

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008 ～2010

課題番号：20390238

研究課題名（和文） プロスタシンによるアルドステロン産生誘導の分子機構の解明と創薬基盤の開発

研究課題名（英文） Mechanism of prostasin-induced aldosterone production

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

腎臓における Na 再吸収と高血圧症の強い因果関係が示唆されている。腎臓での Na 再吸収においてとりわけ重要な働きをしているのが上皮型 Na チャネル (ENaC) である。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単離し、プロスタシンが ENaC 活性を増強することを証明し、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。

アルドステロン産生臓器由来の細胞株を用いてプロスタシンによるアルドステロン産生誘導の分子メカニズムを解明する。特にプロスタシン刺激に対応する細胞膜上の受容体を同定し、その受容体を介したシグナルがどのように CYP11B2 の発現誘導につながるかを詳細に検討し、また、**aldosterone** により活性化される上皮型 Na チャネル (ENaC) の動態を食塩感受性高血圧のモデルである Dahl 食塩感受性高血圧 (DS) ラットにおいて検討した。

研究成果の概要（英文）：

The control of blood pressure (BP) and extracellular fluid volume primarily depends on renal regulation of sodium reabsorption and excretion. The epithelial sodium channel (ENaC) plays an important role in the regulation of blood pressure by modulating Na reabsorption in the kidney. We previously revealed that prostasin increased Na transport through ENaC in the co-expression system using *Xenopus* oocytes, and that aldosterone increased the abundance of prostasin in human and rat urine and in the cultured medium of a mouse cortical collecting duct cell line.

We examine if prostasin increases the aldosterone synthesis in a human adrenocortical cell line (H295R cells). Luciferase assay using CYP11B2 promoter is used to see if the prostasin increases the transcriptional activity of CYP11B2. In addition, ENaC activity is investigated in Dahl hypertensive rats which are the model animal of salt-sensitive hypertension.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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：高血圧、腎、ナトリウム、アルドステロン、プロスタシン

1. 研究開始当初の背景

腎臓における Na 再吸収と高血圧症の強い因果関係が示唆されている。腎臓での Na 再吸収においてとりわけ重要な働きをしているのが上皮型 Na チャネル (ENaC) である。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単離し、プロスタシンが ENaC 活性を増強することを証明し、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。

2. 研究の目的

アルドステロン産生臓器由来の細胞株を用いてプロスタシンによるアルドステロン産生誘導の分子メカニズムを解明する。特にプロスタシン刺激に対応する細胞膜上の受容体を同定し、その受容体を介したシグナルがどのように CYP11B2 の発現誘導につながるかを詳細に検討する。

また、aldosterone により活性化される上皮型 Na チャネル (ENaC) の動態を食塩感受性高血圧のモデルである Dahl 食塩感受性高血圧 (DS) ラットにおいて検討する。

3. 研究の方法

(1) プロスタシンによるアルドステロン産生誘導の検証

ラットの大腿静脈にポリエチレンチューブを留置し、もう一端を I で作製した活性型組み換えプロスタシンを充填した浸透圧ミニポンプ (7日間用) に接続して皮下に留置する。プロスタシンの投与量は 100 µg/day、10 µg/day、1 µg/day、100 ng/day、10 ng/day とする。その後、24 時間ごとに血圧を測定するとともに Day 3、Day 5、Day 7 に sacrifice する。Sacrifice 時に血漿サンプルならびに心臓、腎臓、副腎、大動脈などこれまでにアルドステロン産生の事実または可能性が指摘されている臓器を採取し、mRNA およびタンパク質抽出に供する。その後、以下の点について解析を行う。

- ① 昇圧反応の経時的変化ならびに用量依存性
- ② プロスタシン投与開始後、何日目から血圧が上昇するか、また投与量と昇圧反応の間に何らかの用量依存性が認められる否かを検討する。
- ③ アルドステロン産生臓器の同定採取した各

臓器のmRNAを用いてCYP11B2 (アルドステロン合成酵素)のreal time RT-PCRを行い、CYP11B2の発現が増加している臓器を同定する。同定した臓器におけるプロスタシンによるアルドステロン産生現象の確認

④前項でアルドステロンの産生が示唆された臓器をorgan cultureし、プロスタシンを培養液に添加することで培養上清中へのアルドステロンの分泌が誘導されるかどうかを検討する。細胞レベルでのプロスタシンによるアルドステロン産生誘導の確認。

⑤前項で whole organ でのアルドステロン分泌誘導が明らかになったら、その臓器由来の cell line を可能な限り入手し、プロスタシンが CYP11B2 の発現を誘導する分子メカニズムについて検討する。

(2)aldosterone により活性化される上皮型 Na チャネル(ENaC)の動態を食塩感受性高血圧のモデルである Dahl 食塩感受性高血圧 (DS)ラットにおいて検討した。

