

## 糖尿病性腎症における食塩感受性高血圧の機序解明と セリンプロテアーゼを標的とした降圧療法の検討

柿添 豊<sup>1</sup>, 北村 健一郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>熊本大学大学院生命科学研究部, <sup>2</sup>山梨大学医学部

**概要** 糖尿病性腎症(DN)は1998年以後、透析導入の現疾患として最多であり、DNの進行抑制は大きな社会問題である。DNの進行抑制には血圧のコントロールが極めて重要であるが、ネフローゼ症候群と食塩感受性高血圧を呈することが多く、降圧治療に難渋する例が多い。

上皮型Naチャンネル(ENaC)は腎集合尿細管に存在し、生体内のNaバランスを調整しており、アルドステロンにより活性が調整されている。この際アルドステロンによって誘導されるセリンプロテアーゼ(SP)がENaCを活性化する機序も重要である。分子機序として、ENaCは $\alpha\beta\gamma$ の3量体から構成されるが、 $\gamma$ サブユニットの2箇所がSPで切断され、チャンネル活性が亢進する。ラットにアルドステロンを投与すると、セリンプロテアーゼによる $\gamma$ ENaCの切断が亢進するが、私たちは本邦で開発された合成セリンプロテアーゼ阻害薬(SPI)であるメシル酸カモスタットがアルドステロン投与時のSPによる $\gamma$ ENaCの活性化を抑制し、尿中Na排泄を促進することを報告した。

ネフローゼ症候群のように著明な蛋白尿を呈する病態では尿細管でのNa再吸収が亢進しており、このため浮腫を生じる。この機序として、障害された糸球体から血液中のプラスミノゲンが漏出し、プラスミノゲンは尿細管に発現するウロキナーゼにより活性型のSP・プラスミンへ変換され、プラスミンが $\gamma$ ENaCを切断・活性化することでNa再吸収を亢進させることが報告された。近年尿蛋白の多いDN患者における高血圧にもプラスミンによるENaC活性化が重要であるとの報告がなされ、ENaC阻害薬であるアミロライドによる有意な降圧効果が報告されている。しかし、DNの高血圧に対してSP阻害薬の有効性は不明である。本研究の目的はDNモデルラットにおいて、尿中SPの活性化を評価し、さらにSP阻害薬の降圧効果を検討することである。

尿蛋白を呈さず塩分過剰摂取のない本態性高血圧モデルラット(SHR)では尿中SP活性亢進を認めず、従ってSP阻害薬による降圧効果は認めることができなかった。一方で、食塩負荷糖尿病性腎症モデルラット(SHR/ND mcr-cp)では著明な尿中SP(プラスミン、プロスタシン)の増加と高血圧を呈し、SP阻害薬により尿中SPとともに血圧上昇は有意に抑制された。さらにSP阻害薬は降圧効果のみならず、尿蛋白を著明に減少させたことから、SP阻害薬の降圧効果に依存しない腎糸球体保護効果の検討を併せて行った。SP阻害薬は食塩負荷によって生じたポドサイトのアポトーシス・ポドサイトマーカーの発現低下・糸球体の硬化を著明に抑制したことから、食塩感受性高血圧においては何らかのSPが糸球体で活性化され、血圧非依存的にポドサイト傷害を誘導している可能性が考えられた。

本研究の結果から、SP阻害薬は糖尿病性腎症の糸球体障害、高血圧抑制において有効な治療薬となる可能性が示唆された。糸球体障害に関与するSPは同定できておらず、今後の検討が必要である。

