

食塩感受性高血圧において臓器障害を進展させるセリンプロテアーゼの検索

柿添 豊¹, 北村 健一郎²

¹熊本大学大学院生命科学研究部, ²山梨大学医学部

概要 日本では透析患者数は 32 万人を超え, かつ成人人口のおよそ 8 人に 1 人が慢性腎臓病 (CKD) 患者であると言われており, 透析患者は今後も更なる増加が予想される。CKD に対しては現在レニン・アンギオテンシン (RA) 系阻害薬を主とした保存的療法が行われているが, 未だ CKD の進行を抑制する十分な治療法はなく, 今後新規治療法の開発が望まれている。高血圧は CKD の増悪因子の主たるものであるが, 特に食塩感受性高血圧では非感受性と比べて腎障害の進展が早いことが知られている。アルドステロン (ALD) は腎尿細管, 特に集合尿細管で上皮型 Na チャネルを活性化することで Na 再吸収を亢進させ, 食塩感受性高血圧を誘導する。さらに近年, ALD は腎臓や心臓などの臓器を昇圧と独立した機序で障害することが知られ, ALD は多くの CKD の増悪因子であると報告されている。ALD による臓器障害作用には食塩の存在が必須だが, その機序は十分解明されていない。私達はこれまでセリンプロテアーゼと腎尿細管生理を中心に研究を行ってきた。本研究の目的は, 食塩感受性高血圧の腎障害に関与するセリンプロテアーゼの同定・解析と, それらの誘導・臓器障害機序の分子メカニズムを解明し, 食塩感受性高血圧に対するセリンプロテアーゼを標的とした新規治療法開発に繋げることである。

片腎摘出したラットに ALD と高食塩食を投与すると, 著明な高血圧と腎障害を呈し, 腎組織中にある種のセリンプロテアーゼの活性亢進を認め, タンパク精製と質量分析の手法によりこのプロテアーゼをプラスミンと同定した。選択的アルドステロン受容体阻害薬はプラスミンの活性化を抑制するとともに, 腎障害を軽減した。腎線維芽細胞の培養上清にプラスミンを添加すると炎症・線維化マーカーの発現が亢進し, 合成セリンプロテアーゼ阻害薬はこれらの反応を抑制した。さらに ALD と高食塩食を投与したラットに合成セリンプロテアーゼ阻害薬を経口投与すると, 有意な降圧, 尿蛋白減少, 腎糸球体硬化・間質線維化の抑制, 炎症・線維化マーカーの発現抑制を認めた。

これらの結果から, 食塩感受性高血圧における腎障害進展にセリンプロテアーゼ・プラスミンが関与していると考えられ, セリンプロテアーゼ阻害薬が新規腎臓病治療薬となる可能性が示唆された。

1. 研究目的

日本では透析患者数は 32 万人を超え, かつ成人人口のおよそ 8 人に 1 人が慢性腎臓病 (CKD) 患者であると言われており, 透析患者は今後も更なる増加が予想される。また CKD の存在は, 心血管合併症 (CVD) のリスクを飛躍的に上昇させることが知られている。このため, 透析患者数の増加の抑制や, CVD 抑制のためには CKD 進展抑制が重要である。CKD に対しては現在レニン・アンギオテンシン (RA) 系阻害薬を主とした保存的療法が行われているが, 未だ CKD の進行を抑制する十分な治療法はなく,

今後新規治療法の開発が望まれている。高血圧は CKD の増悪因子の主たるものであるが, 特に食塩感受性高血圧では非感受性と比べて腎障害の進展が早いことが知られている。アルドステロン (ALD) は腎尿細管, 特に集合尿細管で上皮型 Na チャネルを活性化することで Na 再吸収を亢進させ, 食塩感受性高血圧を誘導する。さらに近年, ALD は腎臓や心臓などの臓器を昇圧と独立した機序で障害することが知られ, ALD は多くの CKD の増悪因子であると報告されている。ラットに ALD を単独負荷しても腎障害は来さないが, 食塩の同時負荷で著明な障害が誘導