#### 4. 研究成果

組換えプロスタシンタンパク質をラットに持続静注してプロスタシンによるアルドステロン産生誘導について検討し、副腎のCYP11B2および血漿aldosterone濃度の増加、ヒト副腎皮質腺腫細胞 (H295R cell) においてプロスタシンにより aldosterone 産生の増加を確認した。

DS ラットに高塩食を投与すると正塩食と比べ、血液中のアルドステロンは抑制されたが、ENaC  $\beta$   $\gamma$  サブユニットの mRNA・蛋白の発現亢進と  $\gamma$  サブユニットの shift の亢進を認めた。食塩負荷 DS ラットでは尿中のプロスタシン排泄は尿蛋白の増加と共に増加しており、高血圧に伴う糸球体障害のため血液中から尿

中へ漏出したプロスタシンが  $\gamma$  サブユニットの shift 亢進の原因と考えられた。

食塩感受性高血圧のモデルラットにおいて、プロスタシンの関与が推察された。

#### 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 26 件)

2011. Izumi, Y., Hori, K., Nakayama, Y., Kimura, M., Hasuike, Y., Nanami, M., Kohda, Y., Otaki, Y., Kuragano, T., Obinata, M., Kawahara, K., Tanoue, A., Tomita, K., Nakanishi, T., Nonoguchi, H. Aldosterone requires vasopressin v1a receptors on intercalated cells to mediate Acid-base homeostasis. J Am Soc Nephrol., 22(4):673-80, 2011 査読有
2011. Adachi, M., Miyoshi, T., Shiraishi, N., Shimada, H., Sakaguchi, S., Tomita, K., and Kitamura, K. A study of maintenance therapy after intravenous maxacalcitol for secondary hyperparathyroidism. Clin. Nephrol., in press, 査読有
2011. Makoto Anraku, M., Takeuchi, K., Watanabe, H., Kadowaki, D., Kitamura, K., Tomita, K., Kuniyasu, A., Suenaga, A., Maruyama, T., and Otagiri, M. Cys34 on antioxidative properties of HSA quantitative analysis of cysteine-34 on the antioxidative properties of human serum albumin in hemodialysis patients. J. Pharm. Sci., in press, 2011 査読有
2011. Shiraishi, N., Kitamura, K., Hayata, M., Ogata, T., Adachi, M., Kajiwara, K., Ikeda, H., Miyoshi, T., and

- Tomita, K. A case of anti-glomerular basement membrane antibody-induced glomerulonephritis with cytomegalovirus-induced thrombotic microangiopathy. Intern. Med. J., in press, 2011 査読有
5. 2010. Regulation of renal sodium handling through the interaction between serine proteases and serine protease inhibitors. Kitamura K, Tomita K Clin Exp Nephrol. 14: 405-10, 2010 査読有
6. 2010 Regulation of adrenal aldosterone production by serine protease prostaticin.  
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;2010:793843. Epub 2010 Mar 2. 査読有
7. 2010. P Jutabha, N Anzai, K Kitamura, A Taniguchi, S Kaneko, H Yamada, H Shimada, T Kimura, T Katada, T Fukutomi, K Tomita, W Urano, H Yamanaka, G Seki, T Fujita, K Yan, A Yamada, S Uchida, M F. Wempe, H Endou, and H Sakurai. Human sodium-phosphate transporter hNPT4(SLC17A3) as a common renal secretory pathway for drugs and urate. JBC 285: 35123-35132, 2010 査読有
8. 2009 Nonoguchi H, Kohda Y, Fukutomi R, Nakayama Y, Naruse M, Kitamura K, Inoue T, Nakanishi T, Tomita K. A case with acute renal failure and subsequent nephrotic syndrome. Ren Fail. 2009;31(2):162-6 査読有
9. 2009 Memetimin H, Izumi Y, Nakayama Y, Kohda Y, Inoue H, Nonoguchi H, Tomita K. Low pH stimulates vasopressin V2 receptor promoter activity and enhances downregulation induced by V1a receptor stimulation. Am J Physiol Renal Physiol. 2009 Sep;297(3):F620-8. 査読有
10. 2009 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. 2009 Aug;27(8):1679-89. 査読有
11. 2009 Koda A, Wakida N, Toriyama K, Yamamoto K, Iijima H, Tomita K, Kitamura K. Urinary prostaticin in humans: relationships among prostaticin, aldosterone and epithelial sodium channel activity. Hypertens Res. 2009 Apr;32(4):276-81. 査読有
12. 2009 Matsuo S, Imai E, Horio M, Yasuda Y, Tomita K, Nitta K, Yamagata K, Tomino Y, Yokoyama H, Hishida A; Revised Equations for Estimated GFR From Serum Creatinine in Japan. on behalf of the collaborators developing the Japanese equation for estimated GFR. Am J Kidney Dis. 2009 Mar 31. [Epub ahead of print] 査読有
13. 2009 Acute and chronic metabolic acidosis interferes with aquaporin-2 translocation in the rat kidney collecting ducts. Mouri T, Inoue T, Nonoguchi H, Nakayama Y, Miyazaki H, Matsuzaki T, Saito H, Nakanishi T, Kohda Y, Tomita K. Hypertens Res. 2009 May;32(5):358-63. Epub 2009 Mar 20. 査読有
14. 2009 Nakayama Y, Nonoguchi H, Kohda Y, Inoue H, Memetimin H, Izumi Y, Tomita

