

SGLT2 阻害は進行性糖尿病性腎症におけるメガリンの O-GlcNAc 修飾の抑制を介して近位尿細管での蛋白過剰負荷を軽減する

大友 瞳, 藤田 浩樹

秋田大学大学院医学系研究科 代謝・内分泌内科学講座

(accepted 26 April 2023)

Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition attenuates protein overload in renal proximal tubule via suppression of megalin O-GlcNAcylation in progressive diabetic nephropathy

Hitomi Otomo and Hiroki Fujita

Department of Metabolism and Endocrinology, Akita University Graduate School of Medicine

Key words : SGLT2 inhibition, Proximal tubule, Protein reabsorption, Megalin, O-GlcNAcylation

はじめに

糖尿病性腎症の病因における最近の研究にて、尿細管間質病変が腎機能低下と密接に関連していることが明らかになっている^{1,2)}。糖尿病の腎臓では、障害を受けた糸球体からアルブミンを含む過剰な血漿蛋白が濾過され、そのほとんどが近位尿細管上皮細胞刷子縁膜に豊富に局在するエンドサイトーシス受容体のメガリン、キュビリンから再吸収されるため³⁻⁵⁾、近位尿細管上皮細胞では蛋白の過剰負荷状態が発生する。メガリンとは、糸球体から濾過される様々な低分子量蛋白をエンドサイトーシスによって再吸収する受容体で、600 kDa の 1 回膜貫通型の膜蛋白である。細胞外領域にアルブミン、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL; lipocalin-2) 等の低分子量蛋白のリガンド結合領域が存在し、近位尿細管上皮細胞管腔側

の刷子縁膜に発現し、近位尿細管全体に広範囲 (S1~S3) に発現している。これまでの研究において、過剰な蛋白負荷が近位尿細管細胞のアポトーシス、酸化ストレス、炎症、尿細管間質の線維化を引き起こすことが明らかにされている⁶⁻¹⁰⁾。

sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) 阻害薬は、近位尿細管でのグルコース再吸収を阻害し、尿糖を増加させ、血糖値を低下させる新しい糖尿病薬であり、SGLT2 阻害薬の大規模臨床試験である EMPA-REG OUTCOME¹¹⁾、CANVAS Program¹²⁾、CREDESCENCE Trial¹³⁾、DECLARE-TIMI 58¹⁴⁾ において、心血管保護に加え、腎症の発症進展の抑制が報告されているが、その詳細な分子メカニズムは依然として十分に解明されていない。糖尿病状態下では SGLT2 を介した近位尿細管でのグルコース再吸収は増加しており¹⁵⁾、その細胞内へ流入したグルコースがヘキソサミン合成経路 (hexosamine biosynthetic pathway; HBP) を活性化し^{16,17)}、細胞内タンパク質の O 結合型 β-N-アセチルグルコサミン修飾 (O-GlcNAcylation; O-GlcNAc 修飾) が増加すること¹⁸⁻²⁰⁾、また、O-GlcNAc 修飾はタンパク質間の相互作用の調整や細胞内局在を調節することが報告されている^{19,21)}。

しかしながら、ともに近位尿細管の S1 および S2 セグメントに局在して発現している SGLT2 とメガリ

Corresponding Author : Hitomi Otomo

Department of Endocrinology, Diabetes and Geriatric Medicine, Akita University Graduate School of Medicine, 1-1-1 Hondo, Akita 010-8543, Japan

TEL : +81-18-884-6768

FAX : +81-18-884-6449

E-mail : hitto724@gipc.akita-u.ac.jp

*令和 5 年 2 月 14 日 秋田医学会学術奨励賞受賞記念講演

ンの糖尿病状態下での詳細なクロストークについては不明である。このような背景から、我々は、非肥満型インスリン欠乏型糖尿病マウスモデルであり進行性糖尿病性腎症を発症する KK/Ta-*Ins2*^{Akita} (KK/Ta-Akita) マウスとその野生型 KK/Ta-wild-type 非糖尿病マウスを用いて、SGLT2 阻害がメガリンの O-GlcNAc 修飾へ与える影響とそれによる進行性糖尿病性腎症での腎保護作用を解明することを目的に研究を遂行した。

