

発表番号 60 (0529)

プロスタシンを標的とした食塩感受性高血圧症および高齢者の 低ナトリウム血症の診断薬・治療薬の創薬

北村 健一郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部)
富田 公夫 (熊本大学大学院医学薬学研究部)
安達 政隆 (熊本大学医学部附属病院腎臓内科)
實吉 拓 (熊本大学医学部附属病院腎臓内科)

遺伝性食塩感受性高血圧症の1つである Liddle 症候群において腎臓皮質集合尿管に存在する上皮型ナトリウムチャンネル (ENaC) の gain-of-function mutation が発見されたことなどから腎臓におけるナトリウム再吸収と高血圧症の強い因果関係が示唆されている。1997 年に Vallet らは A6 細胞からトリプシン様セリンプロテアーゼである Channel-activating protease (CAP-1) を単離し、*Xenopus Oocyte* 上に ENaC と共発現させると ENaC 活性が亢進することを報告した。私たちは CAP-1 の mammalian homologue のクローニングに着手し、セリンプロテアーゼのプロスタシンをラット腎臓 cDNA ライブラリーから単離した。プロスタシンは *Xenopus Oocyte* に ENaC と共発現させるとアミロライド感受性ナトリウム電流を 2~5 倍増加させ、アルドステロンは腎臓においてプロスタシンの発現を増強して ENaC を介したナトリウムの再吸収を増加させた。最近、protease nexin-1 (PN-1) がプロスタシンの内因性インヒビター (serpin) であることが報告された。

本研究では、PN-1 がプロスタシンの活性を抑制して ENaC 活性を抑制するかどうか、また TGF- β 1 やアルドステロンなどのホルモンが PN-1 の発現調節を行うかについて検討した。*Xenopus Oocyte* 上では、PN-1 はプロスタシンによる ENaC の活性化を 68 % 抑制した。20 ng/mL の TGF- β 1 は PN-1 の発現を 3.8 ± 0.5 倍増加し、アルドステロンは 53.7 ± 6.7 % 減少させた。さらに M-1 細胞において siRNA を使用し、PN-1 を knockdown すると、Na 電流が約 1.8 倍増加することが明らかとなった。このことは、PN-1 がプロスタシンの活性を抑制することで、Na 再吸収を調節していること、ENaC 活性調節における PN-1 の生理学的意義を強く示すものである。生体におけるセリンプロテアーゼは常に serpin との拮抗状態にあり、このバランスが崩れたときに病気を惹起すると考えられている。すなわち、生体における食塩感受性高血圧にプロスタシンと PN-1 の拮抗関係が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

助成番号 0529

プロスタシンを標的とした食塩感受性高血圧症および高齢者の 低ナトリウム血症の診断薬・治療薬の創薬

北村 健一郎 (熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科)
 富田 公夫 (熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科)
 安達 政隆 (熊本大学医学部附属病院腎臓内科)
 實吉 拓 (熊本大学医学部附属病院腎臓内科)

【研究目的】

自然発症高血圧ラットの腎臓を正常ラットに移植すると、正常ラットに高血圧が発症することや、ヒトの腎移植においてもドナーが高血圧症または高血圧素因を持ち合わせていた場合、レシピエントに高血圧を発症する頻度が高いことなどから高血圧症の成因として腎臓の果たす役割は重要視されている。また、遺伝性食塩感受性高血圧症の1つである Liddle 症候群において腎臓皮質集合尿細管に存在する上皮型ナトリウムチャネル (ENaC) の gain-of-function mutation が発見されたことから腎臓におけるナトリウム再吸収と高血圧症の強い因果関係が示唆されている。ENaC は腎臓、肺、大腸、汗腺、味蕾などの上皮細胞に存在し、ナトリウムの再吸収を担っている。ENaC は α 、 β 、 γ の3つのサブユニットが 2α 、 1β 、 1γ の4量体を形成して1つのチャネルを構成している。この ENaC はアルドステロンや抗利尿ホルモン、インスリンなどのホルモンにより調節を受け、腎臓でのナトリウム再吸収量の最終的な調節を行っている[1-3]。1997年に Valletらはアフリカツメガエルの尿細管細胞 (A6 cell) からトリプシン様セリンプロテアーゼである Channel-activating protease (CAP-1) を単離し、*Xenopus* Oocyte 上に ENaC と CAP-1 を共発現させると ENaC の活性が亢進することを報告した[4]。

