels of soluble (P)RR than those without these both conditions ($P < 0.05$).

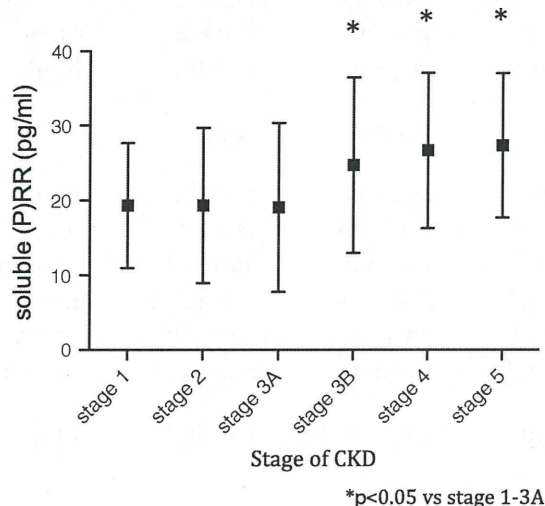


Fig. 2 Relationship between soluble (P)RR levels and CKD stage. Soluble (P)RR positively correlated with the stage of CKD ($P < 0.0001$, $r = 0.313$)

Serum prorenin levels in CKD at stages 1–5

On analyzing the relationships between serum prorenin levels and various parameters of renal function neither eGFR nor serum Cr levels correlated with serum prorenin levels and no significant differences in serum prorenin levels were noted between the CKD stages (Fig. 6).

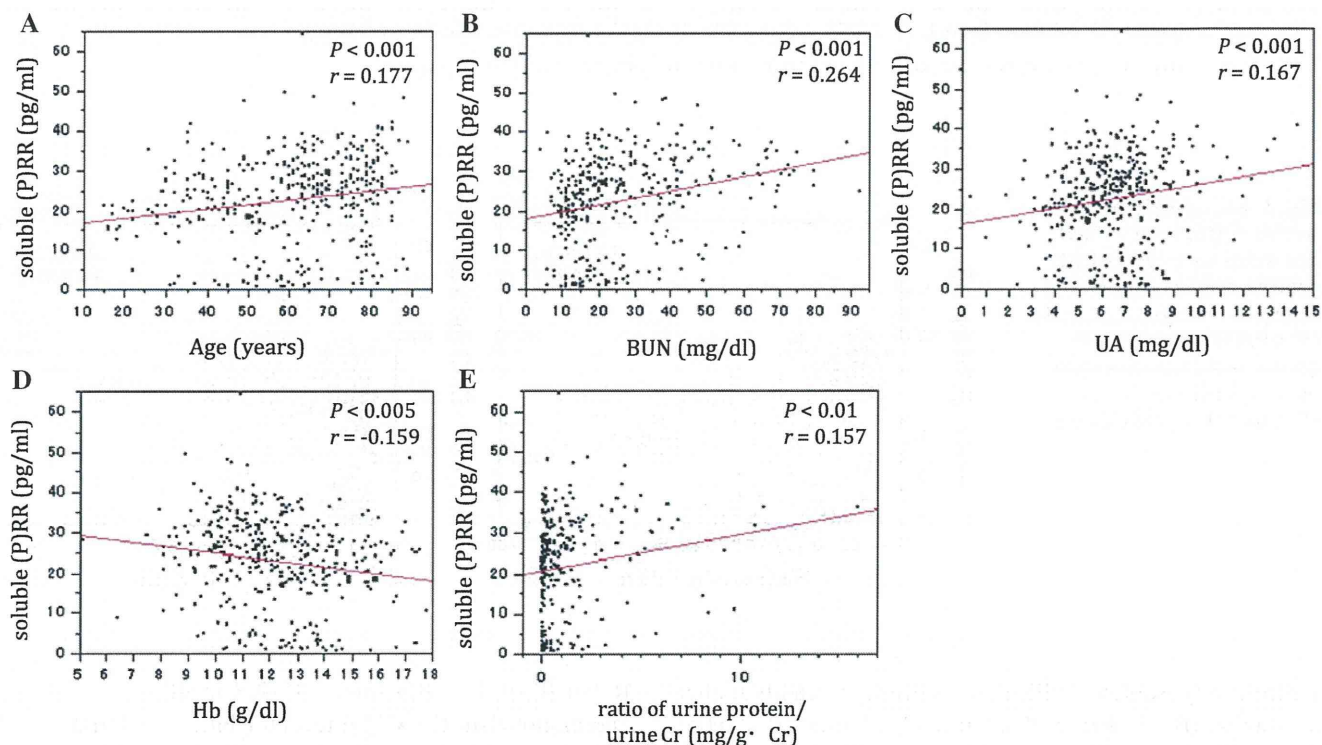


Fig. 3 Relationship between soluble (P)RR levels and age and BUN, UA, and Hb levels in CKD patients. Soluble (P)RR positively correlated with age ($P < 0.001$, $r = 0.177$) (a), serum BUN level ($P < 0.001$, $r = 0.264$) (b), UA level ($P < 0.001$, $r = 0.167$) (c),

negatively correlated with serum Hb level ($P < 0.005$, $r = -0.159$) (d), and ratio of urine protein/urine Cr ($P < 0.01$, $r = 0.157$) (e). Single linear univariate correlations were evaluated using Pearson's correlation coefficient

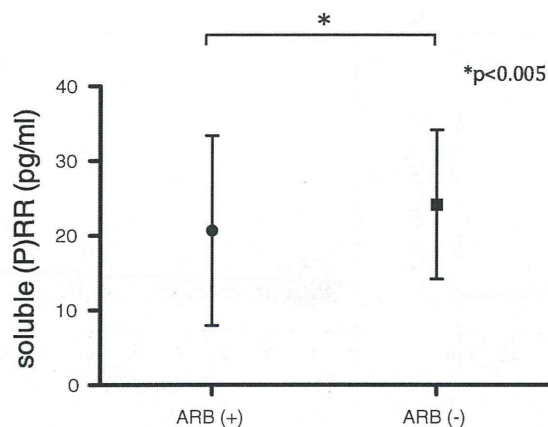


Fig. 4 Relationship between soluble (P)RR levels and ARB treatment in CKD patients. Soluble (P)RR concentration was significantly lower in patients treated with ARB than in those without ARB therapy ($P < 0.005$)

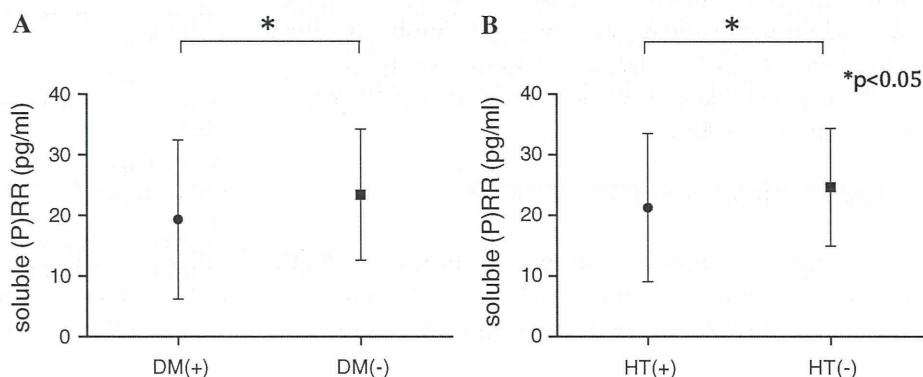
Serum prorenin levels in CKD patients with diabetes mellitus and/or primary hypertension

Serum prorenin levels were significantly higher in patients with diabetes mellitus ($n = 53$) than in those without ($n = 321$) (4.23 ± 6.78 vs 1.82 ± 2.52 , $P < 0.05$). Between patients with ($n = 203$) and without ($n = 171$) hypertension, the levels of serum prorenin showed no significant differences (2.44 ± 4.25 vs 1.83 ± 2.43 , $P = 0.09$). Furthermore, serum prorenin levels showed no significant differences between patients treated with ($n = 147$) and without ARB therapy ($n = 227$) ($P = 0.862$).

