

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591206

研究課題名(和文)CKDの進展に係わるセリンプロテアーゼ群の網羅的同定とその分子機盤の解明

研究課題名(英文)Systematic identification of serine proteases involved in the progression of CKD

研究代表者

北村 健一郎(KITAMURA, Kenichiro)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：10304990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎不全には有効な治療法が少なく、増加し続ける透析患者数を減少させるためには新しい治療薬の開発が急務である。私たちはセリンプロテアーゼ阻害薬が糸球体硬化を軽減し、尿細管間質の線維化を抑制することによって慢性腎不全の進展を有意に遅延させることを示し、この病態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群の1つがプラスミンであることを同定した。

研究成果の概要(英文)：Few therapeutic strategies have been established for the treatment of chronic kidney diseases (CKD). Therefore, to develop a new class of the drugs is absolutely required for the patients with CKD to avoid the renal replacement therapy. Here, we demonstrated that a serine protease inhibitor significantly reduced the progression of CKD by ameliorating the glomerulosclerosis and by inhibiting the interstitial fibrosis, which suggests that serine proteases are involved in the development of the progression of CKD. In addition, we isolated plasmin as a candidate serine protease involved in the aldosterone induced renal injury.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎不全 セリンプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) は日本の成人人口の 8 人に 1 人が罹患していると推測され、末期腎不全 (透析) のリスクであると同時に脳卒中、心筋梗塞、心不全などの心血管病の重要なリスクファクターであることが示されている。CKD の 2 大進展因子として高血圧、タンパク尿の存在が知られ、これらをいかにコントロールするかによって GFR の低下速度が決まる。すなわち降圧治療およびタンパク尿減少治療が透析遅延もしくは透析回避のための重要な戦略となる。私たちは、食塩感受性高血圧症モデルラットにおいて ENaC が奇異的に活性化されていることを示し、セリンプロテアーゼ阻害薬がこのラットに対して Na 利尿による降圧効果と腎保護効果を発揮することを証明した (*J. Hypertens.*, 2009-1、2009-2)。特筆すべきことに、このラットにおいてセリンプロテアーゼ阻害薬は、降圧効果のみならず著明なタンパク尿減少効果も呈し、このタンパク尿減少効果は降圧非依存的であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、CKD の進展にかかわるセリンプロテアーゼ群を microarray やプロテオミクス的手法を用いて網羅的に同定し、それらの分子に対する阻害薬によって腎障害の進行を抑制しうるか否かについて検討することにある。さらに動物実験での効果が検証された場合には CKD 患者の治療への応用性を探ることにある。

3. 研究の方法

(1) 動物実験プロトコール 1

5/6 腎摘ラット： 体重 200-250g 雄性 SD ラットの左腎 2/3 を切除して、2 週間後に右腎を摘除し 5/6 腎摘とした。

薬剤： 持続効果を得るために、メシル酸カモスタット徐放ペレットを作製して皮下投

与を行った。

グループ分け： 5/6 腎摘から 1 週間後、無作為に以下の 3 群 (各群 n=6) に分け、Nx 群と Nx+CM 群にペレット投与を行った。シヤム群 (Sham)、5/6 腎摘+ビークル投与群 (Nx)、5/6 腎摘+CM 投与群 (Nx+CM)

評価項目： 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、1 日尿蛋白排泄量を測定した。

(2) 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 μ m 切片に PAS 染色、Azan-Mallory 染色を行い、組織学的評価を行った。

(3) 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。

(4) Double layer fluorescent zymography (DLFZ 法)

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 $^{\circ}$ 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。

(5) セリンプロテアーゼの同定

5/6 腎摘モデルラットの腎臓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。

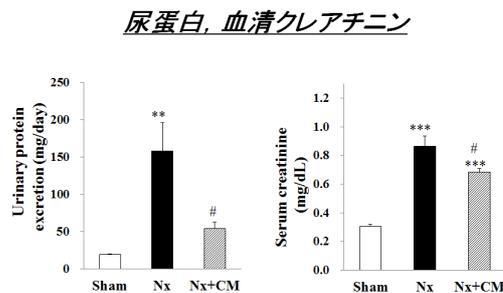
Nx 群の腎蛋白を、2 つの非還元 SDS-PAGE で分離した。ゲルの一方で zymography を行い、目的とするプロテアーゼの部位を同定し、もう一方のゲルは PAGE 後そのまま Deep purple 染色を行って、活性部位を切り出し、LC-MS/MS を行った。

4. 研究成果

(1) セリンプロテアーゼ阻害薬の腎障害進展抑制効果

慢性腎不全モデルである 5/6 腎摘ラットにメシル酸カモスタットを投与したところ、図 1 に示すように血清 Cr 値の上昇および尿蛋白量の増加が有意に抑制されていた。

