

平成 30 年 8 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09291

研究課題名(和文) セリンプロテアーゼ・ヘプシンの腎臓における生理的機能の分子解明

研究課題名(英文) Elucidation of the physiological role of serine protease hepsin in the kidney.

研究代表者

安達 政隆 (ADACHI, MASATAKA)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90398206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：セリンプロテアーゼ・ヘプシンは腎臓に発現しているが、腎の局在やその生理的機能は不明である。本研究において腎近位尿細管から皮質集合尿細管においてヘプシンmRNAおよび蛋白の発現を同定した。急性リン負荷および慢性リン負荷モデルマウスの検討では尿中リン排泄増加を認めしたが、腎でのヘプシンmRNAや蛋白発現に変化は認めなかった。Xenopus oocyteでの検討ではヘプシンはナトリウム依存性リン酸トランスポーターのリン輸送活性には影響を与えず、上皮型ナトリウムチャネル活性を増加することが確認された。以上のことから、ヘプシンは尿細管リン再吸収には関与せず、Na再吸収に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The physiological role of serine protease hepsin, which is expressed in various human tissues including liver, spleen, and kidney, is unknown. Previous studies revealed selective increase in bone alkaline phosphatase in hepsin knockout mice. Based on reports showing the inactivation and degradation of the sodium phosphate cotransporter (NaPi-IIa) via cleavage by proteases, we hypothesized that hepsin reduces phosphate reabsorption in renal proximal tubules. We identified rat hepsin expression along the nephron segment and investigated its expression in mice with acute or chronic phosphate overload. Rat hepsin mRNA was predominantly expressed in proximal tubules, whereas lower hepsin mRNA expression levels were detected in distal and collecting duct tubules. Acute and chronic phosphate overload had no effect on mouse hepsin mRNA or hepsin protein expression in renal tubules. These findings suggested that the serine protease hepsin was not involved in phosphate handling in the kidney.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：水・電解質 セリンプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

我々はラット腎臓よりセリンプロテアーゼ (SP)であるプロスタシンをクローニングし、プロスタシンによる上皮型 Na チャネル (ENaC)の活性化、アルドステロン(Aldo)によるプロスタシンの発現亢進、Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける食塩負荷時の尿中プロスタシン排泄の増加とそれに伴う ENaC の活性化、Dahl ラットでのプロスタシン活性を抑制する合成セリンプロテアーゼ阻害薬 (SPI)の降圧効果と腎障害抑制効果、5/6 腎摘出 CKD モデルラットや一側尿管結紮腎線維化モデルラットにおける SPI の糸球体硬化および間質線維化抑制効果などを証明し、これまでに一貫してプロスタシンと高血圧、腎障害の発症メカニズムを解明してきた。

一方、プロスタシンをクローニングした際にラット腎皮質から作製した cDNA ライブラリーより Type2 膜型セリンプロテアーゼであるヘプシンをクローニングしていたが (unpublished data)、腎臓におけるヘプシンの局在や生理的機能についてはこれまでに報告がなく、未だ不明のままである。ヘプシンは肝臓に優位に発現し、膵臓、腎臓での発現も確認され、全身性ヘプシン欠損マウスの解析では正常発育であり、肝機能異常も認めなかったが、野生型マウスと比較すると血清骨型アルカリフォスファターゼ (BAP)の上昇が報告されている。この論文では血清 Ca やリン濃度は測定されておらず、ヘプシンが肝臓、膵臓、腎臓に局在していることを考慮するとヘプシン欠損マウスにおいて腎臓での Ca、リン代謝異常の存在が強く推測される。

また、近位尿細管管腔側に発現しているリン再吸収に関与するナトリウム依存性リン酸トランスポーター (NaPi-IIa)の活性化にプロテアーゼによる切断が重要であることが報告されていることから、ヘプシンが腎尿細管におけるリン代謝と関連している可能性が強く推測される。

2. 研究の目的

本研究の目的は腎臓においてセリンプロテアーゼであるヘプシンと NaPi-IIa に着目し、腎臓におけるヘプシンの局在とヘプシンによる NaPi-IIa-2 活性化の関与を明らかにし、腎臓でのリン代謝におけるヘプシンの機能的役割を詳細に検討することである。

