

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590977

研究課題名 (和文) アルドステロンの腎障害におけるプロスタシンの関与とその阻害薬の腎保護作用の研究

研究課題名 (英文) Involvement of serine proteases in aldosterone-induced renal injury.

研究代表者

安達 政隆 (ADACHI MASATAKA)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90398206

研究成果の概要 (和文)：近年、心臓や腎臓などの臓器障害にアルドステロン (体内の塩を保持し、カリウムを排泄するホルモン) の関与が証明されたが、その詳細な機序は不明である。我々は食塩により高血圧を発症するラットに蛋白分解酵素 (セリンプロテアーゼ) を阻害する薬であるメシル酸カモスタットを投与することにより、高血圧の改善と腎障害が改善することを報告した。そこで、セリンプロテアーゼが高血圧や臓器障害に関与すると考え、アルドステロンと食塩を投与したラットにメシル酸カモスタットを投与した。その結果、高血圧が改善し、腎組織障害も改善することを証明した。さらに、このラットで誘導されるセリンプロテアーゼを同定し、このセリンプロテアーゼが腎障害に強く関与していると考えられた。これらの成績からセリンプロテアーゼ阻害薬がアルドステロンによる腎障害を改善する新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Aldosterone has been recently reported to have harmful effects on many organs independent of its hemodynamic effect. However the mechanisms of these effects have not been well understood.

We once reported that the administration of a synthetic serine protease inhibitor camostat mesilate lowered the elevated blood pressure and attenuated kidney injury in Dahl salt-sensitive rats. So it would be highly probable that serine proteases are involved in the pathogenesis of salt-sensitive hypertension and organ damages.

In this study, in order to elucidate the role of serine proteases in the kidney injury induced by aldosterone and salt, we administrated camostat to aldosterone/salt-treated uninephrectomized rats. As camostat ameliorated glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis in these rats, we searched and detected one serine protease which was induced by aldosterone/salt. Our results suggest that a serine protease is highly related to kidney injury induced by aldosterone/salt, and serine protease inhibitor could be a new strategy for the treatment of kidney injury associated with aldosterone in human.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：循環器・高血圧、生体分子、薬学、臨床

1. 研究開始当初の背景

近年、心臓や腎臓などの臓器障害にアルドステロンが強く関与していることが証明され、アルドステロンは上皮型 Na チャネル (ENaC) の活性化を介して高血圧を生じるのみならず組織障害を惹起し、相乗的に臓器障害を進展させると考えられている。アルドステロンの臓器障害の機序については酸化ストレスや炎症性サイトカインを増加させる等の報告は存在するがその詳細については不明な点も多い。これまで私たちはラット腎臓よりプロスタシンというセリンプロテアーゼをクローニングし、プロスタシンが ENaC を活性化すること、アルドステロンがプロスタシンの発現を増加させることを証明し、プロスタシンが食塩感受性高血圧症の発症に重要な役割を果たしている可能性を提唱してきた。さらに米国の Chao らは、ラットにヒトプロスタシンを過剰発現させると血漿アルドステロン濃度が上昇することを報告した。これらの事実は、プロスタシンとアルドステロンの間に positive feedback 機構が存在する可能性を示唆している。一方、protease activated receptor (PAR) は消化器系、呼吸器系で炎症に関与し、膵臓や肺などの臓器の線維化にも関与していることが報告されている。腎臓には PAR-1 および PAR-2 が存在しているが、腎臓における PAR の役割については未だ明らかにされていない。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 を活性化することが、推測され、プロスタシンが PAR を介して腎臓の炎症や線維化をもたらす可能性が考えられる。プロスタシンはアルドステロンによって誘導されるため、アルドステロンによる臓器障害、特に腎障害がプロスタシン-PAR 活性化経路を介していることも推測される。

また、基礎および臨床研究の成績からセリンプロテアーゼ阻害薬の尿蛋白減少作用が示されており、腎臓の炎症や線維化を抑制し、腎保護的に作用することが推測される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、プロスタシンが PAR を活性化するかどうかを明らかにし、アルドステロンによる腎障害におけるプロスタシンの役割を検討する。さらにセリンプロテアーゼ阻害薬がプロスタシン活性を抑制することで腎障害を抑制し、腎保護作用を有するかどうかについても検討し、慢性腎臓病 (CKD) の治療へ応用することにある。