1. 糖尿病性腎症における SGLT2 阻害による腎血行動態、アルブミン尿、腎組織病変への影響

KK/Ta-Akita マウスに 6 週間 SGLT2 阻害薬イプラグリフロジン投与を行った群 (イプラグリフロジン群) とインスリン投与を行った群 (インスリン群) において、同程度に空腹時血糖値と HbA1c を低下させるよう薬剤投与量を調整したが、イプラグリフロジン群でのみ、

糸球体高血圧の改善を反映する糸球体濾過量 (glomerular filtration rate; GFR) の低下が観察された。また体重は、コントロール群では高血糖により減少したが、イプラグリフロジン群では変化なく、インスリン群では体重増加がみられた。糖尿病性腎症の臨床マーカーであるアルブミン尿を治療前後で比較すると、コントロール群では週齢に伴う増加がみられたが、イプラグリフロジン群ではアルブミン尿の進行が抑制され、インスリン群では減少した (表 1, 2)。また、periodic acid-Schiff (PAS) 染色による腎組織病変の解析から、イプラグリフロジン群とインスリン群でメサンギウム基質増加や結節性病変などの糖尿病性糸球体硬化病変の進行抑制を認めた。フィブロネクチンは腎臓での糸球体硬化や間質線維化のマーカーであるが、イプラグリフロジン群とインスリン群の腎臓では糸球体と間質におけるフィブロネクチン沈着の抑制を認めた。ポドサイト (糸球体上皮細胞) のマーカーである Wilms' tumor 1 (WT1) 染色による評価では、インスリン群よ

表 1. KK/Ta-Akita マウスにイプラグリフロジンまたはインスリンを 6 週間投与後の各パラメータ (文献 22 より改変)

パラメータ	投与期間	KK/Ta-wild-type コントロール	KK/Ta-Akita		
			コントロール	イプラグリフロジン	インスリン
体重 (g)	Baseline	26.9±0.3	21.4±0.4 ^e	20.5±0.4 ^e	19.9±0.3 ^e
	6 weeks	29.6±0.6 ^b	20.0±0.4 ^b	20.4±0.4	24.8±0.5 ^c
収縮期血圧 (mmHg)	Baseline	104±3	126±6	135±3d	119±7
	6 weeks	106±2	124±4	101±4b	113±3
空腹時血糖 (mg/dl)	Baseline	180±24	521±51 ^e	578±18 ^e	559±12 ^e
	6 weeks	166±33	585±44 ^e	241±11c	166±40 ^c
HbA1c (%)	Baseline	4.8±0.1	10.7±0.5 ^e	11.8±0.7 ^e	11.9±0.5 ^e
	6 weeks	4.5±0.1	14.0±0.1 ^{b,e}	9.3±0.2 ^{a,e}	9.7±0.8 ^{a,e}
総コレステロール (mg/dl)	6 weeks	104±8	159±6 ^c	147±9	129±7
中性脂肪 (mg/dl)	6weeks	135±14	233±14 ^e	179±3f	186±22
BUN (mg/dl)	6 weeks	19.7±1.6	27.7±1.9	34.6±2.5 ^{e,f}	22.6±1.9
クレアチニン (mg/dl)	6 weeks	0.10±0.01	0.17±0.05	0.20±0.06	0.12±0.02
左腎重量/体重 (g/kg)	6 weeks	6.3±0.3	10.4±0.3 ^e	10.5±0.4 ^e	8.7±0.1 ^{e,g}
GFR (μl/min/gBW)	6 weeks	7.1±0.5	16.3±1.5 ^e	11.3±0.3 ^f	16.0±1.3 ^e

Values are means±SEM. 各群 n=5-7.

^ap < 0.05, ^bp < 0.01, ^cp < 0.001 vs. Baseline.

^dp < 0.01, ^ep < 0.001 vs. KK/Ta-wild-type コントロール.

^fp < 0.05, ^gp < 0.01 vs. KK/Ta-Akita コントロール.

