

助成番号 0728

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

北村 健一郎, 富田 公夫

熊本大学大学院医学薬学研究部腎臓内科

概要 私たちはこれまでにセリンプロテアーゼのプロスタシンが上皮型Naチャンネル(ENaC)活性を2~5倍増加させること、アルドステロンが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Naの再吸収を増加させることを証明し、原発性アルドステロン症患者においてその関与を示した。これらの知見はプロスタシンが食塩感受性高血圧発症因子の一つである可能性を強く示唆する。2003年にJulie Chaoのグループは、Wisterラットの尾静脈よりヒトプロスタシン遺伝子を組み込んだアデノウイルスを投与したところ血漿アルドステロン濃度の上昇とともに血圧の上昇が生じることを報告した。しかしながら、プロスタシンがアルドステロン産生を誘導するメカニズムは未だ不明である。私たちは以前、アルドステロンがプロスタシンの発現誘導を行うことを培養細胞、ラットおよびヒトにおいて示している。これらの事実は、プロスタシンとアルドステロンの間にpositive feedback機構が存在し、食塩感受性高血圧の発症進展において悪循環を形成している可能性を示唆するものである。本研究において私たちは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を解明し、本態性高血圧患者における血清プロスタシン濃度と血漿アルドステロン濃度の相関関係についても検討した。

活性型組換えプロスタシンを作成し、ヒト副腎腺腫細胞(H295R)に投与したところアルドステロン合成酵素(CYP11B2)の発現を有意に上昇させ、培養上清へのアルドステロンの分泌も有意に増加していた。プロスタシンによるヒトCYP11B2の発現増強効果は投与6時間後から認められ24時間後まで持続し、48時間後には元のレベルに戻っていた。また、CYP11B2の発現増強効果とアルドステロンの産生増強効果には用量依存性が認められた。H295RにヒトCYP11B2のpromoter-luciferase constructをトランスフェクトし、プロスタシン投与24時間後にルシフェラーゼアッセイを行ったところ、プロスタシンはヒトCYP11B2遺伝子の転写活性を増加させることが明らかとなった。次に不活性型の組換えプロスタシンを作成し、同様の実験を行ったところ、プロスタシンによるCYP11B2の発現増強は認められず、プロスタシンによるCYP11B2の発現誘導にはセリンプロテアーゼ活性が必須であることが明らかとなった。ラットに組換えプロスタシンを持続静注したところ、ラット副腎のCYP11B2発現は増加し、血漿アルドステロン濃度が上昇した。さらに、健常人および本態性高血圧患者において血清プロスタシン濃度と血漿アルドステロン濃度を測定したところ、両者の間には有意な正の相関関係を認めた。

これらの知見は、プロスタシンがそのプロテアーゼ活性により副腎でのアルドステロン産生を刺激することを示し、プロスタシンとアルドステロンの間にpositive feedbackが存在する可能性を示唆した。近年アルドステロンによる臓器障害が注目されており、今回の研究成果はプロスタシン阻害薬がアルドステロンによる臓器障害作用を抑制する可能性を示唆した。今後プロスタシンの阻害薬開発により、これらの可能性を実証する必要がある。

1. 研究目的

高血圧症は先進国の成人人口の約25%に発症し、脳卒中、心筋梗塞、心不全や末期腎不全の主要なリスクファクターとして考えられている。ヒトの腎移植においてドナー

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、遺伝性高血圧症の一つであるLiddle症候群

において腎臓皮質集合尿管に存在する上皮型 Na チャネル(ENaC)の活性型遺伝子変異が発見されたことから腎臓における Na 再吸収と高血圧症の強い因果関係が示唆されている^[1]。腎臓における Na 再吸収には種々のチャネル・トランスポーターが関与しているが、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。ENaCの活性はR-A-A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ことが知られているが、ENaCの活性化機構については不明な点が多い。1997年には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^[2]。2001年に私たちはラット腎臓 cDNA ライブラリーよりプロスタシンというセリンプロテアーゼを単離し、アフリカツメガエルの卵母細胞に共発現させた際にプロスタシンが ENaC の活性を約 2~5 倍増加することを世界で初めて証明した^[3]。また、アルドステロンがプロスタシンの発現を亢進し、原発性アルドステロン症患者の尿中に多量のプロスタシンが分泌され、その高血圧表現型に関与していること^[4]、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^[5]、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^[6]などを次々と証明してきた。さらに、プロスタシンの内因性阻害物質である protease nexin-1 がプロスタシンによる ENaC 活性化を抑制することも証明している^[7]。これらの知見は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強く示唆する。近年、アルドステロンが心臓や腎臓などの臓器障害に大きく関与していることが動物実験や大規模臨床試験において証明され、アルドステロンは ENaC の活性化を介して高血圧を生じるのみならず直接的に組織障害を惹起し、相乗的に臓器障害を進展させると考えられている。2003年にJulie Chaoのグループは、ラットの尾静脈よりヒトプロスタシン発現アデノウイルスを投与し、3日後から血漿アルドステロン濃度が上昇することを報告した^[8]。これらの事実は、プロスタシンとアルドステロンの間に positive feedback 機構が存在し、食塩感受性高血圧の発症や臓器障害の進展において悪循環を形成している可能性を強く示唆する。しかしながら、現時点ではプロスタシンがアルドステロン産生を誘導する分子機構は不明である。本研究の目的は、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を解明し、食塩感受性高血圧およびアルドステロンによる臓器障害進展におけるプロスタシンの役割を検討することにある。