され、ALD の臓器障害作用には食塩の存在が必須とされているが、その理由は十分に解明されていない。

私たちはこれまでに、ALD+高食塩負荷ラットの腎組織中で活性が著明に亢進するセリンプロテアーゼを検出しており、さらに合成セリンプロテアーゼ阻害薬はこのモデルの腎障害を有意に軽減することを見出している。本研究の目的は、食塩感受性高血圧の腎障害に関与するセリンプロテアーゼの同定・解析と、それらの誘導・臓器障害機序の分子メカニズムを解明し、食塩感受性高血圧に対するセリンプロテアーゼを標的とした新規治療法開発に繋げることである。

2. 研究方法

2.1 食塩感受性高血圧モデルラットの腎組織中で誘導されるセリンプロテアーゼの同定

6 週齢の SD ラットに片腎摘出術を行い、2 週間の回復期間の後に①コントロール群、②高食塩食群(8%NaCl 食)、③ALD 投与群(0.75 $\mu\text{g}/\text{h}$, 皮下投与)、④ALD+高食塩食群の 4 群に分け、4 週間飼育後に屠殺して腎組織からタンパク質を抽出した。ALD+高食塩食群において特異的に活性が亢進するセリンプロテアーゼを検出するため、腎抽出蛋白をセリンプロテアーゼ特異的のザイモグラフィ、および合成基質(QAR-MCA; N-t-Boc-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-methylcoumarin)を用いた Double Layer Fluorescent Zymography 法(DLFZ 法)により解析した¹⁾。次に腎臓抽出蛋白を硫酸沈殿、イオン交換クロマトグラフィーにより粗精製し、DLFZ 法により酵素活性を確認しながら目的のセリンプロテアーゼ精製分画を得た後、そのタンパク質を SDS-PAGE で分離し、DLFZ 法を用いてスポットを同定して LC-MS/MS によるプロテオミクス解析を行った。

2.2 アルドステロン受容体阻害薬による腎保護作用とセリンプロテアーゼ活性変化の検討

6 週齢の SD ラットに片腎摘出術を行い、2 週間の回復期間の後に①コントロール群、②ALD+高食塩食群、③ALD+高食塩食群+エプレレノン(0.125%, 混餌)群の 3 群に分け、4 週間飼育後に屠殺して腎組織から蛋白質を抽出した。

2.3 アルドステロンと高食塩食による腎障害におけるセリンプロテアーゼ群の関与の検証

6 週齢の SD ラットに片腎摘出術を行い、2 週間の回復期間の後に①コントロール群、②ALD+高食塩食群、③ALD+高食塩食群+CM(0.1%, 混餌)群の 3 群に分け、4 週間飼育後に屠殺して腎組織からタンパク質を抽出した。

ラットを用いた実験では適宜血圧、24 時間蓄尿による尿蛋白量を測定した。屠殺後に腎障害の程度を組織学的に評価し、real-time PCR で腎障害マーカーの発現変化を評価した。

2.4 *in vitro* における CM のセリンプロテアーゼ活性抑制効果の検討

QAR-MCA (final concentration: 1 mmol/L in 96-well microliter plates) をプラスミン(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と反応させ、反応液中に CM(0-5 μM) を添加した。蛍光プレートリーダーにより器質の分解速度(プラスミン活性)を測定した。

2.5 腎線維芽細胞を用いた検討

腎線維芽細胞(NRK-49F)の培養液中にプラスミン(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) および CM(0-5 μM) を添加し、72 時間培養した。細胞から RNA を抽出し、real-time PCR により炎症・線維化マーカーの発現変化を観察した。

3. 研究結果

3.1 アルドステロンと食塩の血圧、尿蛋白、腎障害に及ぼす効果

コントロール群と比較し高食塩食群、ALD 投与群では有意な血圧の上昇や尿蛋白の増加を認めなかったが、ALD+高食塩食群においては著明な収縮期血圧の上昇と、尿蛋白の増加を認めた(Figure 1A and 1B)。real-time PCR で各群の腎障害マーカーの発現を比較すると、ALD+高食塩食群において I 型および III 型コラーゲン、TGF- β 1, TNF- α および B7-1 の発現が有意に亢進していた(Figure 1C)。