私たちは CAP-1 の mammalian homologue のクローニングに着手し、これまでにセリンプロテアーゼのプロスタシンをラット腎臓 cDNA ライブラリーから単離した。このプロスタシンは *Xenopus* Oocyte に ENaC と共発現させるとアミロライド感受性ナトリウム電流を 2~5 倍増加させ[5]、ナトリウム代謝においてもっとも重要なホルモンの1つであるアルドステロンは腎臓においてプロスタシンの発現を増強して ENaC を介したナトリウムの再吸収を増加させるという新しいナトリウム調節機構を証明した[6]。さらにラットにおいてセリンプロテアーゼ阻害剤であるメシル酸ナファモスタットがプロスタシンを抑制し、尿中 Na 排泄量を増加させること[7]、マウス皮質集合尿細管細胞において

TGF- β がプロスタシンの発現を転写レベルで抑制し、Na 再吸収を阻害すること[8]を明らかにした。これらの知見はプロスタシンがナトリウム代謝において生理学的に重要な役割を果たしていること、および食塩感受性高血圧症の発症因子の1つである可能性を強く示唆するものである。

2004年にアメリカの Karl Chai らのグループは、マウス精巣からプロスタシンの内因性インヒビター (serpin) として protease nexin-1 (PN-1) を同定した[9]。PN-1 はプロスタシンと共有結合することにより、不可逆的にプロスタシンの活性を抑制する。しかしながら、ENaC の活性調節における PN-1 とプロスタシンの相互作用の影響や PN-1 の意義はいまだ知られていない。

本研究ではアフリカツメガエル卵母細胞およびマウス腎皮質集合尿細管細胞 (M-1 cell) を用いて PN-1 とプロスタシンの相互作用が ENaC 活性に与える影響について検討した。

【研究方法】

I. アフリカツメガエル卵母細胞における PN-1 による ENaC 活性の抑制

1. Stage IV ~ V のアフリカツメガエル卵母細胞に ①ENaC α 、 β 、 γ サブユニット、②ENaC α 、 β 、 γ サブユニット+プロスタシン、③ENaC α 、 β 、 γ サブユニット+プロスタシン+PN-1、④ENaC α 、 β 、 γ サブユニット+PN-1 の cRNA をマイクロインジェクションし、16時間後に2電極電位固定法によりアミロライド感受性 Na 電流を測定した。

II. 尿細管上皮細胞における各種ホルモンの PN-1 発現に対する影響

1. マウス腎皮質集合尿細管細胞 (M-1 cell) に TGF- β 1 を投与し、PN-1 および ENaC α 、 β 、 γ サブユニットの発現に対する影響を real time RT-PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて検討した。

2. M-1 cell にアルドステロンを投与し、PN-1 および

ENaC α , β , γ サブユニットの発現に対する影響を real time RT-PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて検討した。

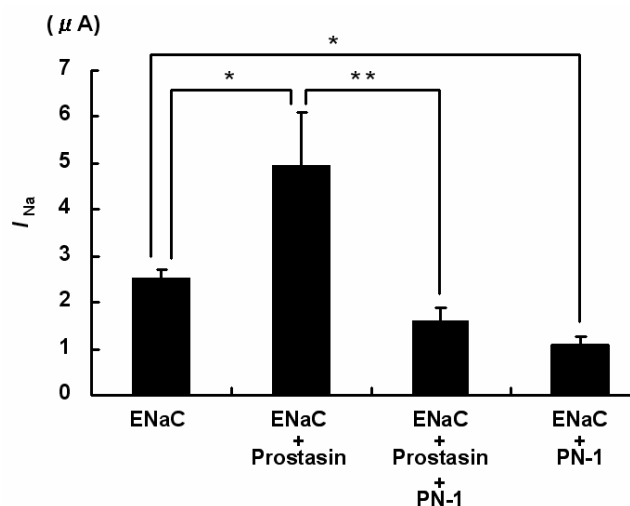
Ⅲ. 尿細管細胞における PN-1 siRNA の Na 電流に与える影響

1. M-1 cell に PN-1 に対する siRNA をトランスフェクションし、アミロライド感受性 Na 電流を測定した。さらに siRNA による PN-1 の発現抑制効果を real time RT-PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて検討した。

