

Calciprotein particle (CPP)とメガリンに着目した、マグネシウムによる腎不全進行抑制の機序解明

山本 毅士

大阪大学大学院医学系研究科腎臓内科学

概要

超高齢化や生活習慣病長期化に伴い、慢性腎臓病(CKD)および透析患者数は年々増加し、医療的にも社会的にもその対策が急務である。高リン(P)血症は血管石灰化の促進因子であり、その健康被害はCKD患者において長年問題視されてきた。2021年、高P食負荷で腎尿細管からのP排泄を増加させると、腎尿細管内に微細なリン酸カルシウム結晶(Calciprotein particle(CPP))が生じ、尿細管を障害することが報告され大きな注目を浴びている(黒尾誠ら「CPP病原体説」JCI 2021)。一方、マグネシウム(Mg)摂食がCKDや心疾患リスクを下げるという疫学調査があるが、その機序は明確ではない。

申請者は老化・生活習慣病が細胞内の恒常性維持機構オートファジーに与える影響とその役割を研究し、特に高P負荷では尿細管のオートファジーがミトコンドリア品質管理を介して腎を保護する一方、オートファジー後期段階の障害を起こし、その保護作用を打ち消すことを見出した。一方、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。

本研究では「Mgは、①病原体CPPの形成抑制±②入り口としてのメガリン機能調節により高P腎毒性を解除できる」という仮説をたて、P-MgバランスやFetuin-A蛋白局在がCPP形成やメガリン機能に及ぼす影響を解明し、CPP形成抑制因子(MgとFetuin-A)やメガリン阻害・拮抗する薬剤(シラスタチンが候補)を模索・検証し、最終的には、食(Mg)を通じて腎保護・健康維持につなげることを目的とした。その結果、①高P低Mg食負荷群の腎尿細管障害はMg補充によって改善すること、電顕にて尿細管腔内や細胞内にCPP様物質が観察されること、高P低Mg食負荷群でインフラマソーム活性化が観察されること、②タモキシフェン誘導性近位尿細管特異的メガリンKOマウス(iMegKO)のアルブミンの取り込みはMegalin欠損により著減すること、③高P負荷低Mg食負荷によりiMegKOマウスは生存率・体重減少が悪化すること、④高P負荷低Mg食負荷時、iMegKOマウスの腎障害と腎線維化は、コントロールマウスと明らかな差は認めないことを見出した。

本研究は、CPPとMegalinを中心に捉え高P毒性(老化腎・CKD・炎症を加速させる)を解明し、それに基づきMgの有効性の確立・提唱まで視野に入れた「食生活と健康」に直結した課題であり、急務であるCKD対策に新たな視点と可能性を提供する。

1. 研究目的

日本人が健康長寿である理由は『伝統的日本食』に起因すると考えられ、その特徴として大豆や魚・海藻、野菜・きのこ、発酵食品等を多く摂取することがあげられる。一

方、欧米化の影響を受け、生活習慣病の増加が問題となっている。中でも近年、『超加工食品』による健康被害が危惧されている。例えば超加工食品を食べると腎不全のリスクが増加するだけでなく、1日500kcalを多く摂取し最

小加工食品に比べ食べるスピードが速く体重・死亡リスクが増加する^{1,2,3)}。

いったいどのように『伝統的日本食』は長寿をもたらし、逆に『超加工食品』は老化を進めてしまうのだろうか。『超加工食品』中の無機リン(P)はほぼすべて吸収され、特に慢性腎臓病(CKD)患者では、P濃度上昇は死亡、心血管疾患・血管石灰化だけでなく腎不全進行とも関連するため、過剰なP摂取は予後に関わる深刻な問題である。一方、食品加工過程でマグネシウム(Mg)が失われる。本邦ではMg摂取量が経年的に減少し、その平均摂取量は推奨量に達していない。したがって、『伝統的日本食』は『Mgを豊富に含む食事』であり、『超加工食品』は『Mgが欠乏した高P食』と言える。

このPとMgのアンバランスが生体に及ぼす影響として共同研究者の坂口悠介らは、高P食により惹起される腎不全マウスの腎尿細管障害・線維化が低Mg食によって増悪すること⁴⁾、またPが高くMgが低いCKD患者では腎不全進行リスクが高い、すなわちP毒性がMg欠乏によって助長されること⁵⁾を観察しているが、その詳細な分子学・細胞学的機序は明らかでない。