3.2 アルドステロンと食塩の腎組織中セリンプロテアーゼ活性及ぼす効果

腎抽出蛋白を用いて、セリンプロテアーゼ特異的のザイモグラフィを行った。ALD+高食塩食群の腎組織中において活性が著明に亢進した約 80 kDa のセリンプロテアーゼを検出した(Figure 2A)。さらに器質として QAR-MCA を用いた DLFZ 法によっても同様の分子量のプロテアーゼ活性の亢進を認めた(Figure 2B)。

3.3 アルドステロンと食塩により誘導されるセリンプロテアーゼの同定

腎臓抽蛋白を硫酸沈殿, イオン交換クロマトグラフィーにより粗精製し, DLFZ 法により酵素活性を, 蛋白染色で夾雑蛋白を確認しながら目的のセリンプロテアーゼが含まれ, 夾雑蛋白の少ない精製分画を得た。その分画を用いて2セットの SDS-PAGE を施行した。1セットは DLF ザイモグラフィー法を施行し, 目的となる酵素活性の位置を確認しながら, もう一方は蛋白染色を行い, 酵素活性に相当する部位を切り出し, タンパク質を抽出した (Figure 2C)。

続いて LC-MS/MS によるプロテオミクス解析を行い, このプロテアーゼをプラスミンと同定した。

3.4 アルドステロン受容体阻害薬エプレレノンによる降圧および腎保護作用とセリンプロテアーゼ活性変化の検討

エプレレノンは ALD+高食塩食による高血圧, 尿蛋白排泄亢進を著明に抑制した。またエプレレノンは腎障害マーカーの mRNA 発現を有意に抑制した (Table 1 and Figure 3A)。続いて腎組織中プラスミン活性化に対するエプレレノンの効果を DLF ザイモグラフィー法で評価した

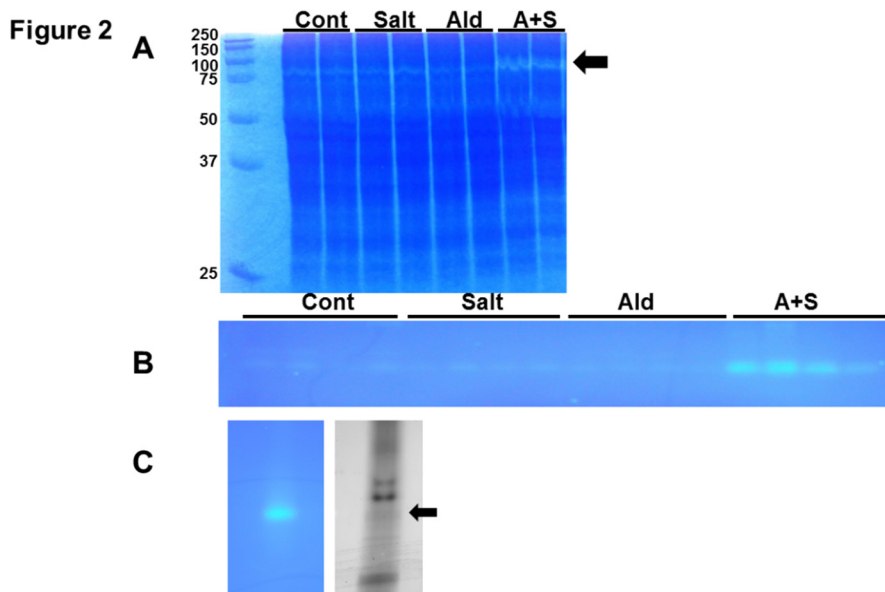
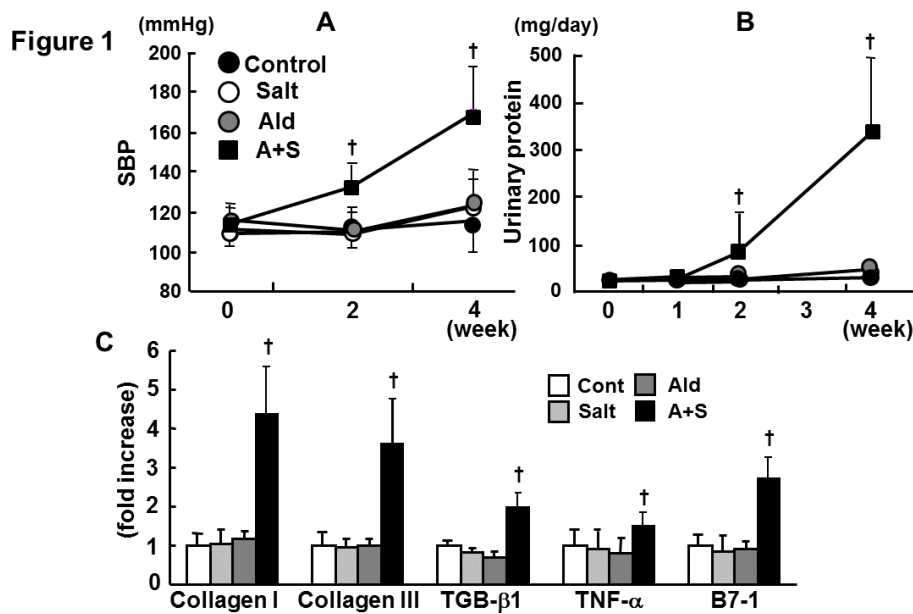
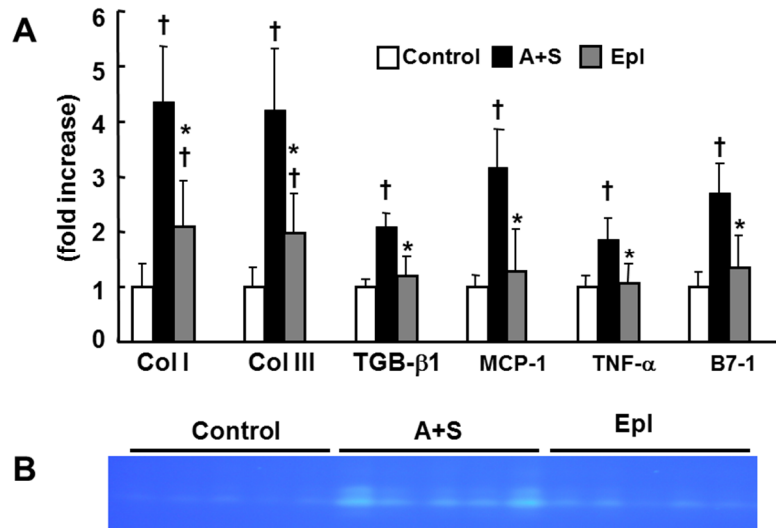