【研究結果】

I. アフリカツメガエル卵母細胞における PN-1 による ENaC 活性の抑制

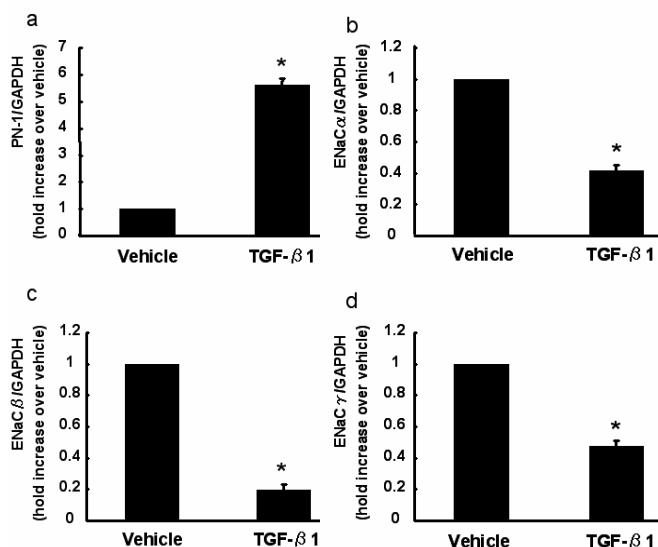
1. アフリカツメガエル卵母細胞発現系では、私たちの従来の報告のようにプロスタシンは ENaC 活性をおよそ2倍に増加させた。さらに PN-1 を共発現させるとプロスタシンによる ENaC の活性化は完全に抑制され、ベースライン以下まで Na 電流を抑制していた。ENaC と PN-1 を共発現させた場合には、PN-1 はベースラインの ENaC 活性を有意に抑制した。これは、おそらくアフリカツメガエル卵母細胞に内因性に存在するプロスタシンの活性抑制によるものと考えられる。



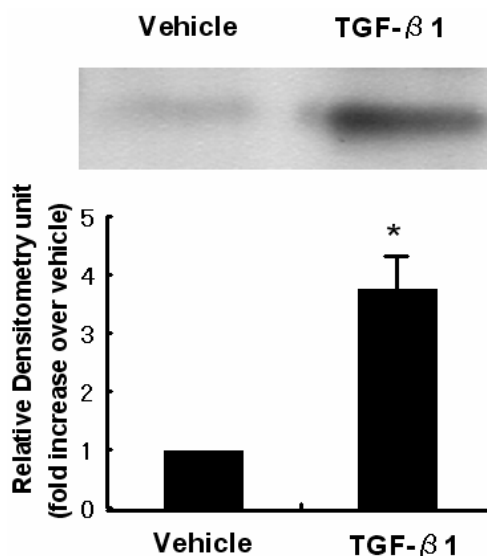
Ⅱ. 尿細管上皮細胞における各種ホルモンの PN-1 発現に対する影響

1. マウス皮質集合尿細管細胞 (M-1 cell) に TGF- β を 20 ng/mL の濃度で投与し、24 時間後の PN-1、ENaC α , β , γ サブユニットの発現に対する影響を real time RT-PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて検討した。20 ng/mL の TGF- β は PN-1 の発現を 5.6 ± 0.3 倍増加させ

