

慢性腎臓病で塩分がプロレニンの受容体蛋白を介する腎組織 RAS 活性化に及ぼす影響

山本 龍夫

浜松大学健康プロデュース学部健康栄養学科

概要 1. 研究目的 レニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system; RAS) には体液量と血圧の維持に関与する循環 RAS と、組織局所で RAS 関連因子が発現する組織 RAS があり、腎組織 RAS 活性化は腎線維化に関与する。しかし、循環 RAS を抑制する塩分負荷に腎保護効果はなく、むしろ腎線維化を進行させるが、その機序は解明されていない。本研究は、高塩分摂取が腎組織の受容体随伴プロレニン系に与える影響と腎線維化への関与を慢性抗胸腺細胞血清 (anti-thymocyte serum; ATS) 腎炎ラットを用いて検討した。

2. 研究方法 片腎摘後に ATS の 2 回静注で作成した慢性 ATS 腎炎ラットを 0.5% 食塩水飲水の高塩分摂取群と水道水飲水の正常塩分摂取群に分け、それらに加えてオルメサルタン 10 mg/kg/日あるいはヒドララジン 5 mg/kg/日を投与した高塩分摂取慢性 ATS 腎炎群、シャム手術後に水道水飲水のコントロール群において、初回 ATS 静注から 14 と 21 日目に血圧測定、21 日目に一日尿蛋白量を蓄尿定量後、断頭屠殺して採血、腎を摘出し、腎組織病変、血漿クレアチニン、血漿レニン活性 (RIA)、血漿と腎組織抽出液のアンジオテンシン II (AngII) の定量 (ELISA)、腎組織のプロレニン、レニン、(プロ)レニン受容体 ((pro)renin receptor; PRR)、AT1 受容体の蛋白量 (ウエスタンブロット; WB)、発現部位 (免疫組織染色; IHC)、mRNA 発現 (QRT-PCR)、腎組織の膜分画と細胞質分画における PRR の定量 (WB)、連続腎切片の PRR、aquaporin 2、calbindin-D-28k の IHC による PRR 発現尿細管の同定を行った。

3. 研究結果 高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎では、血漿レニン活性、血漿 AngII が低下し、傍糸球体細胞の総レニン (レニンとプロレニン) が減少したが、腎線維化が進行し、集合管、結合尿細管にプロレニン、レニンの蛋白と非酵素的活性化プロレニンが増加し、腎皮質の AngII 量が上昇していた。一方、腎皮質のレニン mRNA 発現や AT1 受容体、PRR の蛋白と mRNA 量は、高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎群、正常塩分摂取の慢性 ATS 腎炎群、コントロール群間で有意差はなかったが、PRR の集合管細胞内の分布が、コントロール群では細胞質内に塊～顆粒状にみられるのに対し、高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎では尿腔側細胞膜に移動しており、同部に非酵素的活性化プロレニンが認められた。オルメサルタンは、腎皮質のプロレニン、非酵素的活性化プロレニン、PRR の尿腔側細胞膜への移動、AngII を減少し、腎線維化を抑制したが、ヒドララジンでは変化はみられなかった。

4. 考察 高塩分摂取による慢性 ATS 腎炎の腎線維化の進行は、レニン遺伝子の発現増加や PRR、AT1 受容体量の増加ではなく、集合管細胞において AngII 依存性に PRR が細胞質内小胞から尿腔側細胞膜面に移動してプロレニン、レニンをトラップし、局所でプロレニンは非酵素的に活性化、レニンはその酵素活性を増強させて腎内 AngII 産生、腎組織 RAS 活性化をきたし、腎線維化を進行させる可能性が示唆された。

5. 今後の課題 培養尿細管細胞を AngII で刺激して細胞質内の PRR が細胞膜面に移動し、そこでプロレニンが非酵素的に活性化されるかを *in vitro* 実験などで確認する必要がある。

1. 研究目的

レニン・アンジオテンシン系 (renin-angiotensin system; RAS)には血管の収縮と腎での Na 再吸収などによって体液量と血圧の維持に関与する循環 RAS と、組織局所で RAS 関連因子が発現する組織 RAS がある。腎組織 RAS は循環 RAS とは独立して制御されており、腎組織 RAS の亢進は、様々な慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) における慢性腎不全の進行過程で共通する病態である腎線維化の進行に関与する^{1, 2}。さらに CKD は腎不全のみならず心筋梗塞、心不全、脳卒中といった心血管系疾患の発症や生命予後に関連することも明らかになっており、それにも RAS 亢進の関与が報告されている。一方、塩分負荷は循環 RAS を抑制するが、腎保護効果はなく、むしろ CKD の悪化をきたす³。しかし、塩分がどのような機序で腎組織 RAS に影響を及ぼし、腎線維化に関与するかは明らかではない。