Table 1. Effects of eplerenone on (patho) physiological parameters in uninephrectised aldosterone/salt rats

	Cont	A+S	Eple
BW (g)	410±11	393±36	412±27
rt Kidney wt (mg/g BW)	4.6±0.2	9.0±0.9 [†]	6.0±0.7 ^{†§}
SBP (mmHg)	110±5	174±11 [†]	140±10 ^{†§}
U-TP (mg/day)	15±7	501±86	52±62 [*]
Alb (g/dL)	3.8±0.1	3.2±0.2 [†]	3.7±0.3 [§]
Cr (mg/dL)	0.41±0.02	0.52±0.04 [†]	0.39±0.02 [*]

Cont ; control, A+S ; aldosterone/salt-treated group, Eple ; aldosterone/salt and concomitant eplerenone-treated group, BW ; body weight at week 4, SBP ; systolic blood pressure at week 4, U-TP ; urinary protein excretion at week 4, Alb ; serum albumin level, Cr ; serum creatinin level. Data are expressed as mean ± SD (n = 8). [†]*P* < 0.01 vs. Cont, [§]*P* < 0.05 vs. A+S, ^{*}*P* < 0.01 vs. A+S.

Figure 3

ところ、エプレレノンはプラスミンの活性化を抑制していた (**Figure 3B**)。アルドステロンはミネラルコルチコイド受容体(MR)依存性的および非依存性的な腎障害作用が報告されているが、この結果からプラスミン活性化の誘導にはアルドステロンとMRの相互作用が重要であると考えられた。

3.5 メシル酸カモスタットによるプラスミン活性抑制効果

*in vitro*においてプラスミンとQAR-MCAを反応させ、プラスミンの酵素活性を確認した。この系に0.5もしくは5 μMのCMを作用させると、それぞれプラスミン活性を70.2 ± 5.1% and 91.2 ± 4.0%抑制した (**Figure 4A**)。腎抽出タンパク質を用いたDLFザイモグラフィーの反応液中にCM