Relationship between soluble (P)RR, prorenin, and soluble α -Klotho levels

The relationship between soluble (P)RR and levels of α -Klotho—a possible biomarker of CKD—and prorenin was examined. Soluble (P)RR levels were inversely associated with α -Klotho levels ($P < 0.005$, $r = -0.154$) (Fig. 7a); however, no correlation was seen with serum prorenin levels (Fig. 7b).

Fig. 5 Relationship between soluble (P)RR levels and diabetes mellitus and/or primary hypertension in CKD patients. Soluble (P)RR levels were significantly lower in patients with diabetes mellitus or primary hypertension than in those without these conditions ($P < 0.05$)



Relationship between soluble (P)RR levels and various clinical variables

The relationship between soluble (P)RR level and serum levels of Hb, Cr, BUN, UA, prorenin, and α -Klotho, as well as diabetes mellitus, primary hypertension, ARB therapy, and the patient's sex and age was examined using stepwise multiple regression analysis. Soluble (P)RR levels correlated well with eGFR ($\beta = -0.248$, $F = 21.546$). ARB therapy ($\beta = 0.148$ and $F = 8.754$) and diabetes mellitus ($\beta = 0.112$, $F = 4.984$) also correlated with soluble (P)RR levels (Table 2).

Relationship between initial soluble (P)RR levels and the followed rate of change of serum Cr and eGFR for 1 year

The clinical parameters, including serum Cr and eGFR levels, from 204 patients could be followed after 1 year. We analyzed the correlation between basal soluble (P)RR level and the change in serum Cr level (Δ Cr) and eGFR (Δ eGFR) in these patients after 1 year. The results showed that basal soluble (P)RR levels were positively associated with Δ Cr ($P < 0.05$, $r = 0.159$) and inversely correlated with Δ eGFR ($P < 0.05$, $r = -0.148$) (Fig. 8).

Discussion

This study demonstrated that soluble (P)RR levels correlated positively with serum Cr, BUN, UA, and the urine protein/Cr ratio, and inversely with the eGFR and Hb levels. Notably, soluble (P)RR levels were significantly higher in CKD patients at stages 3B, 4, and 5 than in patients at stages 1–3A. The serum levels of soluble (P)RR were significantly lower in CKD patients with diabetes mellitus or primary hypertension than in those without these conditions. Furthermore, serum soluble (P)RR concentrations were significantly lower in CKD patients treated with ARBs. Interestingly, basal soluble (P)RR levels

Fig. 6 Relationship between serum prorenin level and eGFR, serum Cr level, and CKD stage. Serum prorenin levels did not significantly correlate with eGFR, serum Cr level, or CKD stage. Single linear univariate correlations were evaluated using Pearson’s correlation coefficient. *N.S.* not significant

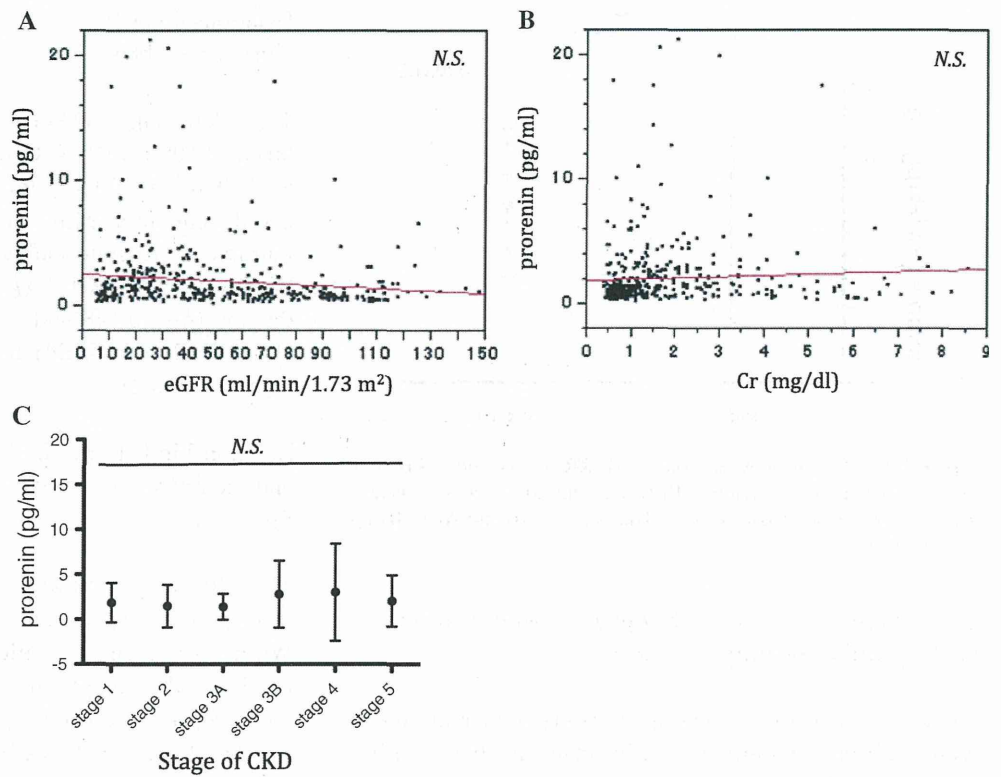
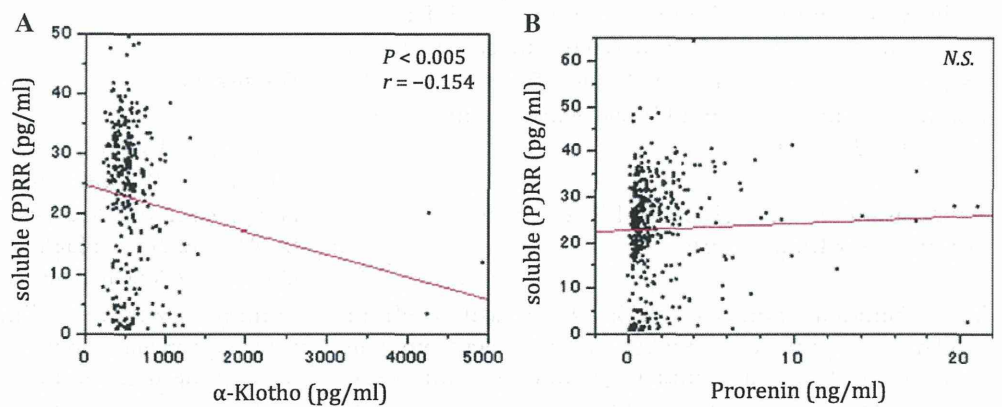


Fig. 7 Relationship between soluble (P)RR levels and serum prorenin and soluble α -Klotho. Soluble (P)RR levels inversely correlated with α -Klotho levels ($P < 0.005$, $r = -0.154$) (a) but not with serum prorenin levels (b)



were positively associated with Δ Cr and inversely associated with Δ eGFR for 1 year. To the best of our knowledge, our study is the first to demonstrate a relationship between serum soluble (P)RR levels and disease severity and progression, coexisting diabetes mellitus, and ARB treatment in patients with CKD.

