

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：17401  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2017～2019  
課題番号：17K15509  
研究課題名(和文) セリンプロテアーゼを介した酸化ストレス制御を標的としたCKD新規治療戦略の構築

研究課題名(英文) Construction of novel CKD therapeutic strategy targeting oxidative stress regulation via serine protease

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我が国では、慢性腎臓病(CKD)の進展阻止による医療費の抑制が医療課題となっている。本研究では、腎障害進展の一因として注目されている酸化ストレス亢進へのセリンプロテアーゼの関与について検討した。その結果、動物実験では、セリンプロテアーゼの関与は明らかにならなかったものの、培養細胞および *in vitro* 実験からセリンプロテアーゼを介し酸化ストレスが制御されている可能性が示され、その一つにFXa-PAR2経路が関与していることが示唆された。本研究で得られた成果は、腎障害進展におけるセリンプロテアーゼの機能解明とCKD治療における新規治療戦略の構築に向けた基盤情報になると考えられる。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、セリンプロテアーゼを介し酸化ストレスが制御されている可能性を示した研究である。酸化ストレスは、腎障害進展機序の一因として以前から注目されており、抗酸化薬の腎疾患治療への応用が期待されている。本研究により、腎疾患における病態形成の共通基盤となる酸化ストレスに対するセリンプロテアーゼの関与が明らかとなり、CKDを含めた種々の腎疾患の病態解明や既存のセリンプロテアーゼ阻害薬を治療薬として応用するための基盤情報になると考えられる。新規治療薬が強く切望されているCKDに対し新たな治療戦略を提示することで、CKDの進展阻止による医療費の抑制に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In Japan, curbing medical costs by preventing the progression of chronic kidney disease (CKD) has become a medical issue. In this study, we investigated the involvement of serine proteases in the enhancement of oxidative stress, which has been attracting attention as one of the factors that contribute to the progression of renal disorders. As a result, animal studies did not reveal the involvement of serine proteases. However, cultured cell experiments and *in vitro* experiments showed that oxidative stress might be regulated by serine proteases, suggesting that the FXa-PAR2 pathway is involved in one of them. Those results may serve as the basic information for elucidating the function of serine proteases in the progression of renal disorders and establishing new CKD therapeutic strategies.

研究分野：医療薬学

キーワード：セリンプロテアーゼ 酸化ストレス 腎障害

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国では、慢性腎臓病 (CKD) の進展による透析患者が年々増加し、2014 年末には 32 万人を超えている。また、透析療法には 1 人あたり年間約 500 万円を要し、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ため、CKD の進展を阻止することが極めて重要な医療課題となっている。これまで、CKD 治療薬として ACE 阻害薬や ARB などのレニン・アンジオテンシン系 (RAS) 阻害薬が成果を挙げているが、CKD の進展を完全には阻止できておらず、常に高カリウム血症の副作用が問題となっている。そのため、臨床現場では RAS 阻害薬に勝る新規治療薬の開発が強く切望されている。

一方、経口投与可能な合成セリンプロテアーゼ阻害薬の 1 つであるカモスタット (CM) は、日本国内において既に臨床使用されている薬剤で、広範囲のセリンプロテアーゼを阻害することが知られている。これまでに申請者は、この CM を 5/6 腎臓摘出慢性腎不全モデルラットに投与することで、CM が抗酸化作用を発揮し、CKD の腎障害進展を抑制することを見出している。加えて、電子スピン共鳴法 (ESR) を用いた検討で CM による抗酸化作用には化学構造に基づくラジカルスカベンジャー様の直接的な機序が関与していることを報告した。更に、興味深いことに培養細胞を用いた検討で、CM はラジカルスカベンジ作用を示すよりも低濃度で酸化ストレスを抑制したことから、ラジカルスカベンジャー様の直接的な機序とは異なる抗酸化メカニズムが関与する可能性が想起された。

