

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 7日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591035

研究課題名（和文）アルドステロンと塩により惹起される腎障害に関与するセリンプロテアーゼの網羅的解析

研究課題名（英文）A comprehensive analysis of serine proteases involved in the renal injury induced by aldosterone and salt loading

研究代表者

北村 健一郎（KITAMURA KENICHIRO）

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：10304990

研究成果の概要（和文）：アルドステロンを食塩と共に動物に投与すると著明な臓器障害を惹起することが知られている。私たちはアルドステロンと食塩によって惹起される腎障害に対してセリンプロテアーゼ阻害薬が著効すること示し、この障害の進展にセリンプロテアーゼが強く関与していることを明らかにした。さらに、私たちはその障害に関与するセリンプロテアーゼの1つとしてプラスミン分子を同定することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Aldosterone has been demonstrated to induce severe organ damage to animals when administered with high salt diet. We demonstrated that a serine protease inhibitor significantly reduced the progression of renal injury induced by aldosterone and high salt diet, suggesting that serine proteases are involved in the development of renal injury. We isolated plasmin as a candidate serine protease involved in the aldosterone induced renal injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学

## 1. 研究開始当初の背景

アルドステロンは腎臓の皮質集合尿細管に存在するミネラルコルチコイド受容体に結合し上皮型ナトリウムチャンネルを活性化することで、この部位でのナトリウム再吸収を亢進（古典的作用）させるため、高血圧発症に関与している。1999年以後、アルドステロ

ンが直接臓器障害を引き起こす可能性が示唆され、その後アルドステロンによる非上皮細胞での酸化ストレス誘導や、炎症・線維化誘導等による直接的な臓器障害作用が報告されている。現在我が国において3500万人以上の高血圧患者が存在すると推定されているが、その約5%が原発性アルドステロン症

であるとの報告があり、多くの高血圧患者の病態にアルドステロンが関与していることが示唆されている。また近年脂肪細胞から放出されるアディポサイトカイン等により副腎でのアルドステロン産生が亢進することが報告されている。日本人のメタボリックシンドロームは高血圧の頻度が高いことを考えると、メタボリックシンドロームにおける臓器障害にアルドステロンが大きく関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、アルドステロンと高食塩食によって惹起される腎組織障害において、セリンプロテアーゼ阻害薬の臓器保護効果を検討することにより、アルドステロンと高食塩食によって生じる臓器障害に関与するセリンプロテアーゼ群を網羅的に解析・同定し、臓器障害進展の分子機構を解明することにある。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物実験プロトコール1

7週齢雄性SDラットの左腎動静脈を結紮し、左腎臓を摘除した。2週間の回復期間後、コントロール(Cont)群、アルドステロン+食塩(A+S)群(アルドステロ 0.75  $\mu$ l/h 皮下、8.0%NaCl 食)、アルドステロン+食塩+カモスタット(A+S+CM)群(アルドステロン 0.75  $\mu$ l/h 皮下、8.0%NaCl+0.1%カモスタット食)の3群に分けた(n=7)。浸透圧ポンプを後頸部皮下に埋込み、Cont群にビークルを、A+SおよびA+S+CM群にアルドステロンを持続投与した。毎週、収縮期血圧の測定と代謝ケージによる24時間蓄尿を行った。4週間後、下大静脈より採血後、右腎を摘出して以後の解析に供した。血清のクレアチニン・ナトリウム・カリウム・総蛋白、血漿アルドステロン濃度、1日尿蛋白排泄量を測定した。

### (2) 動物実験プロトコール2

プロトコール1と同様にSDラットに対して左片腎摘出を行い、9週齢でコントロール(Cont)群、食塩(S)群(8.0%NaCl 食)、アルドステロン(A)群(アルドステロ 0.75  $\mu$ l/h 皮下)、アルドステロン+食塩(A+S)群(アルドステロ 0.75  $\mu$ l/h 皮下、8.0%NaCl 食)の4群に分けた(n=6)。収縮期血圧は0、2、4週で測定し、24時間蓄尿は0、1、2、4週で行った。4週間後にsacrificeし、プロトコール1と同様にサンプルの回収を行った。