3. 研究の方法

アルドステロンによる腎障害、特に炎症・線維化機序にプロスタシンが関与しているかを検討するため、動物モデルを用いて 1) プロスタシン静注ラットモデルによる腎障害の検討、2) プロスタシンおよびセリンプロテアーゼ阻害薬静注ラットモデルによる腎障害の抑制、3) アルドステロン持続投与ラットモデルにおいてのプロスタシン増加による腎障害の検討、4) 同モデルにおいてセリンプロテアーゼ阻害薬による腎障害の抑制の検討を行い、その分子生物学的機序の解明のために培養細胞を用いて 5) プロスタシンによる PAR 活性化の検討、6) PAR アンタゴニストによるプロスタシンの PAR 活性化抑制の確認を行う予定であり、3), 4), 5), 6), 1), 2) の順番で実験を進行した。

4. 研究成果

(1) SD ラットに浸透圧ポンプを用いてアルドステロン持続皮下注 (0.75 μ g/hr) し、1%NaCl 食塩水を飲水させ、4 週間経過観察した。4 週後、血圧は有意に上昇し (図 1)、尿蛋白も有意に増加、血清 Cr も上昇した (図 2)。real time PCR の検討により腎臓において線維化マーカーである Type I、Type III collagen は有意に増加し、ポドサイト障害のマーカーである nephrin は有意に低下、B7-1 は増加、単球走化活性因子である MCP-1 も有意に増加した。Prostasin の発現増加は認めなかったが、ENaC α 、 β 、 γ subunit は増加した (図 2)。また、腎組織標本において糸球体硬化、間質の線維化所見も認めた (図 3)。

同モデルラットにおいて 0.1%メシル酸カモスタットを投与したところ血圧の有意な低下、尿蛋白の減少、血清 Cr の低下を認め (図 1)、Type I、Type III collagen も有意に減少し、nephrin は増加、MCP-1 も有意に低下した (図 2)。腎組織標本においても糸球体硬化、間質の線維化において有意な組織像の改善を認めた (図 3)。

以上のことからアルドステロン投与ラットにおいて経口セリンプロテアーゼ阻害薬であるメシル酸カモスタットが降圧作用を有し、腎保護的に作用することが証明された。

アルドステロン+食塩負荷ラットへのカモスタットの効果

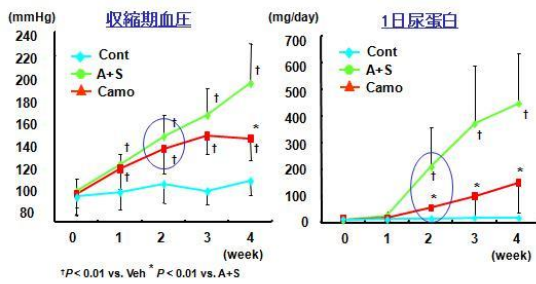


図 1

アルドステロン+食塩負荷ラットへのカモスタットの効果

	Cont	A+S	Camo
BW (g)	438 ± 23	375 ± 22 [†]	356 ± 7 [†]
rtKidney wt (mg/gBW)	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 [†]

[†]P < 0.05 vs. Cont, [‡]P < 0.01 vs. Cont, [§]P < 0.05 vs. A+S, [†]P < 0.01 vs. A+S

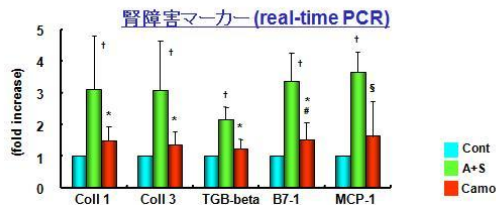


図 2

アルドステロン+食塩負荷ラットへのカモスタットの効果

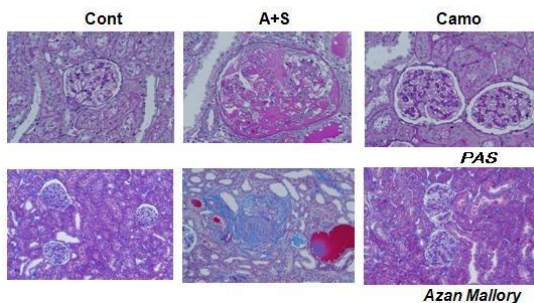


図 3

(2) prostasin による PAR 活性化の検討

prostasin が PAR を活性化するかどうかを検討するため、リコンビナントヒト prostasin (100 μg/ml) を PAR-1 および PAR-2 が発現しているヒト副腎皮質由来の H295R の培養上清に添加し、PAR の活性化を検討したが、活性化は認めなかった。

(3) 浸透圧ポンプを用いて、リコンビナントヒトプロスタシン蛋白を 4 週間持続静注 (10 μg/kg/hr) するラットモデルを作製し、血圧、1 日尿蛋白、尿中 Na、K 排泄、BUN、血清 Cr、