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たしているのに加え、酸化ストレス亢進と深く関わっていることが明らかとなっている。これまでに、トリプシン、キモトリプシンといったセリンプロテアーゼによってスーパーオキシドおよび過酸化水素が産生されることやキサンチンデヒドロゲナーゼが、トリプシンなどによってキサンチンオキシダーゼに変換され活性酸素 (ROS) を産生すること、更には、セリンプロテアーゼ阻害薬であるトシルフェニルアラニクロロメチルケトンが ROS 産生を抑制することが報告されている。そのため、CM による抗酸化作用には化学構造に基づくラジカルスカベンジャー様の直接的な機序とともに、セリンプロテアーゼ阻害作用による間接的な機序が関与しており、“CM のセリンプロテアーゼを介した酸化ストレス制御が CKD の腎障害進展を抑制したのでは” という考えに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、“CM のセリンプロテアーゼを介した酸化ストレス制御が CKD の腎障害進展を抑制する” という仮説を立て、セリンプロテアーゼによる酸化ストレス亢進メカニズムを明らかにし、腎障害進展におけるセリンプロテアーゼの機能解明と CKD 治療における新規治療戦略を構築することを目的に検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) CM の投与により腎組織中の発現量変化が生じるセリンプロテアーゼ群の同定

3 週間の高アデニン (0.75%)・低タンパク食 (2.5%) の摂餌によりアデニン誘発慢性腎不全モデルラットを作製し、Control 群、CKD 群、CKD + CM (200mg/kg) 群の 3 群に分け、5 週間の薬物投与を行った後、血液採取および腎臓の摘出を行った。摘出した腎臓を超音波破砕機によって破砕し、タンパク質を可溶化した後にトリプシン消化を行い、生成されたペプチド混合物を HPLC にかけて各ペプチドに分離し、MS/MS 解析によってセリンプロテアーゼ群の同定を試みた。

#### (2) 培養細胞実験および *in vitro* 実験による酸化ストレス制御へのセリンプロテアーゼの関与についての解析

ヒト近位尿管細胞 (HK-2) 細胞を用いて、インドキシル硫酸 (IS) およびアンジオテンシン II (AII) によって誘導された酸化ストレスに対する CM およびアプロチニン (AP) の細胞内抗酸化活性を評価した。細胞内抗酸化活性の評価には、ジクロロフルオレセインジアセテート (DCFDA) を用いた。DCFDA は非蛍光性であるが、細胞内に取り込まれ ROS によって酸化されると、蛍光性の DCF に変化するため、この蛍光をマイクロプレートリーダーを用いて測定した。また、ROS であるヒドロキシルラジカルに対する直接的な消去能を ESR 法、ペルオキシナイトライトに対する直接的な消去能を蛍光法、スーパーオキシドラジカルに対する直接的な消去能を化学発光法で評価した。加えて、上記の方法にて、ガベキサートメシル酸、ナファモスタットメシル酸の細胞内抗酸化活性および直接的な消去能を評価した。

#### (3) 培養細胞実験による酸化ストレス制御へのセリンプロテアーゼ・FXa の関与についての解析

HK-2 細胞を用いて、セリンプロテアーゼの一つである FXa によって誘導された酸化ストレスに対する FXa 阻害剤・エドキサパン (EDO) および FXa が活性化する PAR2 の阻害剤である FSLLRV-NH2 の細胞内抗酸化活性を評価した。また、IS および AII によって誘導された酸化ストレスに対する EDO の細胞内抗酸化活性を評価した。

4. 研究成果

(1) CMの投与により腎組織中の発現量変化が生じるセリンプロテアーゼ群の同定

Control群、CKD群、CKD+CM (200mg/kg)群の3群に分け、5週間の薬物投与を行った後、摘出した腎組織中で発現量変化が生じているセリンプロテアーゼの同定を試みた。しかしながら、CMによる腎障害の進展抑制効果(図1A)および抗酸化作用は確認されたものの(図1B,C)、腎組織中で発現量変化が生じているセリンプロテアーゼの同定には至らなかった。

