

41

助成番号 0141

## プロスタシンの分泌調節および高血圧における動態の研究

助成研究者：富田 公夫 (熊本大学第3内科)

共同研究者：野々口博史 (熊本大学第3内科)

北村健一郎 (熊本大学第3内科)

高血圧の成因としての腎臓の役割は大きくが種々の報告がある。日本人の高血圧は食塩感受性の割合が高く、腎臓でのNa調節異常の関与が強く考えられている。腎尿細管でのNa再吸収は、近位尿細管での各種物質との共輸送系、ヘンレ係蹄のNa/K/2Cl共輸送系、遠位尿細管のNa/Cl共輸送系とNaチャンネル、などが重要であり、今日、高血圧との関連においては特にNaチャンネルが注目されている。今日まで、Naチャンネルを刺激し、尿細管でのNa再吸収を亢進し高血圧を惹起するホルモンとしてはインスリン、抗利尿ホルモン、アルドステロンなどが重要である。最近、このNaチャンネル機能を亢進する物質(channel-activating protease: CAP1)がアフリカツメガエル細胞よりクローニングされた。この物質はセリンプロテアーゼファミリーに属している。前回、私たちは、Naチャンネルの活性化機序をセリンプロテアーゼファミリーの1つであるラットプロスタシンをクローニングし検討を加え、Naチャンネルを活性化することを示した。

昨年、プロスタシンがアルドステロンにより刺激分泌されることを明らかにした。集合尿細管でのNaチャンネルの活性化にはインスリン、抗利尿ホルモンおよびアルドステロンが重要であり、アルドステロンは細胞内受容体に結合した後核内に移動しaldosterone-induced proteinを介してNa-K-ATPaseを活性化すると考えられているが、新たにプロスタシンが関与している可能性が示された。

培養細胞系を用いての検討で通常状態およびアルドステロン存在下ともにプロスタシンの投与によりamiloride感受性Na輸送のさらなる増加が認められたことによりプロスタシンの生理的な意義が確認された。またamiloride存在下においても、アルドステロンによるプロスタシンの発現誘導量の変化は認められず、細胞内Na濃度の上昇による機序の可能性は少なくアルドステロンによる直接的なpathwayの存在が推測された。

プロスタシンの高血圧における動態はまだ検討されておらず、今後、自然発症高血圧ラットや食塩感受性ラットであるDahlラットにおける動態、さらには、本態性高血圧におけるプロスタシンの役割についての検討する必要がある。



助成番号 0141

## プロスタシンの分泌調節および高血圧における動態の研究

助成研究者：富田 公夫 (熊本大学 第3内科)

共同研究者：野々口博史 (熊本大学 第3内科)

北村健一郎 (熊本大学 第3内科)

## 【研究目的】

自然発症高血圧ラット (SHR) の腎臓を正常ラットに移植することにより、高血圧も移植されることや、ヒトの腎移植においても高血圧者から腎臓を移植された場合や、高血圧素因のあるヒトからの腎臓を移植された場合には、そうでない腎臓を移植された場合に比べ高血圧の発症頻度が高いことより、高血圧の成因の1つとして腎臓の役割が強く考えられている。しかし、どのような異常なのかについては膨大な数の報告がなされているが、重要な成果は得られていない。

昇圧系のレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系、エンドセリン系、抗利尿ホルモン系、降圧系のカリクレイン・キニン系、一酸化窒素系、心房性Na利尿ペプチド系、プロスタグランジン系などNa代謝から各分野で検討され、それぞれ多くの異常が指摘されている。腎尿細管でのNa再吸収は、近位尿細管での各種物質との共輸送系、ヘンレ係蹄のNa/K/2Cl共輸送系、遠位尿細管のNa/Cl共輸送系とNaチャネルなどが重要であり、今日、高血圧との関連においては特にNaチャネルが注目されている。現在まで、Naチャネルを刺激し、尿細管でのNa再吸収を亢進し高血圧を惹起するホルモンとしてはアルドステロンが良く知られているが、抗利尿ホルモンやインスリンもNaチャネルを刺激し、また、抗利尿ホルモンはアルドステロンと協調的にNaチャネルを刺激し尿細管でのNa再吸収を亢進する事が知られている。近年、遺伝性の高血圧の一つであるLiddle症候群において、これらホルモン系とは関係なく、尿細管自体のNaチャネル活性の亢進が原因であることが遺伝子レベルで示された(1, 2, 3, 4)。多くの研究者がこのLiddle症候群にみられたNaチャネルの異常が本態性高血圧症にも認められるのではないかと検討したが、現在まで黒人においては関与が推察されているが、白人や本邦では確認されていない(5, 6, 7, 8)。最近、Naチャネル機能を亢進する物質(channel-activating protease: CAP1)がアフリカツメガエル細胞よりクローニングされた(9)。