Soluble (P)RR levels in CKD stages 1–5

This is the first report to show that serum soluble (P)RR levels are positively correlated with the CKD stage. The expression of (P)RR in the kidneys raised the possibility

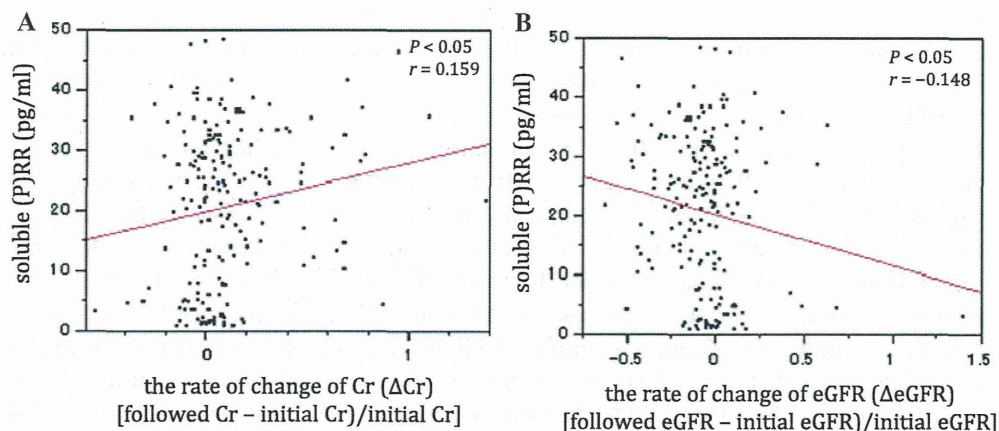
Table 2 Stepwise regression analysis of soluble (P)RR levels in CKD

Variables	Soluble (P)RR		
	β	<i>F</i>	<i>P</i>
eGFR	-0.248	21.546	<0.001
ARB therapy	0.148	8.754	0.003
Diabetes mellitus	0.112	4.984	0.026

Stepwise multiple regression analysis was conducted with soluble (P)RR level as the dependent variable. *F* values for the inclusion and exclusion of variables were set at 4.0 per step

Total $R^2 = 0.1543$, $P = 0.0001$

Fig. 8 Relationship between initial soluble (P)RR levels and the followed rate of change of serum Cr and eGFR for 1 year. Basal soluble (P)RR levels were positively associated with Δ Cr ($P < 0.05$, $r = 0.159$) (a) and inversely associated with Δ eGFR ($P < 0.05$, $r = -0.148$) (b)



that prorenin may be able to generate AT-I from angiotensinogen by binding to (P)RR. The subsequent overproduction of AT-II may then stimulate inflammation and fibrosis in the renal interstitial space. Alternatively, (P)RR may play a role in the tubular transport of water and electrolytes, including H^+ [13]. A previous report showed increased expression of (P)RR in the remnant kidneys of 5 of 6 nephrectomized rats [14]. In a study conducted by Ichihara et al. [15], a (P)RR blocker administered to rats with streptozotocin-induced diabetes or spontaneous hypertension was able to inhibit the development and progression of end-organ damage in these animals, and showed greater benefit than conventional inhibitors in relation to the RAS in diabetic AT-II type 1a receptor-deficient mice. Recently, it has been known that (P)RR functions in a renin-independent manner as an adaptor between Wnt receptors and the vacuolar H^+ -adenosine triphosphatase (V-ATPase) complex. Moreover, (P)RR and V-ATPase were required to mediate Wnt signaling [16]. If soluble (P)RR levels could reflect the (P)RR level in kidney tissue, the increased levels of soluble (P)RR might promote the progression of kidney injury and fibrosis in CKD. One might ask whether it is possible that the increased levels of soluble (P)RR were simply due to decreased GFR. A recent report suggested that soluble (P)RR in the renal medulla is stimulated during AT-II-dependent hypertension and that this form of the (P)RR is secreted into the tubular fluid [17]. This finding indicates that soluble (P)RR levels might be influenced by decreased GFR in rats. However, human studies have yet to address this possibility and further research is required. Although (P)RR-mediated signaling is believed to be involved in the development of glomerular diseases, the expression of (P)RR in podocytes and its function in autophagy suggests a physiological, rather than a pathological role in the kidneys [18]. At present, the function of (P)RR in CKD remains poorly understood. On the basis of our findings, we hypothesized that elevated serum levels of (P)RR may promote the development of renal failure.

Soluble (P)RR levels in patients with diabetes mellitus or primary hypertension

We noted that serum levels of soluble (P)RR were significantly lower in CKD patients with diabetes mellitus; however, the reason for this discrepancy is unknown. While relatively few studies have described the regulatory mechanisms of (P)RR expression, studies by Unger et al. [14, 19] suggest that (P)RR expression may be regulated by renin through a negative feedback loop. In fact, it has been reported that upregulation of renal renin and downregulation of renal (P)RR were observed after angiotensin-converting enzyme inhibition and change to a low-salt diet [20]. Renin downregulates (P)RR expression by a process involving the transcription factor promyelocytic zinc finger protein [19]. As such, whether the increased expression of (P)RR in CKD is a result of a negative feedback signal in the form of decreased intrarenal renin, remains to be clarified.

Soluble (P)RR levels in CKD patients with ARB therapy

A significantly lower level of serum soluble (P)RR was observed in patients treated with ARBs, consistent with the findings of a previous study by Siragy et al. [21], which showed that AT-I receptor blockade with valsartan significantly inhibits the renal expression of (P)RR mRNA and protein in diabetic rats. The AT-I receptor regulates renin production through a short-loop negative feedback mechanism that results in decreased renin production during the stimulation of this receptor [22]. One possibility may be related to the increased AT-II production and expression of AT-I receptors in diabetes [23, 24], leading to enhanced oxidative stress through an increase in NADPH oxidase activity [25]. Blockade of AT-I receptors reduces oxidative stress and superoxidase production in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats [26]. Direct renin inhibition using aliskiren may also exert a similar effect by reducing

the levels of AT-II. Ferri et al. [27] demonstrated that aliskiren reduces (P)RR expression and activity in cultured human aortic smooth muscle cells. An indirect mechanism by which aliskiren reduces (P)RR expression was postulated by Feldman et al. [28] after the administration of aliskiren in diabetic TG(mRen-2)27 rats. By blocking the catalytic activity of renin, aliskiren markedly reduced not only AT-II levels and signaling through AT-I and AT-II receptors but also the negative feedback by which AT-II inhibits prorenin transcription [28] and renin release [29, 30]. In our study, the decreased serum (P)RR levels in CKD patients treated with ARBs suggest that ARBs may slow the progression of CKD. On the other hand, in the present study, there were no significant differences in soluble (P)RR levels between patients with ($n = 19$) or without ACEIs ($n = 351$) ($p = 0.37$). However, we might not be able to meaningfully evaluate the relationship between soluble (P)RR and CKD patients treated with ACEIs because only a limited number of patients were treated with ACEIs.

One might ask whether the effect of ARBs on soluble (P)RR levels in patients with diabetes or hypertension was excluded in this analysis. We could not completely exclude the effect of ARBs on soluble (P)RR levels in patients with diabetes or hypertension, because the majority of these patients had been treated with ARBs. In the future, we need to prospectively study the effect of ARBs on soluble (P)RR levels in healthy subjects and patients with diabetes or hypertension before treatment.

