

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591231

研究課題名(和文) セリンプロテアーゼを介した食塩感受性高血圧発症に関する分子機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism for the development of salt sensitive hypertension by serine proteases.

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：上皮型Naチャンネル(ENaC)は腎臓に存在し、Naの再吸収を行うことで体液量や血圧を調節している。SDラットにアルドステロン(Aldo)を投与すると、ENaCの85→70kDaへの分子量の変化を認める。これまで生体においてENaCの切断・活性化に対するセリンプロテアーゼ(SP)の関与を検討した報告はなく、今回SP阻害薬メシル酸カモスタット(CM)を用いてin vivoにおけるENaCの切断・活性化に対するSPの関与を検討した結果、CMによりENaCの分子量の変化が抑制された。CMがSPを阻害し、ENaCの切断・活性化を抑制したと考えられ、CMが新規降圧利尿薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aldosterone induces a molecular weight shift of the epithelial sodium channel subunit (ENaC) from 85 to 70 kDa that is necessary for the channel activation. However, the in vivo contribution of serine proteases to this cleavage still remains unclear. To address this issue, we administered a synthetic serine protease inhibitor camostat mesilate (CM) to aldosterone-infused rats. CM decreased the abundance of 70 kDa form of ENaC. Our findings strongly indicate that CM inhibited the cleavage of ENaC by prostatic and subsequently suppressed the ENaC activity. The results of our current studies also suggest the possibility that a synthetic serine protease inhibitor CM might represent a new strategy for the treatment of salt-sensitive hypertension in humans.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：高血圧 上皮型ナトリウムチャンネル セリンプロテアーゼ セリンプロテアーゼ阻害薬

### 1. 研究開始当初の背景

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(SP)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(Aldo)がプロスタシンの発現を増加させることを証明した。さらに SP 阻害作用を有する protease nexin-1(PN-1)が、*Xenopus oocyte* の系でプロスタシンの活性を阻害することで上皮型ナトリウムチャンネル(ENaC)の活性化を抑制すること、M1 細胞でプロスタシンを knock down すると Na 電流が 50%低下し、SP 阻害薬(SERPIN)が Na 電流を 50%抑制することも証明し、腎臓において Na の再吸収に SP が重要な役割を果たし、食塩感受性高血圧症の発症に強く関与している可能性を報告してきた。また Dahl 食塩感受性高血圧ラット(DS ラット)において ENaC $\beta$ 、 $\gamma$ サブユニットの蛋白が増加していること、ENaC の活性化に関与している $\gamma$ サブユニットの molecular weight shift (切断)を証明し、SERPIN であるメシル酸カモスタット(CM)を投与すると血圧が低下することを実証し、食塩感受性高血圧治療薬としての SERPIN の可能性を提唱してきた。これまで *in vitro* において ENaC を活性化するプロスタシン以外の SP としてトリプシン、フェーリンなどが報告されている。従って SERPIN である CM がプロスタシンを含めた何らかの SP 活性を抑制することによって ENaC $\gamma$ サブユニットの cleave が減少し、ENaC が活性化されず、Na の再吸収が減少、排泄が増加するため、降圧効果を発揮するものと推定される。しかしながら、これまで SERPIN による生体内での降圧機序を詳細に検討した報告はなく、生体内で SERPIN による $\gamma$ サブユニットの cleave 抑制を証明した成績も存在しない。

近年、アデノウイルスによりヒトプロスタシンをマウスに過剰発現させると高血圧が発症し、さらには血漿 Aldo 濃度が上昇することが報告され、私たちは H295R 細胞にプロスタシンを添加すると Aldo の産生が亢進することを証明した。これはプロスタシンが Aldo の分泌調節においてポジティブフィードバック作用を有することを示唆し、プロスタシンは Aldo と相乗的に高血圧発症に関与していると推定される。プロスタシン以外の SP にも同様の作用を有する可能性があり、食塩感受性高血圧のモデル動物において腎・尿に誘導される SP が明らかとなれば、より特異性の高い阻害薬の開発に繋がり、食塩感受性高血圧の新たな治療戦略の一つとなりうる。

### 2. 研究の目的

近年、SP による ENaC の活性化機序が明らかになり、*in vitro* において ENaC を介した高血圧の病態が解明されつつあるが、生体内での高血圧発症のメカニズムについては不

明な点が多い。これまで私たちはプロスタシンという SP が ENaC を活性化し、食塩感受性高血圧の発症に関与していることを報告し、Dahl 食塩感受性ラットにおいて SERPIN が降圧効果を有することを実証した。従って本研究の目的は生体内での食塩感受性高血圧における SERPIN の降圧機序を明らかにするとともに食塩感受性高血圧発症に関与する新規 SP の同定することにより、SP が関与する食塩感受性高血圧発症の分子機序を解明し、降圧薬としての SERPIN の可能性を検討することにある。

