

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09705

研究課題名(和文) セリンプロテアーゼによる糸球体障害の分子機序解明ならびに新規CKD治療法への応用

研究課題名(英文) The evaluation of molecular mechanism of glomerular injuries by serine proteases and its therapeutic application for CKD.

研究代表者

柿添 豊 (Kakizoe, Yutaka)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：70583037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では慢性腎臓病の進行抑制のため、酵素の1種であるセリンプロテアーゼ(SP)と標的とした治療法開発を目標とした。メタボリック症候群や食塩感受性高血圧モデルラットでは尿中および糸球体のプラスミン活性化を認め、それに伴い尿蛋白増加や糸球体細胞のアポトーシスを認めた。合成セリンプロテアーゼ阻害薬メシル酸カモスタットやプラスミン阻害薬は糸球体障害・蛋白尿を抑制した。SP阻害薬は糸球体障害・尿蛋白を伴うCKDにおいて新しい治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では成人人口のおよそ8人に1人が慢性腎臓病(CKD)患者と推定され、透析患者に至っては2016年度末に32万人を超えており、医療経済の面からも大きな社会問題である。本研究では酵素の1種であるセリンプロテアーゼ(SP)を標的としたCKD治療法の開発を目的とした。メタボリック症候群や食塩感受性高血圧モデル動物にSP阻害薬を投与すると、糸球体障害・蛋白尿が著明に軽減した。SPを標的とした治療法がCKD進行抑制に有用である可能性が示唆され、社会的にも重要な研究であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that serine proteases were involved in the pathogenesis of chronic kidney disease (CKD) and SP inhibitor (SPI) could have renoprotective effects. We conducted this study to identify serine proteases (SPs) which could be associated with glomerular injuries and to explore therapeutic effects of SP inhibition on glomerular injuries in CKD model rats. Urinary plasmin activity and glomerular plasmin were increased in CKD model rats accompanied by massive urinary protein, glomerular sclerosis, and glomerular apoptotic cells. The administration of serine protease inhibitors mitigated those changes. Our study suggests that SP inhibition could be a new strategy for the treatment of CKD with glomerular injury/proteinuria.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：セリンプロテアーゼ プラスミン ポドサイト 慢性腎臓病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本では成人人口のおよそ 8 人に 1 人が慢性腎臓病(CKD)患者と推定され、透析患者に至っては 2016 年度末に 32 万人を超えており、医療経済の面からも大きな社会問題となっている。CKD 進行抑制のため降圧・尿蛋白減少効果を有するレニン・アンジオテンシン(RA)系阻害薬を主体とした腎保護療法が行われているが、未だ十分な成績とは言えない。当教室ではこれまでに腎臓でのセリンプロテアーゼ(SP)の生理学・病態生理学的役割を *in vitro*、*in vivo* で解明した。ラット腎臓 cDNA ライブラリーより GPI アンカー型/分泌型 SP であるプロスタシンを単離し、プロスタシンが集合尿管で上皮型 Na チャネル(ENaC)を活性化すること(Adachi et al. *J. Am. Soc. Nephrol* 2001)、アルドステロンはプロスタシンの発現を誘導すること(Narikio et al. *J. Clin. Invest* 2002)を報告した。申請者は食塩感受性高血圧モデルである Dahl ラットでプロスタシンによる ENaC 活性化により血圧が上昇し (Kakizoe et al. *J Hypertens* 2009)、プロスタシンを抑制する合成 SP 阻害薬(SPI)は Dahl ラットの高血圧と腎障害を著明に抑制すること(Kakizoe et al. *J Hypertens* 2009)、さらに SPI はアルドステロンによるプロスタシンを介した ENaC の切断・活性化を抑制することを報告し(Kakizoe et al. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012)、SP による高血圧発症機序と、SPI による降圧治療の可能性を報告した。さらに SP 阻害薬は 5/6 腎摘出 CKD モデルラットや(Hayata, Kakizoe et al. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012)、一側尿管結紮腎線維化モデルラット(Morinaga, Kakizoe et al. *Am J Physiol Renal Physiol* 2013)、アデニン負荷 CKD ラット(Ueda, Kakizoe et al. *Nephron* 2015)において抗炎症・線維化・酸化ストレス作用により腎障害軽減すること、これらの作用は RA 系阻害薬の腎保護効果を増強すること(Narita, Kakizoe et al. *J Pharmacol sci* 2016)を報告した。さらに、アルドステロンと食塩による腎間質線維化に SP・プラスミンの腎組織内での活性化が重要であり、SPI が腎線維化を抑制することを報告した (Kakizoe et al. *J Pharmacol sci* 2016)。これまで、腎疾患モデルにおける SPI の尿蛋白減少効果を確認していたが、糸球体障害を誘導する SP は不明であり、未解決な問題として残されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで申請者が継続してきた SP による高血圧・腎障害進展の機序解明をさらに発展させ、CKD における糸球体障害進展に關与する SP を尿中より同定し、SP によるポドサイト傷害を介した CKD 進行機序を解明するとともに、SP 阻害薬が CKD の新規治療薬となりうる可能性を検討することである。