生体内でこのCAP1の分布は上皮型Naチャネルの分布とほぼ類似しており、腎、腸、肺、皮膚、卵巣などに分布している。CAP1はトリプシン、カリクレイン、組織プラスミノゲンアクチベーター、などとおおよそ50%の相同性を持つセリンプロテアーゼファミリーに属することがわかった。

これまでに、私たちは、トリプシンによる Na チャネルの活性化機序について検討し、 $\gamma$ サブユニットが関与している可能性を示唆する成績を得た。また、ラットおよびマウスプロスタシンをクローニングし、尿細管レベルにおいて CCD, OMCD, IMCD に発現していること、ENaC とプロスタシンとの共発現によりアミロライド感受性ナトリウム電流がおよそ2倍に増加することを報告した。

プロスタシンの調節因子について昨年度、アルドステロンがプロスタシンの発現を遺伝子レベルおよびタンパクレベルで刺激すること、臨床的には原発性アルドステロン症において尿中排泄量が増加しており副腎腫瘍摘出によりその排泄量が減少することも示した。

今年度はアルドステロンにより誘導されたプロスタシンが Na チャネルの活性化に関与しているか、アルドステロンによるプロスタシンの発現誘導がアルドステロンの直接作用なのかそれとも細胞内 Na 濃度の増加による2次的なものかなどについて検討した。

#### 【研究方法】

##### I. アルドステロンによる Na 摂取量へのアプロチニンの影響

1. アルドステロンにより誘導されるプロスタシンが Na チャネルの活性化に関与しているかについて検討した。マウス集合尿細管培養細胞を用いてプロスタシンの抑制物質であるアプロチニンを用いてアミロライド感受性ナトリウム電流を測定した。

2. 培養細胞においてすでにプロスタシンが十分に存在しているかもしれず、アルドステロンにより誘導されるプロスタシンが効果を持たないかもしれないので、recombinant プロスタシンを投与してのアミロライド感受性ナトリウム電流を測定した。