### 3. 研究の方法

食塩感受性高血圧発症における SP の分子機序を解明するため、DS ラット、アルドステロン投与ラットを用いて 1) DNA マイクロアレイ解析によって同モデルにおける腎組織での mRNA 発現が亢進している SP の同定とザイモグラフィによる腎組織と尿中での活性が亢進した SP の同定、2) 上記モデルラットおよびプロスタシン過剰発現マウスに SERPIN である CM を皮下投与し、ENaC $\gamma$ サブユニットの molecular weight shift の解析、3)分子生物学的機序の解明のために *Xenopus oocyte* を用いて、ENaC を過剰発現させた *oocyte* に同定した SP を添加後、アミロライド感受性 Na 電流を測定し、ENaC の活性化を評価する。さらに、4)臨床的観点から本態性高血圧患者の尿中 SP 活性を測定し、SP 活性と血圧値の相関について検討する。

### 4. 研究成果

I.アルドステロン投与ラットにおいてメシル酸カモスタット(CM)投与時の腎臓での ENaC $\gamma$ サブユニットの molecular weight shift の解析

8週齢の SD ラットに A 群 (6匹) コントロール(浸透圧ポンプ+DMSO 投与)、B 群 (6匹) 浸透圧ポンプを用いて DMSO に溶解したアルドステロン(200 $\mu$ g/日)を 10 日間皮下投与、C 群 (6匹) アルドステロン+CM ペレット(14mg/日)を 10 日間皮下投与したところ、B 群で有意な血清 K 濃度(2.6 $\pm$ 0.1mEq/L)と尿中 Na/K 比(0.43 $\pm$ 0.05)の低下を認め、C 群で B 群と比較すると有意な血清 K 濃度(3.1 $\pm$ 0.2mEq/L)と尿中 Na/K 比(0.50 $\pm$ 0.03)の改善を認めた。また、B 群と C 群で血圧、血清 Cr、尿蛋白量に有意差は認めなかった(表 1)。

回収した腎臓の mRNA からプロスタシンおよび ENaC 各サブユニットの mRNA の発現量を real time PCR にて検討したところ、B 群と C 群で  $\alpha$ ENaC の増加を認めたが、 $\beta$ ENaC は変化がなかった(図 1)。 $\gamma$ ENaC をウエスタンブロット法により解析し、B 群で 85 $\rightarrow$ 70、C 群で 85 $\rightarrow$ 75kDa の molecular weight shift が確認された(図 2)。

表1

	Control	Aldo	CM
Cr (mg/dL)	0.21±0.02	0.23±0.04	0.21±0.03
Na (mEq/L)	144.2±0.4	148.7±0.8 †	147.3±0.5 †§
Cl (mEq/L)	105.8±1.9	94.8±0.8 †	100.2±0.4 †*
K (mEq/L)	4.6±0.2	2.6±0.1 †	3.1±0.2 †*
U-Na/K	0.49±0.02	0.43±0.05 †	0.50±0.03 §
尿蛋白(mg/day)	8.6±3.4	6.9±2.0	7.0±2.9

\*P < 0.05 vs. Control. †P < 0.01 vs. Control. §P < 0.05 vs. Aldo. †\*P < 0.01 vs. Aldo.

図1

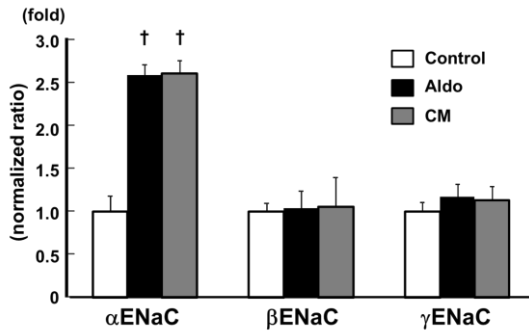
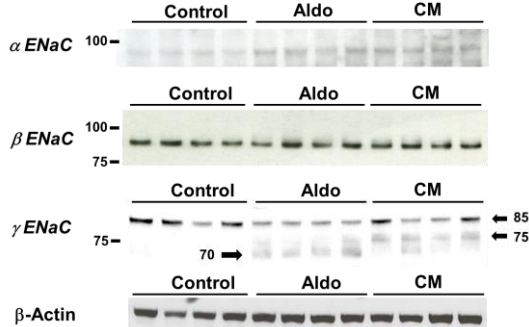