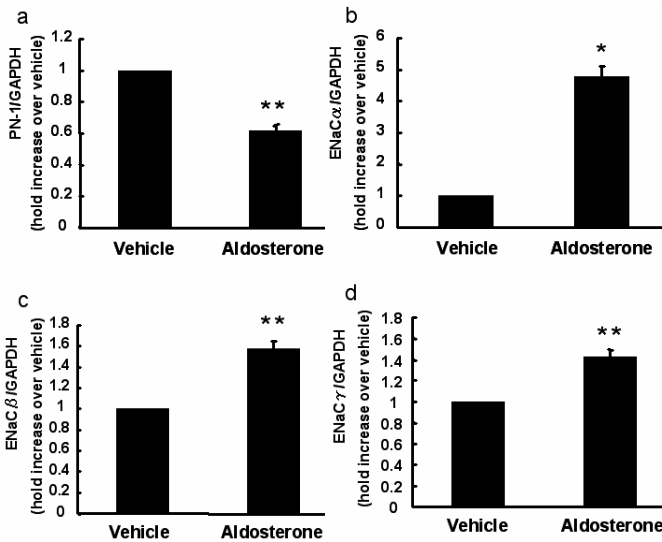
たが、ENaC α , β , γ サブユニットの発現をそれぞれ $59.0 \pm 4.0\%$, $80.4 \pm 2.1\%$, $52.7 \pm 3.4\%$ 減少させた。



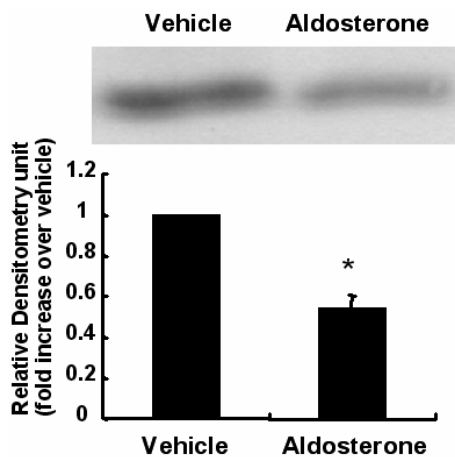
ウエスタンブロットによる解析では、20 ng/mL の TGF- β は PN-1 の発現を 3.8 ± 0.5 倍増加させた。



2. マウス皮質集合尿細管細胞 (M-1 cell) にアルドステロンを $1 \mu M$ の濃度で投与し、24 時間後の PN-1、ENaC α , β , γ サブユニットの発現に対する影響を real time RT-PCR 法およびウエスタンブロット法を用いて検討した。 $1 \mu M$ のアルドステロンは PN-1 の発現を $39.1 \pm 6.0\%$ 減少させたが、ENaC α , β , γ サブユニットの発現をそれぞれ 4.8 ± 0.3 倍、 1.6 ± 0.1 倍、 1.4 ± 0.1 倍増加させた。