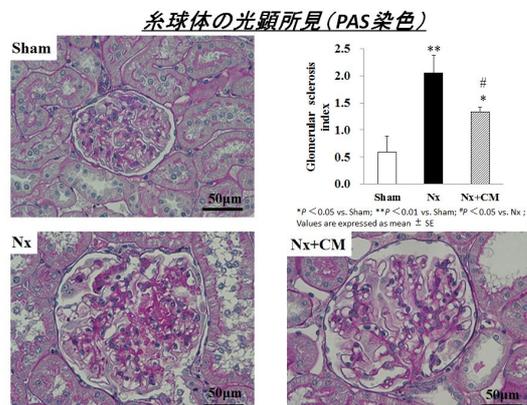
図 1



Sham: sham-operated rats, Nx: vehicle-treated 5/6 nephrectomized rats, Nx+CM: camostat mesilate-treated 5/6 nephrectomized rats; ** $P < 0.01$ vs. Sham; *** $P < 0.001$ vs. Sham; # $P < 0.05$ vs. Nx; Values are expressed as mean \pm SE.

組織学的検討においても、メシル酸カモスタットは糸球体の硬化性病変を有意に改善した(図 2)。図には示さないが、糸球体上皮細胞におけるネフリンおよびポドシンの発現を免疫染色において検討したところ、Nx 群ではそれらの発現が著明に低下していたが、メシル酸カモスタットはそれを有意に改善していた。このことからメシル酸カモスタットによる蛋白尿減少効果はポドサイト保護によるものであることが推測された。

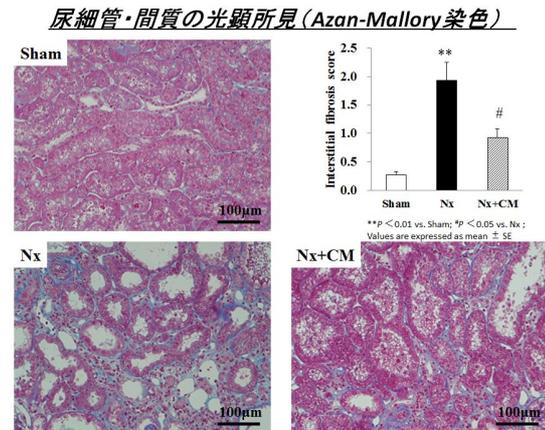
図 2



* $P < 0.05$ vs. Sham; ** $P < 0.01$ vs. Sham; # $P < 0.05$ vs. Nx; Values are expressed as mean \pm SE.

また、尿細管間質の線維化も有意に改善していた(図 3)。

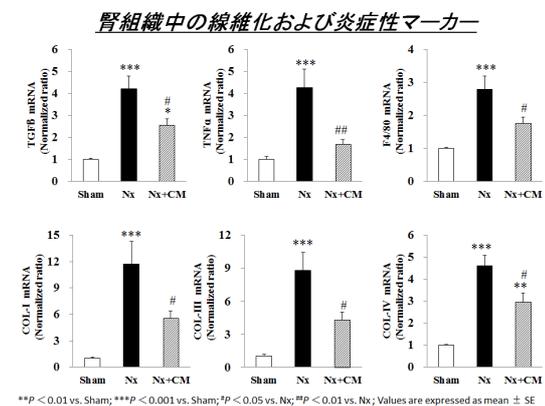
図 3



** $P < 0.01$ vs. Sham; # $P < 0.05$ vs. Nx; Values are expressed as mean \pm SE.

腎臓組織中の線維化マーカーおよび炎症性サイトカインの mRNA 発現を PCR で検討したところ、Nx 群において TGF β 、TNF α 、F4/80 などの炎症性サイトカインの発現と、型コラーゲンなどの線維化マーカーの発現が著明に誘導されていた。メシル酸カモスタットは、それら誘導をすべて有意に抑制していた。これらは、組織学的に認められたメシル酸カモスタットによる尿細管間質の線維化抑制効果を裏付けるものであると考えられた(図 4)。

図 4



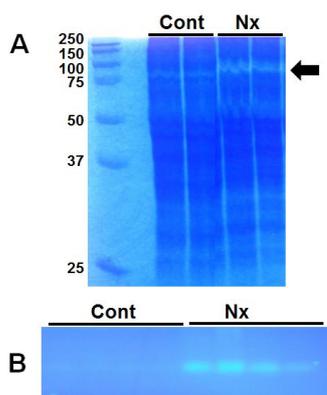
** $P < 0.01$ vs. Sham; *** $P < 0.001$ vs. Sham; # $P < 0.05$ vs. Nx; ** $P < 0.01$ vs. Nx; Values are expressed as mean \pm SE.

