

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19460

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームによる腎障害におけるプロテアーゼの機能解明と治療応用

研究課題名(英文)Functional elucidation and therapeutic application of protease in kidney injury by metabolic syndrome

研究代表者

水本 輝彦 (Mizumoto, Teruhiko)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80749193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームラットに対して高塩食を摂取させることで尿蛋白が著明に増加した。セリンプロテアーゼ阻害薬であるメシル酸カモスタットは同等の降圧作用を持つヒドララジンと比較して尿蛋白を改善することを示した。高塩食摂取によるミネラルコルチコイド受容体の活性化を介した糸球体上皮細胞のアポトーシスを阻害することで尿蛋白を改善させていることを示唆した。メシル酸カモスタットは降圧効果を超えた抗尿蛋白作用を示した。

研究成果の概要(英文)：Severe proteinuria observed in the High salt group were substantially attenuated by both Camostat and Hydralazine. The reduction levels in BP were comparable, but the anti-proteinuric effect of camostat was much greater than that of Hydralazine. High salt diet induced apoptosis of glomerular epithelial cells through activation of mineralocorticoid receptor. This study suggested that serine protease inhibitor attenuates apoptosis of glomerular epithelial cells and improves urinary protein. Taken together, camostat showed an anti-proteinuric effect by defending podocyte from apoptosis beyond its anti-hypertensive action.

研究分野：腎臓内科

キーワード：尿蛋白 メタボリックシンドローム セリンプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

日本では成人の 8 人に 1 人は慢性腎臓病 (CKD) が存在し、平成 25 年度末には透析患者は 31 万人を超えている。メタボリックシンドローム (MetS) は肥満、高血圧、高脂血症、耐糖能異常からなる病態で、MetS を背景に糖尿病性腎症、腎硬化症、肥満腎症から CKD を発症することが知られており、MetS の構成因子は各々が CKD の進展の独立した因子である。本邦においても戦後の食生活欧米化により MetS の有病率は著明に増加しており、これに伴う CKD 患者が今後も増加することは容易に想定される。

近年、非感染性の慢性炎症 (自然炎症) はガン、自己免疫疾患など現代病の病態に重要であることが明らかとなっており、肥満・MetS など生活習慣病もその典型例である。最近我々はセリンプロテアーゼであるプロスタシンが自然炎症の主要なコンポーネントの一つである TLR4 の発現量を規定することで肝臓の慢性炎症を介した耐糖能異常に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

メシル酸カモスタット (CM) は経口投与可能な合成セリンプロテアーゼ阻害薬であり、日本国内において臨床使用されている薬剤で、CM はトリプシン・カリクレイン・プラスミン・トロンピン・補体成分 C1r・C1 エステラーゼを含む広範囲のセリンプロテアーゼを阻害する。臨床的には CM 投与した IgA 腎症、膜性腎症など複数の疾患によるネフローゼ患者において、蛋白尿が減少したことが報告されている。我々の教室ではこれまでに、高食塩負荷したダール食塩感受性ラットにおいて、CM がナトリウム利尿を介した腎保護効果を示すことを報告している。さらに 5/6 腎摘 (Nx) CKD モデルラットに CM を投与する事によって、CM がポドサイト (糸球体上皮細胞) 保護作用、抗炎症作用、抗酸化ストレス作用を発揮し、血清クレアチニン値の上昇お

よび糸球体硬化と肥大を抑制して、CKD の腎障害進行を遅らせる効果を持つことを報告した。

2. 研究の目的

本研究の目的は MetS に伴う腎障害進展機序におけるセリンプロテアーゼの役割および阻害薬の効果を検討、さらには本病態に関わるセリンプロテアーゼ群を網羅的に探索することで新規創薬への可能性を探る事である。

