

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 26 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：21591057

研究課題名（和文） HAI-1B による血圧・ナトリウム代謝制御の分子基盤の解明及び高血圧治療への応用

研究課題名（英文） Regulation of sodium metabolism and hypertension by HAI-1B.

研究代表者

實吉 拓 (MIYOSHI TAKU)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：80398205

研究成果の概要（和文）：HAI-1B は生体内に存在するセリンプロテアーゼインヒビターである。プロスタシンと共に発現し、プロスタシンの活性の制御に関わっている。HAI-1B の cDNA をマウス集合尿管細胞に強制発現させ、電気生理学的な手法により上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) によるナトリウム電流が低下することを証明した。さらにカイク蛋白産生系を利用して HAI-1B リコンビナント蛋白精製を行った。また、HAI-1B の腎集合尿管特異的ノックアウトマウスを作製中である。

研究成果の概要（英文）：HAI-1B is one of endogenous serine protease inhibitors. It expresses with prostaticin in several organs, and acts as a regulator of prostaticin. We elucidated that overexpression of HAI-1B decreased sodium current caused by ENaC, and we purified HAI-1B recombinant protein from silkworm hemolymph. We are preparing construction of renal collecting duct cell-specific HAI-1B knockout mice

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：腎臓内科学

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：高血圧、ナトリウム、HAI-1B

1. 研究開始当初の背景

(1) 腎臓における Na 代謝は体液の恒常性や血圧をコントロールする上で最も重要な役割を担っている。腎臓における Na 調節の中で重要な働きをしているのが上皮型 Na チャンネル (ENaC) である。ENaC は遠位及び集合尿管に分布しており、原発性アルドステ

ロン症や Liddle 症候群、ネフローゼ症候群や肝硬変に伴う浮腫など Na 代謝異常や高血圧を引き起こす病態において関与していることが知られている。ENaC の活性はレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系や ADH などのホルモンにより厳密にコントロールされているが、分子生物学的な ENaC の

活性化機構については未だ不明な点が多い。(2)1997年にある種のセリンプロテアーゼが ENaC を活性化するという全く新しい機序による活性調節の報告がなされている。1998年に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の cDNA クローニングに成功した。プロスタシンは腎尿細管上皮細胞の管腔側に発現し、尿中にも検出されることが分かっている。これらの事実に基づき私たちはプロスタシンが ENaC を活性化するという仮説をたて、アフリカツメガエルの卵母細胞に ENaC とプロスタシンを発現させることにより、プロスタシンが ENaC を活性化することを世界で初めて証明した (J. Am. Soc. Nephrol., 12: 1114-1121, 2001)。また、私たちは Na 代謝を調節するホルモンの中で最も重要なアルドステロンがプロスタシンの発現を調節していることも明らかにしている。

(3) 肝細胞増殖因子活性化因子阻害因子 1 (hepatocyte growth factor activator inhibitor 1; HAI-1) は肝細胞増殖因子 (HGF) の特異的活性化因子として同定された肝細胞増殖因子活性化因子 (HGFA) に対する阻害因子であり、胃癌培養細胞上清中より分離同定された Kunitz タイプのセリンプロテアーゼインヒビター (serpin) である。I 型膜蛋白質として膜上に存在し、細胞外部位の切断により細胞膜より切り離されることが示されている。HAI-1 は生体内において HGFA に対してのみならず、膜型のセリンプロテアーゼであるプロスタシン、マトリプターゼなどの阻害因子であることが報告され、細胞増殖以外における役割の可能性が示唆されている。HAI-1B は前立腺、卵巣の上皮細胞でプロスタシンと共局在することやプロスタシン、ENaC が存在する腎遠位尿細管細胞にも発現していることが報告されている。また、

HAI-1B はプロスタシンと複合体を形成し、プロスタシンのプロテアーゼ活性を阻害することが報告されている。

2. 研究の目的

HAI-B は遠位尿細管においてもプロスタシンと同様に発現していることが示され、生体内において HAI-B がプロスタシンの活性を制御していることが強く示唆されている。そこで我々は HAI-1B がプロスタシンの活性抑制を介して Na 代謝、血圧の調節に重要な役割を果たしているという仮説を立て、HAI-1B の生体内の Na 代謝における役割を明らかにし、高血圧治療への応用を探ることを目的に本研究を行う。

3. 研究の方法

(1) HAI-1B の全長 cDNA を発現ベクターに挿入し、M-1 細胞 (マウス集合尿細管細胞由来) ヘトランスフェクションさせることにより HAI-1B 遺伝子の一過性過剰発現モデル細胞を作製する。細胞をフィルター上に培養し、EVOM (Epithelial volt-ohm meter) を用いて細胞間に流れる Na 電流 (I_{eq}) を測定し、HAI-1B 過剰発現により I_{eq} が減少することを確認する。

(2) HAI-1 ホモ欠損マウスは成長障害をきたし、約 16 日で死亡する。長期の血圧の観察を行うために、ENaC の発現部位である腎集合尿細管の特異的 HAI-1 欠損マウスを Cre/loxP システムを用いて作製する。すなわち、HAI-1-LoxP マウスを作製し、これにすでに入手可能な集合尿細管に特異的に発現する AQP2 プロモーターの Cre マウスを掛け合わせることで集合尿細管特異的 HAI-1 欠損マウスを得る。これをコントロールマウスと並行して飼育し、経時的に両者の血圧の変化を非観血法により計測する。また、