3. 研究の方法

(1) CKDモデルラット(メタボリック症候群(Mets)モデルラット)における尿中SPの評価とSPIの降圧・腎保護効果の検討

13 週齢雄の SHR/ND mcr-cp を通常食塩群(0.3%NaCl 食、NS、n=6)、高食塩群(8.0%NaCl 食、HS、n=8)、高食塩 + SPI 群(メシル酸カモスタット持続皮下投与、HS+CM、n=8)に分け、週 1 回血圧測定(tail cuff)と 24 時間蓄尿を行い、4 週間飼育後 sacrifice した。CM の降圧および尿中電解質変化、尿中 SP 活性変化、糖・脂質代謝の変化、腎組織障害に及ぼす効果を検討した。尿中 SP 活性は SP 特異的な合成基質(QAR-MCA; N-t-Boc-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-methylcoumarin)を用いた Double Layer Fluorescent Zymography 法(DLFZ)で評価した[1]。腎組織の PAS 染色を行い糸球体の組織学的変化を評価した。また糸球体内のアポトーシス細胞の評価のため TUNEL 染色を行い、腎皮質抽出蛋白を用いて Western Blotting によりアポトーシス関連分子である cleaved caspase-3 の蛋白発現を評価した。

(2) 糸球体障害を誘導するCKDモデルラットの尿中SPの探索・同定

4週齢の Dahl 食塩感受性ラット (DS ラット) に 0.3%NaCl 食(NS)、8.0%NaCl 食(HS)、HS+SPI 群 (メシル酸カモスタット混餌、HS+CM)を開始し、蓄尿と血圧測定(tail cuff)を行った。CM の血圧非依存的な効果を検討するため、血圧に差がつく前の早期(7日目)に sacrifice した。DLFZ で尿中の SP 活性を確認した後、同じゲルを用いて Western blotting を施行し SP の同定を行った。PAS 染色で腎臓の組織学的変化を評価し、また、SP の腎臓での局在と CM による変化を確認するため腎組織の免疫染色を行った。

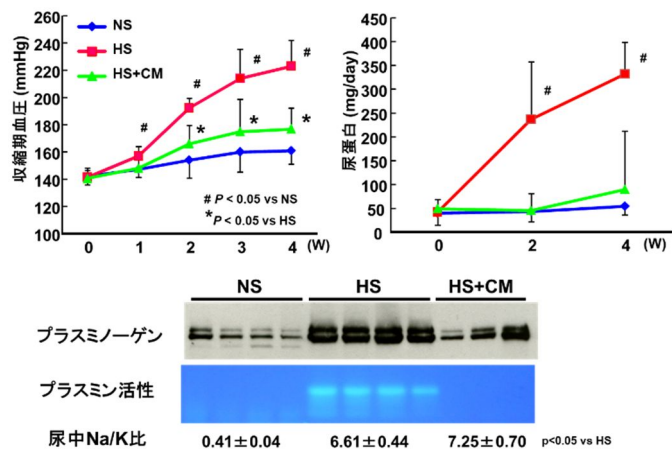


図1. MetSモデルラットにおけるSPIの効果

(3) プラスミン特異的阻害薬 YO-2 の腎保護効果の検討

糸球体障害へのプラスミンの関与を調べるため、神戸薬科大学津田裕子教授よりプラスミン特異的阻害薬 YO-2 を分与して頂いた[2]。4週齢の Dahl 食塩感受性ラットに 0.3%NaCl 食(NS)、8.0%NaCl 食(HS)、HS+YO-2(4mg/kg 腹腔内投与)を開始し、24時間蓄尿と血圧測定(tail cuff)を行った。