(2) 腎障害の進展に関するセリンプロテアーゼの同定

Nx 群の腎臓から抽出した蛋白質を用いて

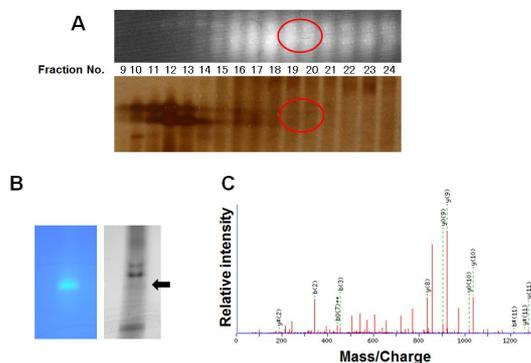
DLFZ 法による解析を行ったところ、セリンプロテアーゼに対する非特異的的合成基質を用いた DLFZ 法において約 85kDa 付近に活性を示すバンドが得られた (図 5 A)。また、合成基質として KHYP-MCA を用いた検討においても同様に約 85kDa 付近に活性のある蛋白質が認められた (図 5 B)。

図 5



Nx 群のラット腎臓から抽出した蛋白質をイオン交換カラムにかけて分画を採取し、それぞれの分画における DLFZ 法によるセリンプロテアーゼ活性の検出を行ったところ、図 6 A に示すように Fraction 19、20 に酵素活性と同時に銀染色による蛋白質のバンドを認めた。そのバンドを切り出して、shotgun LC-MS/MS 解析を施行したところ、蛋白質がプラスミンであることが同定された (図 7 B)。

図 6



現在、神戸学院大学の津田教授が開発したプラスミン阻害薬およびプラスミノゲン KO マウスを使用して、慢性腎不全の進展におけ

るプラスミンの役割を解明するための実験を行っている。

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)

Uchimura, K., Hayata, M., Mizumoto, T., Miyasato, Y., Kakizoe, Y., Morinaga, J., Onoue, T., Yamazoe, R., Ueda, M., Adachi, M., Miyoshi, T., Shiraishi, N., Ogawa, W., Fukuda, K., Kondo, T., Matsumura, T., Araki, E., Tomita, K., and Kitamura, K.

The serine protease prostaticin regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signaling

Nat. Commun., 5: 3428, 2014 査読有 doi: 10.1038/ncomms4428

Kuragano, T., Matsumura, O., Matsuda, A., Hara, T., Kiyomoto, H., Murata, T., Kitamura, K., Fujimoto, S., Hase, H., Joki, N., Fukatsu, A., Inoue, T., Itakura, I., and Nakanishi, T.

Association between hemoglobin variability, serum ferritin levels and mortality in maintenance hemodialysis patients

Kidney Int., 86: 845-854, 2014 査読有 doi: 10.1038/ki.2014.114

Ichijo, S., Furuya, F., Shimura, H., Hayashi, Y., Takahashi, K., Ohta, K., Kobayashi, T., and Kitamura, K.

Activation of the RhoB signaling pathway by thyroid hormone receptor β in thyroid cancer cells

PLoS One, 9: e116252, 2014 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0116252

Shiraishi, N., Kitamura, K., Kohda, Y., Iseki, K., and Tomita, K.

Prevalence and risk factor analysis of nephrosclerosis and ischemic nephropathy in the Japanese general population

Clin. Exp. Nephrol., 18: 461-468, 2014 査読有 doi: 10.1007/s10157-013-0833-5

Morinaga, J., Kakizoe, Y., Miyoshi, T., Onoue, T., Ueda, M., Mizumoto, T., Yamazoe, R., Uchimura, K., Hayata, M., Shiraishi, N., Adachi, M., Sakai, Y., Tomita, K., and Kitamura, K.

The antifibrotic effect of a serine protease inhibitor in the kidney

Am. J. Physiol. (Renal Physiol.), 305: F173-181, 2013 査読有 doi: 10.1152/ajprenal.00586

Olivieri, O.,* Chiecchi, L., Pizzolo, F., Castagna, A., Raffaelli, R., Gunasekaran, M., Guarini, P., Consoli, L., Salvagno, G., and Kitamura, K.

Urinary prostaticin in normotensive individuals: correlation with the aldosterone to renin ratio and urinary sodium

Hypertens. Res., 36: 528-533, 2013 査読有 doi: 10.1038/hr.2012.232

Ushio-Yamana, H., Minegishi, S., Ishigami, T., Araki, N., Umemura, M., Tamura, K., Maeda, E., Kakizoe, Y., Kitamura, K., and Umemura, S.

