

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15993

研究課題名(和文) プロテアーゼ活性化受容体2によるオートファジー制御と慢性腎臓病合併心血管病

研究課題名(英文) The role of PAR2 and autophagy in CKD-related atherosclerosis

研究代表者

大江 佑治 (Oe, Yuji)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：00791980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は凝固因子やプロテアーゼ活性化受容体2(PAR2)の慢性腎臓病関連動脈硬化症における役割を明らかにすることを目的とする。アデニン腎症と高リン食を組み合わせモデルマウスの大動脈石灰化や炎症性サイトカイン、autophagyマーカーを解析したもののPAR2欠損により変化しなかった。内皮障害は血液凝固を亢進させる。そこで内皮障害を背景に重症化する血管石灰化モデルを作成するため、内皮型一酸化窒素合成酵素欠損(eNOS)マウスとアデニン+高リン食を組み合わせ新たな疾患モデルを作成した。eNOS欠損により大動脈や腎におけるカルシウム沈着が悪化し、それらと炎症や血液凝固、酸化ストレスが関連していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

当初予定していた実験ツールでは、血液凝固やPAR2が動脈硬化に与える影響を証明できなかったが、内皮障害を背景に血管石灰化や凝固や炎症が増悪する実験モデルを新たに構築した。今後このモデルを応用して、血液凝固関連因子やPAR, Autophagyの役割を検討することを予定している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the roles of coagulation factors and protease-activated receptor 2 (PAR2) in chronic kidney disease-related atherosclerosis, and the analysis was conducted using animal models. We combined adenine-induced nephropathy with a high phosphorus diet and found no changes in aortic calcification, inflammatory cytokines or autophagy markers due to PAR2 deficiency. Endothelial damage increases coagulation abnormality. To create a model of severe vascular calcification with a background of endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide synthase deficient (eNOS) mice were fed with an adenine plus high phosphorus diet. eNOS deficiency exacerbated calcium deposition in the aorta and kidney, which was associated with inflammation, coagulation, and oxidative stress.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：血液凝固 血管石灰化 ウレミックトキシン 酸化ストレス 炎症

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む本邦において慢性腎臓病・透析導入患者は増加の一途にある。慢性腎臓病は強力な心血管イベントのリスク因子であることが明らかにされており、腎機能(eGFR)が低いほど、アルブミン尿・蛋白尿が高度であるほどそのリスクが高まることが報告されている。CKD 患者の予後、QOL 悪化の一因となっていることからその予防法開発が求められている。

CKD 特有の血管障害としてカルシウム/リン代謝異常による血管石灰化が挙げられるが、その病態は十分に解明されていない。申請者はCKDにおいて血液凝固が活性化していることに着目し、血液凝固因子の標的受容体であるプロテアーゼ活性化受容体 2(protease activated receptor 2; PAR2)がCKDの増悪因子であることを明らかにしてきた。

PAR2の作用機序は多彩であり、NF- $\kappa$ B 経路や MAPK 経路を活性化してサイトカインなどの炎症線維化誘導因子の発現を上昇させる。さらに PAR2 が Autophagy を抑制して臓器障害を引き起こすことも報告されている。

## 2. 研究の目的

PAR2 抑制が CKD 関連動脈硬化改善させる新たな治療標的になるか、特に Autophagy の役割に着目して明らかにする。

## 3. 研究の方法

慢性腎臓病関連血管石灰化、動脈硬化モデルを用いて PAR2 欠損による治療効果を明らかにする。培養細胞の検討からウレミックトキシンが凝固関連因子に与える影響や PAR2 アゴニストが血管石灰化誘導因子発現に与える効果を検証した。

## 4. 研究成果

### (1) 血管石灰化モデルにおける PAR2 の役割

#### ・アデニン腎症モデルの検討

CKD 関連動脈硬化、石灰化を評価するためにアデニン腎症と高リン食を組み合わせたモデル動物が汎用されている。本検討では PAR2 の役割を明らかにするため PAR2(F2rl1)欠損マウスを使用した。10-14 週齢の野生型と PAR2 欠損マウスに 0.2-0.25% アデニン食と 1.8% 高リン食を組み合わせた飼料を 3-4 週間投与し、サンプルを回収した。解剖後に採取した大動脈や腎臓における臓器カルシウム沈着量を評価したが、PAR2 欠損による変化を認めなかった。

### (2) 培養実験を用いた凝固-PAR2 と血管石灰化関連因子発現

慢性腎臓病で蓄積する尿毒素(ウレミックトキシン)が血液凝固を活性化することが報告されている。そこで種々の細胞株(内皮細胞株や単球細胞株、平滑筋細胞株)を用いて、尿毒素による凝固因子や PAR2 発現の変化を評価した。インドール化合物(インドキシル硫酸、インドール 3 酢酸)を培地に添加して、凝固因子の発現を定量 PCR 法で測定したところ、凝固組織因子や PAI1 発現が上昇した。

続いて PAR2 アゴニストによる血管石灰化マーカー発現を誘導するか評価した。マウス平滑筋細胞に PAR2 アゴニスト(2f-LIGRLO, 10  $\mu$ M)を添加して培養し, 血管石灰化関連マーカーを定量 PCR 法で測定したが, *Runx2* や *Alp1* 遺伝子などの発現は変化しなかった。