### (3) 組織学的評価

腎スライスをDubosq-Brazil液中で固定後、包埋した。2  $\mu$ m切片にPAS染色、Azan-Mallory染色を行い、組織学的評価を行った。

### (4) 腎障害マーカーの発現評価

腎組織からRNAを抽出後にreal time RT-PCRを行いCollagen 1、Collagen 3、TGF-beta、B7-1、MCP-1、TNF-alphaの発現を評価した。

### (5) Double layer fluorescent zymography

腎蛋白を非還元SDS-PAGEで分離後、SDSを洗浄した。その後、ゲルと合成基質(KHYR-MCA)を染み込ませたセルロースアセテート膜とを張り合わせ、37°Cでインキュベートした。紫外線(365nm)を照射し、MCAの発光をデジタルカメラで撮影した。

### (6) セリンプロテアーゼの同定

アルドステロン+食塩群の腎蛋白で活性の亢進したセリンプロテアーゼが観察されたため、このプロテアーゼの同定を目的として、プロテオーム解析を行った。

アルドステロン+食塩群の腎蛋白を、2つの非還元SDS-PAGEで分離した。ゲルの一方でzymographyを行い、目的とするプロテアーゼの部位を同定し、もう一方のゲルはPAGE後そのままDeep purple染色を行って、活性部位を切り出し、LC-MS/MSを行った。

### (7) 動物実験プロトコール3

8 週齢の野生型 (n=3) およびプラスミノゲン遺伝子ヘテロ欠損マウス (n=7) に対し、アルドステロンを皮下持続投与し (3.6  $\mu$ g/day)、1%NaCl を投与した。4 週間後に sacrifice し、腎臓の障害マーカーの発現変化を real-time PCR で評価した。

#### 4. 研究成果

##### プロトコール 1

体重、収縮期血圧、尿蛋白、血液検査  
コントロール群に比べアルドステロン群では体重減少を認めたが、カモスタットによる有意な体重変化は認めなかった (Table 1)。アルドステロン群は有意な収縮期血圧の上昇と、尿蛋白排泄増加を認めたが、カモスタットにより 4 週の時点で有意な降圧を、2~4 週で有意な尿蛋白減少効果を認めた (Figure 1)。またアルドステロン群では血清アルブミンの低下、クレアチニンの上昇を認めたが、カモスタットはこの変化を有意に抑制した (Table 1)。

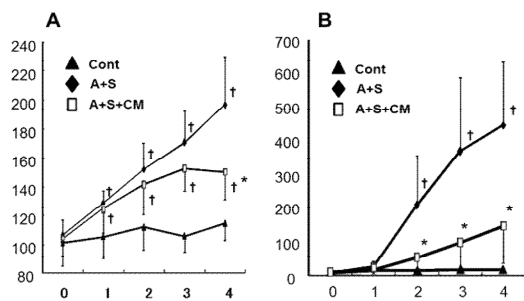


Figure 1

アルドステロン+食塩負荷片腎摘出ラットの収縮期血圧および1日尿蛋白排泄量に対するメシル酸カモスタットの効果

(A)収縮期血圧。(B)1日尿蛋白排泄量。

Cont : コントロール群、A+S : アルドステロン+食塩群、A+S+CM : アルドステロン+食塩+カモスタット群。

† $P < 0.01$  vs. Cont. \* $P < 0.01$  vs. A+S.

Table 1

	Cont	A+S	A+S+CM
BW (g)	438 ± 23	375 ± 22†	356 ± 7†
Heart wt (mg/g BW)	2.9 ± 0.2	4.0 ± 0.3†	3.6 ± 0.3†§
rt Kidney wt (mg/g BW)	4.8 ± 0.6	9.9 ± 1.3†	7.8 ± 0.5†§
Alb (g/dL)	3.8 ± 0.1	3.2 ± 0.4†	3.6 ± 0.2§
Cr (mg/dL)	0.38 ± 0.04	0.54 ± 0.06†	0.40 ± 0.09*
Na (mEq/L)	146 ± 1	149 ± 1†	149 ± 2†
K (mEq/L)	4.7 ± 0.9	3.3 ± 0.5†	2.7 ± 0.2†

Cont : コントロール群、A+S : アルドステロン+食塩群、A+S+CM : アルドステロン+食塩+カモスタット群。

† $P < 0.01$  vs. Cont. § $P < 0.05$  vs. A+S. \* $P < 0.01$  vs. A+S.

