

## 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 29 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：21591056

研究課題名（和文） プロスタシンの生理的役割の検討及び情報伝達経路の解明

研究課題名（英文） elucidation of physiological roles of prostaticin and its signaling pathway

研究代表者

白石 直樹（SHIRAISHI NAOKI）

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：40423660

研究成果の概要（和文）：

ヒト副腎腺腫細胞にリコンビナントプロスタシンを添加すると、濃度依存性にアルドステロンの分泌が増加することが判明した。また、アルドステロン負荷腎障害誘発ラットや5/6腎摘ラットにおいて、セリンプロテアーゼ阻害薬であるカモスタットが腎不全進行を抑制することを示し、その機序について検討した。カモスタットは既に本邦で膵炎への経口治療薬として使用されているため、早期の臨床応用が可能と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that addition of recombinant prostaticin to human adrenocortical cells increased secretion of aldosterone to the media in a dose dependent manner. We also showed that camostat mesilate, a potent serine-protease inhibitor, suppressed the progression of renal injury in aldosterone-induced renal injury model rats and in 5/6 nephrectomized renal failure model rats. Since camostat has been already clinically used as a medicine for pancreatitis and esophagitis in Japan, early clinical application of camostat for renal failure can be expected.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
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	3,500,000	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：シグナル伝達・生体分子・生理活性

1. 研究開始当初の背景  
生体内の情報伝達において、セリン/スレオニ

ン、チロシン残基のリン酸化が最も有名であるが、target 蛋白を分解し構造変化を起こさ

せる事により情報を伝達するプロテアーゼカスケードも繁用されている。プロテアーゼカスケードでは、凝固カスケードや apoptosis カスケードが有名であるが、近年他にも多くの局面で蛋白の切断が重要な働きをしていることが報告されるようになってきた。

私たちは、セリンプロテアーゼであるプロスタシンが、腎集合尿管において、Na の再吸収を行う上皮型 Na チャネル (ENaC) の部分切断を行うことにより、ENaC を活性化することを報告した。ENaC は Na の再吸収を調節することにより、血圧に大きな影響を与えているため、プロスタシンが高血圧に関与している可能性が示唆された。また一方、Chao らは、アデノウイルスベクターを用いてラットにプロスタシン遺伝子を導入したところ、遺伝子導入ラットの血圧が上昇することを見出した。このラットでは血中及び尿中のプロスタシン濃度の上昇が認められたが、付随して血漿中アルドステロン濃度の上昇が認められており、プロスタシンは、直接の ENaC の活性化に加え、アルドステロン分泌を増加させることにより血圧を上昇させる可能性が指摘された。以前より副腎をトリプシン処理するとアルドステロン分泌が増加するという現象が観察されていたが、その詳細は不明であった。これらの知見をあわせると、血中プロスタシン濃度の上昇は副腎に働いて PAR (protease-activated receptor) などの受容体を介して直接アルドステロンの産生を誘導している可能性が考えられる。

以上のように、私たちはプロスタシンの高血圧への関与について研究を続けているが、プロスタシンの働きについて現在のところ詳細まで検討され、具体的に判明しているものは、私たち及び他のグループによる、 $\gamma$ サブユニットの直接切断による ENaC の活性化のみである。プロスタシンに関するそれ以外に

興味ある知見は、プロスタシンの KO マウスは胎児致死に至るが、皮膚においてのみプロスタシンの発現を欠損させたマウスでは、皮膚からの水分喪失によって出産後 60 時間で死亡し、プロスタシンの tight junction 形成における役割が示唆されている。その他多くの臓器で産生されていること、種々の病的状態においてその発現が調節されていることなどから、プロスタシンは血中や種々臓器においても何らかの重要な働きをしていると考えられるが、全く未解明のままである。

## 2. 研究の目的

プロスタシンの血圧調節における役割、特に副腎におけるアルドステロン産生の可能性およびそのメカニズムについて検討する。プロスタシンの腎臓や皮膚以外での生理的および病理的役割について検討する。また、プロスタシン以外の種々セリンプロテアーゼの生理的および病理的役割についても検討する。

## 3. 研究の方法

活性型及び非活性型リコンビナントプロスタシンの大量作成及び精製を行い、これを用いて副腎皮質細胞株を使用し、プロスタシンのアルドステロン産生に及ぼす影響の検討およびその情報伝達経路の解明を行う。

プロスタシンが重要な働きをしていると考えられる臓器特異的発現プロモーターを持つ Cre マウスと、既に作成しているプロスタシン loxP 挿入マウスを掛け合わせ、臓器特異的プロスタシンコンディショナルノックアウトマウスを作成し、また既にラインを維持しているプロスタシン過剰発現マウスを使用し、in vivo におけるプロスタシンの生理的役割の解明を行う。

アルドステロン腎障害モデル、慢性腎不全モデル、腎線維化モデルなどの腎障害モデル動物を使用し、プロテアーゼ阻害薬投与などのプロテアーゼ活性調節による腎障害に与える影響を検討し、プロテアーゼ活性調節薬の腎障害治療における可能性について検討す

る。

#### 4. 研究成果

リコンビナントプロスタシンを作成し、ヒト副腎腺腫細胞 H295R 細胞にアルドステロン産生酵素である CYP11B2 の promoter-luciferase construct を transfection し、リコンビナントプロスタシンを添加したところ、濃度依存性に luciferase 活性が上昇し、また上清中のアルドステロン濃度も増加することが判明した。この効果は、protease-dead プロスタシンにも同様に観察され、またプロテアーゼ阻害薬にて阻害されず、プロスタシンによるアルドステロン誘導作用は、そのプロテアーゼ活性に非依存的なものと考えられ、以上の知見について報告した。