Several limitations to the present study warrant mention. First, we did not include healthy volunteers and were therefore unable to examine soluble (P)RR levels in healthy individuals for comparison. Age may also be associated with changes in soluble (P)RR levels, and we hope to investigate this possibility in future studies. Second, our study is retrospective cross-sectional in nature, and we did not examine possible changes in soluble (P)RR levels over time. Monitoring the levels of soluble (P)RR over time in CKD would be useful in assessing its potential role as a biomarker of renal disease progression. Additionally, our present study is a retrospective cross-sectional study, and monocytes or lymphocytes from the patients at different stages of CKD were not preserved; therefore, we could not measure monocyte or lymphocyte (P)RR levels from these patients at the time of inclusion into our study. Based on the results of the present study, we would like to determine the relationship between soluble (P)RR and the (P)RR levels in monocytes or lymphocytes and kidney tissue in a future prospective study. Third, we were unable to examine renin activation levels because the samples had been preserved before testing; this information would have given further insight into the role of soluble (P)RR in the RAS.

In summary, our findings indicate that serum levels of soluble (P)RR are correlated with renal function in CKD. We speculate that serum soluble (P)RR might influence the progression of renal injury in patients with CKD. Previous studies with animal disease models that block the function of (P)RR have suggested that (P)RR is involved in the pathogenesis of diabetes mellitus and hypertension, and that prorenin/(P)RR is involved in the onset and progression of organ damage. Therefore, further investigation of prorenin/(P)RR in CKD may clarify the progression of disease and the potential role of soluble (P)RR as a marker of CKD progression. Further studies are necessary to gain a clearer understanding of the function of soluble (P)RR in CKD and its role in the pathogenesis of renal injury.

Acknowledgments This work was supported by the Japan Osteoporosis Foundation, Japanese Kidney Foundation, Kochi Organization for Medical Reformation and Renewal (to YT), and a grant from the Ministry of Education, Science, Culture and Sports of the Japan government (to YS, KI, KO, SF, and YT). We thank Ms. Reiko Matsumoto, Ms. Akiko Takano, and Ms. Sekie Saito for their technical assistance.

Conflict of interest All the authors have declared no competing interest.

References

1. Weir MR, Dzau VJ. The renin–angiotensin–aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens*. 1999;12:205S–13S.
2. Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases. *Pharmacol Rev*. 2000;52:11–34.
3. Dzau VJ, Bernstein K, Celermajer D, Cohen J, Dahlöf B, Deanfield J, Diez J, Drexler H, Ferrari R, van Gilst W, Hansson L, Hornig B, Husain A, Johnston C, Lazar H, Lonn E, Lüscher T, Mancini J, Mimran A, Pepine C, Rabelink T, Remme W, Ruilope L, Ruzicka M, Schunkert H, Swedberg K, Unger T, Vaughan D, Weber M. The relevance of tissue angiotensin-converting enzyme: manifestations in mechanistic and endpoint data. *Am J Cardiol*. 2001;88:1L–20L.
4. Derx FH, Schalekamp MA. Human prorenin: pathophysiology and clinical implications. *Clin Exp Hypertens A*. 1988;10:1213–25.
5. Luetscher JA, Kraemer FB, Wilson DM, Schwartz HC, Bryer-Ash M. Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications. *N Engl J Med*. 1985;312:1412–7.
6. Wilson DM, Luetscher JA. Plasma prorenin activity and complications in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1990;323:1101–6.
7. Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD. Specific receptor binding of renin in human mesangial cells in culture: increases plasminogen activator-1 antigen. *Kidney Int*. 1996;50:1897–903.
8. Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II

- production and cellular responses to renin. *J Clin Invest*. 2002; 109:1417–27.
9. Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, McQuillan D, Owens RT, Yu L, Noble NA, Border W. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms. *Kidney Int*. 2006;69:105–13.
 10. Matsuo S, Imai E, Horio M, Yasuda Y, Tomita K, Nitta K, Yamagata K, Tomino Y, Yokoyama H, Hishida A. Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. *Am J Kidney Dis*. 2009;53:982–92.
 11. Schalekamp MADH, Derkx FH, Deinum J, Danser AJ. Newly developed rennin and prorenin assays and the clinical evaluation of rennin inhibitors. *J Hypertens*. 2008;26:928–37.
 12. Watanabe N, Bokuda K, Fujiwara T, Suzuki T, Mito A, Morimoto S, Jwa SC, Egawa M, Arai Y, Suzuki F, Sago H, Ichihara A. Soluble (pro)renin receptor and blood pressure during pregnancy: a prospective cohort study. *Hypertension*. 2012;60:1250–6.
 13. Advani A, Kelly DJ, Cox AJ, White KE, Advani SL, Thai K, Connelly KA, Yuen D, Trogadis J, Herzenberg AM, Kuliszewski MA, Leong-Poi H, Gilbert RE. The (Pro)renin receptor: site-specific and functional linkage to the vacuolar H⁺-ATPase in the kidney. *Hypertension*. 2009;54:261–9.
 14. Hirose T, Mori N, Totsune K, Morimoto R, Maejima T, Kawamura T, Metoki H, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Kohzaki M, Takahashi K, Imai Y. Increased expression of (pro)renin receptor in the remnant kidneys of 5/6 nephrectomized rats. *Regul Pept*. 2010;159:93–9.
 15. Ichihara A, Itoh H, Inagami T. Critical roles of (pro)renin receptor-bound prorenin in diabetes and hypertension: a therapeutic approach. *J Am Soc Hypertens*. 2008;2:15–9.
 16. Cruciat CM, Ohkawara B, Acebron SP, Karaulanov E, Reinhard C, Ingelfinger D, Boutros M, Niehrs C. Requirement of prorenin receptor and vacuolar H⁺-ATPase-mediated acidification for Wnt signaling. *Science*. 2010;327:459–63.
 17. Gonzalez AA, Lara LS, Luffman C, Seth DM, Prieto MC. Soluble form of the (pro)renin receptor is augmented in the collecting duct and urine of chronic angiotensin II-dependent hypertensive rats. *Hypertension*. 2011;57:859–64.
 18. Ichihara A. (Pro)renin receptor and autophagy in podocytes. *Autophagy*. 2012;8:271–2.
 19. Scheffe JH, Menk M, Reinemund J, Effertz K, Hobbs RM, Pandolfi PP, Ruiz P, Unger T, Funke-Kaiser H. A novel signal transduction cascade involving direct physical interaction of the renin/prorenin receptor with the transcription factor promyelocytic zinc finger protein. *Circ Res*. 2006;99:1355–66.
 20. Nguyen G, Contrepas A. Physiology and pharmacology of the (pro)renin receptor. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8:127–32.
 21. Siragy HM, Huang J. Renal (pro)renin receptor regulation in diabetic rat through enhanced angiotensin AT1 receptor and NADPH oxidase activity. *Exp Physiol*. 2008;93:709–14.
 22. Kurtz A, Wagner C. Regulation of renin secretion by angiotensin II-AT1 receptor. *J Am Soc Nephrol*. 1999;19:162–8.
 23. Siragy HM, Awad A, Abadir P, Webb R. The angiotensin II type 1 receptor mediates renal interstitial content of tumor necrosis factor- α in diabetic rats. *Endocrinology*. 2003;144:2229–33.
 24. Sodhi CP, Kanwar YS, Sahai A. Hypoxia and high glucose upregulate AT1 receptor expression and potentiate ANG II-induced proliferation in VSM cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:846–52.
 25. Privratsky JR, Wold LE, Sowers JR, Quinn MT, Ren J. AT1 blockade prevents glucose-induced cardiac dysfunction in ventricular myocytes: role of the AT1 receptor and NADPH oxidase. *Hypertension*. 2003;42:206–12.
 26. Onozato ML, Toji A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int*. 2002;61:186–94.
 27. Ferri N, Greco CM, Corsini GMA. Aliskiren reduces prorenin receptor expression and activity in cultured human aortic smooth muscle cells. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2011;12:469–74.
 28. Feldman DL, Jin L, Xuan H, Contrepas A, Zhou Y, Webb RL, Mueller DN, Feldt S, Cumin F, Maniara W, Persohn E, Schuetz H, Jan Danser AH, Nguyen G. Effects of aliskiren on blood pressure, albuminuria, and (pro)renin receptor expression in diabetic TG(mRen-2)27 rats. *Hypertension*. 2008;52:130–6.
 29. Lu H, Rateri DL, Feldman DL, Jr RJ, Fukamizu A, Ishida J, Oesterling EG, Cassis LA, Daugherty A. Renin inhibition reduces hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*. 2008;118:984–93.
 30. Brown MJ. Aliskiren. *Circulation*. 2008;118:773–84.