##### 腎組織学的評価

アルドステロン群ではPAS染色で糸球体にPAS陽性の沈着物を認め、糸球体硬化を呈していた。またAzan Mallory染色では著明な線維化像を認めた。カモスタットにより、これらの変化は有意に軽減していた (Figure 2)。

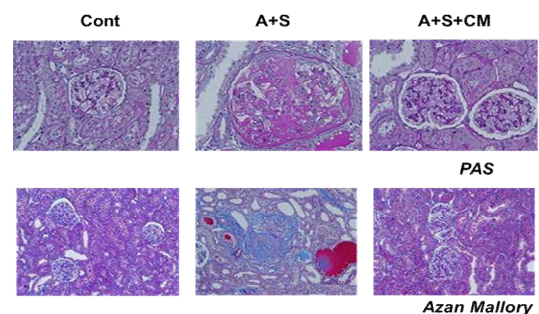


Figure 2

アルドステロン+食塩負荷片腎摘出ラットの組織学的変化に対するメシル酸カモスタットの効果

(上段) PAS 染色 (下段) Azan Mallory 染色

Cont : コントロール群、A+S : アルドステロン+食塩群、A+S+CM : アルドステロン+食塩+カモスタット群。

### 腎障害マーカー(real-time PCR)

アルドステロン群では collagen 1、collagen3、TGF-beta、B7-1、MCP-1 の mRNA 発現がコントロール群と比べ有意に亢進していたが、カモスタットはこれらの発現亢進を抑制した(Figure3)。

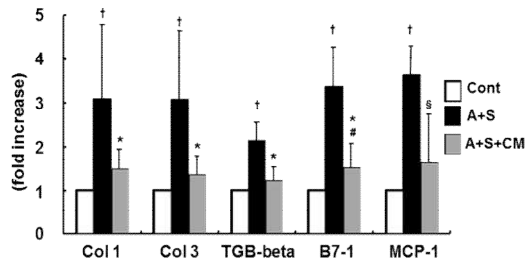


Figure 3

アルドステロン+食塩負荷片腎摘出ラットの腎障害マーカー発現に対するメシル酸カモスタットの効果

Cont : コントロール群、A+S : アルドステロン+食塩群、A+S+CM : アルドステロン+食塩+カモスタット群。

<sup>#</sup>*P* < 0.05 vs. Cont. <sup>†</sup>*P* < 0.01 vs. Cont. <sup>§</sup>*P* < 0.05 vs. A+S. <sup>\*</sup>*P* < 0.01 vs. A+S.

### プロトコール 2

体重、収縮期血圧、尿蛋白、血液検査  
 体重はアルドステロン+食塩群で減少傾向を認めたが、4 群間で有意な差を認めなかった。しかし、アルドステロン+食塩群で著明な腎臓の肥大を認めた(Table2)。アルドステロン+食塩群でのみ収縮期血圧および尿蛋白の有意な上昇・増加を認め(Figure4)、血清アルブミンの低下とクレアチニンの上昇を認めた(Table2)。

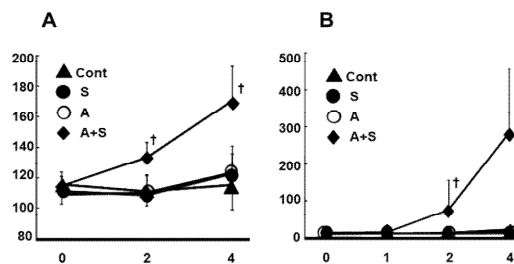


Figure 4

アルドステロン+食塩負荷片腎摘出ラットの収縮期血圧・1日尿蛋白排泄量の変化

Cont : コントロール群、S : 食塩群、A : アルドステロン群、A+S : アルドステロン+食塩群。<sup>†</sup>*P* < 0.01 vs. Cont.