を0.5もしくは5 μMの濃度で添加したところ、同様に濃度依存的なプラスミン活性の低下を認めた (**Figure 4B**)。

3.6 腎線維芽細胞を用いた、プラスミンによる細胞障害作用と、CMの効果の検討

プラスミンを腎線維芽細胞培養上清中に添加すると、TGF-β1, CTGF, MCP-1 および TNF-α等の線維化・炎症性サイトカインの発現亢進を認めた。CMをプラスミンの酵素活性を抑制する濃度(0.5 and 5 μM)で培養上清に投与すると、これらの障害マーカーの発現は有意に抑制されたことから、プラスミンの酵素活性が線維化・炎症反応の誘導に重要であると示唆された (**Figure 4C**)。

3.7 メシル酸カモスタットの降圧および腎保護効果の検討

ALD+高食塩食により高血圧、尿蛋白の増加、血清クレアチニンの上昇、アルブミンの低下を認め、CM はこれらの変化を有意に抑制した (Table 2 and Figure 5)。CM 同時投与群では2週の時点で有意な尿蛋白の減少を認め、4週の時点で血圧を有意に低下させた。CM は降圧効果を発揮する前に尿蛋白を減少させたことから、CM の降圧効果非依存的な腎保護作用が示唆された。組織学的に ALD+高食塩食により糸球体腫大、糸球体硬化および間質の線維化を認め、CM はこれらの変化を抑制していた。さらに CM は ALD+高食塩食による腎障害マーカーの mRNA 発現を有意に抑制した (Figure 6)。

4. 考察

ALD+高食塩食による腎障害に関係するセリンプロテアーゼの同定と、セリンプロテアーゼ阻害薬の腎保護効果を検討するため本研究を行った。ALD+高食塩食群の腎組織中において活性が亢進したセリンプロテアーゼを検出し、ザイモグラフィー、蛋白精製、質量分析の手法により、このプロテアーゼをプラスミンと同定した。合成セリンプロテアーゼ阻害薬である CM は *in vitro* でプラスミン活性を抑制し、ラットに投与することで ALD+高食塩食による血圧上昇、尿蛋白、組織学的な糸球体硬化と間質の線維化、腎障害マーカーの発現などを著明に抑制した。以上のことから、ALD+高食塩食による腎障害にプラスミンの活性化が重要であると考えられた。

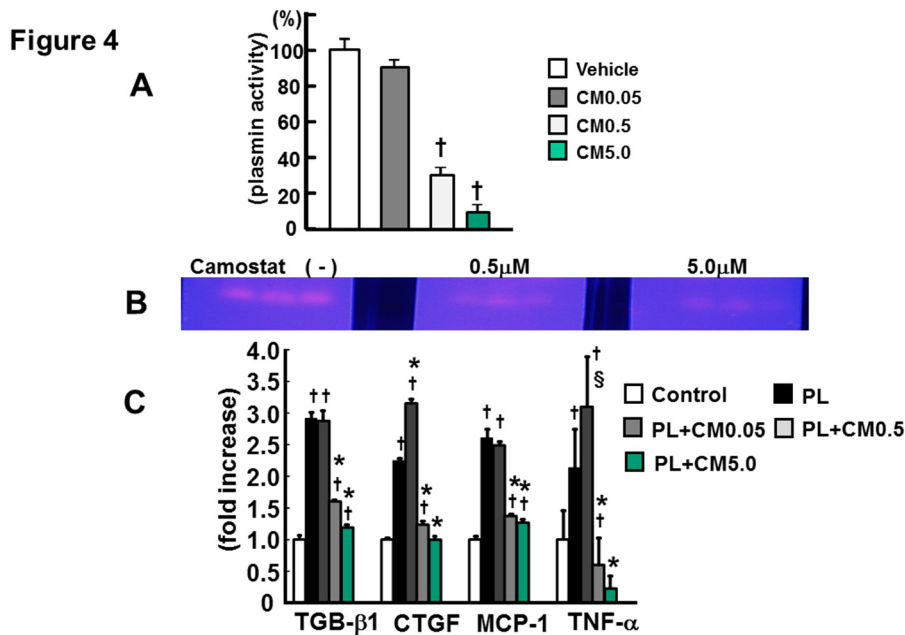


Table 2. Effects of camostat mesilate on (patho) physiological parameters in uninephrectomized aldosterone/salt rats