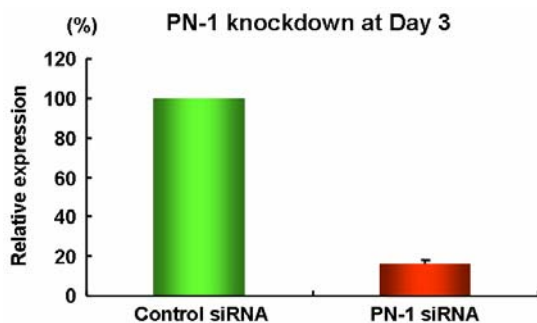


ウェスタンブロットによる解析では、1 μM のアルドステロンは PN-1 の発現を $47.3 \pm 6.7\%$ 減少させた。

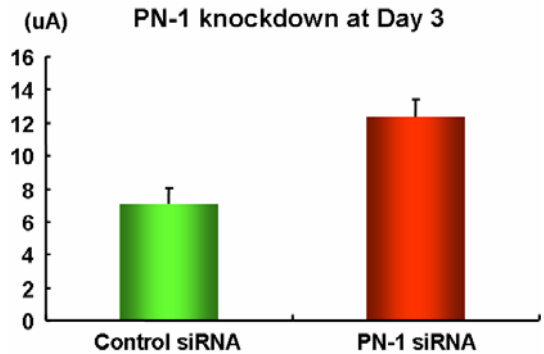


Ⅲ. 尿細管細胞における PN-1 siRNA の Na 電流に与える影響

1. M-1 cell に PN-1 に対する siRNA をトランスフェクションし、3 日後の PN-1 mRNA の発現を検討したところ、mRNA レベルにおいて 80~90% の knockdown 効率が得られた。



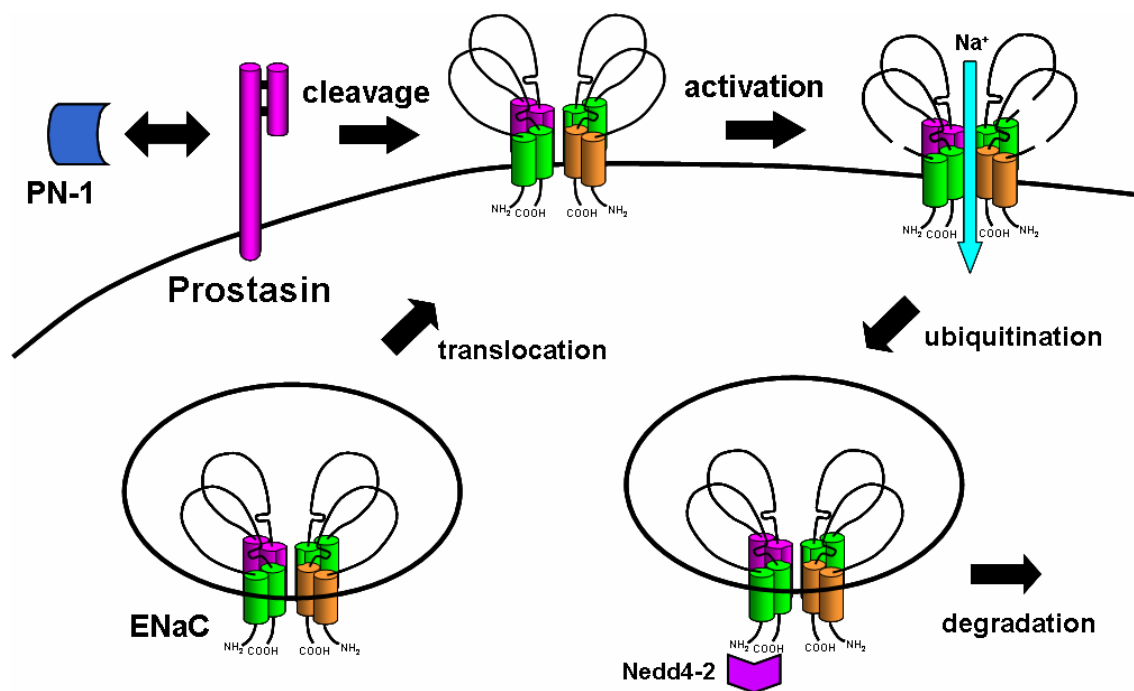
さらにその条件下で ENaC の電流を測定すると PN-1 の knockdown により約 1.8 倍の電流の増加が得られた。このことは、尿細管上皮細胞での Na 再吸収に PN-1 が強く関与していることを示唆する。



【考察】

生体においてセリンプロテアーゼは多彩な機能を担っている。これらのセリンプロテアーゼ対し、その活性を抑制する内因性インヒビター (serpin) が存在し、生体におけるセリンプロテアーゼの作用はセリンプロテアーゼと serpin の相互作用によって調節されている。通常、これらの相互作用は拮抗しており、この拮抗関係が破綻すると病的状態を引き起こすといわれている。セリンプロテアーゼが過剰になっても、また逆に serpin が過剰になっても何らかの病的状態を惹起する。これまでに私たちはセリンプロテアーゼのプロスタシンが ENaC を活性化することを報告してきたが、近年、このプロスタシンの serpin として PN-1 が同定された。今回の私たちの検討により、PN-1 がプロスタシンによる ENaC の活性化を抑制することが明らかとなった。さらに、従来 ENaC 活性の調節をしていると考えられていた TGF-β やアルドステロンなどのホルモンが、ENaC のみならず、PN-1 やプロスタシンの発現を調節することで腎臓での Na 再吸収量を調節している可能性が示唆された。また、M-1 cell において PN-1 を knockdown すると ENaC の活性が約 2 倍増加したことから、尿細管上皮細胞の Na 再吸収メカニズムにおける PN-1 の重要性が強く示唆される。今回の検討から、腎臓における Na 再吸収のメカニズムにおいても、セリンプロテアーゼと serpin の相互作用の重要性が示された。これまで各種ホルモンの Na 再吸収へ与える影響を検討する際に ENaC のみ、あるいは ENaC とプロスタシンの発現を調べることが多かったが、プロスタシンの serpin である PN-1 の発現についても併せて検討する必要がある。