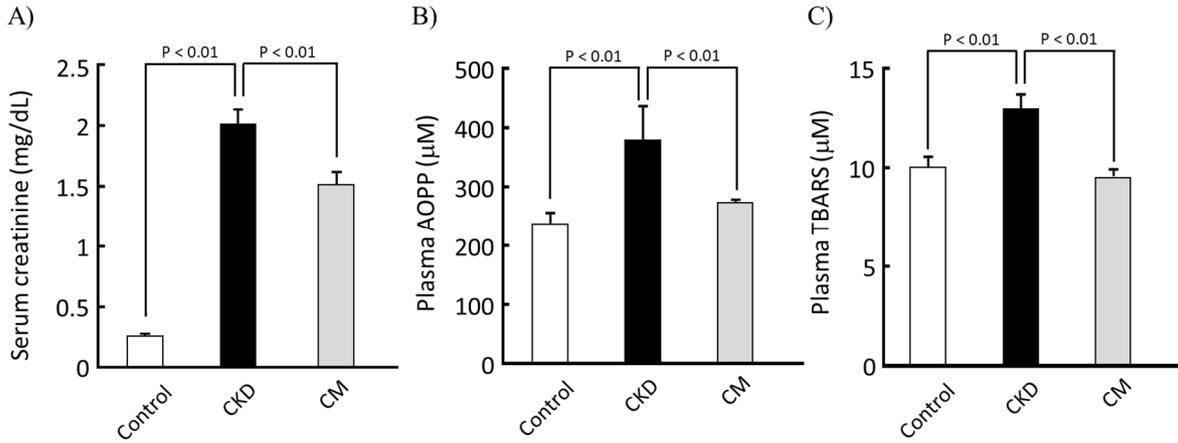


図1. 血清クレアチニン (A) および酸化ストレスマーカー (B, C) の変動

(2) 培養細胞実験および *in vitro* 実験による酸化ストレス制御へのセリンプロテアーゼの関与についての解析

動物実験にて酸化ストレス制御に関与するセリンプロテアーゼの同定に至らなかったため、細胞実験にて検討を行った。HK-2細胞を用いて、CMおよびセリンプロテアーゼの典型的な阻害剤であるアプロチニンの細胞内抗酸化活性を評価した。なお、ポジティブコントロールとしてN-アセチルシステイン (NAC) を用いた。結果、腎障害時に酸化ストレスとの関連が示されているISおよびAIIによって誘導された酸化ストレスに対し、CMは0.1~10μMの濃度で細胞内ROS産生の有意な減少が確認された。同様に、APではISおよびAIIによって誘導された酸化ストレスに対し、1~100KIU/mLの濃度で細胞内ROS産生の有意な減少が確認された。

続いて、CMとアプロチニンの直接的なラジカル消去による抗酸化作用の違いを比較し、酸化ストレス制御へのセリンプロテアーゼの関与について解析を行った。なお、ポジティブコントロールとしてビタミンC (VC) を用いた。まず、ヒドロキシルラジカルに対する直接的な消去能をESR法にて評価した結果、CMは10~1000μMの濃度で直接的なラジカル消去による抗酸化作用が確認されたものの、APでは100~10000KIU/mLのどの濃度でも確認されなかった。次に、ペルオキシナイトライトに対する直接的な消去能を蛍光法にて評価した結果、CMは100~1000μMの濃度で直接的なラジカル消去による抗酸化作用が確認されたものの、APでは100~10000KIU/mLのどの濃度でも確認されなかった。最後に、スーパーオキシドラジカルに対する直接的な消去能を化学発光法にて評価した結果、CMは10~1000μMの濃度で直接的なラジカル消去による抗酸化作用が確認されたものの、APでは100~10000KIU/mLのどの濃度でも確認されなかった。CMは細胞内ROSに対する抗酸化作用および直接的なラジカル消去による抗酸化作用を示し、アプロチニンは直接的なラジカル消去による抗酸化作用を示さないものの、細胞内ROSに対する抗酸化作用を示すことから、セリンプロテアーゼを介し酸化ストレスが制御されている可能性が考えられた。

同様に、ガベキサートメシル酸、ナファモスタットメシル酸の細胞内抗酸化活性および直接的な消去能を評価した。その結果、ガベキサートメシル酸は直接的なラジカル消去による抗酸化作用を示さないものの、細胞内ROSに対する抗酸化作用が確認された。このことから、セリンプロテアーゼを介し酸化ストレスが制御されている可能性が考えられた。