### 1. 研究目的

糖尿病性腎症(DN)は1998年以後、透析導入の現疾患として最多であり、DNの進行抑制は大きな社会問題で

ある。DNの進行抑制には血圧のコントロールが極めて重要であるが、ネフローゼ症候群と食塩感受性高血圧を呈することが多く、複数の降圧薬を使用しても降圧治療に難

流する例が多いため、新規降圧療法の開発が求められる。

上皮型 Na チャネル (ENaC) は主として腎集合尿細管に存在し、生体内の Na バランスを調整している重要輸送体である。生理的にはアルドステロンにより活性が調整されている。アルドステロンによる ENaC の活性化の機序として、蛋白発現量の増加、ユビキチン化の抑制による細胞膜表面の ENaC の増加などが知られていたが、加えてアルドステロンによって誘導されるセリンプロテアーゼ (SP) が ENaC を活性化する機序も重要である。当教室ではこれまでに SP・プロスタシンがその酵素活性により ENaC を活性化すること、またアルドステロンが集合尿細管培養細胞上清やラット尿中のプロスタシンを増加させることを報告しており、アルドステロンによる ENaC の活性化にプロスタシンが介在することを報告している<sup>(1,2)</sup>。近年この詳細な分子機序が解明され、ENaC は  $\alpha\beta\gamma$  の 3 量体から構成されるが、 $\gamma$  サブユニットの 2 箇所が SP で切断され、43 アミノ酸からなる活性阻害ペプチドが切り出されることでチャネル活性が亢進することが報告された<sup>(3)</sup>。ラットにアルドステロンを投与すると、セリンプロテアーゼによる  $\gamma$ ENaC の切断を反映し、Western Blotting において分子量の変化として捉えられる。私たちは本邦で開発された合成セリンプロテアーゼ阻害薬 (SPI) であるメシル酸カモスタットがアルドステロン投与時の SP による  $\gamma$ ENaC の活性化を抑制し、尿中 Na 排泄を促進することを報告した<sup>(4)</sup>。

ネフローゼ症候群のように著明な蛋白尿を呈する病態では尿細管での Na 再吸収が亢進しており、このため浮腫を生じる。この機序としては、古くから血清アルブミン値の低下により血管内の膠質浸透圧が低下し、細胞外液が血管外に漏出することで血管内ボリュームが減少し、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系が亢進するためと考えられていた (underfilling theory)。一方で、ネフローゼ症候群患者の中では血管内ボリュームがむしろ増加しており、血漿レニン活性が抑制されている患者も散見され、蛋白尿に伴い全身性の要因とは別に、腎臓局所で Na 再吸収が亢進する機序が想定されていた (overflow theory)。

2009 年にデンマークの Svenningsen らはネフローゼラットにおいて、障害された糸球体から血液中のプラスミノゲン (分子量約 80 kDa) が漏出し、プラスミノゲンは尿細管に発現するウロキナーゼにより活性型の SP・プラスミン

へ変換され、プラスミンが  $\gamma$ ENaC を切断・活性化することで Na 再吸収を亢進させることを報告した<sup>(5)</sup>。当教室ではネフローゼ症候群を呈する Dahl 食塩感受性ラットの腎臓で  $\gamma$ ENaC の SP による活性化が亢進し、SP 阻害薬が ENaC 活性と高血圧を抑制することを報告した<sup>(6,7)</sup>。

近年尿蛋白の多い DN 患者における高血圧にもプラスミンによる ENaC 活性化が重要であるとの報告がなされ、治療抵抗性高血圧を呈する DN 患者に対しアミロライドによる有意な降圧効果が報告されている<sup>(8)</sup>。しかし、DN の高血圧に対して SP 阻害薬が新規降圧薬となり得るかは検討されていない。本研究の主たる目的は DN モデルラットにおいて、尿中 SP の活性化を評価し、さらに SP 阻害薬の降圧効果を検討することである。

さらに食塩感受性高血圧モデル動物では血圧上昇に伴い高度の蛋白尿を呈することが多いが、これまでの検討で SP 阻害薬は降圧効果のみならず、尿蛋白を著明に減少させたことから、SP 阻害薬の降圧効果に依存しない腎糸球体保護効果の検討を併せて行った。

また糖尿病においては血管内皮障害も高血圧の原因となる。血管内皮表層のグリコサミノグリカン (GAGs) は陰性荷電を持ち、血液中の  $\text{Na}^+$  を電氣的に中和し浸透圧物質作用を抑制するが、血管内皮障害では GAGs の  $\text{Na}^+$  緩衝作用が失われ、 $\text{Na}^+$  が血管内皮細胞の ENaC (EnNaC) より細胞内に流入し、細胞の腫大と eNOS 活性・NO 産生低下が生じ、高血圧の原因となることが報告されている<sup>(9)</sup>。本研究では DN の病態における血管内皮の ENaC (EnNaC) の発現変化と SP 阻害薬の効果の検討を併せて行った。

## 2. 研究方法

### 2.1 本態性高血圧モデルラットにおける尿中 SP の評価と SP 阻害薬の降圧効果の検討

これまでに SP 阻害薬がアルドステロン負荷ラットにおいて ENaC の SP による切断・活性化を抑制することや、Dahl 食塩感受性高血圧ラット (食塩負荷+尿蛋白) において著明な降圧効果を発揮することを報告している。本研究ではまず、高血圧はきたすが蛋白尿などの腎障害は軽度である本態性高血圧モデルラットである SHR において、尿中 SP の評価を行い、SP 阻害薬の降圧効果を検討した。