プロレニンは不活性なレニン前駆体であり、傍糸球体細胞の分泌顆粒内では酵素によるプロセッシングでレニン酵素活性部位を覆うプロセグメントが切断、除去され、活性型のレニンとして血中に分泌され、循環 RAS を制御する。一方、傍糸球体細胞以外ではプロレニンはエキソサイトーシスでプロレニンのまま放出される。正常腎ではプロレニン、レニンは傍糸球体細胞に多くみられ、ヒト血漿にはプロレニンがレニンの約 10 倍高濃度で存在し、糖尿病患者において血中プロレニンの増加が、糖尿病性腎症、網膜症、神経障害といった微小血管障害による合併症の発症に相関することは以前から知られていたが^{4, 5}、不活性のプロレニンがどのような機序で組織障害に関与するかは不明であった。しかし、2002 年に Nguyen らによってプロレニンは (プロ)レニン受容体 ((pro)renin receptor; PRR) に結合すると立体構造が変化し、プロセグメントが酵素的に切り離されることなく酵素活性中心が露出してレニン酵素活性を発揮するプロレニンの非酵素的活性化が見いだされ⁶、従来は不活性の前駆物質とみなされていたプロレニンが、PRR に結合することでレニン活性を獲得する受容体随伴プロレニン系が明らかになった。また、レニンは PRR に結合することでレニン酵素活性が約 4 倍増加し、プロレニン、レニンは PRR 結合を介して MAP キナーゼなどの細胞内信号伝達を惹起すること、さらにゴルジ体で furin によって切断された可溶性 PRR が組織間質液に分

泌され、その局所でプロレニンを活性化する可能性も示唆されており、PRR を介した組織 RAS の活性化が臓器障害に及ぼす影響が注目されている。本研究は、高塩分摂取が腎組織の PRR の発現や分布をいかに変化させ、それが腎組織 RAS 活性にどのような影響をもたらし、腎線維化に関与するかについて慢性進行性腎炎ラットモデルを用いて検討した。

2. 研究方法

2. 1 慢性 ATS 腎炎ラットの作成と実験群

ヒツジ抗ラット抗胸腺細胞血清 (anti-thymocyte serum; ATS) は以前の報告¹と同様に作成した。雄 Wister ラット、体重 150 g、を片腎摘の 1 週間後から 1 週間隔で 2 回 ATS を静注して慢性進行性の ATS 腎炎を惹起した⁷。実験群は、1) シャム手術後に水道水を飲水するコントロール群 (SN 群, n=8)、2) 水道水飲水の正常塩分摂取慢性 ATS 腎炎群 (UA 群, n=8)、3) 0.5% 食塩水飲水の高塩分摂取慢性 ATS 腎炎群 (UAH 群, n=8)、4) アンジオテンシン受容体拮抗薬 (angiotensin II receptor blocker; ARB) のオルメサルタン 10 mg/kg/日 を投与した高塩分摂取慢性 ATS 腎炎群 (UAH+O 群, n=8)、5) コントロールの降圧薬としてヒドララジン 5 mg/kg/日 を投与した高塩分摂取慢性 ATS 腎炎群 (UAH+H 群, n=8) である。本研究プロトコールは、浜松医科大学動物実験倫理委員会の承諾を得ている。

2. 2 検討項目

初回 ATS 静注から 14 と 21 日目に血圧と体重測定、メタボリックケージを用いた 24 時間蓄尿で一日尿蛋白量を定量し、21 日目で断頭屠殺にて採血、腎を摘出して以下の検討を行った。

2. 2. 1 PAS 染色、マッソントリクローム染色による腎組織病変の病理学的検討

2. 2. 2 血漿クレアチニン定量、血漿レニン活性の測定 (RIA)、血漿と腎組織抽出液のアンジオテンシン II (AngII) の定量 (ELISA)⁸

2. 2. 3 腎組織のレニン、PRR、AT1 受容体、TGF- β 1 mRNA の定量 (定量的 RT-PCR)

2. 2. 4 腎組織のプロレニン、レニン、PRR、AT1 受容体の蛋白量と発現部位を各々 western blot (WB) と免疫組織染色 (immunohistochemistry; IHC) で検討した。なお、レニンとプロレニンの同定は、1) プロレニンとレニンの両者を

認識する抗レニン抗体による WB、2)プロレニンのみを認識する抗プロセグメント抗体による WB、3)プロレニンをレニンに変換するトリプシン処理の前後で抗レニン抗体による WB を行い、トリプシン処理後にプロレニンのバンドが消失し、レニンのバンドが増加することで確認した。

2. 2. 5 非酵素的活性化プロレニンは、抗プロレニン gate 領域 (GR) 抗体を用いた IHC で検討した。

2. 2. 6 腎組織をホモゲナイズ後に膜分画と細胞質分画に分け、膜結合型と細胞質内の PRR を各々 WB にて定量した。

2. 2. 7 PRR の発現尿細管は、PRR、aquaporin 2 (AQP2)、calbindin-D-28k の連続切片の IHC で同定した。

2. 3 統計学的解析

データは平均値±SEM で示した。各群間の差は ANOVA と Bonferroni post hoc test による多重比較にて $P < 0.05$ を有意差ありとした。

3. 研究結果

3. 1 循環 RAS

慢性 ATS 腎炎惹起後 21 日目の血漿レニン活性と血漿 AngII は、SN 群に比して UA、UAH、UAH+O、UAH+H 群で有意に低下しており、かつ UAH、UAH+O、UAH+H 群の血漿レニン活性は UA 群よりもより低値であった (Figure 1)。