3. 研究の方法

腎臓におけるヘプシンの生理的機能を解明するため、1)ネフロンセグメントでのラットヘプシンの発現をマイクロダイセクション法を用いた RT-PCR 法およびヘプシン抗体を用いた immunohistochemistry によって解析し、腎臓でのヘプシンの局在を明らかにする。2) アフリカツメガエル卵母細胞 (Xenopus oocyte)を用いて、ヘプシンと NaPi-IIa を共発現させ、灌流液の NA96 に 3mMPi となるよう Pi を添加し、Na 依存性の電流を測定した後、

NaCl をコリンクロライドに置換し、ホールディングポテンシャルを -50mV することにより Ip によるリン輸送活性を測定する。3) 無リン食 + 急性 Pi 負荷時のマウスにおける解析：4 週齢のコントロールマウスに無リン食を与えて飼育し、A 群 (6 匹) 無リン食 + vehicle 腹腔内投与、B 群 (6 匹) 無リン食 + 200 μM リン腹腔内投与し、2 日後に 24 時間蓄尿による尿サンプルを採取し、1 日尿蛋白、尿中 Na、K、Pi 排泄について評価する。観察終了時に sacrifice 後、下大静脈より血液サンプルを採取し Na、K、Cl、BUN、Cr、P を測定する。また、尿サンプルより FEP、Ccr を算出する。A、B 群のマウスから片腎より蛋白を回収し、片腎より mRNA を回収する。回収した腎臓の mRNA からヘプシンの mRNA の発現量を real time PCR にて、腎組織におけるヘプシン蛋白発現を immunohistochemistry で評価する。4) 慢性 Pi 負荷時のマウスにおける解析：4 週齢のコントロールマウス A 群 (6 匹) 0.6% Pi (0.6% Ca 含有)の正リン食、B 群 (6 匹) 1.2% Pi (0.6% Ca 含有)の高リン食を与え飼育し、8 週齢の時点で 24 時間蓄尿による尿サンプルを採取し、以下、無リン食 + 急性 Pi 負荷時マウスと同様の検討を行う。5) Xenopus oocyte を用いて、ヘプシンと α, β, γENaC を共発現させ、ホールディングポテンシャルを -100mV とし、96mM グルコン酸 Na、2mM グルコン酸 K、1.8mM CaCl₂、10mM HEPES、5mM BaCl₂、10mM テトラエチルアンモニウムクロライドを含んだ灌流液で灌流し、アミロライド感受性ナトリウム電流 (I_{Na})を測定する。

4. 研究成果

1)腎臓におけるヘプシン発現の検討

4 週齢雄ラット腎ネフロンをマイクロダイセクション後に PT-PCR を施行したところ、近位尿細管から皮質集合尿細管においてラットヘプシン mRNA の発現を確認した (図 1)。

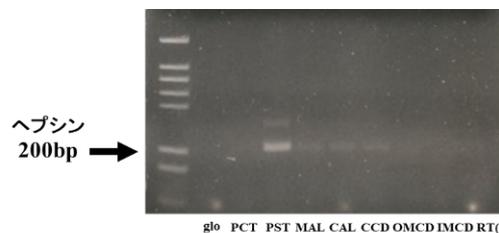


図1 ネフロンセグメントにおけるヘプシンmRNA発現

また、シスプラチン腎症モデルマウスの腎臓においてヘプシン mRNA 発現の減少を認め、ドキサゾシン投与により発現の回復を認めしたが、UUO モデルマウスの腎臓においてはヘプシン mRNA 発現に変化は認めなかった (図 2)。ラット腎近位尿細管細胞 (NRK52E) においてもヘプシン mRNA の発現は観察されなかった。各種臓器でのヘプシン mRNA 発現も同様に再確認したところ、腎臓、肝臓において発現を認めた (図 3)。

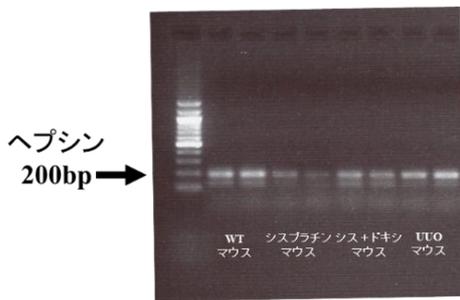


図2 疾患モデルマウスにおけるヘプシンmRNA発現

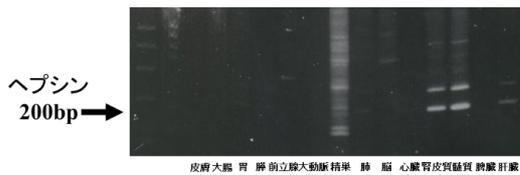


図3 臓器におけるヘプシンmRNA発現

8 週齢雄マウスの腎臓においてヘプシン抗体を用いて immunohistochemistry を施行したところ、近位尿細管および遠位尿細管腔側にヘプシンの発現を確認した(図4)。