5 週齢雄の WKY (正常血圧, SHR のコントロールとして使用)、SHR を、WKY 群 (n=4)、SHR 群 (n=4)、SHR+SP

阻害薬 (SHR+SPI) 群 (n=4) に分け、2 週に 1 回の血圧測定を行い、4 週間飼育後 24 時間蓄尿を行った後に sacrifice した。尿蛋白量、尿中 SP 排泄・活性および SP 阻害薬の降圧効果を検討した。

## 2. 2 糖尿病性腎症モデルラットにおける尿中 SP の評価と SP 阻害薬の降圧効果の検討

SHR/ND mcr-cp は SHR と正常血圧ラットの交配の過程で突然変異によりレプチン遺伝子の異常が生じた系であり、肥満・糖尿病・高血圧・高脂血症のメタボリック症候群を呈する。実験 2 では、通常診療で遭遇する塩分摂取の多い 2 型糖尿病性腎症患者を想定し、食塩負荷 SHR/ND mcr-cp を用いて検討を行った。

13 週齢雄の SHR/ND mcr-cp を通常食塩 (0.3%NaCl 食) 群 (NS, n=6)、高食塩 (8.0%NaCl 食) 群 (HS, n=8)、高食塩 + SP 阻害薬群 (HS+SPI, n=8) に分け、週 1 回血圧測定・24 時間蓄尿を行い、4 週間飼育後 sacrifice した。SPI の降圧および尿中電解質変化、尿中 SP 活性変化、腎組織障害に及ぼす効果を検討した。

## 2. 3 double layer fluorescent zymography (DLFZ)

尿中セリンプロテアーゼ活性を評価するため、セリンプロテアーゼ特異的な合成基質 (QAR-MCA; N-t-Boc-Gln-Ala-Arg-7-amido-4-methylcoumarin) を用いた Double Layer Fluorescent Zymography 法 (DLFZ 法) を行った<sup>(10)</sup>。この手法はゲルにゼラチン・カゼイン等の SP の器質を混入した従来の zymography に比べ、SP による合成器質の切断を蛍光として感知でき、高感度で SP 活性を検出することが可能である。

## 2. 4 SP 阻害薬の血管内皮 EnNaC に及ぼす効果の確認

実験 2 のラットから摘出した大動脈から mRNA・蛋白を抽出し、血管内皮に存在する EnNaC の mRNA・蛋白発現の発現変化を確認した。

## 2. 5 食塩感受性高血圧における SP 阻害薬の糸球体上皮細胞 (ポドサイト) 保護効果の検討

パラフィン包埋した腎組織から 4 μm の切片を作成し、PAS 染色を行い糸球体の病理学的変化を光学顕微鏡で評価した。また糸球体内のアポトーシス細胞の評価のため TUNEL 染色を行った。

## 2. 6 アポトーシス関連シグナルの評価

腎皮質抽出蛋白を用いて Western Blotting によりアポト

ーシス関連分子である Bax, Bcl-2, cleaved Caspase-3 の蛋白発現を評価した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 本態性高血圧モデルラットの尿中 SP の評価と血圧に対する SP 阻害薬の効果の検討

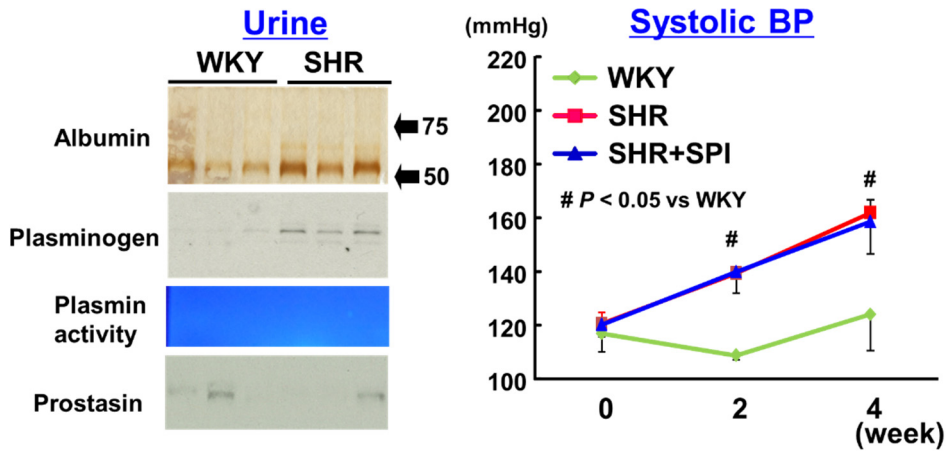
正常血圧の WKY 群と比較し、本態性高血圧モデルラットの SHR では 4 週の時点で、尿中アルブミン排泄の軽度の増加を認めた。尿中プラスミノーゲンの排泄も軽度増加していたが、DLFZ では明らかなプラスミン活性は検出できなかった。さらに尿中プロスタシンの排泄も WKY と SHR で差を認めなかった (Figure 1)。4 週間の経過で SHR は WKY に比較し有意な収縮期血圧の上昇を認めた。SP 阻害薬は SHR の血圧上昇に影響を及ぼさなかった (Figure 1)。尿中 SP の亢進を認めない本態性高血圧ラットでは、SP 阻害薬は降圧効果を発揮しないと考えられた。