3. 2 血圧、血清クレアチニン、蛋白尿、腎皮質 TGF- β 1mRNA、腎線維化病変

血圧は、慢性 ATS 腎炎惹起後 14 日目は各群で差はな

く、21 日目では UAH 群のみ有意に高値であった。慢性 ATS 腎炎惹起後 21 日目の血清クレアチニン、一日尿蛋白排泄量、腎皮質 TGF- β 1mRNA 発現、糸球体硬化と尿細管間質線維化病変 (Figure 2) は、SN 群に比して UA 群で上昇し、UAH 群ではさらに高度であった。また、それらはオルメサルタン投与の UAH+O 群では UAH 群に比して軽減していたが、ヒドララジン投与の UAH+H 群では UAH 群と有意な差はみられなかった。

3. 3 腎皮質の総レニン、非酵素的活性化プロレニン蛋白の IHC

SN 群では総レニン (レニンとプロレニン) 蛋白が傍糸球体細胞に認められ、それらは UA 群で軽度に、UAH 群では著明に減少していた (Figure 3)。SN 群では尿細管に総レニンはほとんど認められないが、UA 群では集合管、結合尿細管に軽度、UAH 群では高度な総レニン蛋白が染色された。UAH 群では一部の近位尿細管にも弱い総レニンの染色がみられた。非酵素的活性化プロレニンの染色強度と分布は総レニンとほぼ同様の傾向が認められた。オルメサルタン投与の UAH+O 群では尿細管の総レニン (Figure 3)、非酵素的活性プロレニンが UAH 群に比して減少していたが、ヒドララジン投与の UAH+H 群では減少は認められなかった。

3. 4 腎皮質プロレニン、レニン蛋白の WB とレニン mRNA

腎皮質のプロレニンとレニン蛋白は、SN、UA 群に比して UAH 群で著明に増加し、それらはオルメサルタン投与 (UAH+O 群) で有意に減少したが、ヒドララジン投与 (UAH+H 群) では減少しなかった (Figure 4)。一方、腎皮

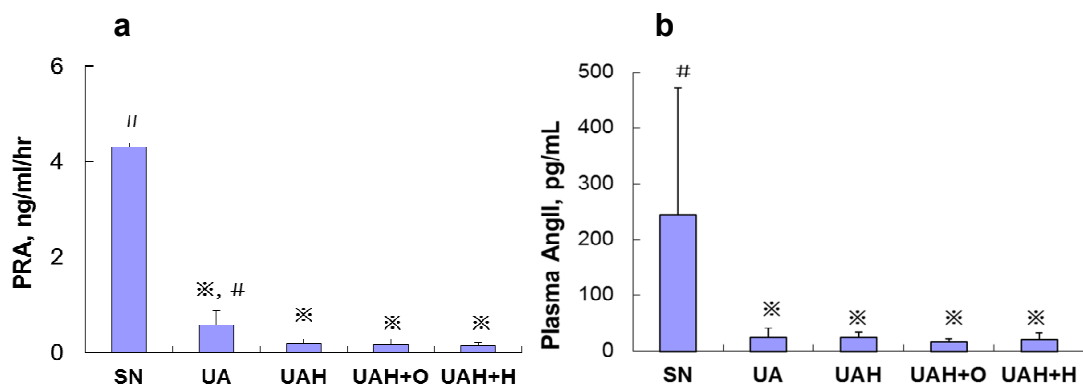


Figure 1. The levels of (a) plasma renin activity (PRA) and (b) plasma angiotensin II (AngII) on day 21. Data are mean±SEM. * $P < 0.05$ versus SN, # $P < 0.05$ versus UA.

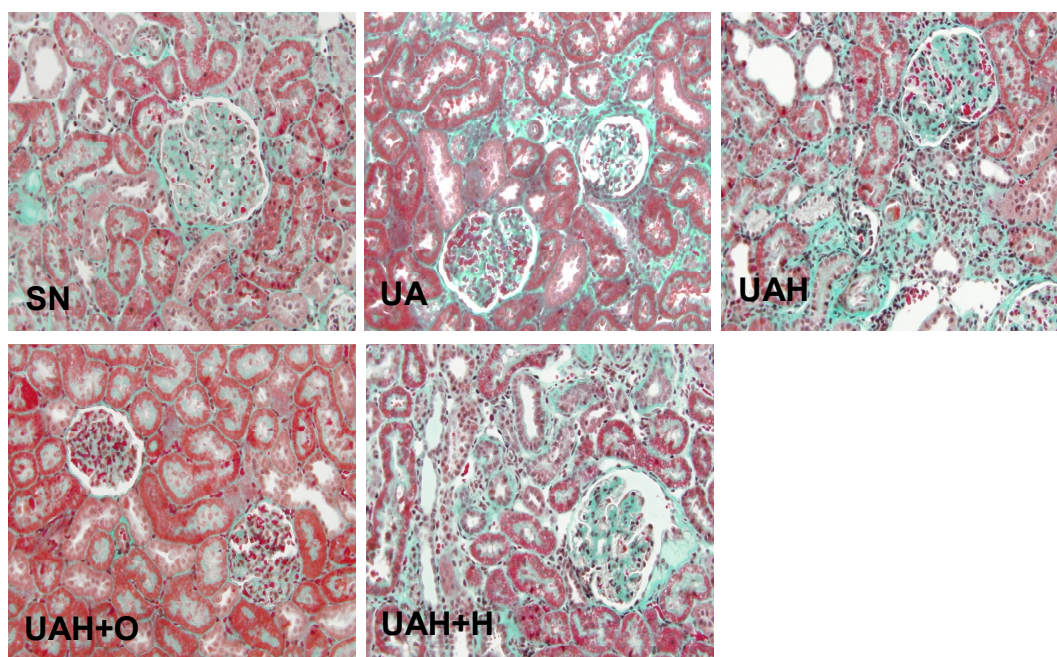


Figure 2. Representative renal histological findings on day 21. The abbreviation of each group is described in the text. Masson's trichrome stain, original magnification, x400.