3. 研究の方法

(1) セリンプロテアーゼが MetS に伴う腎障害進展に果たす役割の検討

肥満高血圧ラットである 13 週齢の雄性 SHR/ND mcr-cp ラットを 通常食群、高塩食群、高塩食 + CM 投与群 (20mg/day)、高塩食 + ヒドララジン (Hyd) 投与群の 4 群に分けて検討する。申請者はすでに本モデルにおいて CM が同等の降圧作用をもつ Hyd 投与群との比較で尿蛋白・糸球体硬化を有意に改善すると同時に、Tunel 染色および WT-1 染色で評価したアポトーシス増加やポドサイト数の減少を CM が改善することを確認していた。そこで腎組織像を検討し、real-time PCR や Western Blotting (WB)、免疫染色を用いて、蛋白尿発症におけるセリンプロテアーゼの関与を明らかにしていく。

(2) MetS モデルにおけるセリンプロテアーゼ群の同定

腎組織切片からレーザーマイクロダイセクション法によって糸球体領域を単離する。UV レーザーにより組織を切り抜き、バッファーで満たしたキャップ内に組織を回収する。回収した細胞を超音波破砕機によって破碎し、タンパク質を可溶化した後にトリプシン消化を行う。

次に、生成されたペプチド混合物を HPLC にかけて各ペプチドへ分離し、MS/MS 解析によって 通常食群から 高塩食群で大きく変化し 高塩食 + CM 投与群でさらに変化するセリンプロテアーゼ群を同定する。

(3) MetS モデルにおけるセリンプロテアーゼ

群の関与の検証

特異的セリンプロテアーゼ阻害薬を用いた検討

同定したセリンプロテアーゼに特異的な阻害薬を入手後、Metsによる腎障害ラットに投与し、血圧・タンパク尿・腎組織障害・Real-time PCRやWestern Blottingで確認される腎障害マーカーの変化などに与える影響を検討する。

遺伝子改変マウスを用いた検討

前半の計画で探索するMets関連腎症の病態に関わるセリンプロテアーゼの欠損マウスを作成し、上記と同様にその役割を個体レベルで検討する。実際申請者はすでにセリンプロテアーゼの一つであるプロスタシンの臓器特異的欠損マウスを作成、利用した経験を持ち合わせている(Mizumoto T et al. Nat Commun 2014)。

当該セリンプロテアーゼを中心としたプロテアーゼカスケードの関与の検討

セリンプロテアーゼは多くの場合、一連の活性化カスケードを形成して生理学的役割を担うことが知られている。そこで、当該セリンプロテアーゼの上流および下流に位置するプロテアーゼについて、Metsによる腎障害ラットにおける活性測定や発現調節を検討する。同時に、当該セリンプロテアーゼのserpinが明らかかな場合はそのserpinの発現状況についても検討を加える。また、あるセリンプロテアーゼのKOマウスの腎組織で、他のセリンプロテアーゼにどのようなフィードバックが誘導されるかを順に検討することで、当該セリンプロテアーゼ群がどのようなカスケードを形成し腎障害を進展させるかを解明する。(4)セリンプロテアーゼによる組織障害の機序についての検討

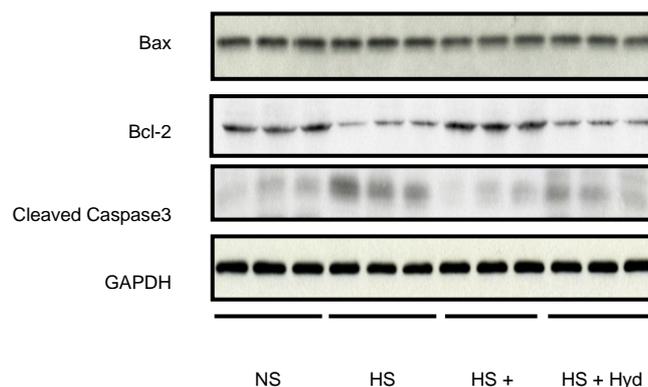
腎臓の培養細胞を用いた研究

同定したセリンプロテアーゼ群による腎組織障害誘導の機序解明のために培養細胞を用いた実験を行う。培養マウスポドサイトはすでに入手済みであるため、当該セリンプロテアーゼを投与し細胞内シグナル伝達の変化、酸化ストレス産生やアポトーシス等の細胞障害性変化を観察する。これまでに一部のセリンプロテアーゼがTGF- β の活性化や、MCP-1の活性化、およびPAR-1(protease activated receptor-1)を介したMAPキナーゼの活性化により細胞・組織障害を誘導する