図2



このラットの尿と腎臓でのプロスタシンの蛋白発現をウエスタンブロット法により解析したところ、これまで報告してきたようにアルドステロン投与によって尿中プロスタシンは有意に増加し、CM 投与によって尿中プロスタシンは著明に減少し、3kDa 上へ shift していることが確認された(図 3)。プロスタシンはマトリプターゼやヘプシンなどのセリンプロテアーゼに 3kDa の light chain を切断されることによって活性化されることが知られており、この 3kDa 上へ shift しているバンドはプロスタシン前駆体である可能性が示唆された。

アルドステロン投与によって腎臓のプロスタシン発現量は増加しなかったが、CM 投与によって腎臓のプロスタシンは 3kDa 上へ shift したプロスタシン前駆体として認められ、その発現量は増加していた(図 4 上段)。

Double-layer fluorescent zymography 法を用いてプロスタシンのプロテアーゼ活性を評価したところ、コントロール群とアルドステロン投与群において約 33kDa の高さにプ

ロテアーゼ活性を認めた(図 4 下段矢印)。CM 投与群においてそのプロテアーゼ活性は消失しており、プロスタシン前駆体の活性化が抑制されていることが示唆された。尚、矢頭のプロテアーゼ活性は CM で抑制されない未知のプロテアーゼと判断した。

図3

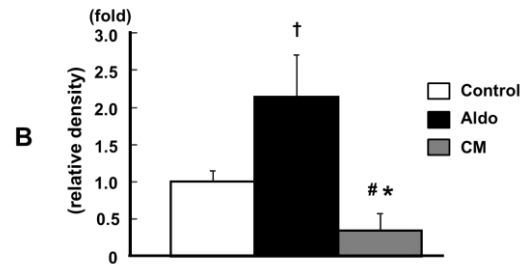
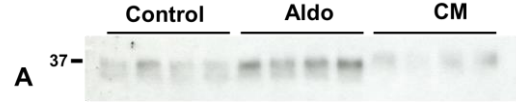
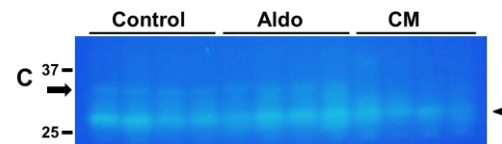
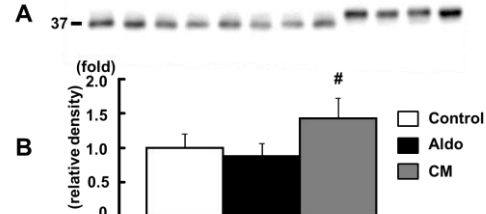
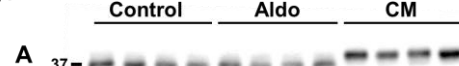


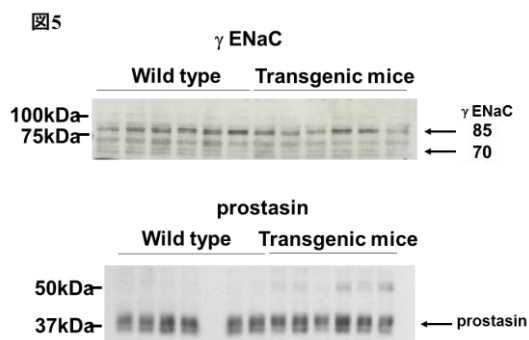
図4



## II. プロスタシン過剰発現マウスにおける腎臓での ENaCγサブユニットの molecular weight shift の解析

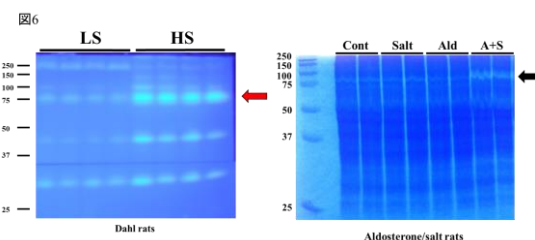
プロスタシン過剰発現マウスの表現型を解析するため、10 週齢のプロスタシン過剰発現マウスの血圧、血清 BUN、Cr および尿蛋白量、尿中 Na、K 排泄量をコントロールマウスと比較検討したが、いずれのパラメーターに関しても有意差はなかった。

プロスタシン過剰発現マウスにまず G 群(6 匹)コントロールから腎臓から蛋白を回収し、回収した腎臓の蛋白から ENaCγサブユニットの molecular weight shift の変化をウエスタンブロット法により評価したが、ENaCγサブユニットの molecular weight shift の変化は観察されなかった(図 5)。そのため、プロスタシン過剰発現マウスの腎臓におけるプロスタシンの発現量を検討したところ、プロスタシンの蛋白発現が約 1.5~2 倍程度と対照と比較して多くないことが ENaCγサブユニットの cleave の変化として捉えられなかった原因と考えられた。



