

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16047

研究課題名(和文) セリンプロテアーゼ制御によるマルチターゲット作用を活用した新規AKI治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a novel AKI treatment utilizing multi-target action by regulating serine proteases

研究代表者

成田 勇樹(Narita, Yuki)

熊本大学・病院・助教

研究者番号：40614665

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、セリンプロテアーゼの制御によるマルチターゲット作用を活用した新規AKI治療法を確立することを目的に、リポポリサッカライド(LPS)誘発AKIモデルおよび虚血再灌流(IR)誘発AKIモデルを用いて、セリンプロテアーゼ阻害薬の有効性評価およびその作用メカニズムを検討した。結果、セリンプロテアーゼ阻害薬であるカモスタット(CM)が、AKIモデルマウスの病態進展を一部抑制し、用量依存的に酸化ストレスおよび炎症を抑制していることが示された。以上より、セリンプロテアーゼの制御によるマルチターゲット作用の活用が新規AKI治療法となり得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

我が国の透析患者数は33万人を超え、透析患者の増加による医療費の高騰が国の財政を圧迫している。また、近年、透析導入の主な要因が急性腎障害(AKI)であることが明らかとなっている。本研究は、セリンプロテアーゼの制御によるマルチターゲット作用を活用した新規AKI治療法を確立することを目的とした。異なる2つのAKIモデルにセリンプロテアーゼ阻害薬を投与すると、病態進展を一部抑制し、用量依存的に酸化ストレス及び炎症を抑制した。セリンプロテアーゼの制御によるマルチターゲット作用の活用が新規AKI治療法となり得ることが示唆され、医学・薬学・医療経済への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：In recent years, many patients have been introduced to dialysis due to acute kidney injury (AKI), and it is essential to take measures against AKI. But, there is no established treatment. This study aimed to establish a novel AKI treatment utilizing a multi-target action by regulating serine proteases. We evaluated the efficacy of serine protease inhibitors and investigated their mechanisms of action using lipopolysaccharide (LPS) and ischemia-reperfusion (IR)-induced AKI models. The results showed that camostat mesilate (CM), a serine protease inhibitor, partially inhibited the pathological progression of AKI model mice and suppressed oxidative stress and inflammatory markers dose-dependently. These results suggested that using multi-target action by regulating serine proteases may be a novel AKI treatment.

研究分野：医療薬学

キーワード：セリンプロテアーゼ AKI マルチターゲット作用

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の透析患者数は 33 万人を超え、透析患者の増加による医療費の高騰が国の財政を圧迫しており、新規透析導入患者の抑制が極めて重要な医療課題となっている。従来、透析導入の主な原因は慢性腎臓病 (CKD) と考えられていたが、近年では、急性腎障害 (AKI) が原因で透析導入に至る症例が CKD 症例よりも圧倒的に多いことが明らかとなっている。そのため、新規透析導入患者の抑制には、AKI に対する対策が必要不可欠である。一方で、AKI の治療は、ここ数十年変化はない。速やかな輸液や緊急の血液透析などの対症療法が中心となっており、確立された治療法は存在しない。故に、臨床現場では対症療法ではなく、根底にある AKI に対する新規治療法の確立が強く切望されている。

AKI の病変の主座は尿細管で、原因は虚血や薬剤など様々であるが、多くの場合「酸化ストレス」の亢進による「炎症」が生じ、それに続く「アポトーシス」が尿細管障害を引き起こす。これまでに上記の因子を標的とした治療法の開発が多数試みられているが、それぞれの因子に対する単独作用では臨床上有効な治療薬の開発は困難を極めていた。一方、セリンプロテアーゼは、食物消化、凝固線溶系、免疫補体反応などの重要な生理的役割を果しているのに加え、がんや動脈硬化疾患、線維症など多彩な疾患に関与していることが知られている。さらに、近年では、セリンプロテアーゼが酸化ストレスや炎症、アポトーシスに深く関連することが明らかになりつつある。申請者は、セリンプロテアーゼ制御の腎疾患治療への応用に取り組む中で、既に臨床利用されているセリンプロテアーゼ阻害薬が、「抗酸化作用」および「抗炎症作用」、「抗アポトーシス作用」といったマルチターゲット作用を有することを明らかにしている [Nephron. 2015, J Pharmacol Sci. 2016, Int J Mol Sci. 2019]。また、AKI 発症時にセリンプロテアーゼが活性化されていることを明らかにしている [Am J Physiol Renal Physiol. 2018]。これらの知見は、“セリンプロテアーゼの制御によるマルチターゲット作用を活用した治療法が新規 AKI 治療法に成り得る”可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究は、セリンプロテアーゼの制御によるマルチターゲット作用を活用した新規 AKI 治療法を確立することを目的に、リポポリサッカライド (LPS) 誘発 AKI モデルおよび虚血再灌流 (IR) 誘発 AKI モデルを用いて、セリンプロテアーゼ阻害薬の有効性評価およびその作用メカニズムを検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) LPS 誘発 AKI モデルを用いた検討