	Cont	A+S	CM
BW (g)	438±23	375±22 †	366±17 †
rt Kidney wt (mg/g BW)	4.8±0.6	9.9±1.3 †	7.8±0.5 †§
Alb (g/dL)	3.8±0.1	3.2±0.4 †	3.6±0.2 §
Cr (mg/dL)	0.38±0.04	0.54±0.06 †	0.40±0.09*

Cont ; control, A+S ; aldosterone/salt-treated group, CM ; aldosterone/salt and concomitant camostat-treated group, BW ; body weight at week 4, Alb ; serum albumin level, Cr ; serum creatinin level. Data are expressed as mean ± SD (n = 8). †P < 0.01 vs. Cont, §P < 0.05 vs. A+S, *P < 0.01 vs. A+S.

Figure 5

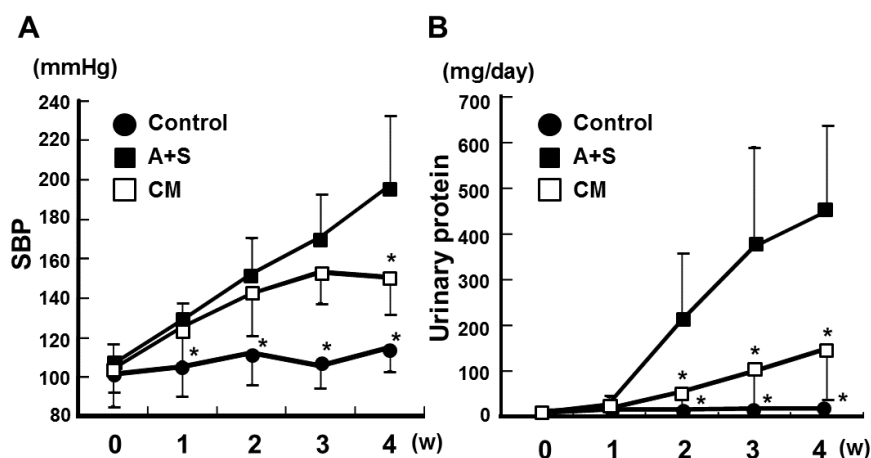
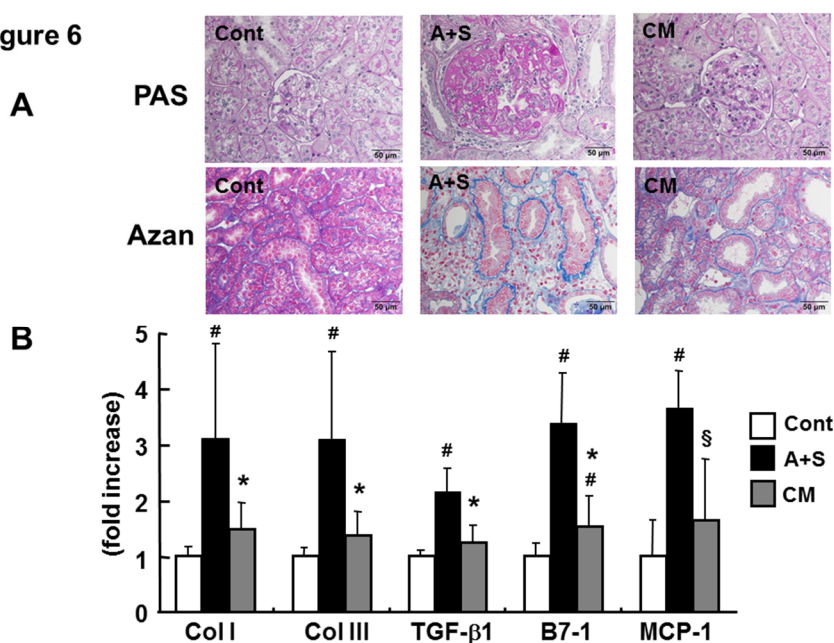