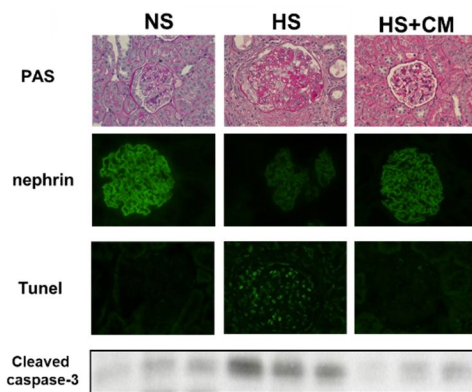


図2. MetSモデルラットにおけるSPIの糸球体保護・アポトーシス抑制効果

4. 研究成果

(1) 食塩負荷 SHR/ND(HS 群)は 4週後には著明な高血圧、蛋白尿と糸球体障害を認めた。HS+CM 群では有意な降圧効果と尿中 Na/K 比の上昇を認め、これまでの当教室からの報告と同様に、CM が ENaC を抑制していると考えられた。尿蛋白減少効果は降圧効果と比較してより強力であり、CM の降圧非依存的な腎保護効果が示唆された(図 1)。

DLFZ で尿中の SP を評価すると、約 80kDa 付近に著明に活性が亢進した SP を認めた。分子量、および基質への反応性、これまでの検討結果よりこの SP がプラスミンである可能性が高いと考えた(図 1)。抗プラスミノゲン抗体を用いた Western blotting では HS 群で尿中プラスミノゲンの増加を認め、HS+CM 群では抑制されていた。近年、糸球体から漏出したプラスミンが酸化ストレス等を介して podocyte 傷害を誘導することが報告されており[3]、抗プラスミン作用をもつ CM を投与すると、プラスミン活性抑制、蛋白尿・糸球体障害の軽減を認めた。CM は食塩負荷により亢進した糸球体硬化、糸球体内アポトーシス細胞の増加や cleaved caspase-3 の蛋白発現亢進を有意に抑制した(図 2)。CM は糖代謝や脂肪細胞のアディポサイトカイン発現には影響を及ぼさなかった。

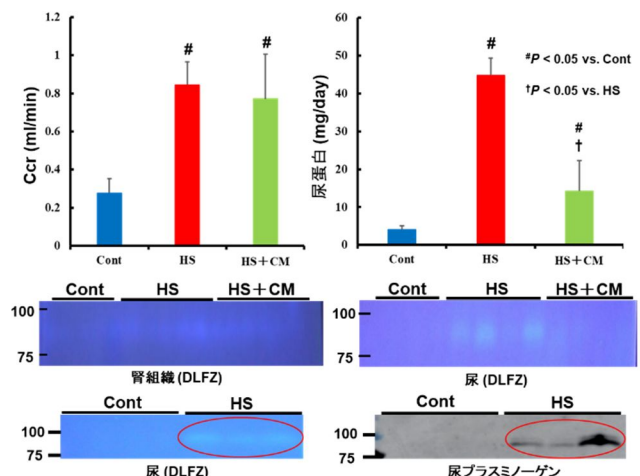


図3. DahlラットにおけるSPIの尿蛋白減少・尿中プラスミン抑制効果

(2) DS ラットを用いて、食塩負荷早期のプラスミン活性を評価した。食塩負荷 1週の

時点では、糸球体過剰を反映しクレアチンクリアランス(Ccr)の上昇と尿蛋白増加、尿プラスミン活性の亢進を認めた。腎抽出蛋白を用いたDLFZではプラスミンの活性化は認めなかった。CMを投与すると、Ccrには変化を認めなかったが、尿中プラスミン活性の抑制と、尿蛋白の減少を認めた(図3)。PAS染色では食塩負荷早期であり、3群間で糸球体の形態に明らかな差は認めなかったが、プラスミン/プラスミノゲンの免疫染色では、食塩負荷により糸球体表面にプラスミン/プラスミノゲンが存在しており、CMは糸球体のプラスミン/プラスミノゲン付着を抑制していた(図4)。このことからCKDではプラスミンが血行動態非依存的に糸球体障害を誘導していることが示唆された。