8 週齢の C57BL/6 雄性マウス (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を 5 群に割り付け (Control 群, LPS + Vehicle 群, LPS + CM 50mg/kg 群, LPS + CM 125mg/kg 群, LPS + CM 250mg/kg 群), LPS 投与 3 日前より注射用水, CM 50, 125 および 250 mg/kg/day を 1 日 2 回に分けて経口投与した。LPS 群, LPS+CM 群に LPS (12.5 mg/kg, i.p.) を投与し 24 時間後に血液および腎臓を採取し、腎機能 (serum creatinine ; Scr, blood urea nitrogen ; BUN, Neutrophil Gelatinase - Associated Lipocalin ; NGAL), 腎臓組織学的評価 (Periodic acid-schiff ; PAS 染色), 酸化ストレス (dihydroethidium ; DHE 染色, malondialdehyde ; MDA 含量, superoxide dismutase ; SOD 活性) および炎症パラメータ (tumor necrosis factor- $\alpha$  ; TNF- $\alpha$ , interleukin-6 ; IL-6, F4/80 染色) の評価を行った。Scr および BUN は、富士ドライケム 7000Z 装置と測定用スライド (富士ドライケムスライド CRE-PIII, BUN-PIII) を用いて測定した。NGAL, TNF- $\alpha$ , IL-6 は、StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Inc. Foster City, California, United States) を用い、SYBR®Green PCR assay のプロトコルに従い PCR 産物の検出を行った。定量方法は PCR の反応効率が一定であることを確認し、comparative CT 法 ( $\Delta\Delta$ CT 法) を用いた。DHE 染色は、DHE 溶液 (5  $\mu$ M, PBS) で 37 °C, 30 分間反応させた後 PBS で 1 回洗浄し (1 分間), 染色後は 90% グリセロール in PBS で封入し、蛍光顕微鏡 (BZ-8000) を用いて画像を取得した。画像の蛍光面積の定量には ImageJ Fiji ソフトウェアを使用した。腎臓組織中 MDA 含量は TBARS Assay Kit (Funakoshi Co., Ltd., Kumamoto, Japan), 腎臓組織中 SOD 活性は SOD Assay Kit - WST (Dojindo Co., Ltd., Kumamoto, Japan) を用い、それぞれ添付のプロトコルに従って測定した。F4/80 染色は、F4/80 (BM8) 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, sc-52664) を用いて染色し、光学顕微鏡 (BZ-X700, Keyence 社) を用いて画像を取得した。

## (2) IR 誘発 AKI モデルを用いた検討

8 週齢の C57BL/6 雄性マウス (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を 3 群に割り付け (Control 群, IR + Vehicle 群, IR + CM 250mg/kg 群), IR の 3 日前より注射用水, CM 250 mg/kg/day を 1 日 2 回に分けて経口投与した。IR の 24 時間後に血液を採取し, 腎機能の評価を行った。Scr および BUN は富士ドライケム 7000Z 装置と測定用スライド (富士ドライケムスライド CRE-PIII, BUN-PIII) を用いて測定した。