Figure 6



プラスミノゲン/プラスミン系は線溶系において重要であり、血管内でフィブリンをフィブリン分解産物(FDP)へ分解し、過剰な凝固を抑制している。前駆体のプラスミノゲンは主として肝臓で生産され、tissue-type plasminogen activator(tPA)や urokinase-type plasminogen activator(uPA)により活性型のプラスミンへと変換される^(2,3)。tPA, uPA は内因性阻害物質 plasminogen activator inhibitors (PAIs)により抑制され、生体内では PAI-1 が重要である⁽⁴⁾。プラスミノゲン/プラスミン系の腎障害への作用は種々の報告があり、一定の見解は得られていない。半月体形成性糸球体腎炎モデルラットを用いた研究では、

外因性に投与した tPA は糸球体でのプラスミンを活性化し、糸球体へのフィブリン沈着を軽減することで、腎障害を抑制することが報告されているが、一方で溶連菌感染後急性糸球体腎炎では菌体成分である nephritis-associated plasmin receptor (NAP1r)により糸球体へ結合したプラスミンが糸球体障害の増悪因子であると報告されている^(5,6)。これらの結果から、プラスミンは病態により種々の作用を持つことが推測される。さらに、尿細管間質線維化におけるプラスミノゲン/プラスミン系の役割も複雑である。プラスミンはフィブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカン等の細胞外マトリックスを直接もしくはマトリックスメタプロテ

アーゼの活性化を介して分解し、間質の線維化に対しては保護的に働くと考えられている⁽⁷⁻⁹⁾。しかし一側尿管結紮モデルマウスを用いた近年の報告では、プラスミン KO マウスは線維化が軽減することが報告された⁽⁹⁾。この機序として、プラスミンは TGF- β 1 の活性化, protease activated receptor-1 (PAR-1) とその下流のシグナル伝達分子である ERK-1/2 の活性化を介して腎線維芽細胞の活性化を誘導すると報告されている⁽⁹⁾。またその線維化誘導作用に加えて、プラスミンは TNF- α , MCP-1 等の炎症性サイトカインの誘導や、酸化ストレス誘導作用を持つことが知られている⁽¹⁰⁻¹²⁾。

細胞実験でプラスミンが炎症・線維化を直接誘導することを確認し、またこの効果はプラスミンの酵素活性を抑制する濃度の CM によって軽減されたことから、プラスミンのプロテアーゼ活性が腎障害に重要であると考えられた。

本研究の結果から、ALD+高食塩食により誘導された食塩感受性高血圧において腎組織中に誘導されたプラスミンが腎障害の増悪因子であると考えられ、セリンプロテアーゼ阻害薬が食塩感受性高血圧における腎障害に対する新たな治療薬になる可能性が示唆された。

5. 今後の課題

今回の実験では、ALD+高食塩食により腎組織中にプラスミンが誘導される機序に関して十分に解明できていない。エプレレノンがプラスミンの活性化を抑制したため、アルドステロンがミネラルコルチコイド受容体に作用することが重要であると示唆される。プラスミノーゲンは主として肝臓で産生され、腎臓においてプラスミノーゲンの mRNA 発現は検出されない。またラット血漿を用いて DLF ザイモグラフィを行ったが、プラスミンの酵素活性は確認できなかった。これらのことから、循環血液中のプラスミノーゲンが ALD+高食塩食の存在下に腎組織中に取り込まれ、局所で活性化されたと考えられるが、詳細な活性化機序は今後の課題である。

本研究では 2 種類の異なる器質を用いて ALD+高食塩食により活性化されるセリンプロテアーゼの検索を行ったが、用いた器質に反応が乏しい他のセリンプロテアーゼが腎障害に関与している可能性は否定出来ないため、今後も他の器質を用いた検索が必要である。また CM はプラスミン以外の種々のセリンプロテアーゼ活性を抑制するた

め、ラットにおける腎保護効果がプラスミン活性を抑制したためであるかは明らかでない。今後はプラスミン/プラスミノーゲン KO マウスを使用し、プラスミン阻害のより特異的な作用を調べる必要がある。