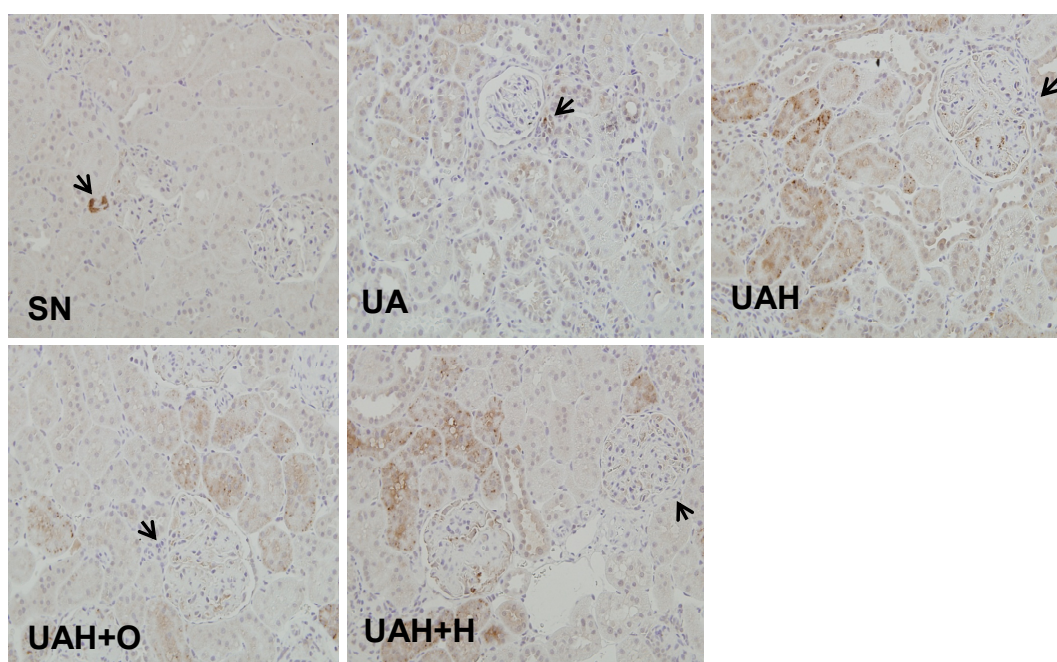


Figure 3. Immunohisto-chemical demonstration of total renin in renal cortex. Immunoreactivity for total renin was observed in juxtaglomerular cells (arrows) in the SN group, but it was decreased in the UA group and was markedly suppressed in the UAH group. In contrast, immunoreactivity for total renin was noted in some collecting ducts and distal tubules in the UA group, and was markedly augmented in the UAH group, where some proximal tubules were also weakly positive. Olmesartan (UAH+O), but not hydralazine (UAH+H), markedly diminished tubular total renin. Original magnification, x400.