ことが報告されているため、まずこれらの変化を確認する。これまで、Metsによる腎障害に対してセリンプロテアーゼ阻害薬は特に尿蛋白抑制効果が強いことを確認しており、降圧非依存的な糸球体保護効果があると考えられる。in situ Zymographyにより糸球体におけるセリンプロテアーゼの活性亢進を確認できたら、まず培養糸球体上皮細胞とメサンギウム細胞に精製した当該セリンプロテアーゼを投与し観察を行う。

4. 研究成果

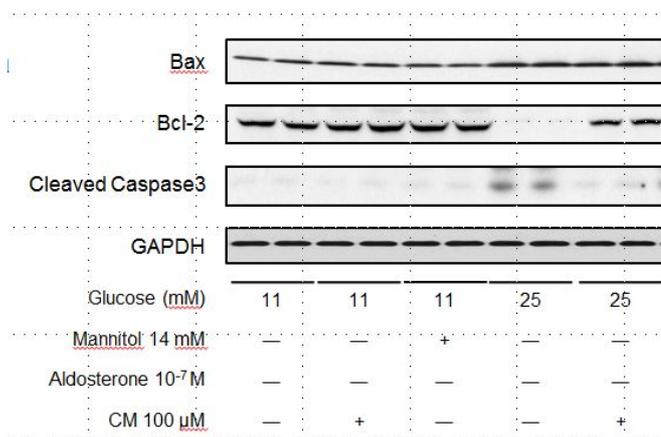
肥満高血圧ラットである13週齢の雄性SHR/ND mcr-cpラットを通常食群、高塩食群、高塩食+CM投与群(20mg/day)、高塩食+ヒドララジン(Hyd)投与群の4群に分け、4週間後、屠殺し、腎臓の検体を採取した。前検討でポドサイトのアポトーシスを阻害することで腎障害を改善することを示していたため、アポトーシスに関わる蛋白質について検討した。活性化されたCaspase3が高塩食で増加し、CMで改善することを見出した。CMは同等の降圧効果のあるHydよりも抗apoptosis蛋白であるBcl-2は高塩食で減少し、CMで改善した。Hydでは改善しなかった。



5/6腎摘におけるSP群の同定を行った。5/6腎摘ラットにおいてCMが尿蛋白を減少させることを確認した。糸球体をレーザーマイクロダイセクションで単離し、トリプシンで溶解し、MS/MS解析を行った。

しかし、注目すべき分子は認めなかった。ミラルコルチコイド受容体(MR)のシグナル

分子である SGK1 は既報通りアルドステロンが減少しているにもかかわらず高塩食で増加し、CM、Hyd はあまり影響を与えなかった。そこで in vitro の系で MR を刺激し、そのシグナルを検討することとした。マウスポドサイトである MPC-5 にアルドステロンを投与し、CM の有無での効果を検討したところ、アルドステロンで Bcl-2 が減少し、CM で改善した。その結果としてアルドステロンで活性化 Caspase3 が CM で減少していた。



CM は高塩食による MR シグナルの下流を阻害し、ポドサイトのアポトーシスを改善させることで、尿蛋白を減少させていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[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. 2016;132:145-153.

査読あり

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. 2016;130:110-6

査読あり

3.Ueda M, Uchimura K, Narita Y, Miyasato Y, Mizumoto T, Morinaga J, Hayata M, Kakizoe Y, Adachi M, Miyoshi T, Shiraishi 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. 2015;129(3):232

査読あり

[学会発表](計0件)

特になし

[図書](計0件)

特になし

[産業財産権]

特になし

出願状況(計0件)

特になし

取得状況(計0件)

特になし

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

水本 輝彦 (Mizumoto Teruhiko)

熊本大学医学部附属病院 特任助教

研究者番号 : 80749193