2021年、高P食負荷で腎尿細管からのP排泄を増加させると、腎尿細管内に微細なP酸カルシウム結晶(Calcioprotein particle(CPP))が生じ、尿細管を障害することが報告⁶⁾され注目を浴びている。筆者は老化・生活習慣病が細胞内の恒常性維持機構オートファジーに与える影響とその役割を研究し^{7,8)}、特に高P負荷では尿細管のオートファジーがミトコンドリア品質管理を介して腎を保護する⁹⁾一方、オートファジー後期段階の障害を起こし、その保護作用を打ち消すことを見出した(論文作成中)。一方、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¹⁰⁾。

以上の背景を元に、本研究では「Mgは、①病原体CPPの形成抑制±②入り口としてのメガリン機能調節により高P腎毒性を解除できる」という仮説をたて、P-MgバランスやFetuin-A蛋白局在がCPP形成やメガリン機能に及ぼす影響を解明し、CPP形成抑制因子(MgとFetuin-A)やメガリン阻害・拮抗する薬剤(シラスタチンが候補)を模索・

検証し、最終的には、食(Mg)を通じて腎保護・健康維持につなげることを目的とし研究を行った。

2. 研究方法

2.1 マウス

薬剤誘導性近位尿細管特異的 megalin ノックアウトマウスは、共同研究者である柳田素子教授らが以前に作製した¹¹⁾。コントロールマウスはそれぞれ対照となる Megalin flox の野生型相当のマウスを使用した。雄マウスのみを被験動物として使用した。マウスには水と標準的なマウス用餌(P・Mgの負荷試験を除く)を自由に摂食させた。それぞれの研究目的に合わせた処置あるいは負荷を行ったマウスを麻酔下で解剖し、採血・採尿を行った。PBS(pH 7.4)でマウスを経心的に灌流し腎臓を採取した。摘出した腎臓をスライスし、4%PFA(パラホルムアルデヒド)で後固定し、パラフィンに包埋するか、OCTコンパウンドで凍結し、切片試料とした。切片試料をPAS(Periodic acid-Schiff)染色し、光学顕微鏡で観察した。

2.2 免疫染色・ウエスタンブロットング・抗体/統計解析

通常に行われる実験方法および統計解析については、当研究室における従来通りの方法を用いた^{7,8,9)}。

3. 研究結果

3.1 CPPに着目したMgによる高P毒性解除

まず、Mg補充が高P腎毒性を解除できるかを検証するため、片腎摘野生型マウスに正(P=0.3%)or高P(P=1.3%)×低(Mg=0.01%)or正(Mg=0.05%)or高Mg(Mg=0.2%)食を与え、腎障害(PAS, TUNEL染色)を評価した。高P低Mg食負荷群で強い障害が認められたが、Mg補充によって有意に改善することが観察された。さらに、電顕にて尿細管管腔内や細胞内にCPP様物質が観察された(Fig. 1)。

CPPは、細胞障害性や炎症を惹起することが知られており、まず腎の炎症を評価したところ、特に、無菌性炎症インフラマソームが、高P低Mg食負荷で活性化されることがわかった(Fig. 1)