III. zymography 法を用いた DS ラットおよびアルドステロン投与ラットにおける腎および尿中での活性が亢進しているセリンプロテアーゼの同定を優先し、検討した。

DS およびアルドステロン投与ラットより回収した腎組織の蛋白と尿を Double-layer fluorescent zymography 法により解析し、DS およびアルドステロン投与ラットの腎と尿で 80、40、25kDa に活性が亢進したセリンプロテアーゼのバンドが確認された。80kDa のバンドの活性が一番強いいため、現在このバンドをゲルから切り出して、蛋白の N 末端アミノ酸解析や液体クロマトグラフ・質量分析(LC/MS)を施行し、蛋白を同定したところ 80kDa の SP はプラスミンであることが判明した(図 6)。



発現が亢進した SP としてプラスミンを同定できたため、DNA マイクロアレイ解析は施行しなかった。In vitro での同定した SP による ENaC の活性化についての検討に関しては、同定した SP がプラスミンであり、プラスミンは  $\gamma$ ENaC の K194 を切断することによって ENaC を活性化することが既に報告されているため、この検討は行わなかった。現在、プラスミンノックアウトマウスを作製し、血圧と ENaC の活性化に関してコントロールマウスと比較することによってプラスミンの血圧上昇および ENaC 活性化における意義を明らかにしているところである。

今回行った実験で、In vivo において CM がアルドステロンによって誘導される  $\gamma$ サ

ブユニットの切断を抑制すること、プロスタシン前駆体のプロセッシングを阻害し、プロスタシンの切断・分泌を抑制することが証明できた。また、アルドステロンと食塩負荷によって SP であるプラスミンが誘導されることが明らかとなり、プラスミンが ENaC を活性化することにより食塩感受性高血圧発症に関与している可能性が示唆された。CM は経口投与可能な薬剤であり、わが国において既に臨床使用されている薬剤でもあるため、プロスタシンやプラスミンの活性抑制によって降圧作用を示す新しいクラスの降圧薬となりうる可能性も示唆された。

#### 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. Morinaga, J., Kakizoe, Y., Miyoshi, T., Onoue, T., Ueda, M., Mizumoto, T., Yamazoe, R., Uchimura, K., Hayata, M., Shiraishi, N., Adachi, M., Sakai, Y., Tomita, K., Kitamura, K. The anti-fibrotic effect of a serine protease inhibitor in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 305(2):F173-81, 2013. 査読有。
2. Hayata, M., Kakizoe, Y., Uchimura, K., Morinaga, J., Yamazoe, R., Mizumoto, T., Onoue, T., Ueda, M., Shiraishi, N., Adachi, M., Miyoshi, T., Sakai, Y., Tomita, K., Kitamura, K. Effect of a serine protease inhibitor on the progression of chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 303(8):F1126-35, 2012. 査読有。
3. Uchimura, K., Kakizoe, Y., Onoue, T., Hayata, M., Morinaga, J., Yamazoe, R., Ueda, M., Mizumoto, T., Adachi, M., Miyoshi, T., Shiraishi, N., Sakai, Y., Tomita, K., Kitamura, K. In vivo contribution of serine proteases to the proteolytic activation of  $\gamma$ ENaC in aldosterone-infused rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 303(7):F939-43, 2012. 査読有。

[学会発表] (計 5 件)

1. 新規治療戦略を目指した CKD 治療薬としてのカモスタットの有用性 成田勇樹、植田美紀、内村幸平、水本輝彦、宮里賢和、森永潤、早田学、柿添豊、安達政隆他 第 8 回日本腎臓病薬物療法学会学術集会・総会、2014 年 10 月 12 日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)
2. CKD に対するメシル酸カモスタット

- (CM)と ARB の腎保護効果の検討 植田美紀、内村幸平、成田勇樹、水本輝彦、尾上友朗、山添リカ、森永潤、早田学、白石直樹、實吉拓、安達政隆他 第 56 回日本腎臓学会学術集会、2013 年 5 月 12 日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)
3. メタボリックシンドローム(Mets)における腎障害進展へのセリンプロテアーゼ(SP)の関与 水本輝彦、北村健一郎、植田美紀、尾上友朗、山添リカ、森永潤、内村幸平、早田学、白石直樹、實吉拓、安達政隆他 第 55 回日本腎臓学会学術集会、2012 年 6 月 3 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
  4. 慢性腎不全に対するセリンプロテアーゼインヒビターの効果 早田学、北村健一郎、内村幸平、森永潤、山添リカ、水本輝彦、尾上友朗、植田美紀、白石直樹、安達政隆他 第 55 回日本腎臓学会学術集会、2012 年 6 月 1 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
  5. 腎尿細管機能制御 プロスタシンによるアルドステロン制御 安達政隆、関健博、富田公夫、北村健一郎 第 55 回日本腎臓学会学術集会、2012 年 6 月 1 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[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

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