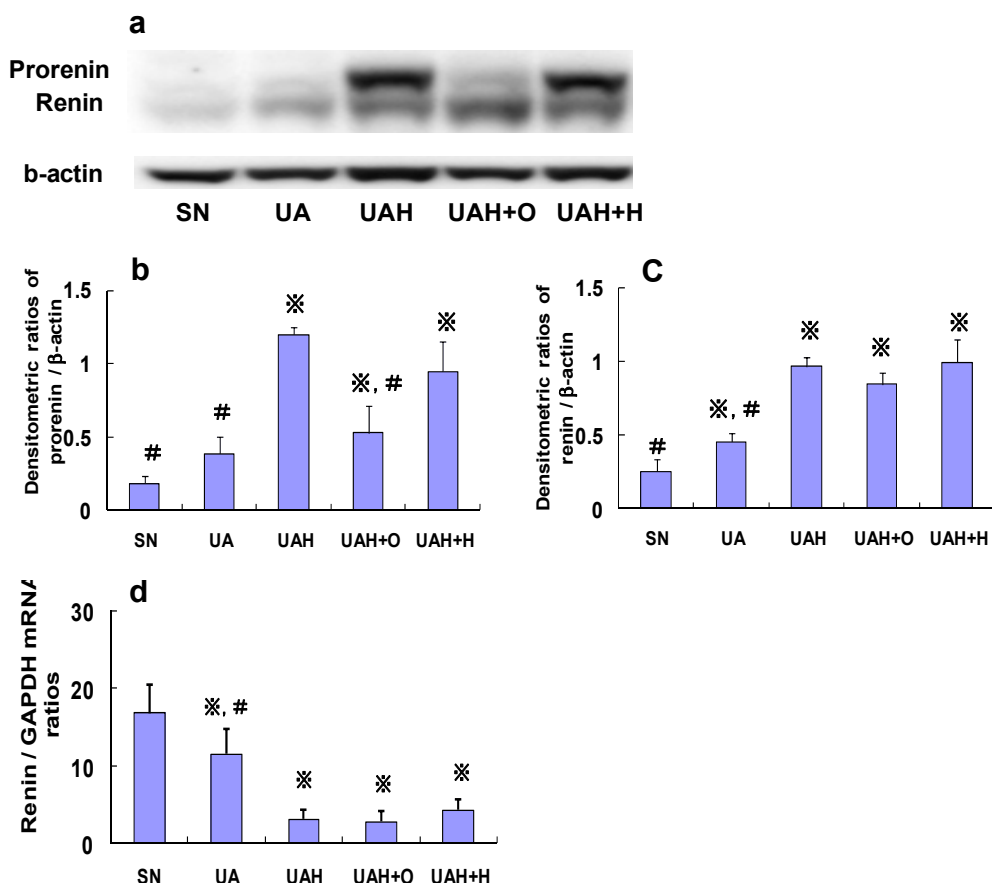


Figure 4. Immunoblot analysis for prorenin and renin proteins and renin mRNA expression in renal cortex. (a) Representative western blot data of prorenin and renin on day 21 and corresponding densitometric ratios of (b) prorenin/β-actin and (c) renin/β-actin in each group. (d) Cortical levels of renin mRNA measured by QRT-PCR. Data in (b), (c) and (d) are mean±SEM. *P<0.05 versus SN, #P<0.05 versus UAH.

質のレニン mRNA 発現は、SN 群に比して UA 群で減少し、UAH 群ではさらに低下していた。オルメサルタン投与群 (UAH+O)、ヒドララジン投与群 (UAH+H) の腎皮質のレニン mRNA 発現は、未投与の UAH 群と有意な差はみられなかった (Figure 4)。

3. 5 腎皮質 PRR 蛋白、mRNA と膜結合型 PRR

腎皮質の PRR 蛋白量と mRNA 発現量は各群間で有意な差はみられなかった。しかし、UAH 群では腎皮質の膜分画の PRR の増加と細胞質分画の PRR の減少が認められた (Figure 5)。この膜分画 PRR の増加はオルメサルタン投与 (UAH+O 群) で低下したが、ヒドララジン投与 (UAH+H 群) では変化しなかった。

3. 6 PRR の発現尿細管、細胞内分布と非酵素的活性化プロレニンの局在

PRR は SN 群では集合管と結合尿細管に認められ、UA、

UAH 群でも同様に PRR は集合管と結合尿細管に認められた。しかしながら、PRR の尿細管細胞内の分布は、SN 群では PRR が細胞質内に塊～顆粒状にみられるのに対し、UAH 群では尿腔側細胞膜面に認められた。オルメサルタン投与 (UAH+O 群) はこの PRR の細胞質内から尿腔側細胞膜への移動を抑制したが、ヒドララジン投与 (UAH+H 群) では PRR 移動の抑制はみられなかった。また、PRR が尿腔側細胞膜面に認められる UAH 群の集合管では、PRR に結合して非酵素的活性化されたプロレニンが認められたが、SN 群の PRR が細胞質内に塊～顆粒状に分布する集合管では非酵素的活性化プロレニンは認められなかった (Figure 6)。

3. 7 AT1 受容体

腎皮質の AT1 受容体蛋白量は、各群で有意な差はみられなかった (Figure 7)。

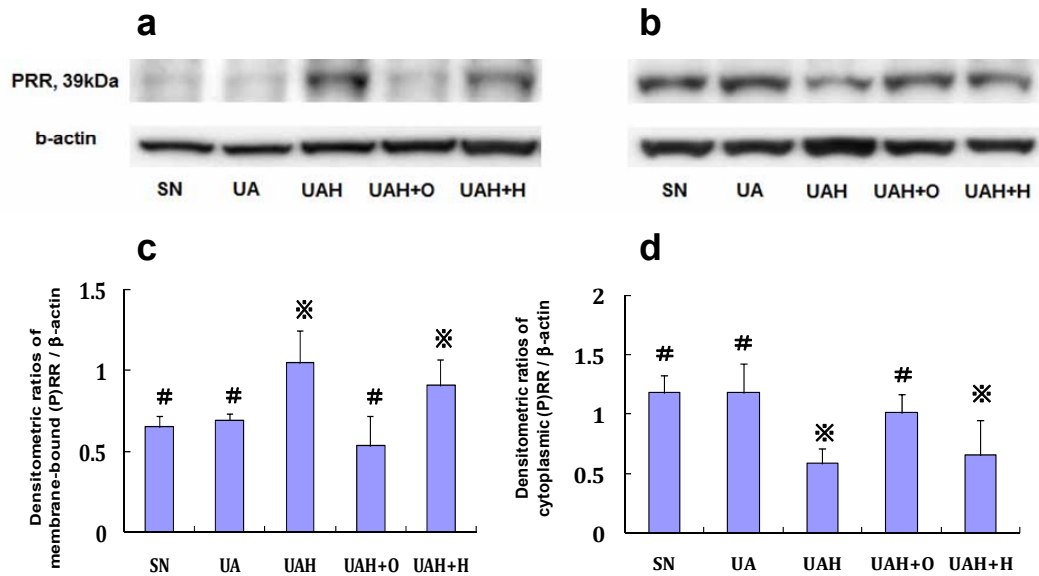


Figure 5. PRR levels in the membrane and cytoplasmic subcellular fractions of renal cortex. Representative western blot data of PRR in (a) membrane and (b) cytoplasmic fractions of renal cortex, and corresponding densitometric ratios of (c) membrane-bound PRR/ β -actin and (d) cytoplasmic PRR/ β -actin. Data in (c) and (d) are mean \pm SEM. * P <0.05 versus SN, # P <0.05 versus UAH.