### 3. 2 食塩負荷糖尿病性腎症モデルラットにおける尿中 SP の変化の検討

SHR/ND mcr-cp に高食塩食を負荷すると、4 週の時点において NS 群と比較し HS 群で著明な尿蛋白 (アルブミン) の増加を認めた。それに伴い、尿中プラスミノーゲンが増加しており、DLFZ では尿中プラスミンの著明な活性亢進を認めた。さらに HS 群で尿中プロスタシン排泄の亢進を認めた。HS+SPI 群では尿中アルブミン、プラスミノーゲン、プロスタシンの排泄亢進、プラスミン活性化はすべて抑制されていた (Figure 2)。ENaC 活性のサロゲートマーカーとして用いられる尿中 Na/K 比 (ENaC 活性抑制により Na 排泄亢進、K 排泄低下により高値となる) は HS 群と比較し HS+SPI 群で上昇しており、SPI による ENaC 活性抑制を示唆する所見であった (Figure 2)。

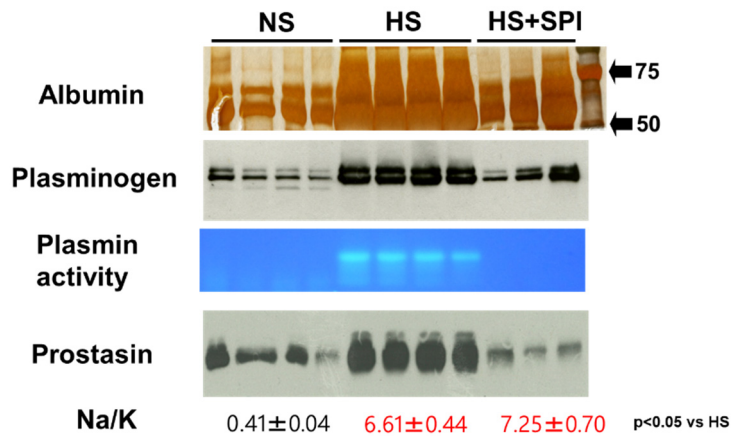
### 3. 3 食塩負荷糖尿病性腎症モデルラットにおける SP 阻害薬の降圧・腎保護効果の検討

HS 群では血圧の上昇を認め、4 週間の観察の後 SBP>220 mmHg となったが、SPI はこの血圧上昇を有意に抑制した (Figure 3)。尿蛋白を定量的に評価すると、HS 群で経時的な尿蛋白排泄亢進を認めた。興味深いことに、SPI 投与により尿蛋白の排泄は 2 週の時点からほぼ完全に抑制されていた (Figure 4)。



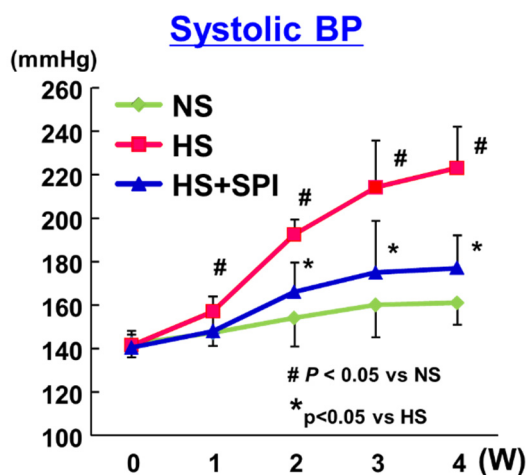
SPI had no significant effects on BP in SHR that did not provide urinary serine proteases activation.