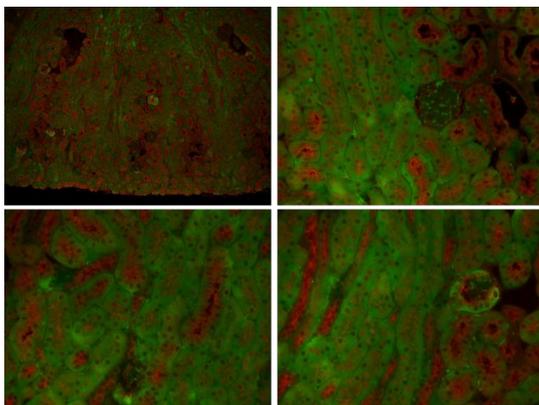


図4 腎臓におけるヘプシン蛋白発現

2) Xenopus oocyte 系でのヘプシンによる NaPi-IIa リン輸送活性の測定

Ambion MEGAscript を使用して作製したラットヘプシン cRNA 1ng および NaPi- a cRNA 15ng を Xenopus oocyte に共発現させ、3 日後に還流液の NA96 に 3mMPi となるよう Pi を添加し、Na 依存性の電流を測定した後、NaCl をコリンクロライドに置換することにより Ip を測定した。コントロールと比較し、ヘプシンと NaPi-IIa を共発現させても Ip に変化はなかった。

3)急性リン負荷モデルマウス(無リン食 + 200 μM リン腹腔内投与)における腎臓でのヘプシン発現解析

急性リン負荷モデルである無リン食 + 急性 Pi 腹腔内投与マウスにおいて腎臓におけるヘプシン mRNA 発現を検討したところ、尿中リン排泄(FEP)は増加したが、血清リン値、

血清 Ca 値に変化はなく、ヘプシン mRNA の発現増加も認めなかった(図5)。Immunohistochemistry によるヘプシン蛋白発現の検討でもヘプシンの蛋白発現の増加は認めなかった。NaPi- a の発現については、腎臓での NaPi- a 抗体を用いた immunohistochemistry を施行したが、NaPi- a を同定できず、抗原賦活化法を変更して再検討中である。

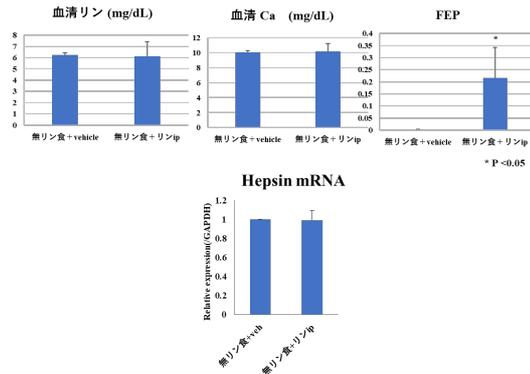


図5 無リン食+リン腹腔内投与マウス

4) 慢性リン負荷モデルマウスにおける腎臓でのヘプシン発現解析

慢性リン負荷モデルである高リン食(1.2% Pi) 負荷マウスにおいて腎臓におけるヘプシン mRNA 発現を検討したところ、急性リン負荷モデルと同様に、尿中リン排泄(FEP)は増加したが、血清リン値、血清 Ca 値に変化はなく、ヘプシン mRNA の発現増加も認めなかった(図6)。Immunohistochemistry によるヘプシン蛋白発現、NaPi- a の発現については、現在、検討中である。

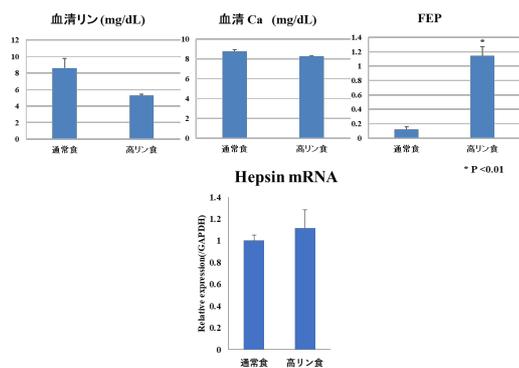


図6 高リン食負荷マウス

5) Xenopus oocyte 系におけるヘプシンによる上皮型ナトリウムチャンネル(ENaC)活性化の検討

リン負荷モデルにおけるヘプシンの発現増加を認めなかったため、ヘプシンと腎尿細管、特に皮質集合尿細管における Na 再吸収の関与を調べるために現在、Ambion MEGAscript を使用して作製したラット ENaC α, β, γ サブユニット cRNA 0.5ng ずつおよびラットヘ