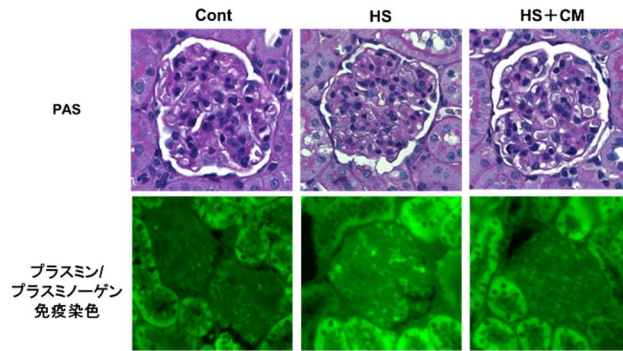


図4. DahlラットにおけるSPIの糸球体プラスミン接着抑制効果

(3) CMは複数のSPを幅広く抑制するため、上記の糸球体保護効果がプラスミンを抑制した効果であるかを検討するため、プラスミン特異的阻害薬(YO-2)を食塩負荷DSラットに投与した。結果はCMと同様に、尿蛋白減少を認めた(図5)。

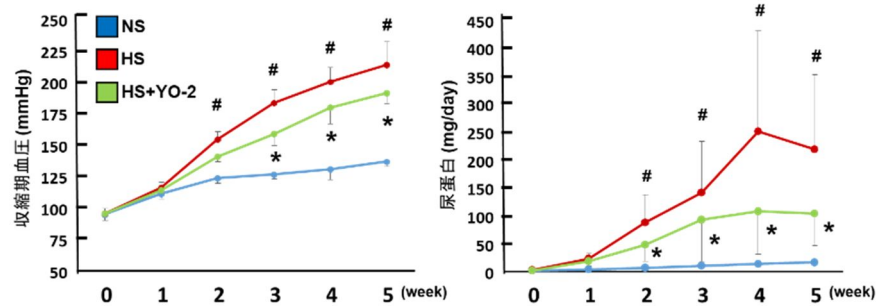


図5. DahlラットにおけるYO-2の効果

以上の結果から、糸球体障害・CKDの進行にプラスミンを主としたSPが増悪因子として働いており、SPを標的とした新たなCKD治療薬の可能性が示唆された。

参考文献

1. Katunuma, N., et al., *Double-layer fluorescent zymography for processing protease detection*. Anal Biochem, 2005. **347**(2): p. 208-12.
2. Okada, Y., et al., *Development of potent and selective plasmin and plasma kallikrein inhibitors and studies on the structure-activity relationship*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2000. **48**(12): p. 1964-72.
3. Raij, L., et al., *Podocyte injury: the role of proteinuria, urinary plasminogen, and oxidative stress*. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **311**(6): p. F1308-F1317.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Eguchi K, Izumi Y, Nakayama Y, Inoue H, Marume T, Matsuo N, Hiramatsu A, Ono M, Kakizoe Y, Kuwabara T, Nonoguchi H, Mukoyama M	4. 巻 in press
2. 論文標題 Insufficiency of urinary acid excretion of overweight or obese patients with chronic kidney disease and its involvement with renal tubular injury.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nephrology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nep.13553.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa T, Kakizoe Y, Iwata Y, Miyasato Y, Mizumoto T, Adachi M, Izumi Y, Kuwabara T, Suenaga N, Narita Y, Jono H, Saito H, Kitamura K, Mukoyama M	4. 巻 315
2. 論文標題 Doxycycline attenuates cisplatin-induced acute kidney injury through pleiotropic effects	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Physiol Renal Physiol	6. 最初と最後の頁 1347-1357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00648.2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Miyasato Y, Yoshizawa T, Sato Y, Nakagawa T, Miyasato Y, Kakizoe Y, Kuwabara T, Adachi M, Ianni A, Braun T, Komohara Y, Mukoyama M, Yamagata K	4. 巻 8
2. 論文標題 Sirtuin 7 Deficiency Ameliorates Cisplatin-induced Acute Kidney Injury Through Regulation of the Inflammatory Response.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 5927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24257-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi E, Yoshikawa K, Nakaya I, Kato K, Miyasato Y, Nakagawa T, Kakizoe Y, Mukoyama M, Soma J.	4. 巻 19