以下に、今回の研究で明らかになった ENaC をめぐるセリンプロテアーゼ/serpin の相互作用をシェーマに示す。



【今後の課題】

PN-1 がプロスタシンの活性を抑制して ENaC 活性を制御することが明らかになったので、このメカニズムを応用して新規作用機序による降圧利尿薬の開発・スクリーニングを検討していく必要がある。

【文献】 Reference List

1. Canessa CM, Schild L, Buell G et al.: Amiloride-sensitive epithelial Na^+ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367: 463-467, 1994
2. Canessa CM, Horisberger JD, Rossier BC: Epithelial sodium channel related to proteins involved in neurodegeneration. *Nature* 361: 467-470, 1993
3. Garty H, Palmer LG: Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* 77: 359-396, 1997
4. Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP et al.: An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389: 607-610, 1997
5. Adachi M, Kitamura K, Miyoshi T et al.: Activation of epithelial sodium channels by proastasin in *Xenopus* oocytes. *J Am Soc Nephrol* 12: 1114-1121, 2001
6. Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M et al.: Regulation of proastasin by aldosterone in the kidney. *J Clin Invest* 109: 401-408, 2002
7. Iwashita K, Kitamura K, Narikiyo T et al.: Inhibition of proastasin secretion by serine protease inhibitors in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 14: 11-16, 2003
8. Tuyen DG, Kitamura K, Adachi M et al.: Inhibition of proastasin expression by TGF- β 1 in renal epithelial cells. *Kidney International* 67: 193-200, 2005
9. Chen LM, Zhang X, Chai KX: Regulation of proastasin expression and function in the prostate. *Prostate* 59: 1-12, 2004

0529

Development of diagnostic and therapeutic drugs for salt-sensitive hypertension and hyponatremia in elderly

Kenichiro Kitamura, Masataka Adachi, Taku Miyoshi, and Kimio Tomita
Department of Nephrology,
Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences

Summary

Identification of gain-of-function mutation in epithelial sodium channel (ENaC) in Liddle's syndrome patients, a hereditary form of salt-sensitive hypertension, indicates the importance of the sodium reabsorption through the kidney in the pathogenesis of salt-sensitive hypertension. In 1997, Vallet et al isolated a channel-activating protease (CAP-1), a trypsin-like serine protease, from A6 cell line and demonstrated that co-expression of CAP-1 and ENaC in *Xenopus* oocytes increased ENaC activity. We isolated a serine protease prostaticin, a mammalian CAP-1 homologue, from rat kidney cDNA library and demonstrated that co-expression of prostaticin and ENaC increased the amiloride-sensitive sodium current in *Xenopus* oocytes. We also found that aldosterone increases sodium reabsorption through ENaC by increasing the expression of prostaticin. Recently a serine protease inhibitor, protease nexin-1 (PN-1), was identified as an endogenous inhibitor for prostaticin activity. Therefore, we hypothesized that PN-1 may regulate sodium reabsorption in the kidney by reducing prostaticin activity, and that expression of PN-1 was regulated by TGF- β 1 or aldosterone, like prostaticin. Expression of PN-1 substantially decreased Prostaticin-induced I_{Na} by approximately 68% in oocytes. Treatment of M-1 cells with 20 ng/ml TGF- β 1 significantly increased mRNA and protein expression of PN-1 by 5.6 ± 0.3 and 3.8 ± 0.5 fold respectively, whereas administration of 10^{-6} M aldosterone markedly decreased mRNA and protein expression of PN-1 to 61.9 ± 6.0 and 53.7 ± 6.7 % respectively. In addition, knockdown of PN-1 expression by siRNA in M-1 cells resulted in the increase in I_{eq} by 1.8 fold. Our study indicates that PN-1 could have a natriuretic role by inhibiting prostaticin activity and suggests the possibility that aldosterone and TGF- β reciprocally regulate the expression of PN-1 in renal epithelial cells contributing to salt retention or natriuresis, respectively by an additional mechanism. PN-1 could represent a new factor that contributes to regulation of ENaC activity in the kidney.