Renin angiotensin antagonists normalize aberrant activation of epithelial sodium channels in sodium-sensitive hypertension

Nephron Exp. Nephrol., 122: 95-102, 2013 査読有 doi: 10.1159/000348660

Kadowaki, D., Sumikawa, S., Arimizu, K.,

Taguchi, K., Kitamura, K., Ishitsuka, Y., Narita, Y., Irie, T., Chuang, V.T., Maruyama, T., Otagiri, M., and Hirata, S.

Effect of acetaminophen on the progression of renal damage in adenine induced renal failure model rats

Life Sci., 91: 1304-1308, 2012 査読有

Hayata, M., Kakizoe, Y., Uchimura, K., Morinaga, J., Yamazoe, R., Mizumoto, T., Onoue, T., Ueda, M., Shiraishi, N., Adachi, M., Miyoshi, T., Sakai, Y., Tomita, K., and Kitamura, K.

Effect of a serine protease inhibitor on the progression of chronic renal failure

Am. J. Physiol. (Renal Physiol.), 303: F1126-1135, 2012 査読有 doi: 10.1152/ajprenal.00706.2011

Uchimura, K., Kakizoe, Y., Onoue, T., Hayata, M., Morinaga, J., Yamazoe, R., Ueda, M., Mizumoto, T., Adachi, M., Miyoshi, T., Shiraishi, N., Sakai, Y., Tomita, K., and Kitamura, K.

In vivo contribution of serine proteases to the proteolytic activation of γ ENaC in aldosterone-infused rats

Am. J. Physiol. (Renal Physiol.), 303: F939-943, 2012 査読有 doi: 10.1152/ajprenal.00705.2011

Kitamura, K. and Tomita, K.

Proteolytic activation of the epithelial sodium channel and therapeutic application of a serine protease inhibitor for the treatment of salt-sensitive hypertension

Clin. Exp. Nephrol., 16: 44-48, 2012 査読有 doi: 10.1007/s10157-011-0506-1

Shiraishi, N., Kitamura, K., Hayata, M.,

Ogata, T., Adachi, M., Kajiwara, K., Ikeda, H., Miyoshi, T., and Tomita, K.

Case of anti-glomerular basement membrane antibody-induced glomerulonephritis with cytomegalovirus-induced thrombotic microangiopathy

Intern. Med. J., 42: e7-11, 2012 査読有
doi: 10.1111/j.1445-5994.2011

〔学会発表〕(計6件)

プロスタシンによる TLR4 の発現制御を介した肝臓におけるインスリン抵抗性発症機序の解明

内村 幸平, 早田 学, 水本 輝彦, 柿添 豊, 福田 一起, 近藤 龍也, 松村 剛, 荒木 栄一, 向山 政志, 北村 健一郎

日本心血管内分泌代謝学会総会 2014 年 11 月 21~22 日 横浜市開港記念会館(神奈川県横浜市)

ANGPTL2 は腎線維化を促進する

森永 潤, 北村 健一郎, 富田 公夫, 尾池 雄一

日本腎臓学会学術総会 2014 年 7 月 4~6 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

CKD に対するメシル酸カモスタット(CM) と ARB の腎保護効果の検討

植田 美紀, 内村 幸平, 成田 勇樹, 水本 輝彦, 尾上 友朗, 山添 リカ, 森永 潤, 早田 学, 白石 直樹, 實吉 拓, 安達 政隆, 酒井 芳紀, 富田 公夫, 北村 健一郎

日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10~12 日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

アルドステロン誘発性腎障害におけるプラスミンの活性化とセリンプロテアーゼ阻害薬の腎保護効果

尾上 友朗, 柿添 豊, 早田 学, 内村 幸平,

森永 潤, 山添 リカ, 水本 輝彦, 植田 美紀, 酒井 芳紀, 富田 公夫, 北村 健一郎

日本腎臓学会学術総会 2013 年 5 月 10~12 日 東京国際フォーラム(東京都千代田区)

メタボリックシンドローム(Mets)における腎障害進展へのセリンプロテアーゼ(SP)の関与

水本 輝彦, 北村 健一郎, 植田 美紀, 尾上 友朗, 山添 リカ, 森永 潤, 内村 幸平, 早田 学, 白石 直樹, 實吉 拓, 安達 政隆, 酒井 芳紀, 富田 公夫

日本腎臓学会学術総会 2012 年 6 月 1~3 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

慢性腎不全に対するセリンプロテアーゼインヒビターの効果

早田 学, 北村 健一郎, 内村 幸平, 森永 潤, 山添 リカ, 水本 輝彦, 尾上 友朗, 植田 美紀, 白石 直樹, 安達 政隆, 實吉 拓, 酒井 芳紀, 富田 公夫

日本腎臓学会学術総会 2012 年 6 月 1~3 日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://yamanashi-3nai.com/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

北村 健一郎(KITAMURA, Kenichiro)

山梨大学・総合研究部・教授

研究者番号: 10304990