表2. KK/Ta-Akita マウスにイブラグリフロジンまたはインスリンを6週間投与後の尿パラメータ (文献22より改変)

尿パラメータ	投与期間	KK/Ta-wild-type コントロール	KK/Ta-Akita		
			コントロール	イブラグリフロジン	インスリン
尿量 (ml/24h)	Baseline	2.5±0.5	24.8±2.2 ^f	23.7±1.0 ^f	21.5±2.3 ^f
	6 weeks	3.2±1.0	28.4±1.7	30.9±1.0 ^e	3.8±1.2 ^b
尿グルコース (g/24h)	Baseline	ND	2.85±0.19	2.54±0.13	2.23±0.22
	6 weeks	ND	3.33±0.23	3.20±0.12 ^b	0.29±0.11 ^b
尿アルブミン (μg/24h)	Baseline	62±18	404±53 ^f	414±36 ^f	307±65 ^d
	6 weeks	58±17	594±59 ^a	405±39	54±19 ^b
尿ナトリウム (mEq/24h)	Baseline	0.22±0.06	0.68±0.04 ^f	0.65±0.03 ^f	0.73±0.10 ^f
	6 weeks	0.32±0.13	0.68±0.04	0.75±0.02 ^a	0.24±0.07 ^a
尿カリウム (mEq/24h)	Baseline	0.20±0.04	1.17±0.07 ^f	1.01±0.04 ^f	1.11±0.16 ^f
	6 weeks	0.25±0.08	1.26±0.06	1.32±0.05 ^b	0.30±0.10 ^a
尿クロール (mEq/24h)	Baseline	0.38±0.14	0.87±0.04 ^e	0.76±0.04 ^e	0.86±0.10 ^e
	6weeks	0.73±0.26	0.90±0.05	0.92±0.04	0.29±0.09 ^a

ND, not determined. Values are means±SEM. 各群 n = 5-7.

^ap < 0.05, ^bp < 0.01, ^cp < 0.001 vs. Baseline.

^dp < 0.05, ^ep < 0.01, ^fp < 0.001 vs. KK/Ta-wild-type.

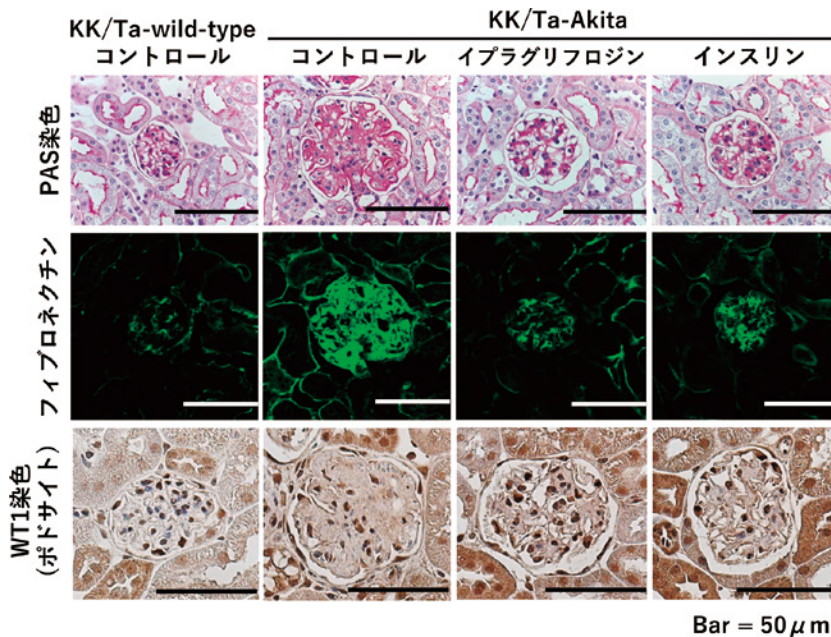


図1. イブラグリフロジン6週間投与後の糸球体組織像 (文献22より引用, 一部改変)

