

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461234

研究課題名(和文) Pax8-rtTA/LC-1システムを用いた腎尿細管近位側プロスタシンの機能解明

研究課題名(英文) The evaluation of role of prostaticin in the proximal tubule with Pax8-rtTA/LC-1 system.

研究代表者

柿添 豊 (Kakizoe, Yutaka)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：70583037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腎尿細管に発現しているセリンプロテアーゼ・プロスタシンの慢性腎臓病、特に腎間質線維化への作用を検証するためプロスタシンとその内因性阻害物質の尿細管特異的ノックアウトマウスを作製し、各種腎障害モデルを用いて解析を行った。アルドステロン+食塩負荷モデルや一側尿管結紮腎線維化モデルを作製したが、いずれにおいてもプロスタシンもしくはHAI-1のノックアウトで有意な障害の軽減や増悪を認めなかった。さらに急性腎障害のモデルであるシスプラチン腎症モデルの検討を行ったが、こちらも有意な変化は認めなかった。これらの実験結果よりプロスタシンやHAI-1の腎障害への関与は低いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the role of a serine protease prostaticin in the pathogenesis of chronic kidney injury, particularly renal interstitial fibrosis, using renal tubule specific prostaticin and its endogenous inhibitor, HAI-1, knock out mice. No amelioration or exaggeration of renal injury was observed in aldosterone/salt model and unilateral ureter obstruction model. Furthermore, the deletion of HAI-1 had no effect on the renal tubule necrosis caused by cisplatin. Our study suggests that renal tubular prostaticin and HAI-1 are not associated with renal injury in those disease model.

研究分野：腎臓病学

キーワード：プロスタシン HAI-1 セリンプロテアーゼ 慢性腎臓病 アルドステロン

1. 研究開始当初の背景

日本では成人人口のおよそ8人に1人が慢性腎臓病(CKD)患者であると言われており、透析患者は平成23年度以後30万人を超えており、今後も更なる増加が予想される。アルドステロンは古くから昇圧ホルモンとして知られていたが、腎臓や心臓などの臓器を血圧非依存的に障害することが報告され、多くのCKDに対し増悪因子となっている。この直接的な臓器障害の機序としては、炎症、線維化、酸化ストレス亢進などが報告されているが、詳細な機序は未だ不明である。アルドステロンによる昇圧の機序としては、集合尿細管に存在する上皮型チャネル(ENaC)によるNa再吸収亢進が重要であるが、この作用にセリンプロテアーゼは深く関与している。当教室ではこれまでにGPIアンカー型/分泌型セリンプロテアーゼであるプロスタシンを単離し、プロスタシンが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させ腎臓でのNa再吸収を増加させること(*J. Clin. Invest.*, 2002)を報告している。さらにDahl食塩感受性高血圧ラットでは食塩負荷により尿中プロスタシン排泄の増加とそれに伴うENaCの活性化を認め(*J. Hypertens.*, 2009)、プロスタシン活性を抑制する合成セリンプロテアーゼ阻害薬(SPI)はDahlラットの血圧上昇と腎障害を抑制した(*J. Hypertens.*, 2009)。さらにSPIはアルドステロン負荷時のプロスタシンを介したENaCの切断・活性化を抑制しNa利尿を促進することも報告している(*AJP renal.*, 2012)。またSPIは5/6腎摘出CKDモデルラットや(*AJP renal.*, 2012)、一側尿管結紮腎線維化モデルラット(*AJP renal.*, 2013)の糸球体硬化と間質の線維化を抑制した。研究開始時にアルドステロン+高食塩負荷ラットにおいて、SPIはプロスタシンの前駆体から活性体への変換を抑制し、腎間質の線維化を著明に抑制する所見を得ていた。腎臓内においてプロスタシンは集合尿細管のみならずENaCが存在しない近位からヘンレ尿細管にかけても強く発現することを確認しているが、近位側のプロスタシンの機能はこれまで明らかにされておらず、アルドステロン負荷時には近位側プロスタシンが腎障害を誘導している可能性がある。セリンプロテアーゼによる臓器障害の機序に関してはこれまでに、細胞外基質の分解、matrix metalloproteinaseの活性化、TGF-β1、MCP-1やIL-1等のサイトカインの活性化、Protease activated receptor(PAR)を介したepithelial mesenchymal transitionなどが報告されている。プロスタシンはトリプシン様の酵素活性を有するためこのPARを活性化する可能性が高く、アルドステロンにより誘導された近位側のプロスタシンがこうした機序を介して腎組織の炎症・線維化を誘導している可能性がある。しかし、プロスタシンのKOマウスは胎生致死であるため、これまで生体におけるプロスタシンの機能に