7

メガリンとCKD

桑原 頌治* 細島 康宏**
齋藤 亮彦*

要旨 腎臓は生体恒常性維持においてさまざまな役割を果たしている臓器である。なかでも近位尿細管は重要な役割をもつと考えられており、その上皮細胞にエンドサイトーシス受容体、メガリンが発現している。メガリンはさまざまなトランスポーターや受容体の機能調節にかかわるとともに、アルブミンを含む多くのタンパク質の代謝あるいは分解に関与する。近年の研究から細胞内シグナルに関与することや、さらにはメガリンを介する病的リガンドのエンドサイトーシスが近位尿細管障害発症のメカニズムに関与することなどが示唆されている。このように多岐にわたる役割をもつメガリンをCKDの診断や治療に応用することを目指した研究も行われている。

〈Key point〉

はじめに

腎臓は肝臓と並ぶ「代謝臓器」である。腎臓におけるタンパク質（および薬物）代謝の中心的な機能分子であるエンドサイトーシス受容体メガリンについて、とくに慢性腎臓病（CKD）との関連性から概説する。

I. エンドサイトーシス受容体メガリン

1. メガリンの構造と機能

メガリンの構造

メガリン (low density lipoprotein-related protein 2; LRP2) は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、1994年にcDNAクローニングから全構造が決定された¹⁾。メガリンは、ヒトではアミノ酸4,655個、ラットでは4,660アミノ酸から構成される巨大なタンパク質であり、分子量は糖鎖修飾を加味すると約600 kDaに及ぶ。LDL受容体ファミリーに属し、短い細胞内領域をもつ1回膜貫通型の膜タンパク質であり、細胞外

Key words: メガリン, エンドサイトーシス, CKD, 糖尿病性腎症

*新潟大学大学院医歯学総合研究科機能分子医学講座 (〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757)

**新潟大学医歯学総合病院腎・膠原病内科

領域には特徴的なリピート配列をもち、リガンド結合領域が存在している (図)。メガリンの機能

ラット以外の種では、メガリンは腎臓において、近位尿細管の管腔側膜のみに局在し、糸球体から濾過されたさまざまなリガンド (おもにタンパク質) 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、さまざまな機能に関与している。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²⁾。

2. メガリンのリガンド

メガリンの特徴

メガリンの特徴として数多くのリガンドをもつことがあげられる³⁾。アルブミンのほか、 α_1 -ミクログロブリン、 β_2 -ミクログロブリン、liver-type fatty acid binding protein (LFABP)、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) などのさまざまな低分子量タンパク質、あるいは、メタボリックシンドロームとの関連が報告されているレプチンなどもメガリンのリガンドである。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。さらにアミノ配糖体などの腎毒性薬物などもリガンドとして知られている。

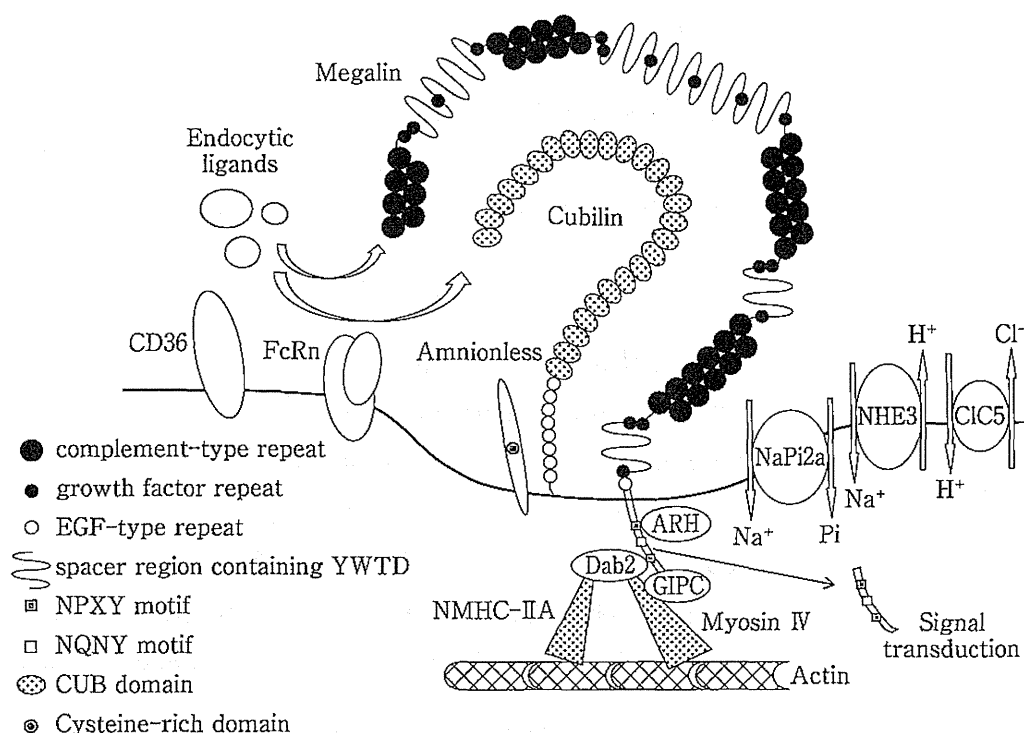


図 近位尿細管上皮細胞の管腔側におけるメガリンとそれに関連する分子群

II. メガリン関連分子

1. キュビリン, アムニオンレス

キュビリン

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 (膜貫通領域をもたない). キュビリンはビタミン B₁₂ 代謝に必要な内因子の受容体として同定された. アルブミンをはじめさまざま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メガリンと共役する. また, キュビリンは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⁴⁾.

アムニオンレス

2. 近位尿細管の輸送体とメガリンの関係

NHE3

Na⁺/H⁺exchanger isoform 3 (NHE3) は近位尿細管の Na⁺の再吸収に主要な役割を果たす輸送体である. Na⁺の再吸収増加は高血圧の発症などに関与することから, その重要性がうかがえる. メガリンが NHE3 と共役することが報告されており, NHE3 による Na⁺輸送機能の調節に関与している可能性がある⁵⁾.

Na⁺輸送機能の調節

ClC5

chloride channel 5 (ClC5) はクロライドチャネルファミリーに属する輸送体で, 近位尿細管においてエンドソームの pH 調節に寄与している. 遺伝性疾患である Dent 病は ClC5 をコードしている *CLCN5* 遺伝子の異常により引き起こされる. Dent 病は, 低分子量タンパク尿, 高カルシウム血症, 腎臓における異所性石灰化, 腎結石, 腎性糖尿, 尿中リン排泄増加などを呈する⁶⁾. メガリン, キュビリン発現の低下が認められており, これが臨床症状の一端を担うと推察される.