りもイブラグリフロジン群でポドサイトの脱落抑制が観察された (図1)。このように、イブラグリフロジン群では糸球体病変が改善しているにもかかわらず、ア

ルブミン尿が減少しなかったことから、その原因を探求するため尿細管でのアルブミンを含む糸球体濾過蛋白の再吸収の変化に着目してさらに調査を行った。

2. SGLT2 阻害による近位尿細管での 蛋白再吸収の抑制

次に、SGLT2 阻害薬投与後のアルブミンと NGAL の近位尿細管での再吸収について評価を行った。NGAL は腎障害時に産生されて近位尿細管の再吸収障害により尿中排泄が増加する低分子量蛋白である。蛍光標識したアルブミン灌流後の糸球体および近位尿細管を評価すると、イブラグリフロジン群では糸球体から漏出するアルブミンは減少しており、近位尿細管でのアルブミン再吸収も抑制されていた。コントロール群では糸球体からの濾過が増加し、近位尿細管で過剰な再吸収が観察された。インスリン群では糸球体からの濾過は減少したが、近位尿細管での過剰な再吸収が観察された。また、イブラグリフロジン群では近位尿細管での NGAL の再吸収が抑制され、尿中 NGAL 排泄が治療後に増加していた。コントロール群では近位尿細管の NGAL 再吸収が増加しており、尿中 NGAL 排泄は治療前後で変化はなかった。インスリン群では近位尿細管の NGAL 再吸収の程度はコントロール群より小さいが、尿中 NGAL 排泄は治療後に減少していた。以上より、イブラグリフロジン群ではアルブミンや NGAL などの低分子量蛋白の近位尿細管での再吸収が減少していることが示された (図 2)。

アルブミン、NGAL はエンドサイトーシス受容体のメガリンを介して再吸収されおり、SGLT2 とメガリンはともに近位尿細管の S1 および S2 セグメントに局在していることから、SGLT2 とメガリンの発現を

評価したが、各群間で SGLT2 とメガリンの発現量に変化はなかった。そこで、SGLT2 阻害によりみられた近位尿細管でのアルブミンと NGAL の再吸収減少はメガリンの機能抑制によりもたらされているのではないかと推察した。

3. SGLT2 阻害によるメガリンの O-GlcNAc 修飾と内在化

O-GlcNAc 修飾がタンパク質間の相互作用の調整や細胞内局在を調節することが報告されていることから、メガリンの O-GlcNAc 修飾を評価した。Western blot ではイブラグリフロジン群は他群と比較して、O-GlcNAc 修飾された蛋白が減少していた。また免疫蛍光染色でもイブラグリフロジン群では他群と比較して、O-GlcNAc 修飾が抑制されていた。この理由として、コントロール群とインスリン群では、尿糖再吸収増加に伴う HBP が亢進している一方、イブラグリフロジン群では SGLT2 阻害によって近位尿細管細胞でのグルコース再吸収が阻害されるため、HBP も抑制されているためと考えられる。また、メガリンの発現部位と O-GlcNAc 修飾の部位がマージしており、メガリンが O-GlcNAc 修飾を受けていることが示された。さらに、尿細管細胞でのメガリンの発現を 2.5 次元で評価すると、コントロール群とインスリン群では、メガリンが近位尿細管上皮細胞管腔側に沿って局在している一方、イブラグリフロジン群では、メガリンの細胞質内への局在が増加し、メガリンの内在化が進行し

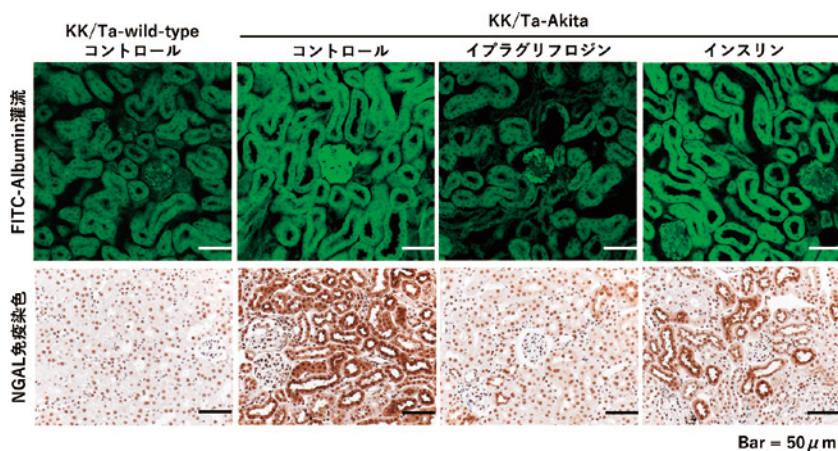


図 2. イブラグリフロジン 6 週間投与後の近位尿細管におけるアルブミンと NGAL の再吸収 (文献 22 より引用, 一部改変)