ついて十分に検討を行うことができなかった。Pax8-rtTA/LC-1ダブルトランスジェニックマウスはPax8プロモーターにrtTA(reverse tetracycline trans activator)cDNAを結合した組換え遺伝子と、TRE(tetracycline responsive element)の下流にCre recombinase/luciferase配列を結合させた組換え遺伝子を合わせ持ち、doxycycline(Dox)の投与下でPax8が発現する尿細管のみにCre recombinaseを発現させる(*Nat. Med.*, 2008)。プロスタシン(Prss8)のloxP-flanked alleleを持つマウスとの交配によりPax8-rtTA/LC-1/Prss8<sup>lox/lox</sup>を作製し、プロスタシンの尿細管特異的KOマウス(TKO)を作製する。さらにプロスタシンの内因性阻害分子であるHAI-1(hepatocyte growth factor activator inhibitor-1)のTKOも作製する。

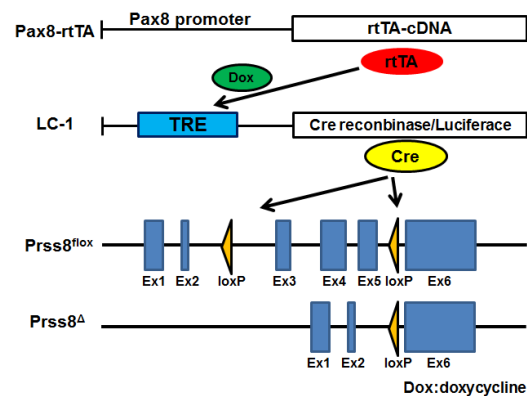
2. 研究の目的

本研究の目的はPax8-rtTA/LC-1システムを用いてプロスタシンおよびHAI-1のTKOマウスを作製し、これまで機能が明らかにされていない近位からヘンレ尿細管にかけてのプロスタシンの腎障害に対する役割とその腎障害作用機序を明らかにし、プロスタシンカスケードを標的とした新たなCKD治療法の可能性を検討することである。

3. 研究の方法

Pax8-rtTA/LC-1/ Prss8<sup>lox/lox</sup>マウスにdoxycycline (Dox) 2mg/mlを約10日間飲水させ、TKOを作製する(図1)。コントロールとしてPax8-rtTA/ Prss8<sup>lox/lox</sup>もしくはLC-1/ Prss8<sup>lox/lox</sup>マウスにDoxを投与したものを使用する。HAI-1についても同様に作製する。

図2 Pax8-rtTA/LC-1/Prss8<sup>lox/lox</sup>



1) プロスタシンTKOマウスの解析  
マウスを代謝ケージで飼育し、24時間蓄尿を施行した後sacrificeし、両腎を採取する。TKOによる尿量、電解質変化を確認する。続いて、浸透圧ポンプを用いてアルドステロンを皮下持続投与(20ug/kg/day)し、同時に高食塩食(8.0%NaCl)を開始する。4週間の観察の後マウスをsacrificeする。血圧、血液生化学、尿アルブミン排泄、腎組織学的変化、WBおよびreal-time PCRによる腎障害マーカーの変化を確認する。