Dent 病

NaPi2a

近位尿細管に発現するリン酸輸送体 NaPi2a (*SLC34A1*) はリン再吸収に重要な役割を果たしているが, NaPi2a のエンドサイトーシス (不活化) にメガリンが関係することが報告されている⁷⁾.

3. 細胞内結合タンパク質

メガリンは種々の細胞内アダプタータンパク質と結合し, その機能を発揮している. JIP (c-Jun-N-terminal kinase interacting protein) 1/2, GIPC (RGS-GAIP-interacting protein C terminus), ANKRA (ankyrin-repeat family A protein), Dab2 (disabled homolog 2), ARH (autosomal recessive hypercholesterolemia) などとの結合が報告されており, 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 並びに GIPC との結合が関与することが明らかにされている. 筆者らも Dab2 に結合する他のモータ

ータンパク質として、nonmuscle heavy chain II A (NMHCIIA) を同定した⁸⁾。

Ⅲ. 近位尿細管障害とアルブミン尿・蛋白尿の関係

正常ラットにおけるアルブミンの glomerular sieving coefficient (糸球体ふるい係数; GSC) はマイクロパンクチャー法や二光子顕微鏡を用いてほぼ 0.001 前後と推定されるが、この値から、ヒトでは 1 日に約 6 g のアルブミンが糸球体で濾過されると計算される。しかし、おもに近位尿細管におけるメガリンと cubam によるエンドサイトーシスにより、糸球体で濾過されたアルブミンは近位尿細管に再吸収され代謝されるため、健常人の尿中にアルブミンはほとんど検出されない (ちなみに近位尿細管におけるアルブミンの処理には、そのほかに FcRn⁹⁾ や CD36¹⁰⁾ なども関与すると考えられる)。

アルブミン尿の機序

したがって、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 (α_1 -ミクログロブリン, β_2 -ミクログロブリン, LFABP, NGAL などの、いわゆる「近位尿細管障害マーカー」の尿中排泄機序と同様に)。このことに関連して、筆者らは、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ている¹¹⁾。

「心腎連関」の機序

糖尿病性腎症ではとくに、比較的初期から近位尿細管障害が起こることが知られており、それが微量アルブミン尿の一因になっていると考えられる。ちなみに筆者らは、尿中メガリン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一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¹²⁾。

尿中メガリン排泄量

濾過タンパク質の量的な負荷

大量の蛋白尿を伴うネフローゼ症候群のような病態においては、糸球体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¹³⁾。しかし糖尿病においては、正常糸球体濾過タンパク質量のレベルにおいても、終末糖化産物 (advanced glycation endproducts) などの修飾を受けた質的異常を伴うタンパク質の負荷により近位尿細管障害が惹起されるのではないかと推察される。

Ⅳ. メガリンをめぐるその他の話題

1. 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*) 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

メガリン遺伝子と eGFR

キュベリン遺伝子
とアルブミン尿

た¹⁴⁾。同様にキュベリンの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¹⁵⁾、メガリンやキュベ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。

2. レニン・アンジオテンシン系 (RAS) とのかかわり

アンジオテンシノ
ゲン

CKD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。筆者らの研究グループは、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活性化にかかわっていることを明らかにした¹⁶⁾。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。

3. Bardoxolone methyl

細胞保護作用

GFRの改善効果

経口抗酸化性炎症調節薬である bardoxolone methyl は Nrf2 の活性化を介して細胞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¹⁷⁾。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¹⁸⁾。これは臨床試験で bardoxolone methyl を使用した際、尿中アルブミン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、蛋白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。

残念ながら本薬剤は副作用のために第3相試験が中止されたが、今後、類似薬などで同様の機序による腎保護作用が期待される。

おわりに

エンドサイトーシス受容体メガリンについて、とくにCKDとのかかわりという観点から概説した。今後、メガリン関連の研究から新しいCKDの診断・治療法の開発が進むことを期待したい。

文 献

- 1) Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, et al : 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
- 2) Saito A, Sato H, Iino N, et al : Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium. J Biomed Biotechnol 2010 :

- 403272
- 3) Christensen EI, Verroust PJ, Nielsen R : Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflugers Arch* 458 : 1039-1048, 2009
 - 4) 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* 2911 : F22-F36, 2006
 - 5) Biemesderfer D, Nagy T, DeGray B, et al : Specific association of megalin and the Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 in the proximal tubule. *J Biol Chem* 274 : 17518-17524, 1999
 - 6) Wrong OM, Norden AG, Feest TG : Dent's disease ; a familial proximal renal tubular syndrome with low-molecular-weight proteinuria, hypercalciuria, nephrocalcinosis, metabolic bone disease, progressive renal failure and a marked male predominance. *QJM* 87 : 473-493, 1994
 - 7) Bachmann S, Schlichting U, Geist B, et al : Kidney-specific inactivation of the megalin gene impairs trafficking of renal inorganic sodium phosphate cotransporter (NaPi-II a). *J Am Soc Nephrol* 15 : 892-900, 2004
 - 8) Hosaka K, Takeda T, Iino N, et al : Megalin and non-muscle myosin heavy chain IIA interact with the adaptor protein Disabled-2 in proximal tubule cells. *Kidney Int* 75 : 1308-1315, 2009
 - 9) Sarav M, Wang Y, Hack BK, et al : Renal FcRn reclaims albumin but facilitates elimination of IgG. *J Am Soc Nephrol* 20 : 1941-1952, 2009
 - 10) Baines RJ, Chana RS, Hall M, et al : CD36 mediates proximal tubular binding and uptake of albumin and is upregulated in proteinuric nephropathies. *Am J Physiol Renal Physiol* 303 : F1006-F1014, 2012
 - 11) Saito A, Kaseda R, Hosojima M, et al : Proximal tubule cell hypothesis for cardiorenal syndrome in diabetes. *Int J Nephrol* 2011 : 957164, 2010
 - 12) Ogasawara S, Hosojima M, Kaseda R, et al : Significance of urinary full-length and ectodomain forms of megalin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 35 : 1112-1118, 2012
 - 13) Motoyoshi Y, Matsusaka T, Saito A, et al : Megalin contributes to the early injury of proximal tubule cells during nonselective proteinuria. *Kidney Int* 74 : 1262-1269, 2008
 - 14) Chasman DI, Fuchsberger C, Pattaro C, 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
 - 15) Boger CA, Chen MH, Tin A, et al : CUBN is a gene locus for albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 22 : 555-570, 2011
 - 16) Matsusaka T, Niimura F, Shimizu A, et al : Liver angiotensinogen is the primary source of renal angiotensin II. *J Am Soc Nephrol* 23 : 1181-1189, 2012
 - 17) Pergola PE, Raskin P, Toto RD, et al : Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 365 : 327-336, 2011
 - 18) Reisman SA, Chertow GM, Hebbbar S, et al : Bardoxolone methyl decreases megalin and activates nrf2 in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 23 : 1663-1673, 2012

Summary

Megalin and CKD

Shoji Kuwahara*, Michihiro Hosojima**, Akihiko Saito*

The kidneys are one of the most important organs in regulation of homeostasis. Proximal tubules play a central role for this function. Megalin, a giant protein belonging to the low density lipoprotein receptor family, is expressed in proximal tubule cells and is involved in receptor-mediated endocytosis. Megalin not only acts to reabsorb many ligands, including albumin, but also acts to regulate functions of various receptors and transporters. It is also likely to be involved in intracellular signal transduction. Recently, it has been revealed that excessive megalin-mediated endocytosis results in damage to the proximal tubule cells. Therefore, megalin is postulated to be a unique target for diagnosis and treatment of CKD.