##### II. アルドステロンによるプロスタシンの発現誘導についての検討

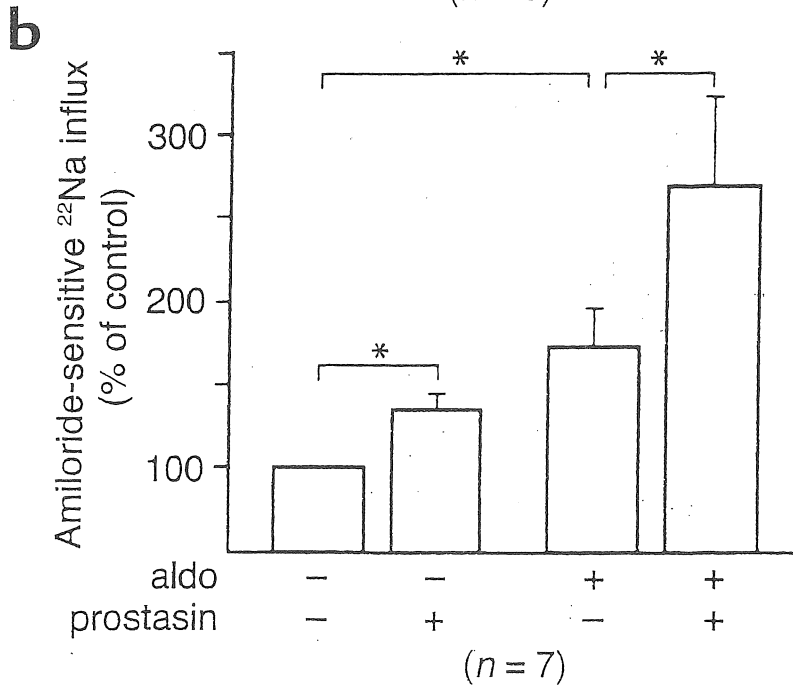
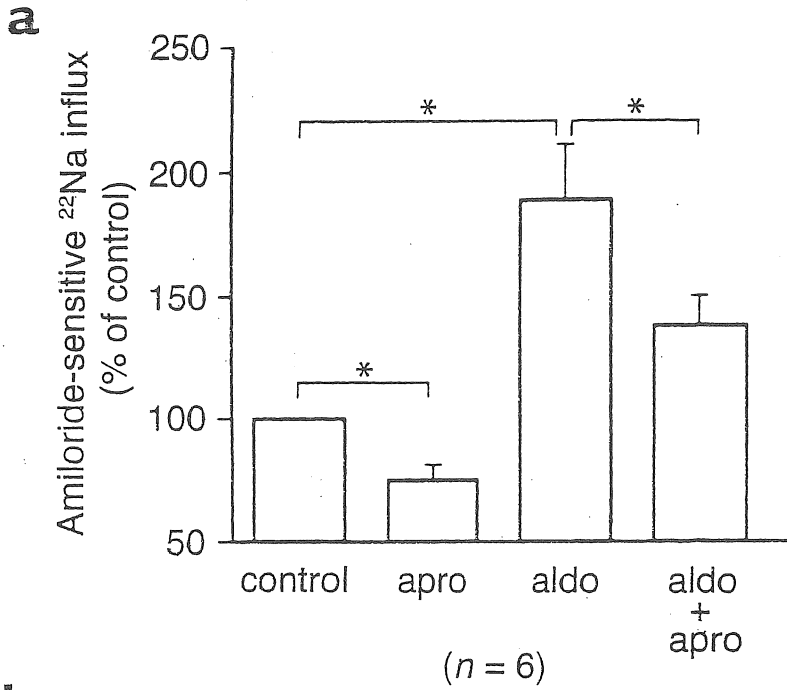
アルドステロンは Na を再吸収し細胞内の Na 濃度を上昇させる。アルドステロンによるプロスタシンの誘導がアルドステロンの直接作用なのか、細胞内 Na 濃度の上昇による2次的なものなのかについて、amiloride により Na チャネルをブロックした状態でのプロスタシンの発現量について検討した。

#### 【研究結果】

##### I. アルドステロンによる Na 摂取量へのアプロチニンの影響

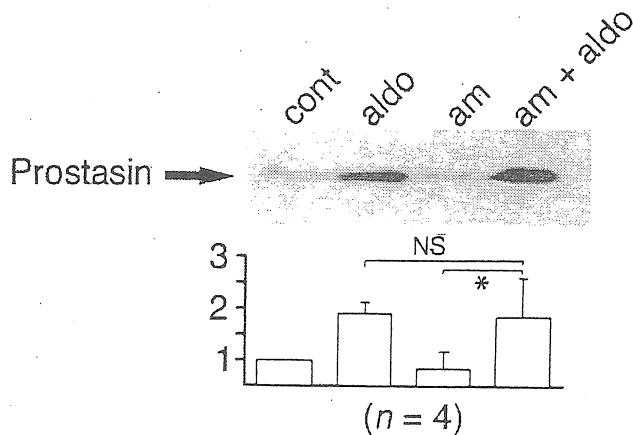
1. アプロチニン処理により amiloride 感受性 Na 輸送はおよそ 25%低下した。アルドステロン投与により、amiloride 感受性 Na 輸送はおよそ 90%増加し、アプロチニン処理により減少した。

2. アルドステロン非存在下に recombinant プロスタシンを投与すると amiloride 感受性 Na 輸送は 1.35 倍増加し、アルドステロン存在下では 1.56 倍増加した。



## II. アルドステロンによるプロスタシンの発現誘導についての検討

Amiloride 存在下においても、アルドステロンによるプロスタシンの発現誘導量の変化は認められず、細胞内 Na 濃度の上昇による機序の可能性は少ないものと思われた。