## 2) HAI-1 TKO マウスの解析

マウスを代謝ケージで飼育し、24 時間蓄尿を施行した後 sacrifice し、両腎を採取する。TKO による尿量、電解質変化を確認する。また食塩を経口急性負荷(1mEq)し、24 時間での尿 Na 排泄量を測定する。

また、腎線維化における尿細管 HAI-1 の役割を確認するため、一側尿管結紮(UUO)モデルを作製し、Day7 で sacrifice し、WB および real-time PCR による腎障害マーカーの変化を確認する。。さらにシスプラチン (20mg/kg) を腹腔内投与し、Day3 で sacrifice し、急性尿細管壊死に対する HAI-1 の役割を検討する。

## 4 . 研究成果

### 1) プロスタシン TKO マウスの解析

Dox 投与により腎組織中プロスタシンは著明に減少した。さらに尿中プロスタシンはほぼ消失し尿中プロスタシンは尿細管細胞に由来することが確認できた(図 1)。

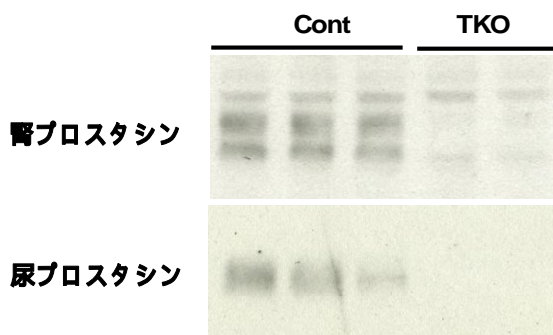


図1 .プロスタシンKOの確認

しかし、コントロールと比較しTKOで体重、尿量、飲水量、尿中各種電解質排泄に変化を認めなかった(表 1, 有意差なし)。

表 1	Cont	プロスタシンTKO
BW (g)	21.7 ± 2.9	21.9 ± 2.4
尿量 (m l)	2.9 ± 0.5	2.5 ± 0.5
飲水量 (m l)	8.6 ± 1.8	8.1 ± 1.1
尿-Na (m Eq/day)	0.28 ± 0.07	0.29 ± 0.05
尿-Cl (m Eq/day)	0.52 ± 0.12	0.49 ± 0.07
尿-K (m Eq/day)	0.71 ± 0.09	0.65 ± 0.13
尿-Ca (m g/day)	0.09 ± 0.03	0.07 ± 1.3
尿-P (m g/day)	5.81 ± 1.68	5.81 ± 1.35
尿-M g (m g/day)	1.43 ± 0.27	1.31 ± 0.21

続いてマウスにアルドステロンと食塩を負荷し、血圧・腎障害を評価した。両群のマウスで血圧に変化は認めなかった(SBP(mmHg): Cont 96.5±8.5, TKO 99.4±7.1, 有意差なし)。

4 週後の尿アルブミン排泄(銀染色)もコントロールと TKO で差を認めなかった。また real-time PCR で評価した腎障害マーカーの発現も有意な変化は確認できなかった(有意差なし)。

TKO では他のセリンプロテアーゼが誘導さ

れ代償的に作用している可能性も考えられ、腎組織中セリンプロテアーゼ活性をセリンプロテアーゼ特異的ザイモグラフィで評価したが、使用した基質においてはコントロールと TKO でセリンプロテアーゼ活性に差を認めなかった。

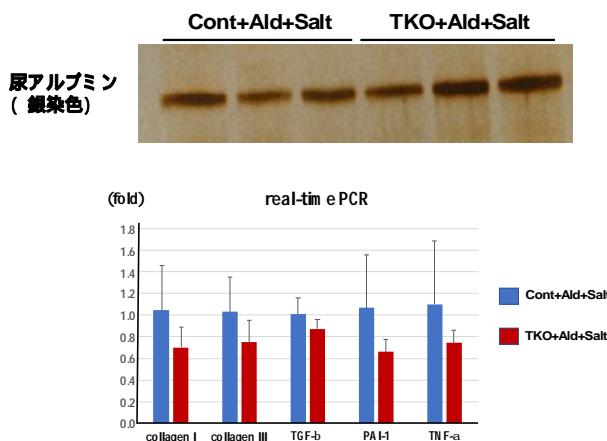


図2.アルドステロン+食塩負荷後の尿中アルブミン排泄と腎障害マーカー

### 2) HAI-1 TKO マウスの解析

続いて HAI-1 TKO マウスの解析を行った。Dox 投与により腎組織中 HAI-1 は著明に減少した(図 3)。しかし、コントロールと比較しTKOで体重、尿量、飲水量、尿中各種電解質排泄に変化を認めなかった(表 2, 有意差なし)。