シン cRNA Ing を *Xenopus oocyte* に共発現させ、アミロライド感受性ナトリウム電流(Ina)を測定したところ、コントロール $905.7 \pm 761.5 \mu\text{A}$ 、ヘプシン $1771.3 \pm 815.7 \mu\text{A}$ とヘプシンによりアミロライド感受性ナトリウム電流が約 1.9 倍に増加した。以上のことから、セリンプロテアーゼであるヘプシンがプロスタシンと同様の機序によって ENaC を活性化し、Na 再吸収を亢進させる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Kakizoe, Y., Miyasato, Y., Onoue, T., Nakagawa, T., Hayata, M., Uchimura, K., Morinaga, J., Mizumoto, T., Adachi, M., Miyoshi, T., Sakai, Y., Tomita, K., Mukoyama, M., Kitamura, K. A serine protease inhibitor attenuates aldosterone-induced kidney injuries via the suppression of plasmin activity. *J Pharmacol Sci.* 132 (2):145-53, 2016. 査読有。
2. Narita, Y., Ueda, M., Uchimura, K., Kakizoe, Y., Miyasato, Y., Mizumoto, T., Morinaga, J., Hayata, M., Nakagawa, T., Adachi, M., Miyoshi, T., Sakai, Y., Kadowaki, D., Hirata, S., Mukoyama, M., Kitamura, K. Combination therapy with renin-angiotensin-aldosterone system inhibitor telmisartan and serine protease inhibitor camostat mesilate provides further renoprotection in a rat chronic kidney disease model. *J Pharmacol Sci.* 130(2):110-6, 2016. 査読有。
3. Ueda, M., Uchimura, K., Narita, Y., Miyasato, Y., Mizumoto, T., Morinaga, J., Hayata, M., Kakizoe, Y., Adachi, M., Miyoshi, T., Shiraiishi, N., Kadowaki, D., Sakai, Y., Mukoyama, M., Kitamura, K. The serine protease inhibitor camostat mesilate attenuates the progression of chronic kidney disease through its antioxidant effects. *Nephron.* 129(3):223-32, 2015. 査読有。

[学会発表](計 5 件)

1. 食塩感受性高血圧における糸球体障害を誘導するセリンプロテアーゼについての検討 岩田康伸, 中川輝政, 柿添豊, 泉裕一郎, 桑原孝成, 安達政隆他 第 40 回日本高血圧学会総会、2017 年 10 月 20 日、ひめぎんホール(愛媛県松山市)
2. 食塩感受性高血圧における糸球体障害へのセリンプロテアーゼ阻害薬の効果の検討 岩田康伸, 中川輝政, 柿添豊, 泉裕一郎, 桑原孝成, 安達政隆, 向山政志 第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017 年 5 月 26 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

3. セリンプロテアーゼ阻害薬による水利尿効果の検討 柿添豊, 中川輝政, 宮里賢和, 泉裕一郎, 桑原孝成, 安達政隆他 第 39 回日本高血圧学会総会、2016 年 10 月 1 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)
4. ドキシサイクリンによるシスプラチン腎症抑制機序の検討 中川輝政, 柿添豊, 末永尚輝, 成田勇樹, 宮里賢和, 水本輝彦, 早田学, 泉裕一郎, 桑原孝成, 實吉拓, 安達政隆他 第 59 回日本腎臓学会学術総会、2016 年 6 月 19 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
5. セリンプロテアーゼ阻害薬および RAS 阻害薬の併用療法による CKD 新規治療戦略の検討 成田勇樹, 植田美紀, 内村幸平, 柿添豊, 水本輝彦, 宮里賢和, 森永潤, 早田学, 中川輝政, 實吉拓, 安達政隆他 第 38 回日本高血圧学会総会、2015 年 10 月 9 日、ひめぎんホール(愛媛県松山市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kumadai-nephrology.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 政隆 (ADACHI, Masataka)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90398206

(2) 研究分担者

向山 政志 (MUKOYAMA, Masashi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号: 40270558