2. 研究方法

2.1 活性型組換えプロスタシンおよび不活性型組換えプロスタシンの作製

1) 活性型組換えプロスタシンの作製のために、ヒトプロスタシンの light chain と heavy chain の間に enterokinase cleavage site を挿入し、C 末端の膜貫通部位を His tag に置換した cDNA を作製した。この cDNA をカイコ発現用のベクターに挿入し、片倉工業株式会社に委託してカイコへの感染およびカイコ体液の回収を行った。

2) 組換え pro-プロスタシンの作製のために、ヒトプロスタシンの C 末端の膜貫通部位を His tag に置換した cDNA を作製した。この cDNA をカイコ発現用のベクターに挿入し、片倉工業株式会社に委託してカイコへの感染およびカイコ体液の回収を行った。

3) カイコ体液を Tris 緩衝液(25 mM, pH 7.5)で 24 時間透析し、0.22 μ M フィルター濾過後に His trap カラムに apply した。0~250 mM のイミダゾールによる linear gradient でカラムを溶出し、125 mM 付近で溶出される分画を回収する。この分画を PEG 濃縮後、再度 Tris 緩衝液(25 mM, pH 7.5)で 24 時間透析し、次に resource Q カラムに apply した。0~500 mM の NaCl による linear gradient でカラムを溶出し、250 mM 付近で溶出される single peak を回収した。この分画を銀染色ならびに抗プロスタシン抗体を用いたウエスタンブロットにより、single band のプロスタシン分画であることを確認した。

4) 活性型組換えプロスタシンは、得られた組換えタンパク質を enterokinase と 37°C で 16 時間反応させ、enterokinase removal kit を用いて反応液から enterokinase を除去することにより作製した。

5) 不活性型組換えプロスタシンは上記の活性型組換えプロスタシンの活性中心である His85, Asp134, Ser238 を Ala で置換し、活性型組換えプロスタシンと同様に産生および精製した。

6) 1~5 のステップで作製した活性型および不活性型組換えプロスタシンの酵素活性を Lys-His-Tyr-Arg-MCA を合成基質として用いて測定した。

2. 2 プロスタシンによるアルドステロン産生誘導の検討

1) 培養ヒト副腎腺腫細胞 (H295R cell) に組換えプロスタシンを投与し、3、6、12、24、48時間後に total RNA を回収して real time PCR 法により CYP11B2 (アルドステロン合成酵素) の mRNA 発現量を測定した。また、プロスタシン投与 48 時間後に培養上清を回収し、ELISA キットを用いて培養上清中のアルドステロン濃度を測定した。また、プロスタシンの CYP11B2 mRNA 発現およびアルドステロン産生に与える影響の用量依存性についての検討も行った。

2) ヒト CYP11B2 の promoter 約 1.5 kbp を pGL3basic reporter vector に挿入し、CYP11B2 promoter-luciferase construct を作成した。この construct を H295R に transfection し、24 時間後にプロスタシンを投与してさらに 24 時間培養後に細胞を回収し、luciferase assay を行った。

2. 3 プロスタシンによるアルドステロン産生 (ラットでの検討)

ラットの大腿静脈にポリエチレンチューブを挿入し、その遠位端をプロスタシンを充填した浸透圧ポンプに接続してポンプを皮下に埋没した。プロスタシンの持続投与開始後一週間目に屠殺し、副腎の CYP11B2 発現および血漿アルドステロン濃度を測定した。