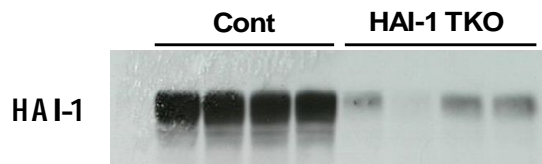


図3.HAI-1 KOの確認

表 2	Cont	HAI-1 TKO
BW (g)	23.5 ± 0.9	24.4 ± 2.2
尿量 (m l)	1.9 ± 0.9	2.0 ± 0.5
尿-Na (m Eq/day)	0.23 ± 0.06	0.24 ± 0.04
尿-Cl (m Eq/day)	0.42 ± 0.13	0.40 ± 0.08
尿-K (m Eq/day)	0.58 ± 0.16	0.56 ± 0.09

さらに、急性塩分負荷を施行したが、12 時間毎の塩分排泄量はコントロールと TKO で差を認めず、TKO によるナトリウムバランスの異常は認めなかった(図 4)。

次に UUO により炎症、線維化マーカーの評価を行った。Real-time PCR および WB による  $\alpha$ -SMA の蛋白発現は TKO による変化を認めなかった(図 5)。

最後にシスプラチン腎症の解析を行った。シスプラチン投与後 72 時間後の BUN、Cr の上昇は TKO で変化を認めなかった (BUN(mg/dL): Cont 131.6±83.9, TKO 123.0±54.8. Cr(mg/dL) : Cont 0.7±0.4, TKO