Key words : Megalin, Endocytosis, CKD, diabetic nephropathy

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

** Division of Clinical Nephrology and Rheumatology, Niigata University Medical and Dental Hospital

3. メガリンとその関連分子をめぐる最近の話題

新潟大学医歯学総合病院腎・膠原病内科 細島康宏

新潟大学大学院医歯学総合研究科機能分子医学講座 桑原頌治

同 特任教授 斎藤亮彦

key words albuminuria, diabetic nephropathy, endocytosis, genome-wide association study, megalin

動 向

近位尿細管エンドサイトーシス受容体メガリンとその関連分子をめぐり、基礎的・臨床的に重要な知見が得られており、それらに基づいて腎臓病の新しい診断・治療法の開発に向けた研究が進んでいる。

A. メガリンの構造、機能、発現調節

メガリン (LRP2) は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、1994年にcDNAクローニングから全構造が決定された¹⁾。メガリンは、糖鎖修飾を加味すると分子量が約600kDaに及ぶ巨大タンパク質である。LDL受容体ファミリーに属し、短い細胞内領域をもつ1回膜貫通型の膜タンパク質であり、細胞外領域には特徴的なリピート配列をもち、リガンド結合領域が存在している。メガリンは腎臓において、ラット以外の種では、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²⁾。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³⁾。最近、ヒトではポドサイトにもその発現を示唆する報告もあるが⁴⁾、既報とは異なるため今後検討が必要である。

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⁵⁾。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⁶⁾。また、私たちは*in vitro*の系で、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⁷⁾。これは*in vivo*においても同様の報告があり、急性腎障害におけるアルブミン尿の増加に寄与していると考えられている⁸⁾。さらに、経口抗酸化薬であるbardoxolone methylによりメガリン発現が抑制されることを示す報告もあるが⁹⁾、詳細は後述する。

B. 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、 α_1 -ミクログロブリン、 β_2 -ミクログロブリン、liver-type fatty acid binding protein (LFABP)、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) 等に加え、低分子量タンパク質、メタボリックシンドロームとの関連が報告されているレプチンなどが含まれる。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 (Sepp1)¹⁰⁾、ジメルカプトコハク酸テクネチウム (^{99m}Tc-DMSA)¹¹⁾、フェチュインA¹²⁾ などがある。

Sepp1はセレノシステインを含むタンパク質であり、肝臓で合成され、生体必須微量元素であるセレンを標的臓器に運ぶ役割を持つ。Sepp1の受容体として、アポリポプロテインE受容体2 (ApoER2) が報告されていたが、ApoER2遺伝子欠損マウス腎臓にSepp1が集積することから異なる経路が推察され、近位尿細管にメガリンを介して取り込まれることが明らかになった¹⁰⁾。

^{99m}Tc-DMSAは腎シンチグラムに利用される診断マーカーで、腎臓に集積する機序が不明であったが、Dent病やFanconi症候群など、近位尿細管のエンドサイトーシス障害があると腎臓の取り込みが減少することが知られていた。メガリン欠損マウスを用いた研究で、^{99m}Tc-DMSAは α_1 -ミクログロブリンと結合し糸球体で濾過され、メガリンによるエンドサイトーシスを受けることが示された¹¹⁾。

さらに、フェチュインAは異所性石灰化抑制因子であるが、メガリンを介した近位尿細管への取り込みが尿細管の石灰化に関わる可能性が示された¹²⁾。

またアミノ配糖体抗菌薬はメガリンを介して腎

毒性を惹起することが知られていたが、ゲンタマイシンがメガリンと結合する分子機序の一端が報告された¹³⁾。

C. メガリン関連分子

1. キュビリン、アムニオンレス

キュビリンはアミノ酸3597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¹⁴⁾。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。キュビリンおよびアムニオンレスの遺伝子異常はImerslund-Gräsbeck症候群を呈する。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。しかしメガリンも小腸で発現するにも関わらず、キュビリンによるビタミンB₁₂-内因子複合体の取り込みには共役しないようである¹⁵⁾。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¹⁶⁾。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。一方キュビリンは最近、メガリンと同様にヒトおよびラットのポドサイトにも発現すると、同じ研究者により報告された¹⁷⁾。しかしこれまで多くの研究者はポドサイトにおける発現を認めておらず、確認が必要と考えられる。

2. 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sodium-phosphate cotransporter type 2a (NaPi2a) などのトランスポーターの機能に影響を与える²⁾ (図1)。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²⁾。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¹⁸⁾。Dab2の機能にはprotein kinase B (PKB/Akt) が関係する¹⁹⁾。

D. 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・タンパク尿の関係

かつて藤乗と遠藤がマイクロパンクチャー法を用いて測定したラット糸球体のglomerular

sieving coefficient (GSC, 糸球体ふるい係数) は0.00062であった²⁰⁾。近年二光子顕微鏡を用いて、蛍光標識アルブミンがラット糸球体を濾過する動態を直接可視化して計測されたGSCは0.001～0.003と報告されている²¹⁾。ヒトの正常GFRは～100mL/min, アルブミンの血漿濃度は～4g/dLであるので、ヒトのGSCをおよそ0.001としても、1日に糸球体を濾過するアルブミン量は100mL/min×60min×24hr×4g/100mL×0.001=～6gと計算される(すなわちネフローゼレベルのアルブミンが正常でも糸球体から濾過されていることになる)。しかし、主に近位尿細管におけるメガリンとキュビリンによるエンドサイトーシスにより、糸球体を濾過されたアルブミンは近位尿細管に再吸収されるため、健康人の尿中にアルブミンはほとんど検出されない。

近位尿細管におけるアルブミンの処理には、メガリン・キュビリンの他にneonatal Fc receptor (FcRn)やCD36なども関与すると考えられる(図

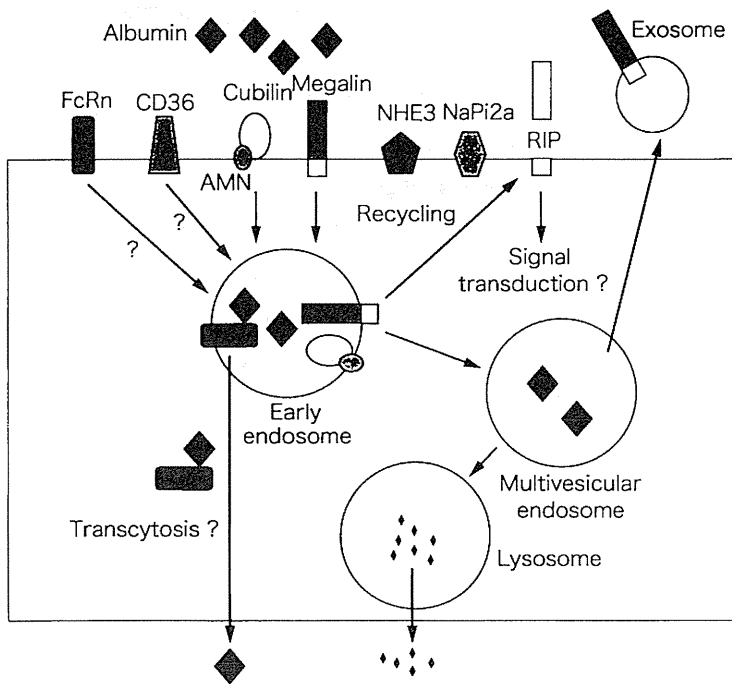


図1 近位尿細管上皮細胞の管腔側に発現するメガリンとそれに関連する分子群およびアルブミンの処理機構
本文参照. amnionless (AMN), Neonatal Fc receptor (FcRn), Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 (NHE3), sodium-phosphate cotransporter type 2a (NaPi2a), regulated intra-membrane proteolysis (RIP)