2. 論文標題 Liddle's-like syndrome associated with nephrotic syndrome secondary to membranous nephropathy: the first case report.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Nephrol.	6. 最初と最後の頁 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-018-0916-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyasato Y, Yoshizawa T, Sato Y, Nakagawa T, Miyasato Y, Kakizoe Y, Kuwabara T, Adachi M, Ianni A, Braun T, Komohara Y, Mukoyama M, Yamagata K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Sirtuin 7 Deficiency Ameliorates Cisplatin-induced Acute Kidney Injury Through Regulation of the Inflammatory Response.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 5927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24257-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Izumi Y, Inoue H, Nakayama Y, Eguchi K, Yasuoka Y, Matsuo N, Nonoguchi H, Kakizoe Y, Kuwabara T, Mukoyama M.	4. 巻 12
2. 論文標題 TSS-Seq analysis of low pH-induced gene expression in intercalated cells in the renal collecting duct.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0184185.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0184185.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Iwata Y, Kakizoe Y, Nakagawa T, Izumi Y, Kuwabara T, Adachi M, Kitamura K, Mukoyama M
2. 発表標題 Serine protease inhibition attenuates glomerular injuries in salt-sensitive hypertension
3. 学会等名 International Society of Hypertension 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩田 康伸、柿添 豊、中川 輝政、泉 裕一郎、栗原 孝成、安達 政隆、北村 健一郎、向山 政志
2. 発表標題 食塩感受性高血圧におけるセリンプロテアーゼ阻害薬の尿蛋白抑制効果の検討
3. 学会等名 第22回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	鄧 欽元、柿添 豊、岩田 康伸、中川 輝政、安達 政隆、泉 裕一郎、柴原 孝成、北村 健一郎、向山 政志
2. 発表標題	食塩感受性高血圧ラットにおけるアミロライドの腎組織中プラスミン抑制による降圧非依存的な腎保護効果
3. 学会等名	第54回高血圧関連疾患モデル学会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	水本 輝彦、柿添 豊、中川 輝政、宮里 賢和、岩田 康伸、安達 政隆、泉 裕一郎、柴原 孝成、北村 健一郎、向山 政志
2. 発表標題	メタボリックシンドロームラットにおけるセリンプロテアーゼ阻害薬の降圧およびポドサイト保護効果
3. 学会等名	第54回高血圧関連疾患モデル学会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	柿添 豊、北村健一郎
2. 発表標題	プロスタシンによる生活習慣病発症の分子機序
3. 学会等名	第23回日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Yasunobu Iwata, Yutaka Kakizoe, Terumasa Nakagawa, Yuichiro Izumi, Takashige Kuwabara, Masataka Adachi, Kenichiro Kitamura and Masashi Mukoyama
2. 発表標題	The effect of serine protease inhibition on glomerular injuries in salt-sensitive hypertension
3. 学会等名	アメリカ腎臓学会 Renal Week 2017 (国際学会)
4. 発表年	2017年～2018年

1. 発表者名 岩田康伸 中川輝政 柿添豊 泉裕一郎 柴原孝成 安達政隆 向山政志
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第60回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Yasunobu Iwata, Yutaka Kakizoe, Terumasa Nakagawa, Yuichiro Izumi, Takashige Kuwabara, Masataka Adachi, Kenichiro Kitamura and Masashi Mukoyama
2. 発表標題 The role of serine proteases on glomerular injuries in salt-sensitive hypertension
3. 学会等名 ISN (International Society of Nephrology) Frontiers Meetings 2018 (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	安達 政隆 (Adachi Masataka)		
研究協力者	中川 輝政 (Nakagawa Terumasa)		
研究協力者	岩田 康伸 (Iwata Yasunobu)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	鄧 欽元 (Tou Shingen)		