

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19590958
 研究課題名(和文) プロテアーゼネクシン1による血圧・ナトリウム代謝制御の分子基盤の
 解明および創薬
 研究課題名(英文) The effect of protease nexin 1 on sodium transport and blood pressure
 and application to drug discovery for treatment of hypertension
 研究代表者
 實吉 拓(MIYOSHI TAKU)
 熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教
 研究者番号：80398205

研究成果の概要：

上皮型ナトリウムチャネルの活性化因子であるプロスタシンに対する抑制蛋白であるプロテアーゼネクシン1の腎尿細管細胞におけるナトリウム電流の抑制を確認した。また、プロテアーゼネクシン1欠損マウスに対して高食塩負荷を行いコントロール群に対して高血圧の発症および進展に差異が生じるかを検討したところ、両群に高血圧を発症するものの、その程度には差がなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生理学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：高血圧、プロスタシン、プロテアーゼネクシン1、上皮型ナトリウムチャネル

1. 研究開始当初の背景

腎臓におけるナトリウム代謝は体液の恒常性や血圧をコントロールする上で最も重要な役割を担っている。腎臓におけるナトリウム調節のなかで重要な働きをしているのが上皮型ナトリウムチャネル(ENaC)である。このENaCは遠位及び集合尿細管に分布しており、原発性アルドステロン症やLiddle症候群、ネフローゼ症候群や肝硬変に伴う浮腫

などナトリウム代謝異常や高血圧を引き起こす病態において関与していることが知られている。ENaCの活性はレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系やADHなどのホルモンにより厳密にコントロールされているが、分子生物学的なENaCの活性化機構については未だ不明な点が多い。

1997年にはある種のセリンプロテアーゼがENaCを活性化するという全く新しい機序

による活性調節の報告がなされている。1998年に私たちはラット腎臓よりプロスタシンというセリンプロテアーゼの cDNA クローニングに成功した。プロスタシンは腎尿細管上皮細胞の管腔側に発現し、尿中にも検出されることが分かっている。これらの事実に基づき私たちはプロスタシンが ENaC を活性化するという仮説をたて、アフリカツメガエルの卵母細胞に ENaC とプロスタシンを発現させることにより、プロスタシンが ENaC を活性化することを世界で初めて証明した (J. Am. Soc. Nephrol., 12: 1114-1121, 2001)。

また、私たちはナトリウム代謝を調節するホルモンの中で最も重要なアルドステロンがプロスタシンの発現を調節していることも明らかにしている。アルドステロン投与によりマウス腎尿細管培養細胞では培養上清中にプロスタシンの分泌が増加し、ラットにおいては尿中へのプロスタシン分泌が増加した。さらに原発性アルドステロン症患者の尿中プロスタシンが健常者に比して著増しており、副腎腺腫摘出術により正常化することも世界に先駆けて明らかにしている (J. Clin. Invest., 109: 401-408, 2002)。また、セリンプロテアーゼ阻害剤のメシル酸ナファモスタットがマウス皮質集合尿細管細胞でのプロスタシンの分泌を抑制し、ラットにメシル酸ナファモスタットを持続静注すると、ラット尿中プロスタシン分泌量をほぼ完全に抑制し、尿中ナトリウム排泄量を有意に増加させることを証明した (J. Am. Soc. Nephrol., 14: 11-6, 2002)。さらに、マウス腎尿細管培養細胞の系において TGF- β 1 がプロスタシンの発現を抑制することを示した (Kidney Int. 67: 193-200, 2005)。また、Chao らのグループはアデノウイルスを用いたラットにおけるプロスタシンの過剰発現系において持続した高血圧を認めたと報告

している (Am. J. Physiol. 284: R1031-6, 2003)。以上のようにプロスタシンが Na 代謝調節や高血圧の発症に関与していることが明らかとなってきている。

2. 研究の目的

PN-1 が実際に動物の生体内で血圧やナトリウム代謝に与える影響を明らかにし、PN-1 のリコンビナント蛋白を精製する手法を用いて、これをターゲットにした高血圧治療への応用の可能性を検討することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)まず、培養細胞系において PN-1 がナトリウム輸送に影響を与えるかどうか検討するために、PN-1 の全長 cDNA を発現ベクターに挿入し、M-1 細胞 (マウス集合尿細管細胞由来) にトランスフェクションさせることにより PN-1 遺伝子の一過性過剰発現モデル細胞を作製する。細胞培養上清または細胞膜分画の蛋白を回収し、PN-1 が発現、分泌されていることをウェスタンブロット法を用いて確かめる。細胞をフィルター上に培養し、EVOM (Epithelial volt-ohm meter) を用いて細胞間に流れるナトリウム電流 (I_{eq}) を測定し、PN-1 過剰発現により I_{eq} が減少することを確認する。

(2)PN-1 ホモ欠損マウスは正常マウスと変わりなく生育することが分かっている。これをコントロールマウスと並行して飼育し、経時的に両者の血圧の変化を血圧やナトリウム代謝に与える影響を検討する。高塩食負荷群と低塩食負荷群を置き、食塩感受性高血圧の発症や高血圧進展に差異があるか検討する。また、腎、心の組織や血液検体、尿検体を採取し、プロスタシンや ENaC の各サブユニッ

