

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 腎疾患実用化研究事業
(英語) Practical Research Project for Renal Diseases

研究開発課題名：

(日本語) メガリンを標的とした腎機能温存・再生療法の開発

(英語) Development of megalin-targeted therapeutic strategies to conserve or regenerate renal functions

研究開発担当者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学新潟大学大学院医歯学総合研究科機能分子医学講座 特任教授 斎藤 亮彦

(英語) Department of Applied Molecular Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences; Professor; Akihiko Saito

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究

開発課題名：

(日本語) 尿中メガリンの排泄機序の解明

(英語) Elucidation of the mechanisms underlying the urinary megalin excretion

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人新潟大学大学院医歯学総合研究科機能分子医学講座 特任教授 斎藤 亮彦

(英語) Department of Applied Molecular Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences; Professor; Akihiko Saito

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学新潟大学大学院医歯学総合研究科機能分子医学講座 特任助教 桑原 頌治

(英語) Department of Applied Molecular Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences; Assistant Professor; Shoji Kuwahara

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学新潟大学大学院医歯学総合研究科病態栄養学講座 特任准教授 細島 康宏

(英語) Department of Clinical Nutrition Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences; Associate Professor; Michihiro Hosojima

分担研究 (日本語) メガリン抑制薬の探索とCKD進展抑制効果の実験的検証

開発課題名： (英語) Investigation of megalin suppressors and their effects on delaying the progression of chronic kidney disease

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人新潟大学大学院医歯学総合研究科機能分子医学講座 特任教授 斎藤 亮彦

(英語) Department of Applied Molecular Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences; Professor; Akihiko Saito

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学新潟大学大学院医歯学総合研究科機能分子医学講座 特任助教 桑原 頌治

(英語) Department of Applied Molecular Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences; Assistant Professor; Shoji Kuwahara

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学新潟大学大学院医歯学総合研究科病態栄養学講座 特任准教授 細島 康宏

(英語) Department of Clinical Nutrition Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences; Associate Professor; Michihiro Hosojima

分担研究 (日本語) メガリン抑制薬による臨床研究及びコンパニオン診断薬の開発

開発課題名： (英語) Conducting a clinical study with an SGLT2 inhibitor and the development of companion diagnostics

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人新潟大学大学院医歯学総合研究科機能分子医学講座 特任教授 斎藤 亮彦

(英語) Department of Applied Molecular Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences; Professor; Akihiko Saito

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人新潟大学医歯学総合病院腎・膠原病内科 教授 成田 一衛

(英語) Division of Clinical Nephrology and Rheumatology, Niigata University Medical and Dental Hospital; Professor; Ichiei Narita

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人新潟大学医歯学総合病院ちけんセンター 准教授 上田 隆宏

(英 語) Clinical Research Center, Niigata University Medical and Dental Hospital; Associate Professor; Takahiro Ueda

研究開発分担者 所属 役職 氏名 :

(日本語) 国立大学法人新潟大学医歯学総合病院プロトコルデータセンター 特任助教 田中 崇裕

(英 語) Protocol Data Center, Niigata University Medical and Dental Hospital; Assistant Professor; Takahiro Tanaka

研究開発分担者 所属 役職 氏名 :

(日本語) デンカ株式会社 デンカイノベーションセンター ライフイノベーション研究所
ダイアグノスティック研究部 部長 平山 吉朗

(英 語) Diagnostics Research Department, Life Innovation Research Institute, Denka Innovation Center, Denka Co., Ltd. ; General Manager; Yoshiaki Hirayama

分担研究 (日本語) メガリン拮抗剤のAKI発症予防効果の実験的検証

開発課題名 : (英 語) Experimental evaluation of the megalin antagonist' s effect on suppressing the development of acute kidney injury

研究開発分担者 所属 役職 氏名 :