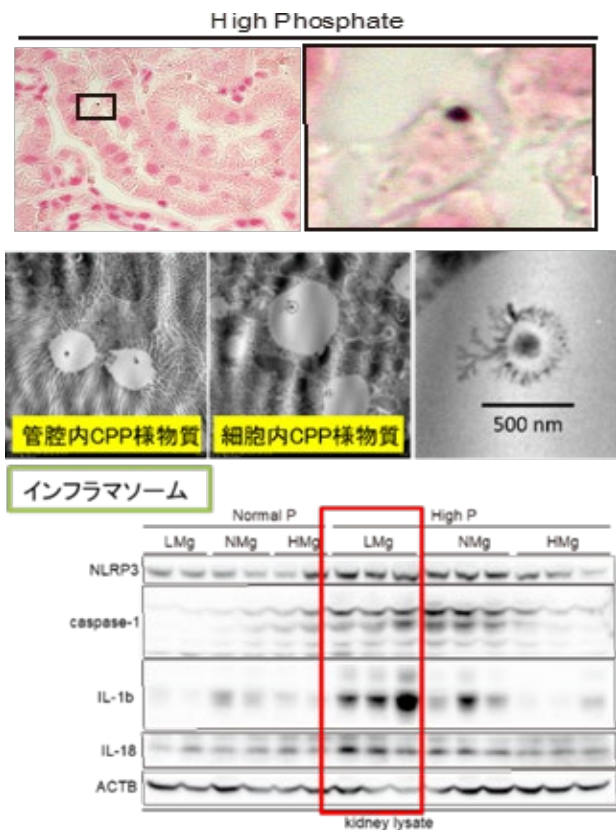


Fig. 1 高リン負荷低マグネシウム食負荷による CPP 形成とインフラマソーム活性化
 (上) 高 P 低 Mg 食負荷群の腎尿細管障害は Mg 補充によって改善する。電顕にて尿細管管腔内や細胞内に CPP 様物質が観察される。
 (下) 高 P 低 Mg 食負荷群でインフラマソーム活性化が観察される。

3. 2 近位尿細管特異的メガリン KO マウスの解析

我々は以前、血中 Fetuin-A が糸球体で濾過されメガリン依存性に近位尿細管に取り込まれること、近位尿細管における Fetuin-A 取り込みを薬剤で阻害すると、尿細管腔内に Fetuin-A が保持され、腎石灰化が抑制されることを明らかにした¹²⁾。その知見から、今回タモキシフェン誘導性近位尿細管特異的メガリン KO マウス (iMegKO) を用いることとした。このマウスでは、タモキシフェン投与によって、メガリンが KO され、アルブミン等の流入が消失することが確かめられた (Fig. 2)。

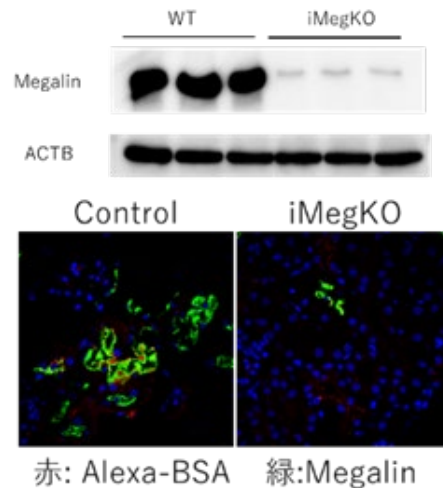


Fig. 2 薬剤誘導性 Megalin ノックアウトマウスの検討
 (上) タモキシフェン誘導性近位尿細管特異的メガリン KO マウス (iMegKO) の Megalin 発現。
 (下) アルブミンの取り込みは Megalin 欠損により著減する。

3. 3 高リン負荷低マグネシウム食負荷時の iMegKO マウスとコントロールマウスの生存率と体重変化

高 P 負荷低 Mg 食負荷により iMegKO マウスは生存率・体重減少が悪化することを見出した (Fig. 3)。

iMegKO マウスでは、『尿管腔内に Fetuin-A が保持されることで CPP 形成が抑制される、あるいは形成された CPP の尿管流入が阻止され、腎尿細管を保護する』と予想されたが、高 P 負荷低 Mg 食負荷時、iMegKO マウスの腎障害と腎線維化は、コントロールマウスと明らかな差は認めなかった (Fig. 4)。今後マウスを増やし PAS 染色・細胞死・炎症・老化等々を評価していく。

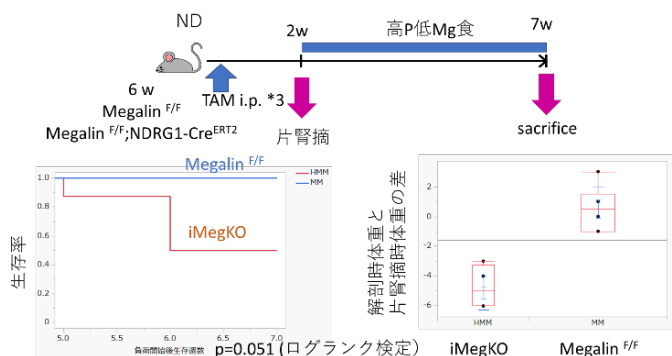


Fig. 3 高リン負荷低マグネシウム食負荷時の iMegKO マウスとコントロールマウスの生存率と体重変化
 (上) 高 P 負荷低 Mg 食負荷のモデル。
 (下) 生存率と体重変化。高 P 負荷低 Mg 食負荷により iMegKO マウスは生存率・体重減少が悪化する。

