

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08638

研究課題名(和文)多発性嚢胞腎に対するセリンプロテアーゼを標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文)The effects of serine protease inhibition on the polycystic kidney disease

研究代表者

柿添 豊(Kakizoe, Yutaka)

熊本大学・病院・講師

研究者番号：70583037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は透析導入の原疾患の中で長らく第4位(原因不明を除く)を占めている多発性嚢胞腎(PKD)に対して、蛋白分解酵素の1種であるセリンプロテアーゼを標的とした新規治療法の開発を目的として行った。PKDモデルラットは多数の腎嚢胞形成と腎重量の増大、腎機能低下を認め、腎組織中にある種のセリンプロテアーゼ(SP)の活性化を認めた。このSPの阻害薬は嚢胞の増大と腎機能低下を抑制した。さらにSP阻害薬は有効な治療法がない肝嚢胞の増大も抑制した。現時点で未だ治療法が十分でないPKDに対して、SP阻害薬が新たな治療戦略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

主要な透析導入の原疾患の中で、多発性嚢胞腎(PKD)は第4位(原因不明を除く)を占める。常染色体優性PKDに対してはトルバプタンにより腎嚢胞の増大と腎機能低下がある程度抑制できるが、多尿(1日4-5L)となることから、生活の質の低下が問題となる。また、時に肝機能障害を認め治療を中断せざるを得ないこともある。本研究によりPKDモデルラットの腎臓である種のセリンプロテアーゼ(SP)が活性化しており、このSPの阻害薬が嚢胞の増大と腎機能低下を抑制することが判明した。さらにSP阻害薬は現時点で治療法がない肝嚢胞の増大も抑制した。SP阻害薬がPKDに対する新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a novel therapeutic approach targeting a serine protease, a type of protein-degrading enzyme, for polycystic kidney disease (PKD), which has been the fourth leading cause of end-stage renal disease requiring dialysis. PKD model rats exhibited numerous kidney cyst formations, increased kidney weight, and impaired renal function, along with the activation of a specific serine protease (SP) in the renal tissue. Inhibitors of this SP effectively suppressed cyst enlargement and renal dysfunction. Furthermore, the SP inhibitor also inhibited the enlargement of liver cysts, for which effective treatments are currently lacking. These findings suggest that SP inhibition could potentially serve as a new therapeutic strategy for PKD, a condition that still lacks sufficient treatment options.

研究分野：腎臓内科

キーワード：セリンプロテアーゼ セリンプロテアーゼ阻害薬 多発性嚢胞腎 慢性腎臓病

1. 研究開始当初の背景

我が国において成人人口のおよそ 8 人に 1 人が慢性腎臓病(CKD)患者と推定され、透析患者数は年々増加しており、2019 年度末には 34 万人を超え、国民の健康と医療経済の面からも大きな社会問題である。CKD の原因となる腎臓病は様々であり、透析患者数を減少させる観点から原疾患を早期診断とし、適切な治療を行うことが重要となる。

主要な透析導入の原疾患の中で、多発性嚢胞腎(PKD)は 3.6%と第 4 位を占め、割合として大きくはないものの、長らく一定の割合が透析導入となっている。PKD は両側の腎臓に大小の嚢胞が多発し、嚢胞が増大するにつれて腎実質の萎縮と間質の線維化が生じ、腎機能が低下する。常染色体優性遺伝形式を示す ADPKD(PKD1、PKD2 の遺伝子変異)と常染色体劣性遺伝形式を示す ARPKD に分類され、ADPKD では 60 歳代で約半数の患者が末期腎不全となる。ADPKD は人口 2000~4000 人に 1 人とされており、遺伝性腎疾患の中では患者数が最多である。ADPKD は腎臓において環状アデノシンリン酸(cAMP)により嚢胞上皮細胞の増殖が促進され、バソプレシンは腎尿細管での cAMP 産生を亢進させる。バソプレシン V2 受容体阻害薬トルバプタンはこの系を抑制し、ヒト ADPKD 患者において腎嚢胞増大と腎機能低下を抑制することが証明され(Torres et al. N Engl J Med 2012)、本邦では 2014 年より臨床使用されている。しかし、トルバプタンは ADPKD の進行を完全には抑制できず(腎機能低下を約 30%抑制)、バソプレシン作用抑制により多尿(1 日 4-5L)となることから、時に生活の質の低下が問題となる。さらに、トルバプタンの代表的な副作用として肝機能障害があり、使用を中断せざるを得ないこともある。また、ADPKD の合併症である肝嚢胞増大により腹痛・腹部膨満・食欲低下などの臨床症状がしばしば問題となるが、肝嚢胞増大抑制薬は、現時点では臨床使用されていない。このため、ADPKD の腎・肝嚢胞増大を抑制する新規治療法の開発が強く望まれていた。