1). 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²²⁾。FcRnはアルブミンと酸性域(pH<6.5)で結合する。したがってメガリン・キュビリンがアルブミンをエンドソームまで取り込んだ後、FcRnがそこでアルブミンと結合し、リソソームではなく、トランスサイトーシスに導く経路が存在する可能性がある。その意味ではComperらの唱えたアルブミンの“retrieval pathway”が存在するといえる。しかし一方彼らは近位尿細管に取り込まれたアルブミンはリソソームで代謝された後、管腔側に放出されると考えた²³⁾。しかしこの経路の存在は、メガリン・キュビリンダブルKOマウスを用いた実験からは否定的と考えられる²⁴⁾。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²⁵⁾。今後、これらの分子とメガリン・キュビ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²⁶⁾。

E. 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²⁷⁾。一方で、抗基底膜抗体を用いたマウスでの検討から、アルブミン主体の選択的な濾過タンパク質の負荷では、逆にメガリンが細胞保護的に働く可能性を示唆するとし

た報告もある²⁸⁾。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 endproducts)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²⁹⁾。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、今後のさらなる検討が期待される。

F. 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、糸球体で濾過され、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タンパク質である—たとえば α_1 -ミクログロブリン³⁰⁾、 β_2 -ミクログロブリン²⁶⁾、liver-type fatty acid-binding protein (LFABP)³¹⁾、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)³²⁾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(図2)。

また、N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG)は近位尿細管細胞内に存在するリソソーム酵素であるが、どれだけ感度よく障害に応じて細胞から逸脱するか検討が必要である(NAGは血液にも存在するため、血中濃度や糸球体透過性が亢進すれば尿中にも増加する)。kidney injury molecule (KIM)-1については障害される近位尿細管細胞で産生が亢進するといわれているが、鋭敏性については今後検討される必要がある³³⁾。

糖尿病性腎症では特に、比較的初期から近位尿細管障害が起こることが知られており、それが微量アルブミン尿の一因になっていると考えられる。

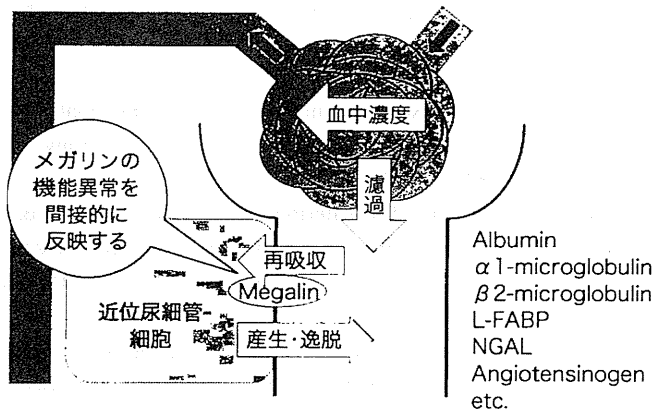


図2 近位尿細管障害マーカーの尿中排泄機序
本文参照.

ちなみに私たちは、メガリンの尿中排泄様式は regulated intramembrane proteolysis (RIP) 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³⁴⁾ (図1)。

G. メガリンをめぐるその他の話題

1. 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*)³⁵⁾ 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³⁶⁾。 *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³⁷⁾。また前述のように、キュビ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¹⁶⁾、メガリンやキュビ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。

2. レニン・アンジオテンシン系(RAS)との関わり

CKD 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³⁸⁾。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。

3. Bardoxolone methyl

経口抗酸化薬である bardoxolone methyl は Nrf2 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³⁹⁾。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⁹⁾。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。本薬剤は副作用のために第3相試験が中断されたが、今後、類似薬などでの腎保護作用が期待される。

むすび

エンドサイトーシス受容体メガリンについて、特にCKDとの関わりという観点から概説した。今後メガリン関連の研究から新しいCKDの診断・治療法の開発が進むことを期待したい。

文献

- 1) Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, et al. 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*. 1994; 91: 9725-9.
- 2) Saito A, Sato H, Iino N, et al. Molecular mechanisms of receptor-mediated endocytosis in the renal proximal tubular epithelium. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010: 403272.
- 3) Shah M, Baterina OY, Jr., Taupin V, et al. ARH directs megalin to the endocytic recycling compartment to regulate its proteolysis and gene expression. *J Cell Biol*. 2013; 202: 113-27.
- 4) Prabakaran T, Nielsen R, Larsen JV, et al. Receptor-mediated endocytosis of alpha-galactosidase A in human podocytes in Fabry disease. *PLoS One*. 2011; 6: e25065.
- 5) Tojo A, Onozato ML, Kurihara H, et al. Angiotensin II blockade restores albumin reabsorption in the proximal tubules of diabetic rats. *Hypertens Res*. 2003; 26: 413-9.
- 6) Hosojima M, Sato H, Yamamoto K, et al. Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor- and insulin-mediated signaling cross talk. *Endocrinology*. 2009; 150: 871-8.
- 7) Takeyama A, Sato H, Soma-Nagae T, et al. Megalin is downregulated via LPS-TNF-alpha-ERK1/2 signaling pathway in proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 407: 108-12.
- 8) Schreiber A, Theilig F, Schweda F, et al. Acute endotoxemia in mice induces downregulation of megalin and cubilin in the kidney. *Kidney Int*. 2012; 82: 53-9.
- 9) Reisman SA, Chertow GM, Hebbbar S, et al. Bardoxolone methyl decreases megalin and activates nrf2 in the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23: 1663-73.
- 10) Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, et al. Megalin mediates selenoprotein P uptake by kidney proximal tubule epithelial cells. *J Biol Chem*. 2008; 283: 6854-60.
- 11) Weyer K, Nielsen R, Petersen SV, et al. Renal uptake of 99mTc-dimercaptosuccinic acid is dependent on normal proximal tubule receptor-mediated endocytosis. *J Nucl Med*. 2013; 54: 159-65.
- 12) Matsui I, Hamano T, Mikami S, et al. Retention of fetuin-A in renal tubular lumen protects the kidney from nephrocalcinosis in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013; 304: F751-60.
- 13) Dagil R, O'Shea C, Nykjaer A, et al. Gentamicin binds to the megalin receptor as a competitive inhibitor using the common ligand binding motif of complement type repeats: insight from the nmr structure of the 10th complement type repeat domain alone and in complex with gentamicin. *J Biol Chem*. 2013; 288: 4424-35.
- 14) 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*. 2006; 291: F22-36.
- 15) Christensen EI, Nielsen R, Birn H. From bowel to kidneys: the role of cubilin in physiology and disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2013; 28: 274-81.
- 16) Boger CA, Chen MH, Tin A, et al. CUBN is a gene locus for albuminuria. *J Am Soc Nephrol*. 2011; 22: 555-70.
- 17) Prabakaran T, Christensen EI, Nielsen R, et al. Cubilin is expressed in rat and human glomerular podocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27: 3156-9.
- 18) Hosaka K, Takeda T, Iino N, et al. Megalin and nonmuscle myosin heavy chain IIA interact with the adaptor protein Disabled-2 in proximal tu-