- K. Different Mechanisms for the Progression of CKD with ACE Gene Polymorphisms. *Nephron Clin Pract.* 2009;111(4):c240-6. Epub 2009 Mar 17 査読有
15. 2009 Urinary prostaticin in humans: relationships among prostaticin, aldosterone and epithelial sodium channel activity. Koda A, Wakida N, Toriyama K, Yamamoto K, Iijima H, Tomita K, Kitamura K. *Hypertens Res.* 2009 Apr;32(4):276-81. Epub 2009 Feb 27. 査読有
16. 2009 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.* 2009 Jan;27(1):181-9. 査読有
17. 2009 Wakamatsu S, Nonoguchi H, Ikebe M, Machida K, Izumi Y, Memetimin H, Nakayama Y, Nakanishi T, Kohda Y, Tomita K. Vasopressin and hyperosmolality regulate NKCC1 expression in rat OMCD. *Hypertens Res.* 2009 32 : 481-487 査読有
18. 2009. High serum alanine aminotransferase levels for the first three successive years can predict very high incidence of hepatocellular carcinoma in patients with Child Stage A HCV-associated liver cirrhosis. Miyakawa K, Tarao K, Ohshige K, Morinaga S, Ohkawa S, Okamoto N, Shibuya A, Adachi S, Miura Y, Fujiyama S, Miyase S, Tomita K. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(11):1340-8. 査読有
19. 2008 H. Nonoguchi, Y. Izumi, Y. Nakayama, Y. Kohda, K. Tomita. The MAXIMA trial. *Lancet.* 371;299-300. 査読有
20. 2008 Anraku M, Kitamura K, Shintomo R, Takeuchi K, Ikeda H, Nagano J, Ko T, Mera K, Tomita K, Otagiri M. Effect of intravenous iron administration frequency on AOPP and inflammatory biomarkers in chronic hemodialysis patients: a pilot study. *Clin Biochem.* 2008 Oct;41(14-15):1168-74. 査読有
21. 2008 Izumi Y, Nakayama Y, Memetimin H, Inoue T, Kohda Y, Nonoguchi H, Tomita K. Regulation of V2R transcription by hypertonicity and V1aR-V2R signal interaction. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Oct;295(4):F1170-6. 査読有
22. 2008 Nakayama Y, Inoue T, Kohda Y, Inoue H, Izumi Y, Tomita K, Nonoguchi H. Long-term observation of renal function on combination therapy with prostaglandin and angiotensin-converting enzyme inhibitor for chronic kidney disease. *Clin Nephrol.* 2008 Jun;69(6):402-7. 査読有
23. 2008 Aoyagi T, Izumi Y, Hiroshima M, Matsuzaki T, Yasuoka Y, Sanbe A, Miyazaki H, Fujiwara Y, Nakayama Y, Kohda Y, Yamauchi J, Inoue T, Kawahara K, Saito H, Tomita K, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin regulates the renin-angiotensin-aldosterone system via V1a receptors in macula densa cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Jul;295(1):F100-7. 査読有
24. 2008 Yokoyama H, Anzai N, Ljubojevic M, Ohtsu N, Sakata T, Miyazaki H, Nonoguchi H, Islam R, Onozato M, Tojo A, Tomita K, Kanai Y, Igarashi T, Sabolic I,

- Endou H. Functional and immunochemical characterization of a novel organic anion transporter Oat8 (Slc22a9) in rat renal collecting duct. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(4):269-78. 査読有
25. 2008 Matsuzaki T, Morisaki T, Sugimoto W, Yokoo K, Sato D, Nonoguchi H, Tomita K, Terada T, Inui K, Hamada A, Saito H. Altered pharmacokinetics of cationic drugs caused by down-regulation of renal rat organic cation transporter 2 (Slc22a2) and rat multidrug and toxin extrusion 1 (Slc47a1) in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Drug Metab Dispos.* 2008 Apr;36(4):649-54. 査読有
26. 2008 Nonoguchi H, Kiyama S, Kitamura K, Naruse M, Tomita M, Tazoe N, Tajiri M, Nakayama Y, Kohda Y, Inoue T, Tomita K. Long-term plasma levels and dose modulation of alacepril in patients with chronic renal failure. *Hypertens Res.* 2008 Jan;31(1):29-36. 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

北村 健一郎 (KITAMURA KENICHIRO)  
熊本大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：10304990