Ccr を評価した。プロスタシン投与ラットで血圧上昇を認めず、尿蛋白、尿中 Na、K 排泄、BUN、血清 Cr、Ccr もコントロールと有意差を認めなかった。

このモデルラットにおいて腎組織標本および線維化マーカー、ポドサイト障害マーカーに有意な変化を来さなかった。リコンビナントプロスタシン蛋白の用量設定の問題が腎組織障害を来さなかった原因と推測されたが、リコンビナント蛋白の大量投与は蛋白の精製上の問題から困難と考えられた。

(4) アルドステロン持続および食塩投与ラットにおいてプロスタシン以外のセリンプロテアーゼが腎障害に関与している可能性を考慮し、同モデルラットの腎組織ならびに尿のザイモグラフィ (KHYP-MCA を基質とした) を施行した。図5、6に示すように活性が増加したセリンプロテアーゼを検出した。

片腎摘出ラットに対するアルドステロンと食塩の効果

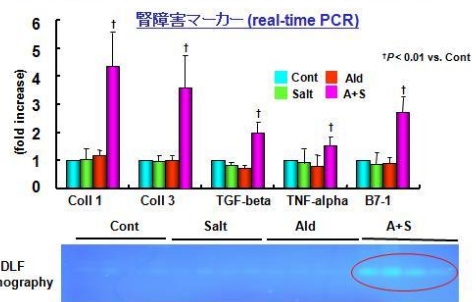


図 4

カモスタットによるセリンプロテアーゼ活性の抑制

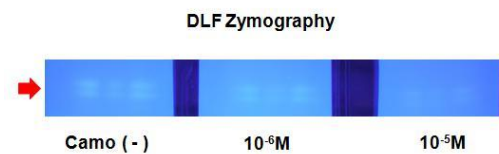


図 5

そこで LC-MS/MS を用いて解析を行い、活性が増加したセリンプロテアーゼの同定に成功した。

2D-DLF-Zymography

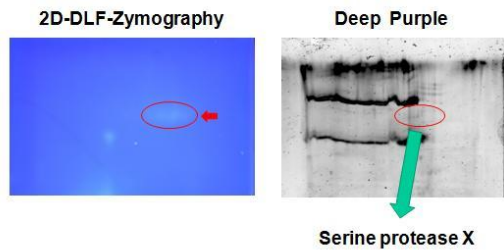


図6

現在、同定したセリンプロテアーゼによる腎障害発生機序に関してポドサイト等を用いた培養細胞系で検討中であるが、今回の成績からセリンプロテアーゼ阻害薬がアルドステロンによる腎障害を改善する新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

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3件)

1. Ko, T., Kakizoe, Y., Wakida, N., Hayata, M., Uchimura, K., Shiraishi, N., Miyoshi, T., Adachi, M., Aritomi, S., Konda, T., Tomita, K., Kitamura, K. Regulation of adrenal aldosterone production by serine protease prostaticin. *J Biomed Biotechnol.* **2010**: 793843, 2010. (査読あり)
2. Kakizoe, Y., Kitamura, K., Ko, T., Wakida, N., Maekawa, A., Miyoshi, T., Shiraishi, N., Adachi, M., Zhang, Z., Masilamani, S., Tomita, K. Aberrant ENaC activation in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens.* **27**: 1679-89, 2009. (査読あり)
3. Maekawa, A., Kakizoe, Y., Miyoshi, T., Wakida, N., Ko, T., Shiraishi, N., Adachi, M., Tomita, K., Kitamura, K. Camostat mesilate inhibits prostaticin activity and reduces blood pressure and renal injury in salt-sensitive hypertension. *J hypertens.*, **26**: 1-10, 2008. (査読あり)

[学会発表] (計3件)

1. アルドステロンによる腎障害に対するメシル酸カモスタットの効果 柿添豊、北村健一郎、内村幸平、森永潤、安達政隆他 第53

回日本腎臓学会学術総会 2010年6月16日 神戸国際会議場

2. プロスタシンによるアルドステロン産生誘導 関健博、北村健一郎、脇田直樹、柿添豊、安達政隆他 第51回日本腎臓学会学術総会 2008年6月1日 福岡国際会議場

3. 食塩感受性高血圧に対するセリンプロテアーゼ阻害薬の降圧効果 柿添豊、前川愛、北村健一郎、脇田直樹、関健博、安達政隆他 第51回日本腎臓学会学術総会 2008年5月30日 福岡国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www2.kuh.kumamoto-u.ac.jp/nephrology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 政隆 (ADACHI MASATAKA)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90398206