### 【考察】

Liddle 症候群の Na チャネル遺伝子の異常の発見により高血圧の原因遺伝子の研究は非常に活性化され多くの興味ある研究がなされつつある。この Na チャネル遺伝子の異常がなぜ Na チャネル活性を亢進させるのかについて、ユビキチン蛋白結合 N e d d 4 の WW domain が重要な役割を持っていることが示されているが、この調節因子に関しては細胞内 Na イオン濃度が重要で、G 蛋白が関与することが示唆されている。

CAP1 はアフリカツメガエル細胞からクローニングされたものでヒトの生理的意義を検討するには発生学的に遠いと考え、まずラットにおいて検討を始めた。ヒトプロスタシンは 1995 年にカリクレインファミリーの一つとしてクローニングされていた (10) が、機能は全く不明でその後検討されていなかった。

セリンプロテアーゼであるラットプロスタシンは Na チャネルと同様の分布を示し、一回膜貫通型で、尿細管に存在すると考えられる。この分泌様式に関し、アミノ酸配列上 GPI (グリコシルホスファチジルイノシトール) アンカー蛋白が推定され、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C (PIPLC) により分解され、アンカーとしての機能を失い、膜から離れ培養上清中に遊離することが明らかとなった。尿中にプロスタシンが排泄されることより、尿細管の管腔側に存在することが推測される。

昨年度、プロスタシンの発現は、アルドステロンにより刺激されることを明らかにした。アルドステロンは細胞内受容体に結合した後核内に移動し aldosterone-induced protein を介して Na-K-ATPase を活性化すると考えられているが、新たにプロスタシンが関与している可能性が示された。

培養細胞系を用いての検討で通常状態およびアルドステロン存在下ともにプロスタシ

ンの投与により amiloride 感受性 Na 輸送のさらなる増加が認められたことによりプロスタシンの生理的な意義が確認された。また amiloride 存在下においても、アルドステロンによるプロスタシンの発現誘導量の変化は認められず、細胞内 Na 濃度の上昇による機序の可能性は少なくアルドステロンによる直接的な pathway の存在が推測された。

## ENaCの活性化機構

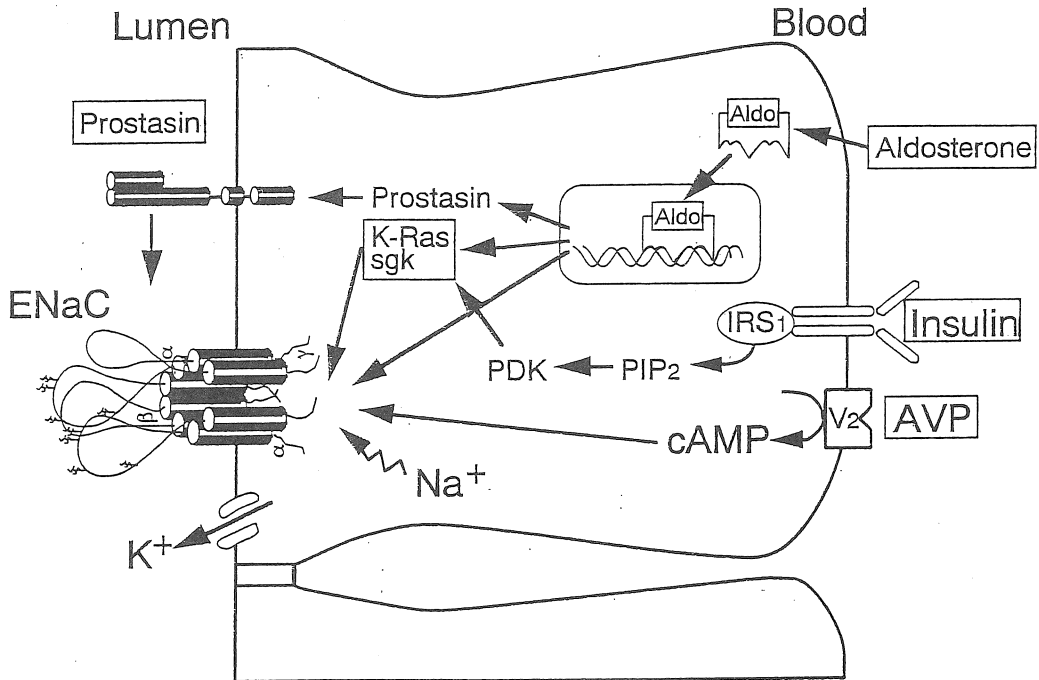


図3. ENaC 発現調節の模式図

### 【今後の課題】

プロスタシンの高血圧における動態はまだ検討されていない。自然発症高血圧ラットや食塩感受性ラットである Dahl ラットにおける動態、さらには、本態性高血圧におけるプロスタシンの役割についての検討が残っている。