2. 4 健常人および本態性高血圧患者における血清プロスタシン濃度と血漿アルドステロン濃度の相関性の検討

健常人 (n=15)、本態性高血圧症患者 (n=27) から同意書を取得の上、血清および血漿を採取し、血清 prostasin 濃度をプロスタシン特異的 RIA 法で、血漿 aldosterone 濃度を ELISA で測定した。

3. 研究結果

3. 1 活性型組換えプロスタシンおよび不活性型組換えプロスタシンの作製

次に活性型組換えプロスタシンならびに組換え pro-プロスタシンを方法のところで述べたようにカイコを使用して生産し、二段階カラムにて精製した。図 1 左パネルに示すように、プロスタシンは銀染色にて単一バンドとして表れ、そのバンドに一致して抗プロスタシン抗体が反応した。また、活性型組換えプロスタシンを得るために、方法のところで記載したようにプロスタシンの light chain と heavy chain の間に挿入した cleavage site を enterokinase で切断することにより活性化した。図 1 左パネルに示すように enterokinase はプロスタシンを切断することにより分子量をシフトさせ、切断が十分に生じていることが証明された。

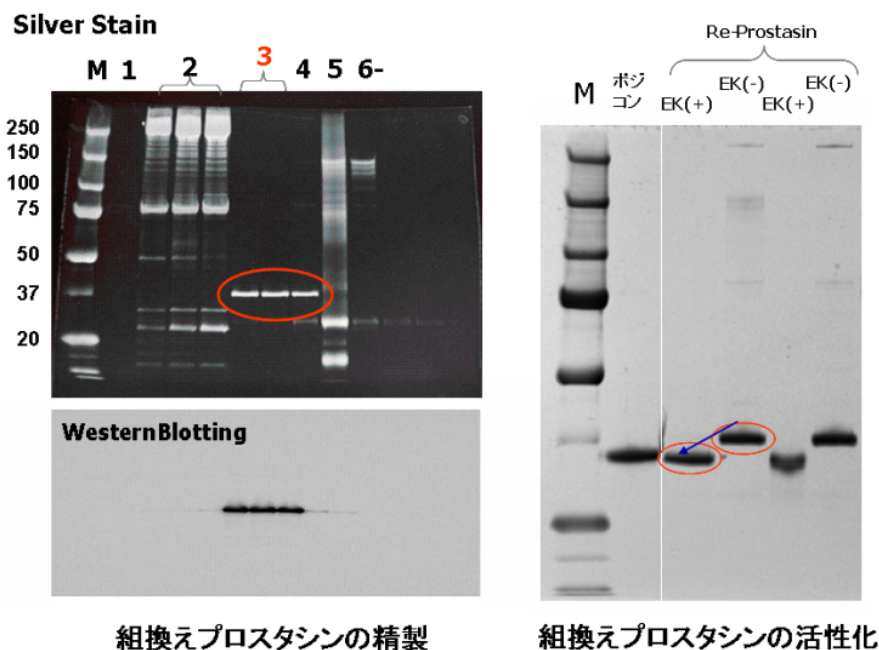


図 1

活性型組換えプロスタシンおよび不活性型組換えプロスタシンのプロテアーゼ活性をプロスタシン特異的な合成基質である Lys-His-Tyr-Arg-MCA を用いて確認した。

図 2 に示すように、活性型組換えプロスタシンのみが酵素活性を呈し、不活性型組換えプロスタシンは全く酵素活性を呈さなかった。

3. 2 プロスタシンによるアルドステロン産生誘導の検討

H295R cell にプロスタシンを投与し、経時的に CYP11B2 の mRNA 発現量を測定したところ、図 3 に示すようにプロスタシンは6時間後から24時間後にかけて有意に CYP11B2 の mRNA 発現を増加した。

また、プロスタシンによる CYP11B2 の発現誘導は図 4 に示すように0~400 µg/mL の範囲で用量依存性を示していた。

プロスタシンを投与して48時間後の H295R cell 培養上清中のアルドステロン濃度を測定したところ、図 5 に示すようにプロスタシンは有意にアルドステロンの分泌を促進し、その反応は用量依存性を示していた。

次にプロスタシンによる CYP11B2 の発現誘導が mRNA

転写活性の亢進によるものかどうかを調べるために、CYP11B2 遺伝子の 1.5 kbps の promoter-luciferase construct を作成し、luciferase assay を行った。図 6 に示すようにプロスタシンは有意に CYP11B2 の転写活性を増強した。すなわちプロスタシンは転写の亢進を介して CYP11B2 の発現誘導を行っていた。