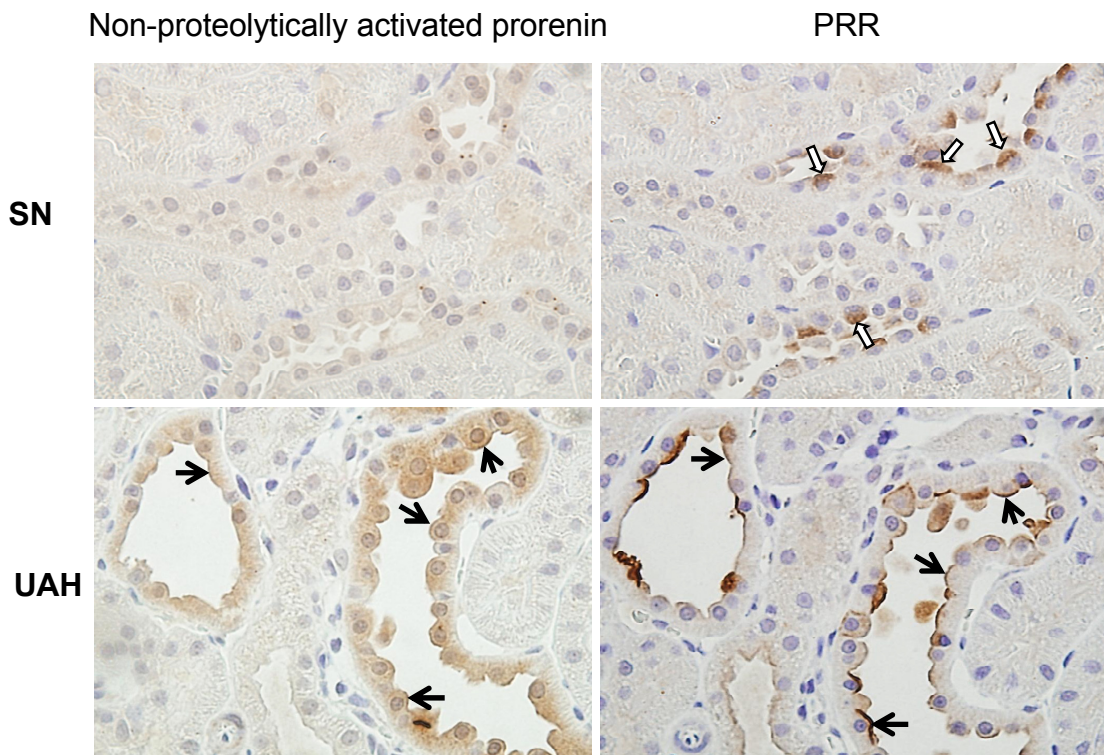


Figure 6. Co-distribution of PRR with non-proteolytically activated prorenin in consecutive kidney sections. Collecting duct cells showing lumpy granular cytoplasmic immunostaining for PRR (open arrows) were observed predominantly in the SN group and were negative for non-proteolytically activated prorenin. In contrast, the collecting duct cells showing apical membranous immunostaining for PRR (arrows) were observed predominantly in the UAH group and were positive for non-proteolytically activated prorenin. Original magnification, x1000.

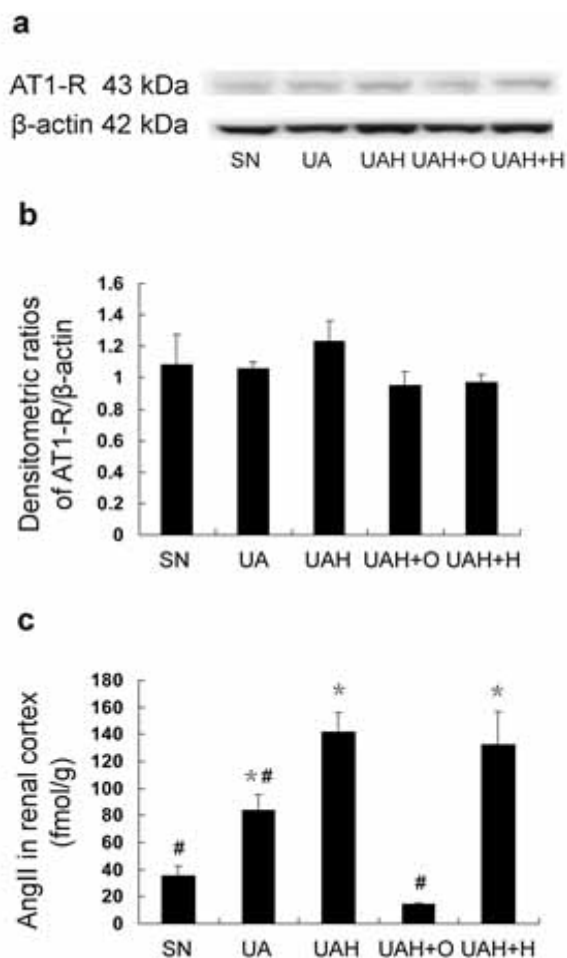


Figure 7. AT1-receptor (AT1-R) protein and AngII levels in renal cortex. (a) Representative immunoblot data of AT1-R in renal cortex and (b) corresponding densitometric ratios of AT1-R/β-actin. (c) Renal cortical AngII levels measured by radioimmuno-assay. Data in (b) and (c) are mean±SEM. *P<0.05 versus SN, #P<0.05 versus UAH.