2. 研究の目的

当教室ではこれまでに腎臓・尿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解明することを目的として基礎研究を行ってきた。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細管で上皮型 Na チャネル(ENaC)を活性化すること(J Am Soc Nephrol 2001)、アルドステロンがプロスタシンの発現を亢進し、ENaC を活性化すること(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 ラットで尿中プロスタシン排泄の増加とそれに伴う ENaC の活性化によって血圧が上昇すること(Kakizoe et al. J Hypertens 2009)、プロスタシン活性を抑制する合成 SP 阻害薬(SPI)が Dahl ラットの血圧と腎障害を著明に抑制すること(Maekawa, Kakizoe et al. J Hypertens 2009)、さらに SPI がアルドステロンによるプロスタシンを介した ENaC の切断・活性化を抑制し、Na 排泄を促進することを報告し(Uchimura, Kakizoe et al. Am J Physiol Renal Physiol 2012)、SP による高血圧発症機序と SPI が新規降圧薬となる可能性を報告した。さらに SPI は 5/6 腎摘出 CKD モデルラット(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, (Narita, Kakizoe et al. J Pharmacol sci 2016) の腎障害を抗炎症・線維化・酸化ストレス作用により抑制することを報告した。さらに、セリンプロテアーゼの一種であるプラスミンが食塩

感受性高血圧や急性腎障害において増悪因子として働いており、プラスミン阻害により病態が改善することを報告している (Kakizoe et al. J Pharmacol sci 2016, (Nakagawa, Kakizoe et al. Am J Physiol Renal Physiol 2018, Deng, Kakizoe et al. Hypertens Res 2022.)。このように、これまで一貫して SP と高血圧、腎障害発症メカニズムを解明してきた。

PKD と SP に関しては、過去に他の研究室から、PKD モデルラットの尿中で SP・カリクレインが増加しているとの報告があるが(Braun et al. Kidney Int 2002)、SP 阻害薬やノックアウトマスをを用いた検討はなされておらず、SP の病態への関与は不明である。本研究は、唯一の特異的治療薬であるトルバプタン投与でも腎不全の進行を完全に抑制できず、肝嚢胞に対しては有効な治療法がない PKD において、SP を標的とした新たな治療法開発の可能性を検討することを目的として行った。

3. 研究の方法

1)合成セリンプロテアーゼ阻害薬メシル酸カモスタット(CM)の AQP2 活性への効果

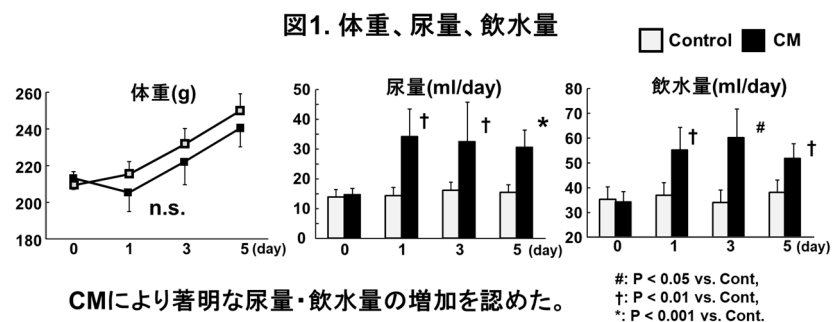
現在 ADPKD の治療薬として臨床使用されているトルバプタンはバソプレシン V2 受容体阻害薬であり、多尿・多飲・口渇をきたす。まず、予備検討として、セリンプロテアーゼがバソプレシン-V2 受容体-AQP2 の経路に影響を及ぼしているかを確認するために、正常の SD ラットに CM を投与して AQP2 活性や水利尿に及ぼす効果を検証した。CM は徐放ペレットを用いて皮下持続投与し(2 tablets, 14mg/day)、尿量や AQP2 タンパク発現を評価した。SD ラットを Control 群(Vehicle ペレット)と CM 群の 2 群に分け、Day0, 1, 3, 5 に 24 時間蓄尿を行い、血圧測定(tail cuff 法)後に sacrifice した。腎組織中および尿中エクソソーム中の AQP2 の蛋白発現を評価した。さらにセリンプロテアーゼとして、ENaC 活性化因子であるプロスタシンと近年 AQP2 活性との関連が報告された Tmprss4[1]の発現を評価した。