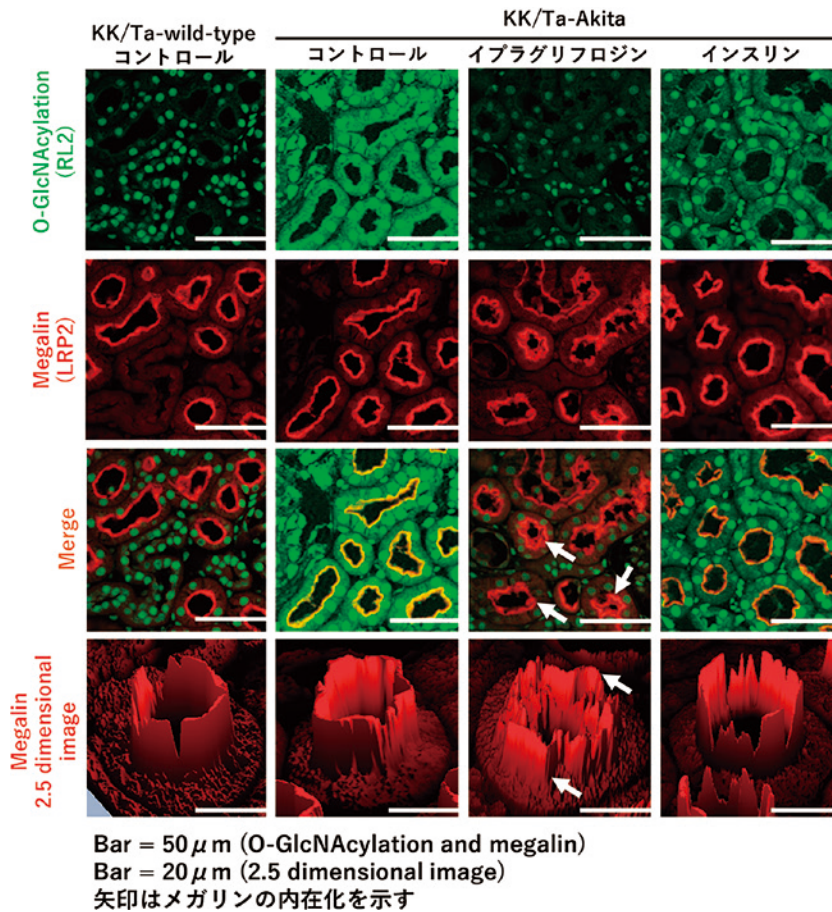


図3. イブラグリフロジン6週間投与後の近位尿細管におけるメガリンの局在とO-GlcNAc修飾(文献22より引用,一部改変)

ていた(図3)。これらの結果より、イブラグリフロジン群ではSGLT2阻害に伴う近位尿細管細胞でのグルコース再吸収抑制とHBPの抑制によりメガリンのO-GlcNAc修飾が抑制され、メガリンの内在化が進行することでそのエンドサイトーシス機能が抑制され、過剰な蛋白の再吸収が低下し、細胞内蛋白過剰負荷が軽減すると考えられた。

4. SGLT2阻害による近位尿細管上皮細胞におけるミトコンドリアの形態への影響

ミトコンドリアの形態異常が酸化ストレスの増加、腎線維化と密接に関連していることが報告されている

ため、我々はSGLT2阻害薬投与後の近位尿細管上皮細胞のミトコンドリアの形態について電顕による解析を行った。コントロール群ではミトコンドリアの腫大化や断片化、クリステの乱れ、また外膜の破裂などが観察されたが、イブラグリフロジン群ではそれらの形態異常が抑制されていた。また、インスリン群でもコントロール群に比して形態異常は少なかったが、イブラグリフロジン群よりも形態異常の程度は大きかった(図4)。したがって、SGLT2阻害は近位尿細管上皮細胞での過剰なグルコースと蛋白の再吸収を抑制することで、これらによる細胞内負荷を軽減し、ミトコンドリアの形態異常の抑制に寄与すると考察された。

(28)