0.6±0.3. 有意差なし)。

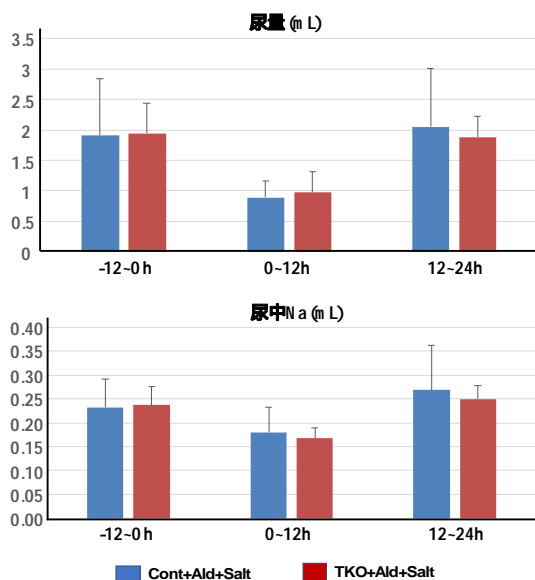


図4. 急性食塩負荷後の尿量と尿中ナトリウム排泄

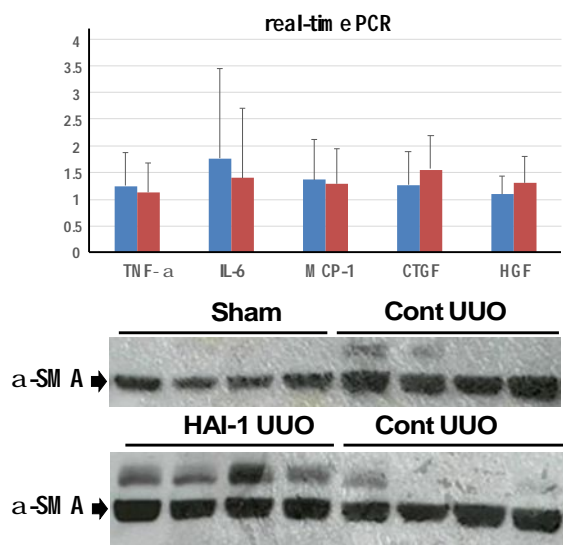


図5. UUOによる腎障害マーカーの発現変化

本研究ではプロスタシンとその内因性阻害物質であるHAI-1の尿中ナトリウム・電解質排泄とアルドステロン/食塩等による腎線維化および急性尿細管傷害への役割を解析したが、いずれも有意な変化を認めなかった。腎尿細管には複数のセリンプロテアーゼおよびインヒビター(セルピン)が発現しており、単独の因子が欠損しても他の分子が代償している可能性があるが、本研究では確認できなかった。

##### 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9件)

1. Izumi Y, Inoue H, Nakayama Y, Eguchi K, Yasuoka Y, Matsuo N, Nonoguchi H,

Kakizoe Y, Kuwabara T, Mukoyama M. TSS-Seq analysis of low pH-induced gene expression in intercalated cells in the renal collecting duct. **PLoS One**. 2017 Aug 31;12(8):e0184185. 査読有

2. Luo R, Kakizoe Y, Wang F, Fan X, Hu S, Yang T, Wang W, Li C. Deficiency of mPGES-1 exacerbates renal fibrosis and inflammation in mice with unilateral ureteral obstruction. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2017 Jan 1;312(1):F121-F133. 査読有

3. Kakizoe Y, Miyasato Y, Onoue T, Nakagawa T, Hayata M, Uchimura K, Morinaga J, Mizumoto T, Adachi M, Miyoshi T, Sakai Y, Tomita K, Mukoyama M, Kitamura K. A serine protease inhibitor attenuates aldosterone-induced kidney injuries via the suppression of plasmin activity. **J Pharmacol Sci**. 2016 Oct;132(2):145-153. 査読有

4. Iwashita Y, Kuwabara T, Hayata M, Kakizoe Y, Izumi Y, Iiyama J, Kitamura K, Mukoyama M. Mild systemic thermal therapy ameliorates renal dysfunction in a rodent model of chronic kidney disease. **Am J Physiol Renal Physiol**. 2016 Jun 1;310(11):F1206-15. 査読有

5. Yoshimura Y, Kuwabara T, Shiraishi N, Kakizoe Y, Tasaki M, Obayashi K, Ando Y, Mukoyama M. Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy found with abnormal urinalysis at a general health checkup. **Nephrology (Carlton)**. 2016 Apr;21(4):341-2. 査読有

6. Narita Y, Ueda M, Uchimura K, Kakizoe Y, Miyasato Y, Mizumoto T, Morinaga J, Hayata M, Nakagawa T, Adachi M, Miyoshi T, Sakai Y, Kadowaki D, Hirata S, Mukoyama M, Kitamura K. Combination therapy with renin-angiotensin-aldosterone

system inhibitor telmisartan and serine protease inhibitor camostat mesilate provides further renoprotection in a rat chronic kidney disease model. **J Pharmacol Sci.** 2016 Feb;130(2):110-6. 査読有

7. Ueda M, Uchimura K, Narita Y, Miyasato Y, Mizumoto T, Morinaga J, Hayata M, Kakizoe Y, Adachi M, Miyoshi T, Shiraishi N, Kadowaki D, Sakai Y, Mukoyama M, Kitamura K. The serine protease inhibitor camostat mesilate attenuates the progression of chronic kidney disease through its antioxidant effects. **Nephron.** 2015;129(3):223-32. 査読有
8. Sun Y, Jia Z, Yang G, Kakizoe Y, Liu M, Yang KT, Liu Y, Yang B, Yang T. mPGES-2 deletion remarkably enhances liver injury in streptozotocin-treated mice via induction of GLUT2. **J Hepatol.** 2014 Dec;61(6):1328-1336. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.018. Epub 2014 Jul 27. 査読有
9. 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, Kitamura K. The serine protease prostaticin regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signalling. **Nat Commun.** 2014 Mar 11;5:3428. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