Table 2

	Cont	S	A	A+S
BW (g)	449 ± 15	450 ± 36	473 ± 26	434 ± 47
Heart wt (mg/g BW)	2.8 ± 0.1	3.3 ± 0.2 <sup>#</sup>	3.0 ± 0.2	4.1 ± 0.4 <sup>†</sup>
rt Kidney wt (mg/g BW)	4.7 ± 0.2	5.3 ± 0.3	5.1 ± 0.2	8.7 ± 1.3 <sup>†</sup>
Alb (g/dL)	3.8 ± 0.1	3.9 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.3 ± 0.2 <sup>†</sup>
Cr (mg/dL)	0.41 ± 0.01	0.42 ± 0.06	0.40 ± 0.03	0.49 ± 0.07 <sup>†</sup>
Na (mEq/L)	144 ± 1	146 ± 1	146 ± 1	148 ± 2 <sup>†</sup>
K (mEq/L)	4.6 ± 0.2	4.4 ± 0.1	3.1 ± 0.2 <sup>†</sup>	2.8 ± 0.3 <sup>†</sup>
PRA (ng/ml/h)	31.3 ± 13.3	0.4 ± 0.3 <sup>†</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>†</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>†</sup>
PAC (pg/ml)	427 ± 211	235 ± 136	1074 ± 503 <sup>†</sup>	1198 ± 638 <sup>†</sup>

Cont : コントロール群、S : 食塩群、A : アルドステロン群、A+S : アルドステロン+食塩群。<sup>#</sup>*P* < 0.05 vs. Cont. <sup>†</sup>*P* < 0.01 vs. Cont.

### 腎障害マーカーの発現評価(real-time PCR)

アルドステロン+食塩群では collagen 1、collagen3、TGF-beta、B7-1、TNF-alpha の mRNA 発現が他群と比べ有意に亢進していた(Figure5)。

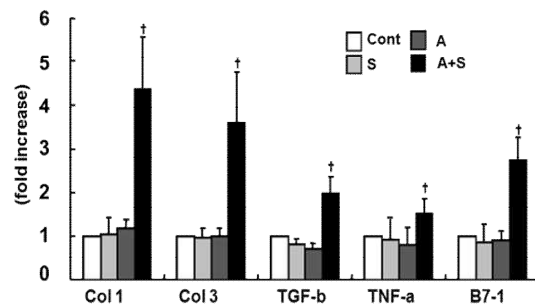


Figure 5

アルドステロン+食塩負荷片腎摘出ラットの腎障害マーカー発現変化

Cont : コントロール群、S : 食塩群、A : アルドステロン群、A+S : アルドステロン+

食塩群。Col1 : コラーゲン 1、Col3 : コラーゲン 3。† $P < 0.01$  vs.Cont.

#### Double Layer Fluorescence Zymography

基質に KHYP-MCA を用いた Zymography では、アルドステロン+食塩群で約 80kDa のサイズに他群と比較し、活性の亢進したセリンプロテアーゼを検出した(Figure6)。

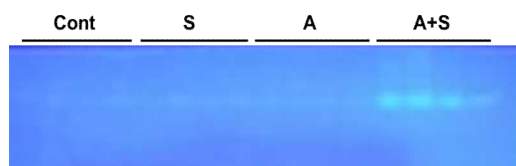


Figure 6

アルドステロン+食塩負荷片腎摘出ラットの腎組織中のセリンプロテアーゼ活性変化  
Cont : コントロール群、S : 食塩群、A : アルドステロン群、A+S : アルドステロン+食塩群。

#### セリンプロテアーゼの同定

プロテオーム解析によりアルドステロン+食塩群の腎組織中で活性の亢進しているプロテアーゼはプラスミノゲン・プラスミンであることが判明した。

#### プラスミノゲン KO マウスの解析

アルドステロンと食塩を 4 週間負荷した、野生型およびプラスミノゲンヘテロノックアウトマウスの腎臓から RNA を抽出し、逆転写後、腎臓の障害マーカーの発現変化を比較した。野生型 3 匹、ヘテロノックアウト 7 匹と野生型の匹数が少ないため統計学的有意差は認めなかったが、観察した線維化および炎症性の腎障害マーカーはいずれもヘテロノックアウトマウスで発現の減少傾向を認めた(Figure7)。

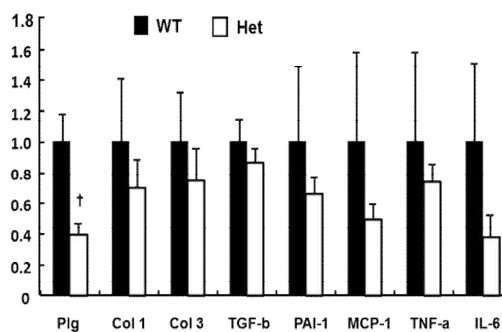


Figure 7

プラスミノゲン・プラスミンがアルドステロンと食塩による腎障害に及ぼす効果  
腎臓組織中のプラスミノゲン、1 型および 3 型コラーゲン、TGF-beta、PAI-1、MCP-1、TNF-alpha、IL-6 の mRNA 発現。

WT : 野生型マウス、Het : プラスミノゲン遺伝子ヘテロ欠損マウス。

† $P < 0.01$  vs.WT.