2)PKD モデルラットに対するセリンプロテアーゼ阻害薬 (SPI) の効果

代表的な PKD モデルラットである PCK ラット (pkhd1 遺伝子異常) を使用して検討を行った。ラットを Control 群 (Sprague Dawley, SD ラット) PKD 群 (PCK ラット) PKD + SPI 治療群 (PCK+SPI) の 3 群に分け、32 週間観察した後に sacrifice し、腎重量、腎機能、腎組織中 SP 活性、炎症・線維化関連分子の遺伝子発現について評価した。腎組織中 SP 活性は Double Layer Fluorescent Zymography (DLFZ)法[2]により評価した。

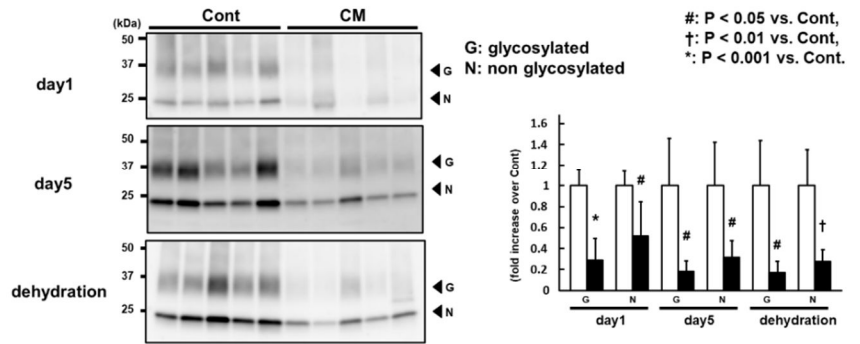
4. 研究成果

1)合成セリンプロテアーゼ阻害薬メシル酸カモスタット(CM)の AQP2 活性への効果[3]



CM 投与開始後、Day1～5 まで尿量と飲水量の増加を認めた(図 1)。24 時間の飲水制限においても CM 群では尿量の増加と、より著明な体重減少を認め、多尿は腎臓における体液保持能の低下によることが判明した。また、Control 群と CM 群で 1 日の尿中 Na や浸透圧物質排泄量には差を認めず、CM により自由水排泄

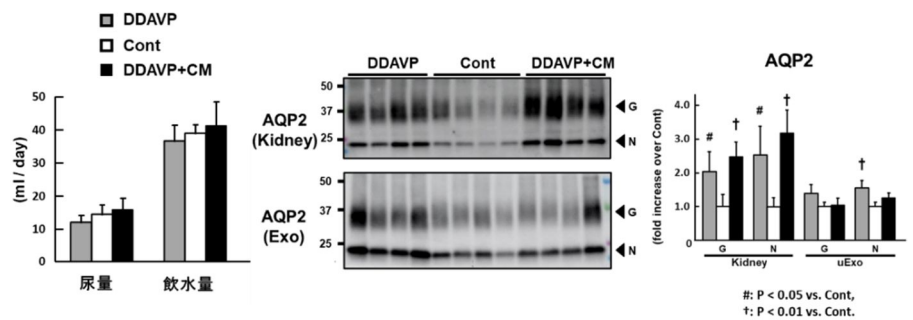
図2. CMによる尿中エクソソームAQP2発現変化



CM投与により尿中エクソソームAQP2の発現低下を認めた。

が亢進していると考えられた。Control 群と CM 群では自由水代謝に影響を及ぼす血清 K、Ca、ADH および腎髄質浸透圧には差を認めなかった。腎組織中の AQP2 発現量に差を認めなかったが、尿中エクソ

図3. CMによる多尿に対するDDAVPの効果



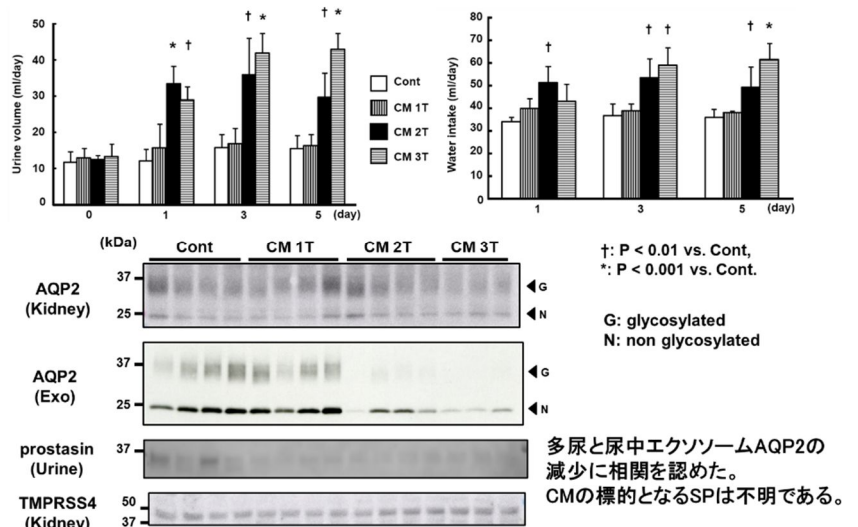
CMによる多尿と尿中エクソソームAQP2の減少は、DDAVP投与により消失した。