SGLT2 阻害薬による腎保護メカニズム

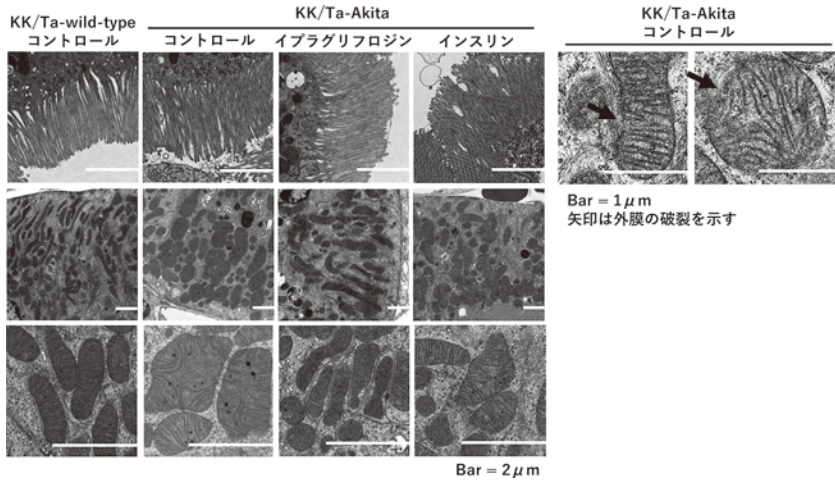


図4. イブラグリフロジン 6 週間投与後の近位尿細管におけるミトコンドリアの形態への影響 (文献 22 より引用, 一部改変)

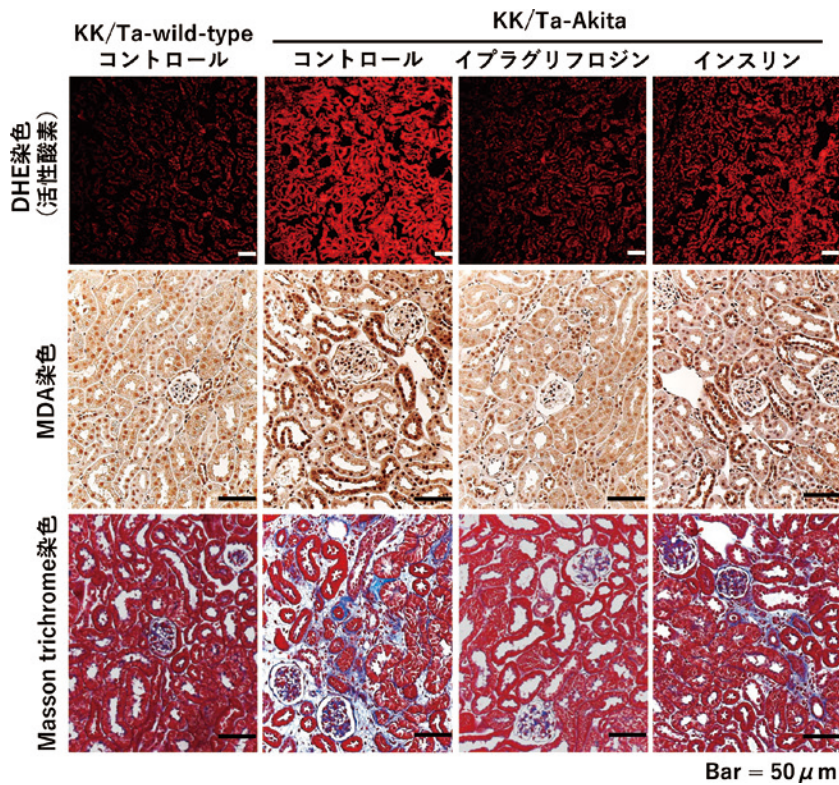


図5. イブラグリフロジン 6 週間投与後の腎酸化ストレスと間質の線維化 (文献 22 より引用, 一部改変)

5. SGLT2 阻害による腎酸化ストレスと 間質線維化の抑制

酸化ストレスマーカー dihydroethidium (DHE) および malondialdehyde (MDA) の腎組織染色による解析から、インスリン群に比してイプラグリフロジン群における顕著な酸化ストレスの減少が観察された。また、Masson trichrome 染色による解析では、イプラグリフロジン群において高度に腎間質の線維化が抑制されていた (図 5)。これらの結果から、SGLT2 阻害は糖尿病状態下で惹起されるミトコンドリアの形態異常を抑制することでその機能障害を改善し、結果として酸化ストレスを減少させ、腎線維化の抑制に貢献するものと考えられる。

6. 糖尿病性腎症における SGLT2 阻害による 腎保護作用の分子メカニズム

本研究結果から提唱される糖尿病性腎症における SGLT2 阻害による腎保護作用の分子メカニズムについて図 6 にまとめた。糖尿病状態下の近位尿細管では、糸球体から尿細管腔へ過剰に濾過されるグルコースが SGLT2 を経由して上皮細胞内へ再吸収されると、細