文献

1. Shimkets RA., et al : Liddle's syndrome : Heritable human hypertension caused by mutations in the  $\beta$  subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79:407-414, 1994
2. Schild L. et al : A mutation in the epithelial sodium channel causing Liddle disease increases channel activity in the *Xenopus laevis* oocyte expression system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 92: 5699-5703, 1995
3. Snyder PM., et al : Mechanism by which Liddle's syndrome mutations increase activity of a human epithelial Na channel. *Cell* 83: 969-978, 1995
4. Schild L. et al : Identification of PY motif in the epithelial Na channel subunits as a target sequence for mutations causing channel activation found in Liddle syndrome. *EMBO J.* 15: 2381-2387, 1996
5. Chang H., T. Fujita : Lack of mutations in epithelial Na channel  $\beta$ -subunit gene in human subjects with hypertension. *J. Hypertens.* 14: 1417-1419, 1996
6. Persu A. et al : Genetic analysis of the  $\beta$ -subunit of the epithelial Na channel in essential hypertension. *Hypertension* 32:129-137, 1998
7. Baker EH., et al : Association of hypertension with T594M mutation in  $\beta$  subunit of epithelial Na channels in black people resident in London. *Lancet* 351: 1388-1392, 1998
8. Su YR., et al : A novel variant of the  $\beta$ -subunit of the amiloride-sensitive sodium channel in African Americans. *J. Am. Soc. Nephrol.* 7: 2543-2549, 1996
9. Vallet V., et al : An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389: 607-610, 1997
10. Yu JX. Chao L. Chao J. Molecular cloning, tissue-specific expression, and cellular localization of human prostaticin mRNA. *J. Biol. Chem.* 270(22): 13483-9, 1995
11. Muto S, Imai M, Asano Y. Mechanisms of the hyperkalaemia caused by nafamostat mesilate: effects of its two metabolites on Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport properties in the rabbit cortical collecting duct. *Br J Pharmacol.* 111(1):173-8, 1994
12. Muto S, Imai M, Asano Y. Effect of nafamostat mesilate on Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport properties in the rabbit cortical collecting duct. *Br J Pharmacol.* 109(3):673-8, 1993



## The mechanism of the activation of sodium channel by serine protease and the regulation of prostaticin

Kimio Tomita, Hiroshi Nonoguchi, Kenichiro Kitamura  
Third Department of Internal Medicine,  
School of Medicine, Kumamoto University

### Summary

Abnormal renal physiology plays a central role in virtually all sustained hypertensive states. In Japan, the population of salt-sensitive hypertension is relatively high. There are several mechanisms in the kidney to reabsorb Na from the luminal fluid, for examples, Na co-transporter systems in the proximal tubule, Na/K/2Cl co-transporter in the loop of Henle, Na/Cl co-transporter and Na channel in the distal nephron. Recent report has given a strong impact on the pathogenesis of essential hypertension. Liddle syndrome, in which patients develop a form of genetic hypertension, has been shown to have mutations within the cytoplasmic COOH terminal of the  $\beta$ - and  $\gamma$ -subunits of the epithelial Na channel lead to a hyperactivity of the channel. In patients with essential hypertension, however, significant relation has not detected. Recently, a new Na channel activator, channel-activating protease(CAP1), has been cloned from a *Xenopus* kidney epithelial cell line. We investigated the mechanism of the activation of Na channel and the regulation of rat prostaticin.

Prostaticin is secreted into incubation medium in cultured M-1 cell line. Urinary prostaticin secretion was stimulated when rat was given aldosterone by osmotic mini-pump. Recombinant prostaticin further stimulated the Na uptake in the presence of aldosterone, suggesting the physiological role of prostaticin.

Our data suggest that prostaticin, a serine protease, was stimulated by aldosterone. Further studies are necessary to clarify whether prostaticin and other Na regulatory hormone systems are closely linked or not. It is also interesting whether prostaticin is involved in the pathogenesis in essential hypertension.