性抑制により自由水排泄が亢進したと考えられた。

CM は生理的なバソプレシンの作用を抑制している可能性があり、非生理的なデスモプレシン投与によりその効果が打ち消されるかを検証した。デスモプレシンにより腎組織中と尿中エクソソームの AQP2 蛋白質量の増加を認めた。さらに、CM による尿量の増加と uExo-AQP2 の減少は、デスモプレシンの持続皮下投与により消失した(図 3)。よって、CM は生理的なバソプレシン-V2 受容体-AQP2 の経路に作用していると考えられた。

続いて、CM の多尿効果に容量依存性があるかについて確認を行った。CM ペレット 1 錠では多尿を認めなかったが、2 錠と 3 錠では同程度の多尿を認めた。容量依存性はなく、生体内で CM がある一定濃度を超えることで多尿を呈すると考えられた。次に CM の効果が SP の抑制を

図4. CM投与量による腎組織と尿中エクソソームのAQP2発現変化



多尿と尿中エクソソームAQP2の減少に相関を認めた。CMの標的となるSPIは不明である。

介したものであるかを確認するために、プロスタシンと TMPRSS4 について評価を行った。過去に CM ペレット 2 錠で、尿中プロスタシンの排泄低下と ENaC の活性低下をきたすこ

とを報告しているが、今回は1錠から尿中プロスタシンの排泄低下を認め、プロスタシンへの作用と多尿は独立したものであると考えられた。また、CMはいずれの投与量においてもTMPRSS4の発現量に変化を及ぼさなかった(図4)。現時点では、AQP2活性や自由水排泄に関与する、CMの標的となるSPは不明である[3]。

2)PKDモデルラットに対するセリンプロテアーゼ阻害薬(SPI)の効果

PKDでは多数の腎嚢胞形成と腎重量の増大、腎機能低下を認めたが、これらはSPI投与により抑制されていた[腎重量/体重(%): Cont 0.56±0.05, PKD 2.02±0.30, PKD+SPI 1.39±0.20; 血清クレアチニン(mg/dL): Cont 0.29±0.03, PKD 0.77±0.21, PKD+SPI 0.48±0.07]。PKDでは血圧の上昇を認めたが、CMによる降圧効果は認めなかった。PKDの腎組織中に、ある種のSPの活性化を認め、SPIはこれらの変化を抑制した。加えて、SPIはPKDの腎組織中の炎症・線維化関連のmRNA発現を抑制した。さらにSPIはPCKラットの肝嚢胞の増大と肝組

織中の炎症・線維化関連分子の発現を有意に抑制した。本研究ではPCKで増加した尿量をSPIはむしろ減少させた。これは、腎障害による多尿が軽減されたためと考えられた(図5)。

	Control	PCKラット	PCK+SPI
BUN (mg/dL)	14.7±1.5	40.5±7.2#	24.1±5.0*
Cr (mg/dL)	0.29±0.03	0.78±0.22#	0.48±0.07*
腎重量/体重 (%)	0.56±0.05	2.02±0.30#	1.39±0.20*
肝重量/体重 (%)	2.89±0.21	7.82±3.04#	4.92±0.19*

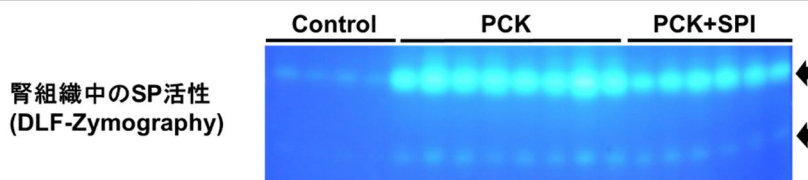


図5. PKDモデルラット(PCKラット)における腎組織中セリンプロテアーゼ(SP)活性亢進(矢印)と腎重量の増加、腎機能障害をセリンプロテアーゼ阻害薬(SPI)は抑制した。SPIは肝重量の増加も抑制した。