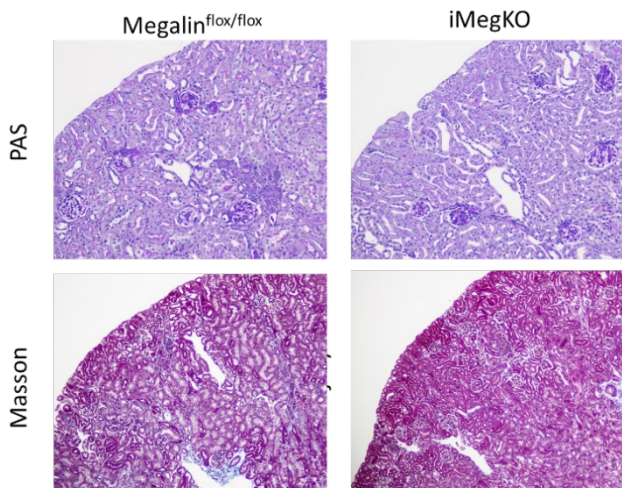


Fig. 4 高リン負荷低マグネシウム食負荷時の iMegKO マウスとコントロールマウスの腎障害と腎線維化
高 P 負荷低 Mg 食負荷時, iMegKO マウスの腎障害と腎線維化は, コントロールマウスと明らかな差は認めない。

4. 考察

本研究では,

- ①高 P 低 Mg 食負荷群の腎尿細管障害は Mg 補充によって改善すること, 電顕にて尿細管管腔内や細胞内に CPP 様物質が観察されること, 高 P 低 Mg 食負荷群でインフラマソーム活性化が観察されること
- ②タモキシフェン誘導性近位尿細管特異的メガリン KO マウス (iMegKO) のアルブミンの取り込みは Megalin 欠損により著減すること
- ③驚くべきことに, 高 P 低 Mg 食負荷により iMegKO マウスは生存率・体重減少が悪化すること
- ④一方で, 高 P 負荷低 Mg 食負荷時, iMegKO マウスの腎障害と腎線維化は, コントロールマウスと明らかな差は認めないこと

を見出した。

メガリンは, 近年様々な急性腎障害 (AKI), CKD モデルの報告でその重要性が指摘されるが CPP との関連は未解明である。本研究で得られる知見は, メガリンを介した物質の取り込み・代謝に関わる分子機構の解明につながり, CKD 病態や Mg 腎保護機序解明に寄与するとともに老化・アンチエイジングに対する波及効果があり, 今後さらなる高齢社会を迎える我が国において社会へのインパクトは大きいと考えられる。

本研究における最大の発見は, 高 P 低 Mg 食負荷によって iMegKO マウスがコントロールマウスに比べ, 体重減少を呈し死亡にいたったことである。現時点で死亡の原因は不明であるが, 生き残った高 P 低 Mg 食負荷 iMegKO マウスの腎臓は, コントロールマウスに比べ明らかな悪化は認めていなかったため, 腎不全による死亡ではないかもしれない。一方, メガリンは腎臓保護作用や全身恒常性維持にとって必須のタンパク (例えばアルブミンや Fetuin-A など) を再吸収しており, 特に高 P 低 Mg 食負荷時にはそれらが欠乏したため, 著明な血管内脱水や, 心臓冠動脈や大動脈の血管石灰化が進行し, 心血管死を引き起こしたのかもしれない。今後, マウス生存率の再現実験を行うとともに, 死亡原因について詳細に検討を行っていききたい。