トの mRNA や蛋白の発現レベルの変化などについても検討する。

(3) PN-1 過剰発現マウスを作製し、PN-1 欠損マウスと同様な検討を行い、評価する。

(4) PN-1 cDNA をバキュロウィルスの DNA と相同配列を持つ発現プラスミドベクターへ挿入する。これをバキュロウィルスゲノム DNA と昆虫培養細胞にコトランスフェクションし相同組み換えを起こすことにより、PN-1 組み換えウィルスを得る。このウィルスを業者に依頼しカイコ蛋白産生系で PN-1 発現蛋白を多量に含んだカイコ体液を得る。この体液をシリカゲル、イオン交換、銅イオン結合キレートカラムなどを担体としたクロマトグラフィーを使用し、最も精製度の高い方法を検討し、十分な量の PN-1 リコンビナント蛋白を得ることができる。

(5) 作製した PN-1 リコンビナント蛋白を試験管内でプロスタシン蛋白と作用させた後、両者の結合が得られるか検討するために電気泳動を行い、ウェスタンブロット法にてバンドのシフトがあることを確認する。また、この条件下で、合成基質である KHYR-AMC を使用して吸光度法によりプロスタシンのプロテアーゼ活性を測定し、これが阻害されていることを確かめる。さらに、フィルター上に培養した M-1 細胞の上皮側や血管側から PN-1 リコンビナント蛋白を作用させ、I_{eq} に影響を及ぼすかどうか検討する。

(6) アデノウィルス系によるプロスタシン過剰発現ラットを使用し、高血圧の発症が抑制できるかを検討する。PN-1 は分子量約 43000 の比較的小分子の蛋白であることから腹腔内投与、またはオスモティックミニポン

プを使用した静脈内持続投与モデルを作製し、経時的に血圧を測定、またメタボリックケージを使用して尿中ナトリウム排泄量などを測定し Na 代謝の変化についても検討する。

また、食塩感受性高血圧モデル動物である Dahl ラットを用いて、高塩食負荷群と低塩食負荷群の二群に分け、PN-1 リコンビナント蛋白を投与し、同様の検討をおこない、食塩感受性高血圧に対する効果を検討する。

(7) 実際に降圧効果を得られたら、PN-1 の最適投与量を決定するため、PN-1 の投与量や頻度の条件を変えて投与し、PN-1 の降圧効果における用量反応曲線を求め、ED₅₀ 値や LD₅₀ 値を得ることができる。

(8) 健常者、および種々の原因の高血圧患者から血液、尿のサンプルを得る。これらの検体の尿中 PN-1 濃度を ELISA 測定系を用いて測定する。また、血液中、尿中の電解質やレニン活性、アルドステロン濃度などの測定を行い、高血圧患者における PN-1 の動態を把握する。これらの検討により、PN-1 が高血圧の診断、発症の予測、病勢のマーカーとなるか検討する。

4 . 研究成果

まず、マウス集合尿管培養細胞において PN-1 遺伝子の過剰発現が、ナトリウム電流を抑制することを示した。すなわち PN-1 により上皮性 ENaC の活性化因子であるプロスタシンが抑制され、ナトリウム電流が低下した可能性が考えられた。

次に、PN-1 ホモ欠損マウスは正常マウスと変わりなく生育し、明らかな形態以上がないことがわかっているが、血圧の変化やナトリウム代謝異常についてはまだ検討されてい

ない。そこでこのマウスに高塩食負荷群と低塩食負荷群をおき、食塩感受性高血圧の発症や高血圧進行の程度に差異があるか検討した。

高食塩食投与前の血圧は両群間に相違を認めなかった。8週間の観察期間で両群において血圧の明らかな上昇を認めたが、両群間に血圧の相違を認めなかった。また、尿中ナトリウム排泄量にも両群間で差を認めなかった。また、両群の腎を摘出しRNA、蛋白を回収した。プロスタシンやENaCのRNAや蛋白発現の比較をreal-time PCR法やウェスタンブロッティング法を用いて行ったが、両群間に相違は認めなかった。

以上のように動物モデルではPN-1の有無により、血圧に差異を認めなかった。

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 2件)

1. Kakizoe Y, Kitamura K, Ko T, Wakida N, Maekawa A, Shiraishi N, Miyoshi T, Adachi M, Zhang Z, Masilamani S, Tomita K. Aberrant ENaC activation in Dahl Salt-Sensitive Rats. J Hypertens. in press (査読あり)
2. Maekawa A, Kakizoe Y, Miyoshi T, Wakida N, Ko T, Shiraishi N, Adachi M, Tomita K, Kitamura K. Camostat mesilate inhibits prostatic activity and reduces blood pressure and renal injury in salt-sensitive hypertension. J Hypertens. 27:181-9. 2009 (査読あり)

〔学会発表〕(計 2件)

1. 柿添豊、前川愛、北村健一郎、脇田直樹、関健博、安達政隆、白石直樹、實吉拓、富田公夫 食塩感受性高血圧に対するセリンプロテアーゼ阻害薬の降圧効果、第12回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2008年11月29日、熊本市国際交流会館
2. 関健博、北村健一郎、脇田直樹、柿添豊、安達政隆、實吉拓、白石直樹、前川愛、有富静、富田公夫、第12回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2008年11月29日、熊本市国際交流会館

6. 研究組織

(1)研究代表者

實吉 拓(MIYOSHI TAKU)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・助教

研究者番号：80398205

(2)研究分担者

(3)連携研究者

富田 公夫(TOMITA KIMIO) (2007年度は研究分担者)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号：40114772