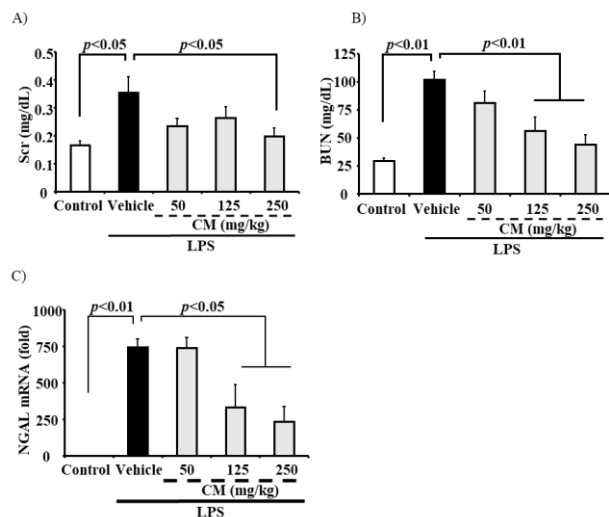
## 4. 研究成果

### (1) LPS 誘発 AKI モデルに対するセリンプロテアーゼ阻害薬の有効性評価および作用メカニズムの検討

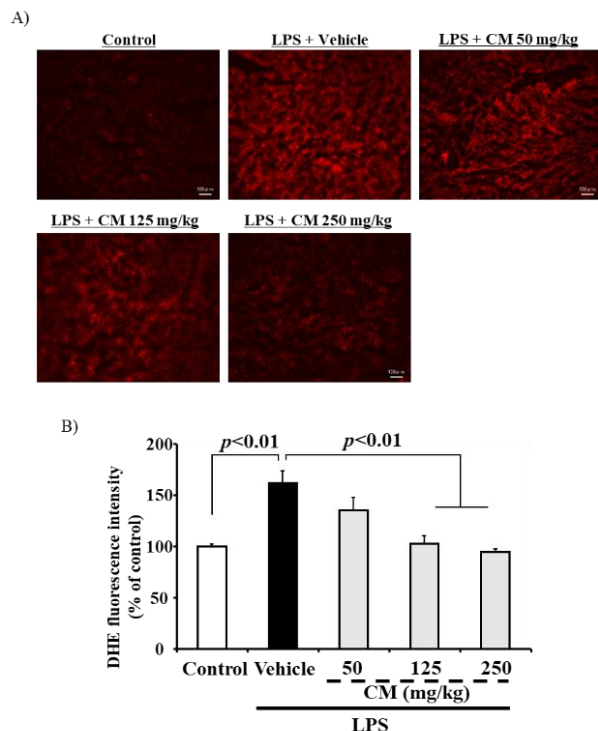
LPS 誘発 AKI モデルに対する非特異的セリンプロテアーゼ阻害薬カモスタット (CM) の有効性を評価した。LPS 投与 24 時間後における腎機能の評価したところ, Scr は, Control 群と比較して, LPS + Vehicle 群で顕著に上昇し, LPS + CM 250 mg/kg 群で有意に抑制された (Fig. 1A)。また, BUN および NGAL mRNA 発現は, LPS + Vehicle 群で顕著に上昇し, LPS + CM 125 mg/kg および 250 mg/kg 群で有意に抑制された (Fig. 1B, C)。加えて, 腎臓の組織学的評価を PAS 染色にて行った。PAS 染色では, LPS + Vehicle 群で糸球体の萎縮が認められ, LPS + CM 125 mg/kg および 250 mg/kg 群ではそれらが改善していた。

CM の AKI モデルに対する腎障害抑制効果が認められたことから, AKI 進展に関わる酸化ストレスについて評価した。O<sub>2</sub><sup>•-</sup> に反応し赤色発色する DHE 染色では, LPS + Vehicle 群で O<sub>2</sub><sup>•-</sup> が顕著に上昇し, LPS + CM 125 mg/kg および 250 mg/kg 群で有意な改善が示された (Fig. 2)。また, 腎組織中 MDA 含量は, LPS + Vehicle 群で顕著に上昇し, LPS + CM 250 mg/kg 群で有意に抑制された。加えて, 生体内抗酸化能の指標である SOD 活性は, Control 群と比較し, LPS + Vehicle 群で低下していたものの, LPS + CM 群で改善傾向が認められた。

次に, CM の AKI モデルに対する腎障害抑制効果および酸化ストレス抑制効果が認められたことから, AKI の進展および酸化ストレスの両方に関する炎症マーカーについて評価した。TNF- $\alpha$  および IL-6 mRNA 発現は, LPS + Vehicle 群で顕著に上昇し, LPS + CM 250mg/kg 群で抑制された。F4/80 染色では, LPS + Vehicle 群でマクロファージ浸潤が認められ, CM 125 および 250 mg/kg 群で抑制された (Fig.3)。



**Fig. 1. Effect of CM on renal function in LPS induced AKI mice.** The levels of A) serum creatinine (Scr) and B) blood urea nitrogen (BUN). C) NGAL mRNA expression were measured by real time PCR. Values are expressed as the means  $\pm$  SE (LPS, LPS+CM 250 mg/kg; n=7, others; n=6).

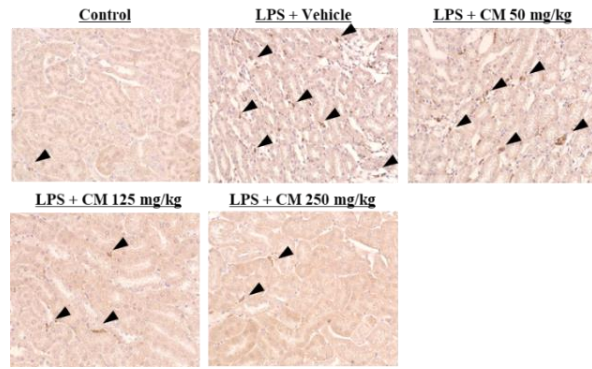


**Fig. 2. Effects of CM on renal oxidative stress response in LPS induced AKI mice by DHE-staining.** A) Representative photomicrographs of DHE-stained kidney sections and B) image analysis of the fluorescence intensity of DHE-staining was performed. Original magnification:  $\times$ 400. Scale bars