(日本語) 国立大学法人新潟大学大学院医歯学総合研究科機能分子医学講座 特任教授 斎藤 亮彦

(英 語) Department of Applied Molecular Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences; Professor; Akihiko Saito

研究開発分担者 所属 役職 氏名 :

(日本語) 国立大学法人新潟大学医歯学総合病院腎・膠原病内科 助教 俣田 亮平

(英 語) Division of Clinical Nephrology and Rheumatology, Niigata University Medical and Dental Hospital; Assistant Professor; Ryohei Kaseda

分担研究 (日本語) メガリン拮抗薬による医師主導治験の準備となる臨床研究

開発課題名 : (英 語) Clinical studies to prepare future clinical trials with megalin antagonists

研究開発分担者 所属 役職 氏名 :

(日本語) 国立大学法人新潟大学大学院医歯学総合研究科機能分子医学講座 特任教授 斎藤 亮彦

(英 語) Department of Applied Molecular Medicine, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences; Professor; Akihiko Saito

(日本語) 国立大学法人新潟大学医歯学総合病院ちけんセンター 准教授 上田 隆宏

(英 語) Clinical Research Center, Niigata University Medical and Dental Hospital; Associate Professor; Takahiro Ueda

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人新潟大学医歯学総合病院プロトコルデータセンター 特任助教 田中 崇裕
(英語) Protocol Data Center, Niigata University Medical and Dental Hospital; Assistant Professor; Takahiro Tanaka

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人新潟大学医歯学総合病院感染管理部 准教授 田邊 嘉也
(英語) Division of Infection Control and Prevention, Niigata University Medical and Dental Hospital; Associate Professor; Yoshinari Tanabe

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 埼玉医科大学国際医療センター呼吸器内科 教授 各務 博
(英語) Department of Respiratory Medicine, Saitama Medical University International Medical Center; Professor; Hiroshi Kagamu

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) デンカ株式会社 デンカイノベーションセンター ライフイノベーション研究所
ダイアグノスティック研究部 部長 平山 吉朗
(英語) Diagnostics Research Department, Life Innovation Research Institute, Denka Innovation Center, Denka Co., Ltd.; General Manager; Yoshiaki Hirayama

II. 成果の概要（総括研究報告）

メガリンは近位尿細管腔側膜に発現するエンドサイトーシス受容体であり、糸球体を濾過する多種類のタンパク質や薬物の再吸収・代謝及び細胞内シグナリングに関わっている。慢性腎臓病（糖尿病性腎症など）及び急性腎障害（薬剤性腎症など）において、尿中メガリン測定を診断や発症予測に用いたうえで、それぞれメガリン抑制薬及びメガリン拮抗薬による腎機能の温存及び再生を目指している。そのような目標に向かって、基礎・臨床研究を行い、将来の臨床試験の準備を行っている。以下の研究項目ごとに成果の概要を述べる。

(1) 尿中メガリンの排泄機序の解明

尿中メガリンの排泄機序の解明については、C-メガリン（全長型）の解析を終了させ、*Diabetes* 誌に論文が採択された。この解析により、尿中C-メガリンは、2型糖尿病患者においては、残存ネフロン近位尿細管細胞のメガリンを介する質的・量的タンパク質代謝負荷によるエンドソーム・リソソーム障害を反映して、エクソサイトーシスを介して増加することを突き止めた。

(2) メガリン抑制薬の探索と慢性腎臓病進展抑制効果の実験的検証

肥満を伴う2型糖尿病モデルである高脂肪食負荷マウスにおいて、近位尿細管細胞がメガリンを「入り口」として腎障害性物質を取り込み、(オート)リソソーム障害からオートファジー不全や種々の形質変化をきたすことが起点となって、尿細管-糸球体障害が起