胞内での HBP が活性化し、uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) の産生が増加する。その後、O-GlcNAc transferase (OGT) によりメガリンの O-GlcNAc 修飾が進み、メガリンの尿細管腔側での局在が増加する。その結果、アルブミンや低分子量蛋白の再吸収が過剰となり、近位尿細管上皮細胞内で増加したグルコースと蛋白が同部位でのミトコンドリア形態障害を惹起し、酸化ストレスの増加とそれに伴う間質の炎症・線維化を引き起こす。このような状況下での SGLT2 阻害はグルコースの再吸収を減少させ、HBP の活性化を抑制することでメガリンの O-GlcNAc 修飾を軽減する。結果として、O-GlcNAc 修飾を受けないメガリンが増加し、内在化することで近位尿細管腔側に局在するメガリンが減少する。これにより、アルブミンや低分子量蛋白の再吸収が減少し、過剰な細胞内グルコースと蛋白によって惹起されるミトコンドリア障害を抑制し、酸化ストレスの軽減から間質の炎症・線維化を抑制する。こうした一連の糖尿病性腎症における SGLT2 阻害による腎保護作用の新規分子メカニズムを我々は本研究を通じて提唱する。

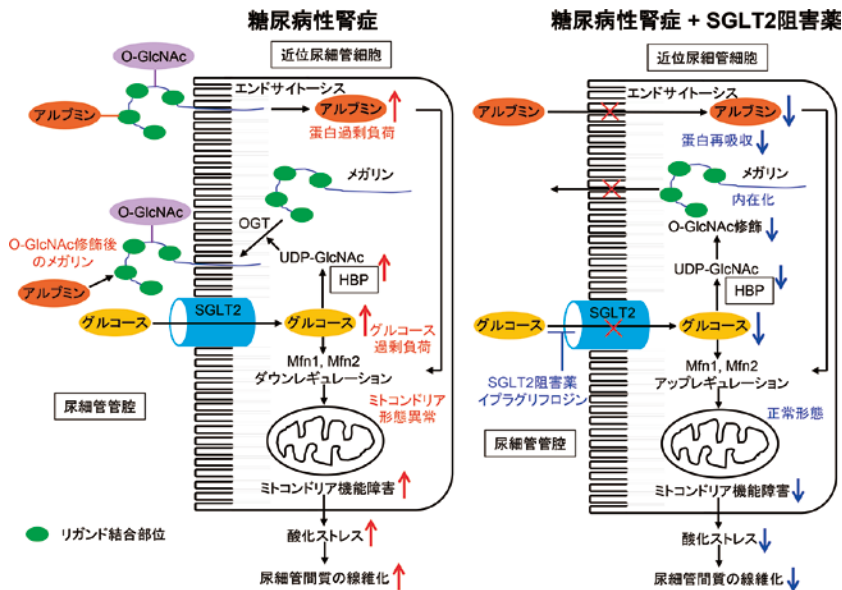


図 6. 糖尿病性腎症における SGLT2 阻害による腎保護作用の分子メカニズム (文献 22 より引用、一部改変)

7. 結 語

本研究により, SGLT2 阻害がメガリンの O-GlcNAc 修飾を抑制し, それに続くメガリンの内在化およびエンドサイトーシス機能抑制を通じて進行性糖尿病性腎症における近位尿細管での蛋白過剰負荷の改善をもたらすこと, さらにこのような変化に伴い近位尿細管のミトコンドリアの形態, 腎酸化ストレスおよび間質線維化の改善に寄与することが明らかとなった. 加えて, 糖尿病性腎症における SGLT2 阻害による腎保護作用の礎となる SGLT2 阻害とメガリンのクロストークメカニズムが本研究を通じて世界で初めて解明されたと考えよう. 最後に, 本研究成果が糖尿病性腎症の発症進展機序のさらなる解明と新規治療戦略の確立に貢献することを願ってやまない.

謝 辞

本研究を行うにあたり, 共著者の先生方にはご指導ならびにお力添えを賜り, 心より御礼申し上げます. また, 脇裕典教授はじめ代謝・内分泌内科学講座の皆様, 技術系スタッフの藤嶋広美様には, 本研究へのご理解とご支援を賜り, 大変心強い思いでありました. 感謝の気持ちばかりです. ありがとうございます. この場をお借りして御礼申し上げます.