## (2) IR 誘発 AKI モデルに対するセリンプロテアーゼ阻害薬の有効性評価

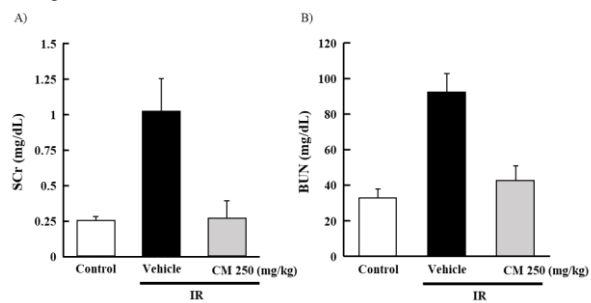
AKI は様々な病態を背景として発症する疾患である。そこで、LPS 以外の IR 誘発 AKI モデル動物においてもセリンプロテアーゼ阻害薬の有効性を評価した。IR 24 時間後における腎機能を評価したところ、Scr および BUN は、Control 群と比較して、LPS+Vehicle 群で顕著に上昇し、LPS + CM 250 mg/kg 群で有意に抑制された (Fig. 4A, B)。

以上の結果より、セリンプロテアーゼ阻害薬 CM は LPS および IR 誘発性 AKI モデルマウスの病態進展を一部抑制することが明らかとなった。特に、LPS 誘発性 AKI モデルマウスにおいては、用量依存的に酸化ストレスおよび炎症を抑制し、AKI 進展抑制に関与することが示された。以上より、セリンプロテアーゼの制御によるマルチターゲット作用の活用が新規 AKI 治療法となり得る可能性が示唆された。



**Fig. 3. Effect of CM on renal inflammation markers in LPS induced AKI mice.**

Representative photomicrographs of F4/80-stained kidney sections were shown at 24 h after the administration of LPS. Original magnification:  $\times 400$ .



**Fig. 4. Effect of CM on renal function in IR induced AKI mice.**

The levels of A) serum creatinine (Scr) and B) blood urea nitrogen (BUN). Values are expressed as the means  $\pm$  SE (n=3).

5. 主な発表論文等

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

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 無
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 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 無
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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西垣愛奈、成田勇樹、有馬勇一郎、辻田 賢一、城野 博史、齋藤秀之
2. 発表標題 硫酸転移酵素 Sult1a1 欠損マウスを用いた慢性腎臓病の心血管 疾患発症に対するインドキシル硫酸の寄与と解明
3. 学会等名 第65回（令和4年度）日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Aina Nishigaki, Yuki Narita, Yuichiro Arima, Kenichi Tsujita, Hirofumi Jono, Hideyuki Saito
2. 発表標題 Attenuation of cardiac pathological alterations in sulfotransferase 1a1-deficient mice with chronic kidney failure through decreased indoxyl sulfate accumulation
3. 学会等名 第32回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒方文香、成田勇樹、柿添豊、石塚洋一、門脇大介、平田純生
2. 発表標題 LPS 誘発性急性腎障害に対するセリンプロテアーゼ阻害薬の腎保護作用の検討
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成田勇樹、緒方文香、柿添豊、近藤悠希、石塚洋一、門脇大介、平田純生、齋藤秀之
2. 発表標題 セリンプロテアーゼ阻害薬による急性腎障害抑制効果の検討及び抗酸化機序の探索
3. 学会等名 第15回日本腎臓病薬物療法学会学術集会・総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成田勇樹
2. 発表標題 慢性腎臓病患者のポリファーマシーに対する 総合的戦略に関する研究 : プレイオトロピック効果による酸化ストレス制御の治療応用
3. 学会等名 第31回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 郡田 菜緒, 山下 真実, 成田 勇樹, 城野 博史, 齋藤 秀之
2. 発表標題 低酸素誘発腎障害後の線維化亢進機序におけるインドキシル硫酸の毒性学的役割
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西垣 愛奈, 松下 馨介, 林 祐也, 郡田 菜緒, 成田 勇樹, 城野 博史, 齋藤 秀之
2. 発表標題 硫酸転移酵素Sult1a1欠損マウスを用いた腎虚血再灌流後線維化形成におけるインドキシル硫酸の寄与解明
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 道脇 なつみ, 鶴木 隼平, 小山 直子, 下河 優奈, 桑原 孝成, 向山 政志, 成田 勇樹, 城野 博史, 齋藤 秀之
2. 発表標題 糖尿病虚血性急性腎障害併発モデルラットの病態進展におけるインドキシル硫酸の関与
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020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
---------	---------