6. 文献

- (1) Katunuma N, Le QT, Miyachi R, Hirose S. Double-layer fluorescent zymography for processing protease detection. *Anal Biochem* 2005; 347(2):208-212.
- (2) Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, De VR, van den Oord JJ, Collen D, Mulligan RC. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* 1994; 368(6470):419-424.
- (3) Ploplis VA, Carmeliet P, Vazirzadeh S, Van V, I, Moons L, Plow EF, Collen D. Effects of disruption of the plasminogen gene on thrombosis, growth, and health in mice. *Circulation* 1995; 92(9):2585-2593.
- (4) Saksela O, Rifkin DB. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu Rev Cell Biol* 1988; 4:93-126.
- (5) Kitching AR, Holdsworth SR, Ploplis VA, Plow EF, Collen D, Carmeliet P, Tipping PG. Plasminogen and plasminogen activators protect against renal injury in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med* 1997; 185(5):963-968.
- (6) Oda T, Yamakami K, Omasu F, Suzuki S, Miura S, Sugisaki T, Yoshizawa N. Glomerular plasmin-like activity in relation to nephritis-associated plasmin receptor in acute poststreptococcal glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(1):247-254.
- (7) Baricos WH, Cortez SL, el-Dahr SS, Schnaper HW. ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade. *Kidney Int* 1995; 47(4):1039-1047.
- (8) Stetler-Stevenson WG. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol* 1996; 148(5):1345-1350.
- (9) Zhang G, Kernan KA, Collins SJ, Cai X, Lopez-Guisa

- JM, Degen JL, Shvil Y, Eddy AA. Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: role of plasmin-activated signals. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18(3):846-859.
- (10) Moons L, Shi C, Ploplis V, Plow E, Haber E, Collen D, Carmeliet P. Reduced transplant arteriosclerosis in plasminogen-deficient mice. *J Clin Invest* 1998; 102(10):1788-1797.
- (11) Schreiber A, Pham CT, Hu Y, Schneider W, Luft FC, Kettritz R. Neutrophil serine proteases promote IL-1beta generation and injury in necrotizing crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23(3):470-482.
- (12) Syrovets T, Lunov O, Simmet T. Plasmin as a proinflammatory cell activator. *J Leukoc Biol* 2012; 92(3):509-519.

Identification of Serine Proteases that Promote the Organ Injuries in the Salt-Sensitive Hypertension

Yutaka Kakizoe¹, Kenichiro Kitamura²

¹Kumamoto University, ²University of Yamanashi

Summary

The increasing number of dialysis patients and high prevalence of chronic kidney disease (CKD) are major social problems in Japan and other developing countries. Although renin-angiotensin system (RAS) inhibitors are widely used to treat CKD, it is still difficult to stop the progression of CKD. Hypertension, especially salt-sensitive hypertension, is one of important factor to exaggerate CKD. Aldosterone increases sodium reabsorption via the activation of epithelial sodium channel in the distal nephron, resulting in the salt-sensitive hypertension. In addition, emerging evidence has suggested that aldosterone has direct deleterious effects on the kidney independently of its hemodynamic effects. We have previously studied the physiological and pathophysiological roles of serine proteases in the sodium homeostasis and kidney injuries. The current study was conducted to investigate the roles of serine proteases and the beneficial effects of serine protease inhibitor in kidney injuries with salt-sensitive hypertension caused by aldosterone and salt. We observed a serine protease that was activated by aldosterone/salt in rat kidney lysate, and identify it as plasmin with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Eplerenone, a selective aldosterone receptor blocker, suppressed the activation of plasmin and attenuated kidney injuries, suggesting that the interaction of aldosterone and mineralocorticoid receptor is necessary for the induction of plasmin. Plasmin increased pro-fibrotic and inflammatory gene expressions in rat renal fibroblast cells. A synthetic serine protease inhibitor (SPI) inhibited the protease activity of plasmin in vitro and suppressed cell injury markers induced by plasmin in the fibroblast cells. Furthermore, SPI ameliorated glomerulosclerosis and interstitial fibrosis in the kidney of aldosterone/salt-treated rats. Our findings indicate that serine protease plasmin has important roles in kidney injuries caused by salt-sensitive hypertension, and that serine protease inhibitor could provide a new strategy for the treatment chronic kidney diseases with hypertension in humans.