プロスタシンによる CYP11B2 の発現誘導にセリンプロテアーゼ活性が必要かどうかを調べるために、不活性型組換えプロスタシンを作成し、H295R cell に投与して CYP11B2 の発現誘導を検討した。図 7 に示すように、不活性型プロスタシンは CYP11B2 発現に対して何ら影響を与えなかった。このことは、プロスタシンのセリンプロテアーゼ活性が CYP11B2 の発現誘導に必須であることを強く示唆する。

3. 3 プロスタシンによるアルドステロン産生(ラットでの検討)

活性型プロスタシンを Wister ラットの大腿静脈から 200 µg/week 速度で持続静注したところ、図 8 に示すように副腎の CYP11B2 発現が有意に増加し、血漿アルドステロン

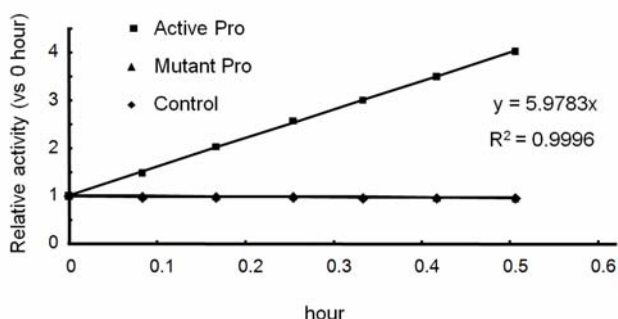


図 2

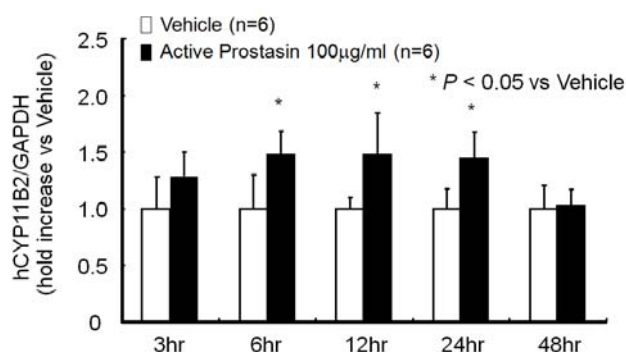


図 3

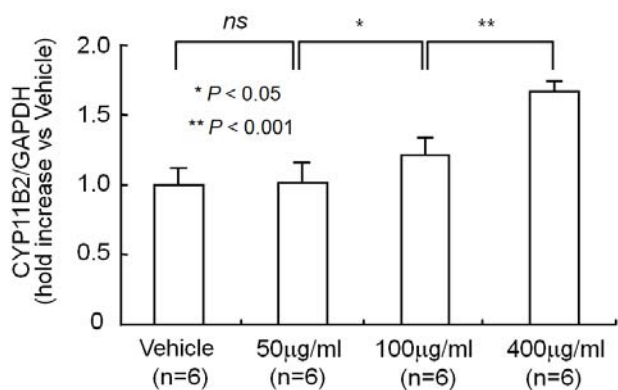


図 4

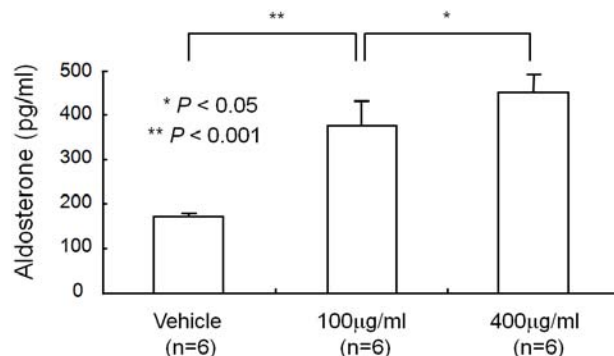


図 5

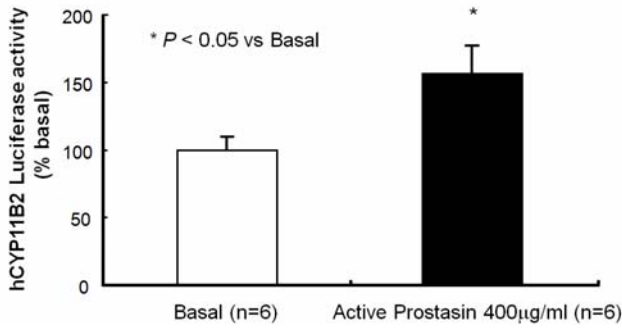


図 6

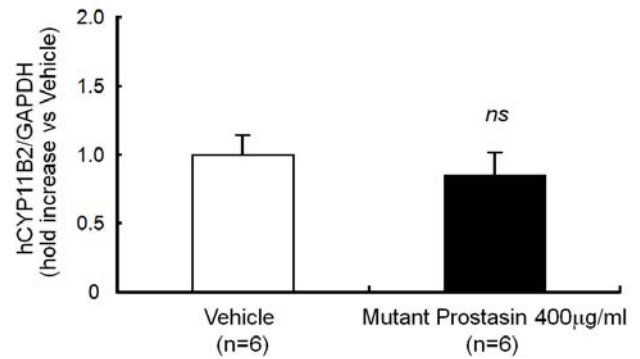


図 7

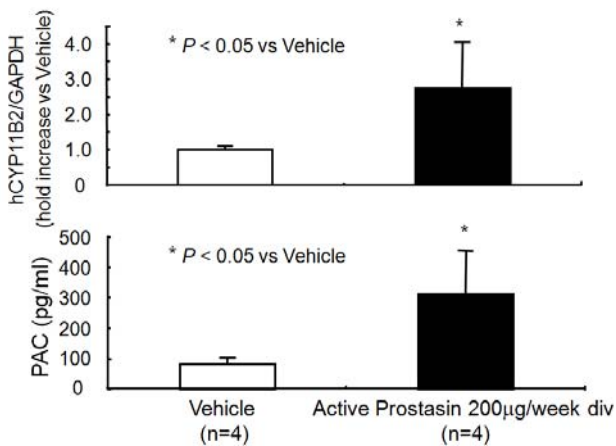


図 8

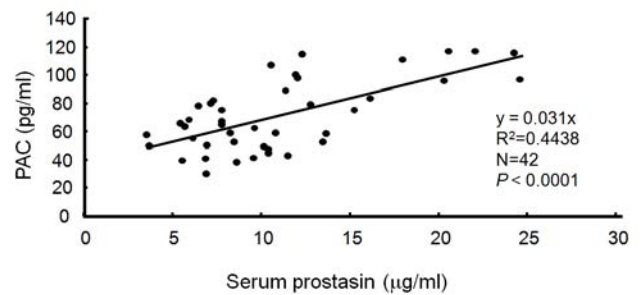


図 9

濃度も有意に上昇していた。これらの事実から H295R cell で認められたプロスタシンによるアルドステロン産生誘導が、生体においても生じていることが推測された。