#### 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 12 件)

- ① Tasic, V., Hynes, A. M., Kitamura, K., et al (9 人中 2 番目) 査読有  
Clinical and functional characterization of URAT1 variants  
*PLoS One*, 6: e28641, 2011
- ② Adachi, M., Tomita, K., Kitamura, K., et al (7 人中 7 番目) 査読有  
A study of maintenance therapy after intravenous maxacalcitol for secondary hyperparathyroidism  
*Clin. Nephrol.*, 76: 266-272, 2011
- ③ Anraku, M., Kitamura, K., Tomita, K., et al (10 人中 5 番目) 査読有  
Cys34 on antioxidative propertie of HSA quantitative analysis of cysteine-34 on the anitoxidative properties of human serum albumin in hemodialysis patients  
*J. Pharm. Sci.*, 100: 3968-3976, 2011
- ④ Kitamura, K. and Tomita, K. 査読有

Regulation of renal sodium handling through the interaction between serine proteases and serine protease inhibitors *Clin. Exp. Nephrol.*, 14: 405-410, 2010

⑤ Ko, T., Tomita, K., Kitamura, K., et al (12人中11、12番目) 査読有

Regulation of adrenal aldosterone production by serine protease prostaticin *J. Biomed. Biotech.*, 2010: 793843, 2010

⑥ Jutabha, P., Kitamura, K., Tomita, K., et al (22人中3、12番目) 査読有

Human sodium-phosphate transporter 4 (hNPT4/SLC17A3) as a common renal secretory pathway for drugs and urate *J. Biol. Chem.*, 285: 35123-35132, 2010

⑦ Kakizoe, Y., Kitamura, K., Tomita, K., et al (11人中2、11番目) 査読有

Aberrant ENaC activation in Dahl salt-sensitive rats

*J. Hypertens.*, 27: 1679-1689, 2009

⑧ Koda, A., Tomita, K., Kitamura, K., et al (7人中6、7番目) 査読有

Urinary prostaticin in humans: relationships among prostaticin, aldosterone and epithelial sodium channel activity

*Hypertens. Res.*, 32: 267-281, 2009

⑨ Maekawa, A., Tomita, K., Kitamura, K., et al (9人中8、9番目) 査読有

Camostat mesilate inhibits prostaticin activity, and reduces blood pressure and renal injury in salt-sensitive hypertension

*J. Hypertens.*, 27: 181-189, 2009

[学会発表] (計22件)

① K. Uchimura: A Synthetic Serine Protease Inhibitor Camostat Mesilate Inhibited the Proteolytic Activation of gENaC in the Kidney of the Aldosterone-Infused Rats  
Kidney Week 2011、2011.11.11、フィラデルフィア、米国

② J. Morinaga: A Synthetic Serine Protease Inhibitor Camostat Mesilate Attenuates Renal Interstitial Fibrosis in Rats

Kidney Week 2011、2011.11.11、フィラデルフィア、米国

③ 柿添 豊: アルドステロンによる上流型 Na チャネル活性化におけるセリンプロテアーゼ阻害薬の効果

第54回日本腎臓学会学術総会、2011.05.15、パシフィコ横浜 (神奈川県)

④ 森永 潤: 片側尿管結紮モデルラットにおけるメシル酸カモスタットの効果

第54回日本腎臓学会学術総会、2011.05.15、パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計8件)

① 早田学、北村健一郎: 薬剤性 AKI  
*Modern Physician*: 31(1): 57-61, 2011

② 早田学、北村健一郎: AKI 保存的治療における体液・電解質管理について  
*腎と透析*: 69 supplement: 365-367, 2010

③ 早田学、北村健一郎: Prostaticin  
*腎と透析*: 69(3): 247-250, 2010

④ 柿添豊、北村健一郎: アルドステロンの標的分子  
*腎と透析*: 68(6): 994-998, 2010

[その他]

ホームページ等

<http://www.kumadai-nephrology.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 健一郎 (KITAMURA KENICHIRO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号: 10304990

### (2) 研究分担者

富田 公夫 (TOMITA KIMIO)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号: 40114772