この機序を突き止めた (*J Am Soc Nephrol* 2016)。

- (3) SGLT2 阻害薬による臨床研究及びコンパニオン診断薬の開発
新潟大学医学部倫理審査委員会の承認と UMIN への登録を経て、SGLT2 阻害薬エンパグリフロジンによる糖尿病性腎症患者対象の探索的臨床研究、RECOVERY 試験 (**Renoprotection and Companion Diagnostics Verification in Type 2 Diabetes Patients Treated with Empagliflozin**) を開始した。
- (4) メガリン拮抗薬の急性腎障害発症予防効果の実験的検証
ゲンタマイシン、コリスチン、バンコマイシン、シスプラチンによる急性腎障害はメガリンを介して起こること、その発症をシラスタチンが拮抗して抑制することを明らかにした (*J Am Soc Nephrol*, in press)。このたび新たにメガリン拮抗剤として同定されたシラスタチン (特許出願中) は、これまで腎デヒドロペプチダーゼ-I 阻害薬として臨床で安全に使用されており、今後メガリンを介する様々な薬剤性腎障害の予防における有効性が期待される。
- (5) メガリン拮抗薬による臨床研究あるいは医師主導治験の準備となる臨床研究
尿中メガリン測定の有用性を調べるため、バンコマイシン使用予定患者およびシスプラチン使用予定肺がん患者を対象とした臨床研究については、倫理委員会の承認 (修正) を得て、患者登録を進めている。

Megalin is an endocytic receptor expressed at the apical membrane of proximal tubule cells. Megalin mediates the uptake and metabolism of glomerular-filtered substances, such as proteins and drugs, and intracellular signaling. We have been establishing urinary megalin measurement systems to evaluate the severity of chronic kidney disease or to predict the risk of acute kidney injury. We have been also developing therapeutic strategies to preserve or regenerate renal functions in chronic kidney disease (CKD) (e.g., diabetic kidney disease) and acute kidney injury (AKI) (e.g., drug-induced kidney injury) using megalin suppressors and megalin antagonists, respectively. Towards the goal, we have been carrying out basic and clinical studies to prepare future clinical trials. The achievements of our projects in the past one year are described as follows:

(1) Elucidation of the mechanisms underlying the urinary megalin excretion

We have analyzed the mechanism underlying urinary full-length megalin (C-megalin) excretion in type 2 diabetes. By this analysis, we have elucidated that urinary C-megalin is increased *via* exocytosis of megalin-containing exosomes in association with megalin-mediated quantitative or qualitative protein metabolic load to the endo-lysosomal system in proximal tubule cells of residual functional nephrons. The paper has been accepted by *Diabetes*.

(2) Investigation of megalin suppressors and experimental evaluation of their effects on inhibiting the progression of chronic kidney disease

in a high-fat-diet-induced obesity-related type 2 diabetes mouse model, the megalin-mediated uptake of nephrotoxic substances was found lead to (auto)lysosomal dysfunction, autophagy impairment, and various phenotypic changes in proximal tubule cells, which is involved primarily in the development of tubuloglomerular alterations (*J Am Soc Nephrol* 2016).

(3) Conducting a clinical study with an SGLT2 inhibitor and the development of companion diagnostics

Approved by the institutional review boards of Niigata University and registered with the University Hospital Medical Information Network–Clinical Trials Registry, we have started a pilot study in patients with type 2 diabetes to evaluate the effect of empagliflozin on the suppression of diabetic kidney disease progression and investigate the companion diagnostics including urinary megalin measurements (Renoprotection and Companion Diagnostics Verification in Type 2 Diabetes Patients Treated with Empagliflozin, RECOVERY).

(4) Experimental evaluation of the megalin antagonist's effect on suppressing the development of acute kidney injury

Nephrotoxicity induced by anti-microorganism or anti-cancer drugs is a serious clinical problem. We found that megalin blockade with cilastatin suppresses efficiently the nephrotoxicity induced by gentamicin, colistin, vancomycin, and cisplatin. The paper has been accepted by *the Journal of the American Society of Nephrology*. Cilastatin, newly identified as a megalin antagonist (patent pending), has been used safely in the clinical setting as a renal dehydropeptidase-I inhibitor, so it would be a promising agent for inhibiting various forms of drug-induced nephrotoxicity mediated *via* megalin.