### (3) 内皮機能低下による血管石灰化モデルの作成

当初予定していたモデルやツール(実験 1, 2)では血液凝固や PAR2 が血管石灰化に及ぼす影響や Autophagy の役割を明らかにすることができなかった。動物実験で使用した C57BL/6J 系統は石灰化に抵抗性であることが明らかにされており, PAR2 欠損による治療効果が十分に評価できなかった可能性を考えた。そこで内皮障害を背景に重症化する血管石灰化モデルを作成するため, 内皮型一酸化窒素合成酵素欠損(eNOS)マウスとアデニン+高リン食を組み合わせた新たな疾患モデルを作成した。12-14 週齢の eNOS 欠損マウスを使用した。実験的に大動脈や腎におけるカルシウム沈着が悪化し, それらと炎症や血液凝固, 酸化ストレスが関連することを示唆するデータが得られた(図 1)。今後このモデルを応用して, 血液凝固関連因子や PAR, Autophagy の役割を検討することを予定している。

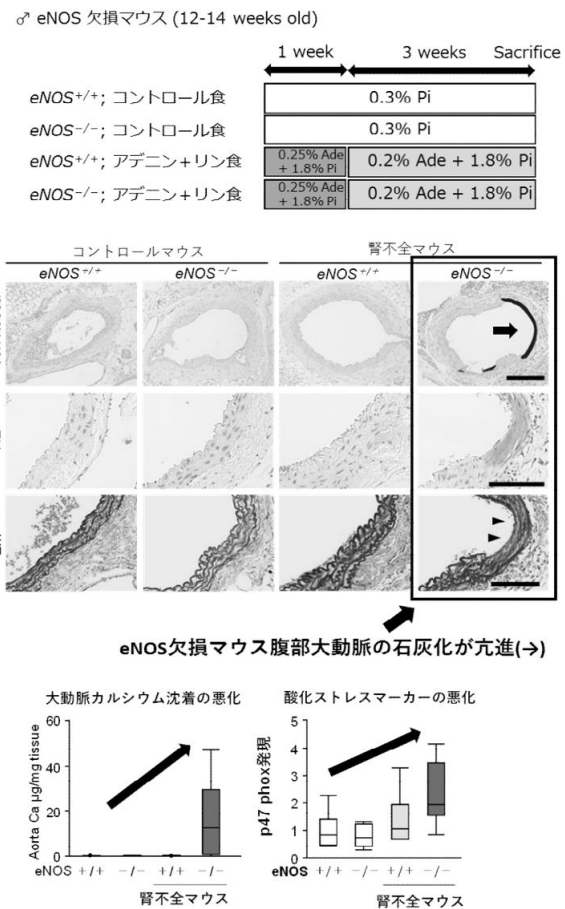


図 1. 内皮障害が血管石灰化を悪化させる

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oe Yuji, Mitsui Shohei, Sato Emiko, Shibata Naoko, Kisu Kiyomi, Sekimoto Akiyo, Miyazaki Mariko, Sato Hiroshi, Ito Sadayoshi, Takahashi Nobuyuki	4. 巻 191
2. 論文標題 Lack of Endothelial Nitric Oxide Synthase Accelerates Ectopic Calcification in Uremic Mice Fed an Adenine and High Phosphorus Diet	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 283 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2020.10.012	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 Mitsui Shohei, Oe Yuji, Sekimoto Akiyo, Sato Emiko, Hashizume Yamato, Yamakage Shu, Kumakura Satoshi, Sato Hiroshi, Ito Sadayoshi, Takahashi Nobuyuki	4. 巻 318
2. 論文標題 Dual blockade of protease-activated receptor 1 and 2 additively ameliorates diabetic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F1067 ~ F1073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00595.2019	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 Oe Yuji, Sato Emiko, Sato Hiroshi, Miyazaki Mariko, Ito Sadayoshi, Takahashi Nobuyuki	4. 巻 186
2. 論文標題 Uremic toxins alter coagulation and fibrinolysis-related genes expression in human endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Thrombosis Research	6. 最初と最後の頁 75 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2019.12.017	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 Oe Yuji, Fushima Tomofumi, Sato Emiko, Sekimoto Akiyo, Kisu Kiyomi, Sato Hiroshi, Sugawara Junichi, Ito Sadayoshi, Takahashi Nobuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Protease-activated receptor 2 protects against VEGF inhibitor-induced glomerular endothelial and podocyte injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39914-8	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 Watanabe Mari, Oe Yuji, Sato Emiko, Sekimoto Akiyo, Sato Hiroshi, Ito Sadayoshi, Takahashi Nobuyuki	4. 巻 316
2. 論文標題 Protease-activated receptor 2 exacerbates cisplatin-induced nephrotoxicity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F654 ~ F659
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00489.2018	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大江佑治、佐藤恵美子、宮崎真理子、岡本好司、佐藤博、伊藤貞嘉、高橋信行
2. 発表標題 内皮型NO合成酵素欠損はCKD関連異所性石灰化を誘導する
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大江 佑治、佐藤 博、宮崎 真理子、伊藤 貞嘉、高橋 信行
2. 発表標題 インドキシル硫酸が凝固・線溶系関連因子発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第64回日本透析医学会学術集会総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------