(3) 培養細胞実験による酸化ストレス制御へのセリンプロテアーゼ・FXaの関与についての解析

酸化ストレスとの関連が報告されているセリンプロテアーゼ・FXaに関して、FXa阻害薬・EDOおよびFXaが活性化するPAR2の阻害剤であるFSLRY-NH2を用いて、FXaによって誘導された酸化ストレスに対する細胞内抗酸化活性を評価した。結果、FXaによって誘導された酸化ストレスに対し、EDOは0.1~100μMの濃度で細胞内ROS産生の有意な減少が確認された(図2A)。同様に、FXaによって誘導された酸化ストレスに対し、FSLRY-NH2で細胞内ROS産生の有意な減少が確認された。また、ISおよびAIIによって誘導された酸化ストレスに対するEDOの細胞内抗酸化活性を評価した。結果、ISによって誘導された酸化ストレスに対し、EDOは0.1~100μMの濃度で細胞内ROS産生の有意な減少が確認された(図2B)。また、AIIによって誘導された酸化ストレスに対し、EDOは100μMの濃度で細胞内ROS産生の有意な減

少が確認された (図 2 C)。エドキサバンおよび FSLLRV-NH2 の両薬剤で、FXa によって誘導された細胞内 ROS 産生が有意に減少したことから、FXa-PAR2 経路が酸化ストレス産生に参与していることが示唆された。

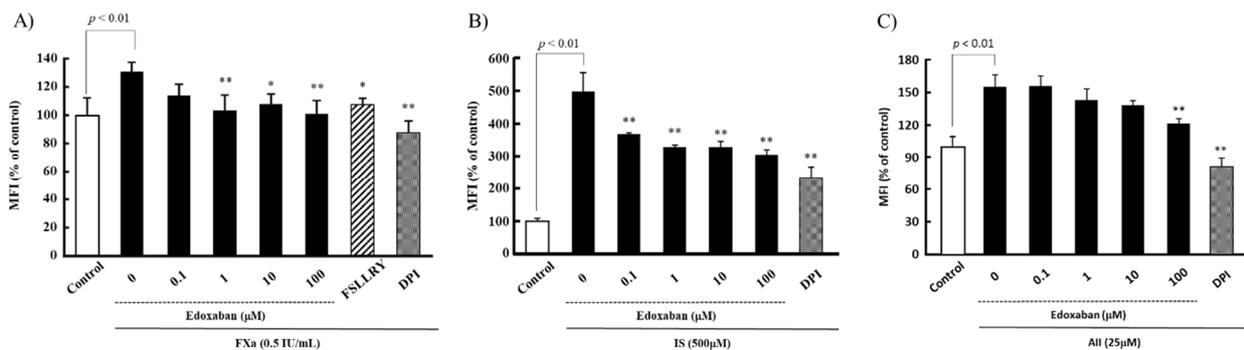


図 2 . FXa (A) および IS (B) ・ AII (C) によって誘導された酸化ストレスに対する EDO の細胞内抗酸化活性評価

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. FXa or IS or AII alone.