Fig. 1. The effect of SPI on essential hypertension model rats

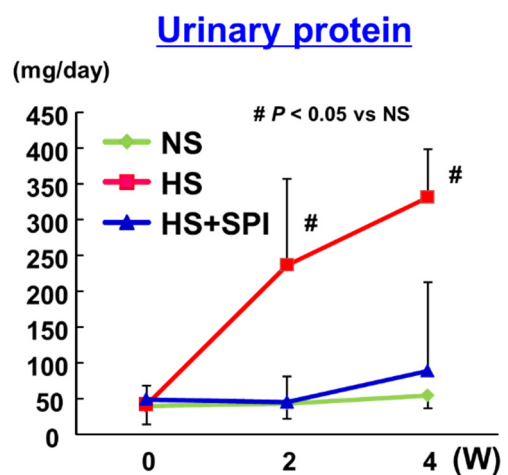


Urinary serine proteases were increased in HS group accompanied by severe albuminuria. These changes were suppressed by SPI.

Fig. 2. Urinary albumin, plasminogen, plasmin, prostatin and Na/K ratio in SHR/ND mcr-cp



CM suppressed hypertension as well as urinary protein excretion.  
Fig. 3. The effect of CM on Systolic BP in SHR/ND mcr-cp with HS diet



CM suppressed hypertension as well as urinary protein excretion.  
Fig. 4. The effect of CM on urinary protein in SHR/ND mcr-cp with HS diet

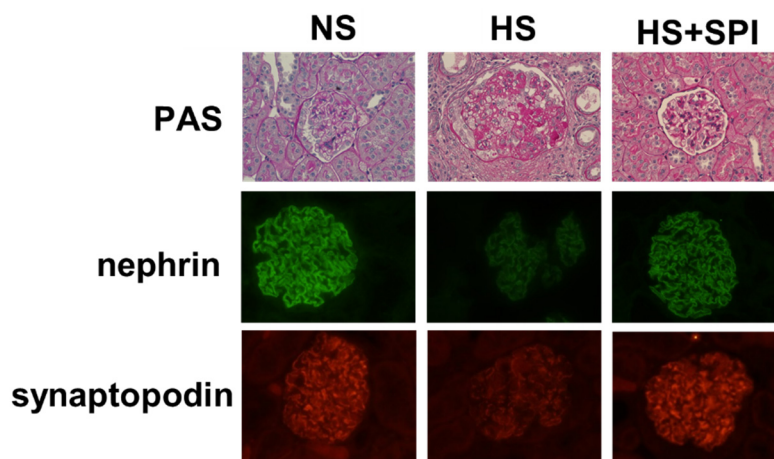
### 3. 4 食塩負荷糖尿病性腎症モデルラットにおける大動脈の EnNaC 発現変化の検討

大動脈から RNA を抽出し、real-time PCR で EnNaC 発現の変化の検討を試みた。しかし、用いた手法ではこれまで腎組織中の ENaC 発現は容易に確認できるものの、大動脈における発現はいずれの群においても確認できなかった。

### 3. 5 SP 阻害薬による尿蛋白減少効果の検討(糸球体障害の評価)

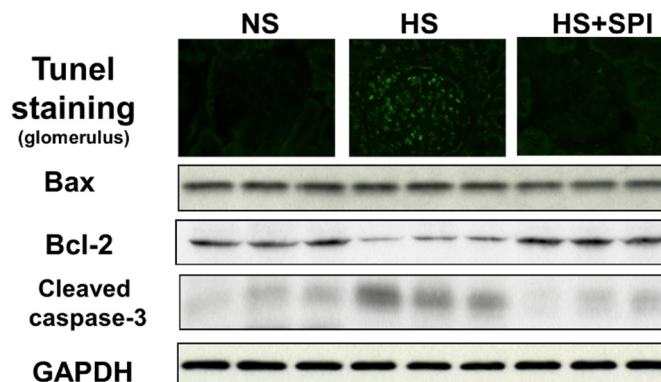
実験 2 において、SP 阻害薬により降圧効果以上に尿蛋白抑制効果が顕著であったことから、SP 阻害薬は降圧非依存的に腎糸球体保護効果を持つと考えられ、その機序を検討した。組織学的評価では HS 群で糸球体の肥大と巣状分節性硬化像を認めたが、この変化は SPI により抑制されていた (Figure 5)。さらに糸球体上皮細胞(ポドサイト)の