一方で, 近年, 糖尿病性腎臓病における脂肪酸結合アルブミンによる腎障害や, バンコマイシン等による薬剤性腎障害は, メガリンを介して起こり, メガリン KO やシラスタチンにより抑制されることが報告されている^{13, 14, 15, 16}。実際, 筆者らの検討では, 高脂肪食肥満マウスでの腎障害が, シラスタチンにより SGLT2 阻害薬と同様に軽減することを観察している。以上から, 今後は, これらの知見を進展させ, メガリンを遺伝学的に完全にノックアウトしたモデルではなく, シラスタチンが CPP 流入を阻害することで腎不全進行を抑制しうるかを検証していく必要がある。シラスタチンを用いた検討を着実に進めることができれば, 本研究の当初の目的に合致した, 「Mg (や Fetuin-A) は, ①病原体 CPP の抑制と②メガリン機能を適切に抑制することにより, 高 P 腎毒性を解除できる」という結論が得られると期待できる。

食生活が健康にもたらす影響を分子・細胞生物学的観点から検討し成功した研究は乏しい。黒尾教授らの「CPP 病原体説」が注目を浴び, CPP 吸着カラムの開発が進められている。一方, 現時点で CPP 形成抑制やメガリン阻害の創薬は進んでいない。筆者は食生活を通じて, CPP 抑制やメガリン調節 (メガリン機能を適切に抑制する) を行うことこそが健康長寿の秘訣と考えている。その観点から, これまでに, オートファジー障害を解除する食品を探索し, 特に魚食に多く含まれる「EPA がオートファジーを回復し腎脂肪毒性を軽減する」ことを見出した¹⁷。Mg もまた伝統的な和食や「にがり」に豊富に含まれる。対照

的に、現在わが国でも広く流通している加工食品・ファストフード・コンビニ食などでは、食品添加物に用いられる無機 P の消化管吸収率が極めて高くほぼすべて吸収されてしまう一方、精製過程で大半の Mg が失われてしまう、すなわち高 P 低 Mg 食である。実際、厚生労働省『国民栄養調査』によると Mg 推定摂取量の平均値(男性; 50-59 歳)は 2002 年から 2019 年の間に 299 mg から 265 mg へ減少し、推奨量である 370 mg を大きく下回っている。このように、P 毒性を増強させる典型的な食事が現代社会に広く流布しており、今後改めて、Mg の有効性の確立・提唱を推進していきたい。

5. 今後の課題

本研究は、CPP とメガリンを中心に捉え、高 P 毒性(老化腎・CKD・炎症を加速させる)を解明し、それに基づき Mg の有効性の確立・提唱まで視野に入れた「食生活と健康」に直結した課題であり、急務である CKD 対策に新たな視点と可能性を提供する。今後、さらにメガリン研究が進展し、病態に応じたメガリンの生理的意義あるいは病態形成機序を解明し、高 P 毒性本態と Mg による P 毒性軽減の機序が解明され、CKD 患者の予後改善、超高齢化社会における健康長寿に寄与することが望まれる。

本研究の計画立案にあたっては、大阪大学大学院腎臓内科学の坂口悠介特任助教/松井功講師/高嶋義嗣講師(当時)/猪阪善隆教授に多くのご指導をいただいた。本研究の実施にあたっては、窪田卓也医員/松井翔医員が多くのマウス実験で協力いただいた。マウス作製では京都大学大学院腎臓内科学柳田素子教授、オートファジー・Rubicon 研究では大阪大学大学院遺伝学吉森保教授より、それぞれご助言・ご指導をいただいた。この場を借りて深く感謝申し上げます。