以上の結果から、PKDにおいて腎嚢胞のみならず、肝嚢胞の進展にもSP活性化が関与していると考えられ、SPIがPKDの新規治療薬となる可能性が示唆された。また、SPIの1種であるメシル酸カモスタットは高用量でトルバプタンのように水利尿効果を発揮したが、PCKラットに投与したSPIは尿量をむしろ減少させたことから、トルバプタンによる多尿・口渴に認容性が低い場合は特に、腎組織中のSPを標的とした治療法が有用であると考えられた。

参考文献

1. Keppner, A., et al., *Deletion of the serine protease CAP2/Tmprss4 leads to dysregulated renal water handling upon dietary potassium depletion.* Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 19540.
2. Deng, Q., et al., *The serine protease plasmin plays detrimental roles in epithelial sodium channel activation and podocyte injury in Dahl salt-sensitive rats.* Hypertens Res, 2023. **46**(1): p. 50-62.
3. Kakizoe, Y., et al., *Camostat mesilate, a serine protease inhibitor, exerts aquaretic effects and decreases urinary exosomal AQP2 levels.* J Pharmacol Sci, 2022. **150**(4): p. 204-210.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Deng Qinyuan, Kakizoe Yutaka, Iwata Yasunobu, Nakagawa Terumasa, Miyasato Yoshikazu, Nakagawa Miyuki, Nishiguchi Kayo, Nagayoshi Yu, Adachi Masataka, Narita Yuki, Izumi Yuichiro, Kuwabara Takashige, Tsuda Yuko, Mukoyama Masashi	4. 巻 46
2. 論文標題 The serine protease plasmin plays detrimental roles in epithelial sodium channel activation and podocyte injury in Dahl salt-sensitive rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 50～62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41440-022-01064-2	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 Kakizoe Yutaka, Nakagawa Terumasa, Iwata Yasunobu, Deng Qinyuan, Adachi Masataka, Miyasato Yoshikazu, Nakagawa Miyuki, Nagayoshi Yu, Nishiguchi Kayo, Narita Yuki, Izumi Yuichiro, Kuwabara Takashige, Tomita Kimio, Kitamura Kenichiro, Mukoyama Masashi	4. 巻 150
2. 論文標題 Camostat mesilate, a serine protease inhibitor, exerts aquaretic effects and decreases urinary exosomal AQP2 levels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 204～210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.09.003	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 Mizumoto Teruhiko, Kakizoe Yutaka, Nakagawa Terumasa, Iwata Yasunobu, Miyasato Yoshikazu, Uchimura Kohei, Adachi Masataka, Deng Qinyuan, Hayata Manabu, Morinaga Jun, Miyoshi Taku, Izumi Yuichiro, Kuwabara Takashige, Sakai Yoshiki, Tomita Kimio, Kitamura Kenichiro, Mukoyama Masashi	4. 巻 146
2. 論文標題 A serine protease inhibitor camostat mesilate prevents podocyte apoptosis and attenuates podocyte injury in metabolic syndrome model rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 192～199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2021.04.003	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yutaka Kakizoe, Yasunobu Iwata, Terumasa Nakagawa, Qinyuan Deng, Masataka Adachi, Yoshikazu Miyasato, Miyuki Nakagawa, Yu Nagayoshi, Kayo Nishiguchi, Yuki Narita, Yuichiro Izumi, Takashige Kuwabara, and Masashi Mukoyama
2. 発表標題 Serine protease inhibition exerts aquaretic effects and decreases urinary exosomal AQP2 levels
3. 学会等名 第29回国際高血圧学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Qinyuan Deng, Yutaka Kakizoe, Yasunobu Iwata, Terumasa Nakagawa, Yoshikazu Miyasato, Miyuki Nakagawa, Kayo Nishiguchi, Yu Nagayoshi, Masataka Adachi, Yuki Narita, Yuichiro Izumi, Takashige Kuwabara, Yuko Tsuda, and Masashi Mukoyama
2. 発表標題 Plasmin inhibition alleviates hypertension and podocyte injury in Dahl salt-sensitive rats
3. 学会等名 第29回国際高血圧学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿添豊 中川輝政 岩田康伸 トウキンゲン 宮里賢和 泉裕一郎 柴原孝成 安達政隆 向山政志
2. 発表標題 セリンプロテアーゼ阻害薬による尿エクソソーム中AQP2減少を伴う水利尿効果
3. 学会等名 第26回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿添豊、鄧 欽元、岩田 康伸、中川 輝政、泉 裕一郎、柴原 孝成、安達 政隆、津田裕子、向山 政志
2. 発表標題 食塩感受性高血圧におけるプラスミン阻害薬の降圧・腎保護効果の検討
3. 学会等名 第26回日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------