3. 4 健常人および本態性高血圧患者における血清プロスタシン濃度と血漿アルドステロン濃度の相関性の検討

健常人 (n=15)、本態性高血圧症患者 (n=27) から血清および血漿を採取し、血清 prostasin 濃度をプロスタシン特異的 RIA 法で、血漿 aldosterone 濃度を ELISA で測定したところ、図 9 に示すように血清プロスタシン濃度と血漿アルドステロン濃度の間に有意な正の相関関係が認められた。

4. 考 察

私たちのこれまでの研究により、アルドステロンがプロスタシンの発現を増強すること、また Julie Chao らの研究により、プロスタシンの過剰発現が血漿アルドステロン濃度を上昇させることが明らかとなっており、アルドステロンとプロ

スタシンの間に positive feedback が存在する可能性が示唆されていた。しかしながら、Julie Chao らの実験系はプロスタシン発現アデノウイルスをラット尾静脈から全身に投与するものであったため、結果として生理的にプロスタシンが発現していない臓器にも過剰にプロスタシンが発現していた。つまり、彼らの実験系で得られた結果は、非特異的なプロスタシンの過剰発現によって誘導された非生理的な現象を見ている可能性がある。プロスタシンは膜結合型セリンプロテアーゼであるが、血液中や尿中にも分泌型として存在することが知られている。尿中プロスタシンの生理学的な意義はかなり解明されてきているが、血中プロスタシンの生理的な機能は全く解明されていない。そこで、本研究では組換えプロスタシンを副腎由来の細胞やラットに投与して、血中プロスタシン濃度が上昇した状態が生理学的にアルドステロン産生亢進を生じうるかについて検討したところ、上記のようにプロスタシンがそのセリンプロテアーゼ活性によって副腎皮質に作用し、CYP11B2 発現を誘導してアルドステロンの産生を亢進することが明らかとなっ