3. 8 腎皮質 AngII

腎皮質の AngII は SN 群に比して UA 群で増加し、UAH 群ではさらに高値であった。この UAH 群の腎皮質の AngII は、オルメサルタン投与 (UAH+O 群) で有意に低下したが、ヒドララジン (UAH+H 群) では変化しなかった (Figure 7)。

4. 考 察

高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎では、血漿レニン活性、血漿 AngII といった循環 RAS は抑制されるが、腎線維化病変は正常塩分摂取に比して高度となり、尿蛋白排泄量、

血漿クレアチニンも増加した。腎皮質の RAS 関連因子に関しては、高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎では傍糸球体細胞のプロレニン、レニンは減少しているにもかかわらず、集合管を中心とした尿細管でプロレニン、レニン蛋白が増加し、腎皮質 AngII が上昇しており、腎組織 RAS の活性化が認められた。しかし、腎皮質の AT1 受容体の発現量は高塩分摂取と正常塩分摂取で有意差は認めず、さらに腎皮質のレニン mRNA 発現量も高塩分摂取で増加はみられなかった。腎皮質の定量性 RT-PCR の結果のみでは集合管などでの局所的なレニン mRNA 増加の可能性は完全には否定できないが、少なくとも腎皮質全体では明かなレニン遺伝子発現の増加は確認されず、高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎における集合管を中心とした尿細管におけるプロレニン、レニン蛋白の増加は、レニン遺伝子の発現増加ではなく、同部におけるプロレニン、レニン蛋白のトラップ増加の可能性が示唆された。

PRR を調べたところ、腎皮質の PRR の蛋白、mRNA 発現量としては高塩分あるいは正常塩分摂取の慢性 ATS 腎炎、正常塩分摂取のコントロールの各群間で有意な差は認められなかったが、正常塩分摂取では集合管細胞質内に塊～顆粒状にみられる PRR が、高塩分摂取では集合管細胞の尿管腔側細胞膜面に観察され、連続切片を用いた検討にて高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎の PRR が尿管腔側細胞膜面に認められる集合管細胞は、非酵素的活性化プロレニンが陽性であることより、同部において細胞膜面に現れた PRR がプロレニンをトラップして非酵素的に活性化している可能性が考えられた。

AngII による尿中への H⁺排泄の促進では、AngII が集合管 α 介在細胞の細胞内小胞の V-ATPase を尿管腔側の細胞膜微絨毛に移動をさせるが⁹、PRR は V-ATPase 結合蛋白としての機能を有していることから、高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎ラットで認められる集合管での PRR の尿管腔側細胞膜面への移動は、AngII による V-ATPase の尿管腔側細胞膜微絨毛への移動と並行して起こっている可能性が考えられる。実際のところ、高塩分摂取でみられるこれらの尿細管間質線維化の進行、腎機能の低下、集合管を中心とした尿細管におけるプロレニン、レニン蛋白の増加、PRR の尿管腔側細胞膜面への移動と同部における非酵素的活性化プロレニンの増加は、ARB のオルメサルタン投与で軽減され、一方、同程度の降圧をきたすヒドララジンでは

軽減しなかった。したがって、高塩分摂取による慢性 ATS 腎炎の尿細管間質線維化の増悪は、集合管細胞において AngII 依存性に PRR が細胞内小胞から尿腔側細胞膜に移動することでプロレニン、レニンをトラップし、その局所でプロレニンは非酵素的に活性化、レニンはその酵素活性を増強させて腎皮質 AngII の産生増加、腎組織 RAS の活性化をきたし、尿細管間質線維化を進行させている可能性が示唆された。尿細管の PRR にトラップされるプロレニン、レニンの由来は現時点では明かではないが、レニン、プロレニンは尿中に存在しており^{10,11}、また、傍糸球体細胞由来のプロレニン、レニンが腎間質に移行することが報告されている^{12,13}。

5. 今後の課題

高塩分摂取の慢性 ATS 腎炎でみられる集合管の尿腔側細胞膜の PRR の増加は、オルメサルタン投与で軽減することより AngII を介する可能性が示唆されるが、現時点では直接的な確認はできていない。培養尿細管細胞を AngII で刺激して細胞内の PRR が細胞膜面に移動するかを *in vitro* 実験で調べ、さらにそこでプロレニンが非酵素的に活性化されるかを検討する必要がある。また、尿腔側細胞膜面の PRR の増加が V-ATPase の移動に伴っているか、集合管でトラップされるプロレニン、レニンの由来も検討する必要がある。