メタボリックケージを使用することにより尿中のナトリウム排泄量などを測定し HAI-1 欠損との関連性を評価する。さらに、一定期間の測定を終えたマウスを解剖し、腎臓におけるプロスタシンや ENaC の各サブユニットの mRNA レベルの発現量を real time PCR 法により評価する。各蛋白の発現量や分布の変化も腎組織の免疫組織学検討を行うことにより評価する。

(3) まずヒト HAI-1B cDNA をバキュロウイルスの DNA と相同配列を持つ発現プラスミドベクターへ挿入する。これをバキュロウイルスゲノム DNA と昆虫培養細胞にコトランスフェクションし相同組み換えを起こすことにより、HAI-1B 組み換えウイルスを得る。このウイルスを業者に依頼しカイコ蛋白産生系で HAI-1B 発現蛋白を多量に含んだカイコ体液を得る。この体液をシリカゲル、イオン交換、銅イオン結合キレートカラムなどを担体としたクロマトグラフィーを使用し、最も精製度の高い方法を検討し、HAI-1B リコンビナント蛋白を得る。

(4) まず、作製した HAI-1B リコンビナント蛋白を試験管内でプロスタシン蛋白と作用させた後電気泳動を行い、結合が得られるか検討する。また、この条件下で、合成基質である QAR-AMC を使用して吸光度法によりプロスタシンのプロテアーゼ活性を測定し、これが阻害されていることを確かめる。

次に、アデノウイルス系によるプロスタシン過剰発現ラット（既に開発済みである）を使用し、高血圧の発症が抑制できるかを検討する。HAI-1B は分子量約 66000 の比較的小分子の蛋白であることから腹腔内投与、またはオスモティックミニポンプを使用した静脈内持続投与モデルを作製し、経時的に血圧を測定、またメタボリックケージを使用して尿中 Na 排泄量などを測定し Na 代謝の変化

についても検討する。

また、食塩感受性高血圧モデル動物である Dahl ラットにも HAI-1B リコンビナント蛋白を投与し、同様の検討を行う。

実際に降圧効果を得られたら、HAI-1B の至適投与量を決定するため、HAI-1B の投与量や頻度の条件を変えて投与し、HAI-1B の降圧効果における用量反応曲線を求める。

(5) 本態性、及び種々の原因による高血圧患者の血液、尿サンプルを集め、尿中 HAI-1B 濃度を ELISA 法を用いて測定する。HAI-1B を測定する ELISA キットはすでに市販されており、入手可能である。また、同時に血中レニン活性、アルドステロン濃度、尿中 Na 排泄量、尿中プロスタシン濃度などを測定し、尿中 HAI-1B 濃度との関連について検討する。これらの結果からヒト高血圧の病態における HAI-1B の役割を明らかにする。

4. 研究成果

HAI-1B の cDNA をマウス集合尿細管細胞へ強制発現させ、電気生理学的な手法により ENaC による細胞間ナトリウム電流を測定した。コントロールに比較し、HAI-1B 群では電流が明らかに低下することを証明した。

腎集合尿細管特異的のノックアウトマウスを作製して実験を行う予定であったが、未だ成功していない。また、HAI-1B cDNA をカイコ蛋白産生系により発現させ、カイコ体液から各種クロマトグラフィーを使用して、HAI-1B リコンビナント蛋白精製を行った。

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 2 件)

①實吉拓、富田公夫 (他 10 名、7 番目)
Regulation of adrenal aldosterone production by serine protease prostaticin. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010 巻、2010 年、793843、査読有

②實吉拓、富田公夫 (他 9 名、6 番目)
Aberrant ENaC activation in Dahl salt-sensitive rats. Journal of Hypertension. 27 巻、2009 年、1679-1689、査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

①森永潤、實吉拓、富田公夫 (他 9 名) A synthetic serine protease inhibitor Camostat Mesilate attenuates renal interstitial fibrosis in rats. アメリカ腎臓学会Kidney Week 2011、2011年10月11日、ペンシルベニアコンベンションセンタ(フィラデルフィア, 米国)

②柿添豊、實吉拓、富田公夫 (他 9 名) A synthetic serine protease inhibitor Camostat Mesilate inhibited the proteolytic activation of gENaC in the kidney of the aldosterone-induced rats. アメリカ腎臓学会Kidney Week 2011、2011年10月10日、ペンシルベニアコンベンションセンタ(フィラデルフィア, 米国)

③早田学、實吉拓、富田公夫 (他 7 名) ラット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、平成 22 年 6 月 17 日、神戸国際会議場

④柿添豊、實吉拓、富田公夫 (他 6 名) 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、平成22年6月16日、神戸国際会議場

⑤森永潤、實吉拓、富田公夫 (他 9 名) 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、2011年6月15日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑥柿添豊、實吉拓、富田公夫 (他 9 名) アルドステロンによる上皮型Naチャン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、2011年6月15日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑦實吉拓、富田公夫 (他 8 名) Role of prostaticin in the nitric oxide-mediated natriuresis in the kidney. 第 14 回国際内分泌学会、2010 年 3 月 30 日、京都国際会館(京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

實吉 拓 (MIYOSHI TAKU)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：80398205

(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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：