た。このプロスタシンとアルドステロンの関係は健常人および本態性高血圧患者においても認められ、ヒトにおいてもプロスタシンとアルドステロン間に positive feedback 機構が存在する可能性が示唆された。

5. 今後の課題

今回の研究により、プロスタシンが CYP11B2 の発現誘導を介してアルドステロンの産生を亢進することが明らかとなったが、細胞外のプロスタシンがどのように細胞内にシグナルを伝え、CYP11B2 の発現誘導を生じるかはわかっていない。今後さらに詳細な分子機序を解明していく必要がある。

文 献

1. Snyder PM, Price MP, McDonald FJ *et al.*: Mechanism by which Liddle's syndrome mutations increase activity of a human epithelial Na⁺ channel. *Cell* 83:969-978, 1995
2. Vallet V, Chraïbi A, Gaeggeler HP *et al.*: An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389: 607-610, 1997
3. Adachi M, Kitamura K, Miyoshi T *et al.*: Activation of epithelial sodium channels by prostasin in *Xenopus* oocytes. *J Am Soc Nephrol* 12: 1114-1121, 2001
4. Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M *et al.*: Regulation of prostasin by aldosterone in the kidney. *J Clin Invest* 109: 401-408, 2002
5. Iwashita K, Kitamura K, Narikiyo T *et al.*: Inhibition of prostasin secretion by serine protease inhibitors in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 14: 11-16, 2003
6. Tuyen DG, Kitamura K, Adachi M *et al.*: Inhibition of prostasin expression by TGF- β 1 in renal epithelial cells. *Kidney International* 67: 193-200, 2005
7. Wakida N, Kitamura K, Tuyen DG *et al.*: Inhibition of prostasin-induced ENaC activities by PN-1 and regulation of PN-1 expression by TGF- β 1 and aldosterone. *Kidney Int* 70: 1432-1438, 2006
8. Wang C, Chao J, Chao L: Adenovirus-mediated human prostasin gene delivery is linked to increased aldosterone production and hypertension in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: R1031-R1036, 2003

No. 0728

Molecular Mechanisms by which Prostasin Stimulates Aldosterone Production by Adrenal Glands

Kenichiro Kitamura and Kimio Tomita

Department of Nephrology, Kumamoto University, Graduate School of Medical Sciences

Summary

Previously we demonstrated that a serine protease prostasin increases the activity of epithelial sodium channel (ENaC) when the two are coexpressed in *Xenopus* oocytes. We also found that aldosterone increases the expression of prostasin in the kidney and that urinary prostasin is increased in primary aldosteronism patients. These findings strongly suggest that the possibility that prostasin might be one of the candidate factors involved in the development of salt-sensitive hypertension. In 2003, Dr. Julie Chao's lab reported that intravenous injection of adenovirus carrying human prostasin cDNA through a rat tail vein resulted in an elevation of blood pressure and plasma aldosterone concentration. However, the precise mechanisms by which overexpression of prostasin increases plasma aldosterone concentration remain undetermined.

In the current studies, we demonstrated that enzymatically active recombinant prostasin significantly increased the mRNA expression of CYP11B2 (aldosterone synthase) as well as the secretion of aldosterone into the culture medium in H295R cells (a human cell line from adrenocortical adenoma). Prostasin increased the mRNA expression of CYP11B2 6 hr after treatment and reached maximum induction at 24 hr, then returned to the basal levels at 48 hr. Induction of CYP11B2 by prostasin was dose-dependent within the range from 0 to 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Luciferase assay using 1.5 kbp promoter region of human CYP11B2 revealed that prostasin enhances the transcriptional activity of CYP11B2 in H295R cells. A protease-dead mutant of prostasin had no effect on the expression of CYP11B2, suggesting that proteolytic activity of prostasin is required for the activation of CYP11B2. Continuous intravenous infusion of active recombinant prostasin into male Wistar rats resulted in an increase in CYP11B2 expression in the adrenal glands and an elevation of plasma aldosterone concentration. Furthermore, we demonstrated a significant positive correlation between serum prostasin concentration and plasma aldosterone concentration in healthy volunteer and patients with essential hypertension.

Our current findings suggest that prostasin stimulates aldosterone production in the adrenal gland through its proteolytic activity and that there may be a positive feedback between prostasin and aldosterone. Recently, aldosterone-mediated organ damage has been demonstrated by a number of basic and clinical studies. Therefore, a prostasin inhibitor might serve as an organ protection drug through the suppression of aldosterone production.