文献

- Ohashi N, Yamamoto T, Huang Y, Misaki T, Fukasawa H, Suzuki H, Togawa A, Suzuki S, Fujigaki Y, Nakagawa T, Nakamura Y, Suzuki F, Kitagawa M, Hishida A: Intrarenal RAS activity and urinary angiotensinogen excretion in anti-thymocyte serum nephritis rats, *Am J Physiol Renal Physiol* 2008, 295: F1512-1518
- Kobori H, Ohashi N, Katsurada A, Miyata K, Satou R, Saito T, Yamamoto T: Urinary angiotensinogen as a potential biomarker of severity of chronic kidney diseases, *J Am Soc Hypertens* 2008, 2: 349-354
- Suzuki H, Yamamoto T, Ikegaya N, Hishida A: Dietary salt intake modulates progression of antithymocyte serum nephritis through alteration of glomerular angiotensin II receptor expression, *Am J Physiol Renal Physiol* 2004, 286: F267-277
- Luetscher JA, Kraemer FB, Wilson DM, Schwartz HC, Bryer-Ash M: Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications, *N Engl J Med* 1985, 312: 1412-1417
- Wilson DM, Luetscher JA: Plasma prorenin activity and complications in children with insulin-dependent diabetes mellitus, *N Engl J Med* 1990, 323: 1101-1106
- Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD: Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin, *J Clin Invest* 2002, 109: 1417-1427
- Yamamoto T, Noble NA, Miller DE, Border WA: Sustained expression of TGF-beta 1 underlies development of progressive kidney fibrosis, *Kidney Int* 1994, 45: 916-927
- Nishiyama A, Seth DM, Navar LG: Renal interstitial fluid angiotensin I and angiotensin II concentrations during local angiotensin-converting enzyme inhibition, *J Am Soc Nephrol* 2002, 13: 2207-2212
- Pech V, Zheng W, Pham TD, Verlander JW, Wall SM: Angiotensin II activates H⁺-ATPase in type A intercalated cells, *J Am Soc Nephrol* 2008, 19: 84-91
- Yukimura T, Miura K, Matsushima Y, Ikemoto F, Yamamoto K: Urinary excretion of renin and its biochemical properties in dogs, *Hypertension* 1984, 6: 837-842
- Nielsen AH, Hermann KL, Mazanti I, Poulsen K: Urinary excretion of inactive renin during blockade of the renal tubular protein reabsorption with lysine, *J Hypertens* 1989, 7: 77-82
- Peti-Peterdi J, Fintha A, Fuson AL, Tousson A, Chow RH: Real-time imaging of renin release *in vitro*, *Am J Physiol Renal Physiol* 2004, 287: F329-335
- Rosivall L, Mirzahassemi S, Toma I, Sipos A, Peti-Peterdi J: Fluid flow in the juxtaglomerular interstitium visualized *in vivo*, *Am J Physiol Renal Physiol* 2006, 291: F1241-1247

Effect of Salt Intake on the Intrarenal RAS Activity Mediated by the Receptor Proteins for Prorenin in Chronic Kidney Disease

Tatsuo Yamamoto

Department of Health and Nutritional Sciences, Faculty of Health Promotional Sciences
Hamamatsu University

Summary

Two distinct renin-angiotensin systems (RAS) exist; the circulating RAS and the tissue RAS. Activation of intrarenal RAS is involved in the progression of kidney fibrosis in chronic kidney disease (CKD). Although high salt intake suppresses the circulating RAS, it aggravates kidney injury in CKD. Prorenin is a precursor of renin and contains a prosegment that obstructs access of angiotensinogen to the active site of renin. On binding to (pro)renin receptor (PRR), prorenin gains renin activity through non-proteolytic activation mediated by conformational changes, leading to unfolding of the prosegment from the enzymatic cleft, and becoming enzymatically active. To elucidate the effect of high salt intake on intrarenal RAS activity and kidney injury in CKD, we investigated the PRR-mediated prorenin activation in rats with chronic anti-thymocyte serum (ATS) nephritis on high salt intake. Fibrotic kidney lesions were more severe in the nephritis rats on high salt intake than normal salt intake. Despite suppression of plasma renin and angiotensin II, and immunoreactivity for total renin (prorenin and renin) in juxtaglomerular cells, marked increases in prorenin and renin proteins were noted in collecting ducts and connecting tubules without concomitant rises in renin mRNA, non-proteolytically activated prorenin, and cortical angiotensin II in the nephritic rats on high salt intake. Although no significant changes in the cortical levels of PRR and AT1 receptor were noted among the control and nephritic rats on normal and high salt intake, alteration of PRR immunostaining pattern in the collecting ducts from cytoplasmic distribution, which was noted on normal salt intake, to apical membranous one, along with elevated non-proteolytically activated prorenin, was observed in the nephritic rats on high salt intake. Olmesartan, an AT1 receptor antagonist, decreased cortical prorenin, non-proteolytically activated prorenin and angiotensin II, and apical membranous PRR immunostaining in the collecting ducts, and attenuated the renal lesions. These data suggest that angiotensin II-dependent increase in membrane-bound PRR is involved in the augmentation of intrarenal binding of prorenin, followed by its non-proteolytic activation and angiotensin II generation, with resultant worsening of renal fibrosis in chronic ATS nephritis on high salt intake.