6. 文献

1. Avesani CM, et al. Ultraprocessed foods and chronic kidney disease-double trouble. *Clin Kidney J.* 2023;16(11):1723-1736.
2. Rico-Campa A, et al. Association between consumption of ultra-processed foods and all cause mortality: SUN prospective cohort study. *BMJ.* 2019;365:l1949.
3. Hall KD, et al. Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell Metab.* 2019;30(1):67-77 e63.
4. Sakaguchi Y, et al. Low magnesium diet aggravates phosphate-induced kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2019;34(8):1310-1319.
5. Sakaguchi Y, et al. Magnesium modifies the association between serum phosphate and the risk of progression to end-stage kidney disease in patients with non-diabetic chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2015;88(4):833-842.
6. Shiizaki K, et al. Calcium phosphate microcrystals in the renal tubular fluid accelerate chronic kidney disease progression. *J Clin Invest.* 2021;131(16).
7. Yamamoto T, et al. Time-dependent dysregulation of autophagy: Implications in aging and mitochondrial homeostasis in the kidney proximal tubule. *Autophagy.* 2016;12(5):801-813.
8. Yamamoto T, et al. High-Fat Diet-Induced Lysosomal Dysfunction and Impaired Autophagic Flux Contribute to Lipotoxicity in the Kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(5):1534-1551.
9. Fujimura R, et al. Autophagy protects kidney from phosphate-induced mitochondrial injury. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;524(3):636-642.
10. Saito A, et al. Role of megalin, a proximal tubular endocytic receptor, in the pathogenesis of diabetic and metabolic syndrome-related nephropathies: protein metabolic overload hypothesis. *Nephrology (Carlton).* 2005;10 Suppl:S26-31.
11. Mori KP, et al. Increase of Total Nephron Albumin Filtration and Reabsorption in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(1):278-289.
12. Matsui I, et al. Retention of fetuin-A in renal tubular lumen protects the kidney from nephrocalcinosis in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;304(6):F751-760.
13. Kuwahara S, et al. Megalin-Mediated Tubuloglomerular Alterations in High-Fat Diet-Induced Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(7):1996-2008.
14. Hori Y, et al. Megalin Blockade with Cilastatin Suppresses Drug-Induced Nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(6):1783-1791.

15. Matsushita K, et al. Cilastatin Ameliorates Rhabdomyolysis-induced AKI in Mice. *J Am Soc Nephrol.* 2021;32(10):2579-2594.
16. Goto S, et al. Megalin-related mechanism of hemolysis-induced acute kidney injury and the therapeutic strategy. *J Pathol.* 2024.
17. Yamamoto T, et al. Eicosapentaenoic acid attenuates renal lipotoxicity by restoring autophagic flux. *Autophagy.* 2021;17(7):1700-1713.

Elucidating the Mechanism of Magnesium-Mediated Attenuation of Kidney Disease Progression with a Focus on Calciprotein Particle (CPP) and Megalin.

Takeshi Yamamoto

Department of Nephrology, Osaka University Graduate School of Medicine

Summary

With the increase in the elderly population and the prolonged duration of lifestyle-related diseases, the number of patients with chronic kidney disease (CKD) and those undergoing dialysis has been increasing yearly, making it a pressing issue both medically and socially. Hyperphosphatemia is a promoting factor for vascular calcification, and its health hazards have long been a concern for CKD patients. It was reported that increasing phosphate (P) excretion from the kidney tubules through a high P diet leads to the formation of fine calcium P crystals (calciprotein particles, CPPs) within the tubules, causing tubule damage. Meanwhile, epidemiological studies suggest that magnesium (Mg) intake reduces the risk of CKD and cardiovascular diseases, although the mechanism remains unclear. I have studied the impact of aging and lifestyle-related diseases on the autophagy and its role. Notably, it was found that under high P load, autophagy protects the kidney via mitochondrial quality control but also causes late-stage autophagy stagnation, nullifying its protective effects. On the other hand, megalin, an endocytosis receptor expressed on the apical membrane of proximal tubules, is involved in the reabsorption, metabolism, and intracellular signaling of various proteins and drugs filtered by the glomerulus.

In this study, we hypothesize that "Mg can mitigate high P nephrotoxicity by either inhibiting the formation of pathogenic CPPs or regulating the function of megalin as an entry point." We have aimed to elucidate the effects of P-Mg balance and Fetuin-A localization on CPP formation and megalin function, explore CPP formation inhibitors (Mg and Fetuin-A), and megalin antagonistic drugs (cilastatin as a candidate). The results showed: 1) Tubular damage in the high P, low Mg diet group with CPP-like substances observed in the tubular lumen and cells under electron microscopy was improved by Mg supplementation. Inflammation activation was also observed in the high P, low Mg diet group; 2) Tamoxifen-induced proximal tubule-specific megalin knockout mice (iMegKO) exhibited significantly reduced albumin uptake; 3) The survival rate and weight loss of iMegKO mice worsened under high P and low Mg diet load; 4) No significant difference in kidney damage and fibrosis was observed between iMegKO mice and control mice under high P and low Mg diet load. These findings offer a new perspective and potential for urgent CKD countermeasures, directly linking diet and health.