以上、本研究で得られた成果は、腎障害進展におけるセリンプロテアーゼの機能解明と CKD 治療における新規治療戦略の構築に向けた基盤情報になると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Narita Yuki, Hamamura Kana, Kashiyama Mami, Utsumi Sara, Kakizoe Yutaka, Kondo Yuki, Ishitsuka Yoichi, Jono Hirofumi, Irie Tetsumi, Mukoyama Masashi, Saito Hideyuki, Kadowaki Daisuke, Hirata Sumio, Kitamura Kenichiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Edoxaban Exerts Antioxidant Effects Through FXa Inhibition and Direct Radical-Scavenging Activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4140 ~ 4140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20174140	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 Nakatani Sakura, Maeda Keisuke, Akagi Junji, Ichigi Misato, Murakami Marina, Harada Yoshihiko, Utsumi Sara, Fukunaga Masaki, Narita Yuki, Kondo Yuki, Ishitsuka Yoichi, Irie Tetsumi, Kadowaki Daisuke, Hirata Sumio	4. 巻 42
2. 論文標題 Coefficient of Determination between Estimated and Measured Renal Function in Japanese Patients with Sarcopenia May Be Improved by Adjusting for Muscle Mass and Sex: A Prospective Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1350 ~ 1357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00154">https://doi.org/10.1248/bpb.b19-00154</a>	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 Kondo Yuki, Ishitsuka Yoichi, Kawabata Nobuhiro, Iwamoto Nobuhide, Takahashi Risa, Narita Yuki, Kadowaki Daisuke, Hirata Sumio, Uchino Satoru, Irie Tetsumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Knowledge and awareness of nonpharmacist salespersons regarding over-the-counter drug use in patients with chronic kidney disease in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0213763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0213763	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 Muraya Nanako, Kadowaki Daisuke, Miyamura Shigeyuki, Kitamura Kenichiro, Uchimura Kohei, Narita Yuki, Miyamoto Yohei, Chuang Victor Tuan Giam, Taguchi Kazuaki, Maruyama Toru, Otagiri Masaki, Hirata Sumio	4. 巻 2018
2. 論文標題 Benzbromarone Attenuates Oxidative Stress in Angiotensin II- and Salt-Induced Hypertensive Model Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oxidative Medicine and Cellular Longevity	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/7635274	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 Nakagawa Terumasa, Kakizoe Yutaka, Iwata Yasunobu, Miyasato Yoshikazu, Mizumoto Teruhiko, Adachi Masataka, Izumi Yuichiro, Kuwabara Takashige, Suenaga Naoki, Narita Yuki, Jono Hirofumi, Saito Hideyuki, Kitamura Kenichiro, Mukoyama Masashi	4. 巻 315
2. 論文標題 Doxycycline attenuates cisplatin-induced acute kidney injury through pleiotropic effects	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F1347 ~ F1357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00648.2017	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 Urata Motoki, Narita Yuki, Fukunaga Masaki, Kadowaki Daisuke, Hirata Sumio	4. 巻 22
2. 論文標題 Simple Formula for Predicting Drug Removal Rates During Hemodialysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 485 ~ 493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1744-9987.12675	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 榎山真美、成田勇樹、浜村佳奈、柿添豊、向山政志、門脇大介、平田純生、北村健一郎
2. 発表標題 腎疾患治療への応用を目指したカモスタットの抗酸化作用解析
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 成田勇樹、浜村佳奈、櫻山真美、近藤悠希、石塚洋一、入江徹美、門脇大介、平田純生
2. 発表標題 第Xa因子阻害剤エドキサバンの腎疾患治療への応用を目指した抗酸化作用の解析
3. 学会等名 第5回 日本医薬品安全性学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福永雅樹、内田朱美、末吉美優、前田仁志、成田勇樹、渡邊博志、丸山徹、瀬尾量、平田純生、門脇大介
2. 発表標題 ノイトロピンの抗酸化作用及び腎保護効果への寄与
3. 学会等名 第13回日本腎臓病薬物療法学会学術集会・総会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浜村佳奈、成田勇樹、櫻山真美、門脇大介、平田純生
2. 発表標題 第Xa因子阻害剤エドキサバンの抗酸化作用の解析と腎疾患治療への応用
3. 学会等名 第12回日本腎臓病薬物療法学会学術集会・総会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 成田勇樹、門脇 大介、平田 純生
2. 発表標題 腎と遠隔臓器保護を目指して～臨床につながる視点～
3. 学会等名 第28回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福永雅樹、兵藤沙耶、門脇大介、小谷俊介、成田勇樹、平田純生
2. 発表標題 アセトアミノフェン及びその代謝物の抗酸化作用の解析と慢性腎臓病治療への応用
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末吉美優、門脇大介、福永雅樹、目井瑞絵、成田勇樹、平田純生
2. 発表標題 ストレプトゾトシン誘発早期糖尿病モデルラットにおけるラクツロースの腎機能と腸内環境に及ぼす影響
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兵藤 沙耶、門脇 大介、成田 勇樹、平田 純生
2. 発表標題 アセトアミノフェン及びその代謝物の抗酸化作用の解析と慢性腎臓病治療への応用
3. 学会等名 第27回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----