また私たちは、臓器特異的プロスタシンノックアウトマウスの解析を進め、今まで全く想定されていなかった、意外かつ非常に重要な *in vivo* におけるプロスタシンの新しい役割を発見し、現在投稿準備を行っている。

また、アルドステロンによる腎障害のメカニズム解明のために、アルドステロンを負荷して腎障害を誘導したラットに、セリンプロテアーゼ阻害剤であるメシル酸カモスタットを投与しその効果を検討したところ、メシル酸カモスタット投与群において血圧上昇の抑制および腎障害軽減が認められ、アルドステロンによる腎障害にセリンプロテアーゼが大きな役割を果たしていることが示された。さらに、このアルドステロン負荷ラットの腎組織中に、メシル酸カモスタットにより阻害される何らかのセリンプロテアーゼの活性が亢進していることが判明し、そのプロテアーゼの同定を行った。さらに私たちは、慢性腎不全モデルである 5/6 腎摘ラットにおいて、セリンプロテアーゼ阻害薬であるカモスタットが腎不全進行を抑制することを示

し、その機序について検討した（投稿中）。

カモスタットは既に本邦で瘰癧への経口治療薬として使用されているため、早期の臨床応用が可能と考えられ、今回の発見は腎障害治療における非レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系薬剤の発見という意味において、臨床的に非常に重要なものであると考えられる。

#### 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 8 件）

- (1) Case of anti-glomerular basement membrane antibody-induced glomerulonephritis with cytomegalovirus-induced thrombotic microangiopathy. Shiraishi-N, Kitamura-K, Hayata-M, Ogata-T, Adachi-M, Kajiwaru-K, Ikeda-H, Miyoshi-T, Tomita-K. Internal medical Journal. 2012, 42(3): e7-e11. 査読有
- (2) A study of maintenance therapy after intravenous maxacalcitol for secondary hyperparathyroidism. Adachi-M, Miyoshi-T, Shiraishi-N, Shimada-H, Sakaguchi-S, Tomita-K, Kitamura-K. Clin Nephrol. 2011, 76(4):266-72. 査読有
- (3) Regulation of adrenal aldosterone production by serine protease prostaasin. Ko T, Kakizoe Y, Wakida N, Hayata M, Uchimura K, Shiraishi N, Miyoshi T, Adachi M, Aritomi S, Konda T, Tomita K, Kitamura K. J Biomed Biotechnol. 2010:793843. 査読有
- (4) Aberrant ENaC activation in Dahl salt-sensitive rats. Kakizoe Y, Kitamura K, Ko T, Wakida N, Maekawa A, Miyoshi T,

Shiraishi N, Adachi M, Zhang Z, Masilamani S, Tomita K. J Hypertens. 2009

Aug;27(8):1679-89. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) A synthetic serine protease inhibitor camostat mesilate inhibited the proteolytic activation of gENaC in the kidney of the aldosterone-infused rats. Uchimura-K, Kakizoe-Y, Onoue-T, Hayata-M, Morinaga-J, Mizumoto-T, Adachi-M, Miyoshi-T, Shiraishi-N, Sakai-Y, Tomita-K, Kitamura-K. American Society of Nephrology Kidney Week 2011, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA. November 10, 2011 (Nov8-13)

(2) A synthetic serine protease inhibitor camostat mesilate attenuates renal interstitial fibrosis in rats. Morinaga-J, Kakizoe-Y, Miyoshi-T, Onoue-T, Mizumoto-T, Hayata-M, Uchimura-K, Shiraishi-N, Adachi-M, Sakai-Y, Tomita-K, Kitamura-K. American Society of Nephrology Kidney Week 2011, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, PA. November 11, 2011 (Nov8-13)

(3) アルドステロンによる上波型 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：パシフィコ横浜：2011 年 6 月 16 日。柿添豊，北村健一郎，内村幸平，早田学，森永潤，尾上友朗，水本輝彦，安達政隆，實吉拓，白石直樹，酒井芳紀，富田公夫。

(4) 腎硬化症、虚血性腎症の発症率と危険因子の同定に関する研究：第 54 回日本腎臓学会学術総会：パシフィコ横浜：2011 年 6 月 16 日。白石直樹，富田公夫。

(5) 片側尿管結紮モデル(UUO)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：パシフィコ横浜：2011 年 6 月 15 日。森永潤，北村健一郎，尾上友朗，水本輝彦，内村幸平，早田学，柿添豊，安達政隆，實吉拓，白石直樹，酒井芳紀，富田公夫。

(6) ラット腎虚血再灌流障害におけるセリンプロテアーゼの役割：第 53 回日本腎臓学会学術総会：神戸国際会議場：2010 年 6 月 17 日。早田学，北村健一郎，柿添豊，内村幸平，森永潤，安達政隆，白石直樹，實吉拓，富田公夫，酒井芳紀。

(7) 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：第 53 回日本腎臓学会学術総会：神戸国際会議場：2010 年 6 月 17 日。柿添豊，北村健一郎，内村幸平，早田学，森永潤，安達政隆，白石直樹，實吉拓，酒井芳紀，富田公夫。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白石 直樹 (SHIRAISHI NAOKI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号：40423660

### (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