1. Yasunobu Iwata, Yutaka Kakizoe, Terumasa Nakagawa, Yuichiro Izumi, Takashige Kuwabara, Masataka Adachi, Kenichiro Kitamura, Masashi Mukoyama. The effect of serine protease inhibition on glomerular injuries in salt-sensitive hypertension. **アメリカ腎臓学会 Renal Week 2017, ニューオリンズ, 米国 (2017年11月)**

2. Yuichiro Izumi, Koji Eguchi, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Hiroshi Nonoguchi, Yutaka Kakizoe, Takashige Kuwabara, Masashi Mukoyama. Urinary acid excretion in overweight patients with CKD. **アメリカ腎臓学会 Renal Week 2017, ニューオリンズ, 米国 (2017年11月)**
3. Shuro Umemoto, Takashige Kuwabara, Daisuke Fujimoto, Tomoko Kanki, Teruhiko Mizumoto, Yutaka Kakizoe, Yuichiro Izumi, Kiyoshi Mori, Masashi Mukoyama. Local inflammatory mechanism aggravated by intraglomerular crosstalk in diabetic kidney. **アメリカ腎臓学会 Renal Week 2017, ニューオリンズ, 米国 (2017年11月)**
4. Mami Sugimoto, Hideki Inoue, Mikiko Fukagawa, Tomoko Yamasaki, Yutaka Kakizoe, Yuichiro Izumi, Takashige Kuwabara, Masataka Adachi, Yushi Nakayama, Masashi Mukoyama. Renal heavy/light-chain amyloidosis diagnosed by immunostaining and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in a patient with non-ischemic cardiomyopathy. **アメリカ腎臓学会 Renal Week 2017, ニューオリンズ, 米国 (2017年11月)**
5. 梅本周朗, 栗原孝成, 神吉智子, 藤本大介, 水本輝彦, 早田学, 泉裕一郎, 柿添豊, 向山政志. 糸球体内メサンギウム細胞-Mφの細胞間クロストークにおけるERストレス応答の検討. 第60回日本腎臓学会学術総会, 仙台国際センター, 宮城 (2017年5月)
6. 泉裕一郎, 江口剛人, 松尾尚美, 中山裕史, 井上秀樹, 柿添豊, 栗原孝成, 野々口博史, 向山政志. NFAT5とEGR1を介した浸透圧変化とpH変化の相互作用の検討. 第60回日本腎臓学会学術総会,

- 仙台国際センター，宮城（2017年5月）
7. 岩田康伸，中川輝政，柿添豊，泉裕一郎，  
栞原孝成，安達政隆，向山政志．食塩感  
受性高血圧における糸球体障害へのセリ  
ンプロテアーゼ阻害薬の効果の検討．第  
60回日本腎臓学会学術総会，仙台国際セ  
ンター，宮城（2017年5月）
  8. 藤本大介，栞原孝成，神吉智子，梅本周  
朗，水本輝彦，早田学，泉裕一郎，柿添豊，  
向山政志．ポドサイトとメサングウム細  
胞における細胞間クロストークが ER ス  
トレス応答に及ぼす影響の検討．第60回  
日本腎臓学会学術総会，仙台国際センタ  
ー，宮城（2017年5月）
  9. 江口剛人，泉裕一郎，中山裕史，井上秀  
樹，中川輝政，松尾尚美，柿添豊，栞原孝  
成，向山政志．集合管間在細胞における  
アルドステロンとユビキチン-プロテア  
ソーム系を介した Rhcg 発現調節につい  
ての検討．第60回日本腎臓学会学術総会，  
仙台国際センター，宮城（2017年5月）

〔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

柿添 豊（KAKIZOE YUTAKA）

熊本大学大学院生命科学研究部・腎臓内科学  
分野・助教

研究者番号：70583037