文 献

- Gilbert, R.E. (2017) Proximal Tubulopathy: Prime Mover and Key Therapeutic Target in Diabetic Kidney Disease. *Diabetes*. **66**, 791-800.
- Bonventre, J.V. (2012) Can we target tubular damage to prevent renal function decline in diabetes? *Semin Nephrol*. **32**: 452-462.
- Nielsen, R., Christensen, E.I. and Birn, H. (2016) Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney Int*. **89**: 58-67.
- De, S., Kuwahara, S. and Saito, A. (2014) The endocytic receptor megalin and its associated proteins in proximal tubule epithelial cells. *Membranes (Basel)*. **4**: 333-355.
- Kerjaschki, D. and Farquhar, M.G. (1982) 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.
- Zhuang, Y., Yasinta, M., Hu, C., Zhao, M., Ding G. and Bai, M., et al. (2015) Mitochondrial dysfunction confers albumin-induced NLRP3 inflammasome activation and renal tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol*. **308**: F857-866.
- Nishi, Y., Satoh, M., Nagasu, H., Kadoya, H., Ihoriya, C., Kidokoro, K., et al. (2013) Selective estrogen receptor modulation attenuates proteinuria-induced renal tubular damage by modulating mitochondrial oxidative status. *Kidney Int*. **83**: 662-673.
- Fang, L., Xie, D., Wu, X., Cao, H., Su, W. and Yang, J. (2013) Involvement of endoplasmic reticulum stress in albuminuria induced inflammasome activation in renal proximal tubular cells. *PLoS One*. **8**: e72344.
- Takagaki, Y., Shi, S., Katoh, M., Kitada, M., Kanasaki, K. and Koya, D. (2019) Dipeptidyl peptidase-4 plays a pathogenic role in BSA-induced kidney injury in diabetic mice. *Sci Rep*. **9**: 7519.
- van Timmeren, M.M., Bakker, S.J., Vaidya, V.S., Bailly, V., Schuur, T.A., Damman, J., et al. (2006) Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. **291**: F456-464.
- Wanner, C., Inzucchi, S.E., Lachin, J.M., Fitchett, D., von Eynatten, M., Matthews, M., et al. (2016) Empagliflozin and Progression of Kidney Disease in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. **375**: 323-334.
- Neal, B., Perkovic, V., Mahaffey, K.W., de Zeeuw, D., Fulcher, G., Erondou, N., et al. (2017) Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. **377**: 644-657.
- Perkovic, V., Jardine, M.J., Neal, B., Bompoint, S., Heerspink, H.J.L., Charytan, D.M., et al. (2019) Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N Engl J Med*. **380**: 2295-2306.
- Wiviott, S.D., Raz, I., Bonaca, M.P., Mosenzon, O., Kato, E.T., Cahn, A., et al. (2019) Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. **380**: 347-357.
- Al-Jobori, H., Daniele, G., Cersosimo, E., Triplitt, C., Mehta, R., Norton, L., et al. (2017) Empagliflozin and Kinetics of Renal Glucose Transport in Healthy Individuals and Individuals With Type 2 Diabetes.

- Diabetes*. **66** : 1999-2006.
- 16) Goldberg, H.J., Whiteside, C.I., Hart, G.W. and Fantus, I.G. (2006) Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology*. **147** : 222-231.
- 17) Walgren, J.L., Vincent, T.S., Schey, K.L. and Buse, M.G. (2003) High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. **284** : E424-434.
- 18) Yang, X. and Qian, K. (2017) Protein O-GlcNAcylation : emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **18** : 452-465.
- 19) Fisi, V., Miseta, A. and Nagy, T. (2017) The Role of Stress-Induced O-GlcNAc Protein Modification in the Regulation of Membrane Transport. *Oxid Med Cell Longev*. **2017** : 1308692.
- 20) Hart, G.W., Housley, M.P. and Slawson, C. (2007) Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*. **446** : 1017-1022.
- 21) Butkinaree, C., Park, K. and Hart, G.W. (2010) O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) : Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta*. **1800** : 96-106.
- 22) Otomo, H. Fujita, H., et al. (2020) Sodium-glucose cotransporter 2 inhibition attenuates protein overload in renal proximal tubule via suppression of megalin O-GlcNAcylation in progressive diabetic nephropathy. *Metabolism*. **113** : 154405.