(5) Clinical studies to prepare future clinical trials with megalin antagonists

Based on the approval by the institutional review boards of Niigata University, we have been conducting clinical studies in patients, who undergo the treatment with vancomycin or cisplatin, to investigate the clinical relevance of urinary megalin measurements.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 2 件）

1. 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, Komatsu M, Nishiyama A, Saito A: Megalin-mediated tubuloglomerular alterations in high-fat diet-induced kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27, 1996-2008.
2. Suruda C, Tsuji S, Yamanouchi S, Kimata T, Nguyen HT, Kurosawa H, Hirayama Y, Tsukaguchi H, Saito A, Kaneko K: Decreased urinary excretion of the ectodomain form of megalin (A-megalin) in children with OCRL gene mutations. *Pediatr Nephrol*, 2017, 32:621-25
3. 桑原頌治, 細島康宏, 俣田亮平, 斎藤亮彦: 近位尿細管細胞と蛋白尿. *腎と透析* 2016, 81 : 54-8

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. シスプラチン腎症発症予測マーカーとしての尿中メガリン, 口頭, 近藤利恵, 各務博, 渡辺聡, 阿部徹哉, 細島康宏, 俣田亮平, 小屋俊之, 菊地利明, 成田一衛, 斎藤亮彦, 第 113 回日本内科

学会総会・講演会, 2016/4/15-2016/4/17, 国内.

2. 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, 口頭, 飯田倫理, 細島康宏, 蒲澤佳子, 桑原頌治, 石川友美, 忰田亮平, 中村和則, 鈴木芳樹, 成田一衛, 黒澤寛之, 平山吉朗, 斎藤亮彦, 第59回日本腎臓学会学術総会, 2016/6/17-2016/6/19, 国内.
3. 腎癆痕のバイオマーカーとしての尿中メガリンの有用性, 口頭, 山内壮作, 木全貴久, 辻章志, 斎藤亮彦, 金子一成, 第59回日本腎臓学会学術総会, 2016/6/17-2016/6/19, 国内.
4. Mechanisms underlying urinary excretion of full-length and extracellular domain forms of megalin, 口頭, De S, Kuwahara S, Hosojima M, Ishikawa T, Kaseda R, Yoshioka Y, Suzuki Y, Narita I, Ochiya T, Kurosawa H, Hirayama Y, Saito A, The 59th Annual Meeting of the Japanese Society of Nephrology, 2016/4/15-2016/4/17, 国内.
5. Two forms of urinary megalin excretion are novel predictors of the progression of early-stage diabetic nephropathy in type 2 diabetes mellitus, ポスター, Iida T, Hosojima M, Kabasawa K, Nakamura K, Kuwahara S, Ishikawa T, Kaseda R, Suzuki Y, Kurosawa H, Hirayama Y, Narita I, Saito A, 49th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2016/11/15-2016/11/20, 国外.
6. Megalin blockade with cilastatin suppresses drug-induced nephrotoxicity, ポスター, Kuwahara S, Hosojima M, Kaseda R, Goto S, Iida T, Saito A, 49th Annual Meeting of American Society of Nephrology, 2016/11/15-2016/11/20, 国外.
7. 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, 口頭, 飯田倫理, 細島康宏, 蒲澤佳子, 桑原頌治, 石川友美, 忰田亮平, 中村和利, 鈴木芳樹, 成田一衛, 平山吉朗, 斎藤亮彦, 第28回日本糖尿病性腎症研究会, 2016/12/3-2016/12/4, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

CKDの食事療法・生活指導, 斎藤亮彦, 市民公開メディカルセミナー in 新発田, 2016/11/10, 国内

(4) 特許出願

なし