のマーカである nephrin, synaptopodin の発現を免疫染色で評価したところ、HS 群ではポドサイトマーカーの染色性の低下を認めたが、SPI はこの変化を抑制した (Figure 5)。次にポドサイト傷害の機序を確認するため、糸球体内のアポトーシスを評価した。Tunel 染色では、HS 群において主にポドサイトに一致してアポトーシスを認め、SP 阻害薬により抑制されていた (Figure 6)。アポトーシス関連シグナルの評価を行うと、アポトーシス促進因子である Bax の発現変化は認めなかったが、HS 群でアポトーシス抑制因子の Bcl-2 発現が減少しており、SPI により抑制されていた (Figure 6)。すなわち、SPI は HS における Bax/Bcl-2 比の上昇を抑制していた。この変化を反映して、HS 群における cleaved caspase-3 の発現増加は SPI により抑制されていた。



CM attenuated glomerular sclerosis and podocyte injuries.

Fig. 5. The effect of CM on glomerular sclerosis and podocyte injuries in SHR/ND mcr-cp with HS diet



CM suppressed apoptosis in the kidney.

Fig. 6. The effect of CM on apoptosis in the kidney of SHR/ND mcr-cp with HS diet

#### 4. 考 察

進行した糖尿病性腎症では腎機能の低下に伴いインスリンの代謝抑制や腎臓での糖新生の低下から血糖コントロールは改善してくることが多く、進行抑制には血圧のコントロールがより重要となる。しかし、RA系阻害薬を中心とし複数の降圧薬を使用しても治療抵抗性高血圧を呈することが多い。そのため尿蛋白中のSPによるENaC活性化の抑制が有効な治療法となる可能性がある。本研究では実臨床において治療抵抗性高血圧を呈することが多い、塩分摂取の多い2型糖尿病性腎症を想定したモデル動物を作成し、尿中SPの評価とSP阻害薬の降圧効果を比較した。尿蛋白を呈さず塩分過剰摂取のない本態性高血圧モデルラットでは尿中SP活性亢進を認めず、従ってSP阻害薬による降圧効果は認めることができなかった。一方で、食塩負荷糖尿病性腎症モデルラットでは著明な尿中SPの増加と高血圧を呈し、SP阻害薬により有意に抑制された。このことから、SPによるENaC活性化を介した血圧上昇は、高アルドステロン状態や蛋白尿を呈する病態において顕著にあらわれることが伺える。興味深いことに、デンマークの研究グループによるヒトの腎組織を用いた報告では $\gamma$ ENaCの切断・活性化はフロセミドを用いた患者（血中アルドステロンが上昇）では認められず、尿蛋白を呈する群でのみ認められたことから、ヒトにおいては特に尿蛋白と高血圧を呈する病態においてSPによるENaC活性化が重要な治療標的となる可能性がある<sup>(11)</sup>。実際に治療抵抗性高血圧を呈する糖尿病性腎症患者に対しアミロライドによる降圧効果が報告されているが、アミロライドは直接的なENaC抑制効果に加えて、ウロキナーゼ活性を抑制する効果を持つため、尿細管腔内でのプラスミノゲンからプラスミンへの移行を阻害することで相加的なENaC抑制効果を発揮する<sup>(12;12)</sup>。我が国ではアミロライドは臨床使用できず、使用可能なENaC阻害薬であるトリアムテレンにはウロキナーゼ抑制効果がないため、ウロキナーゼやプラスミンに対して抑制効果を持つSP阻害薬の併用が有用となる可能性がある。

本研究では糖尿病性腎症において腎臓以外の臓器におけるENaCの活性化とSPの関与を検討することも目的としていた。血管内皮表層のグリコサミノグリカン(GAGs)は陰性荷電を持ち、血液中のNa<sup>+</sup>を電氣的に中和しNa<sup>+</sup>の浸透圧物質作用を抑制するが、血管内皮障害ではGAGs

のNa<sup>+</sup>緩衝作用が失われ、Na<sup>+</sup>が血管内皮細胞のENaC(EnNaC)より細胞内に流入し、細胞の腫大とeNOS活性・NO産生低下が生じ、高血圧の原因となることが報告されている。糖尿病性腎症におけるEnNaCの発現変化の検討を試みたが、今回の実験で用いたreal-time PCRやWestern Blottingの手法では、これまで腎臓におけるENaCを評価できたものの、大動脈でのENaC発現を検出することができなかった。今後はより高感度の検出方法の検討が必要である。

当教室のこれまでの食塩感受性高血圧モデルラットを用いた検討と同様に、本研究においてもSP阻害薬は降圧効果もさることながら、著明な尿蛋白抑制効果を発揮した。我々のpreliminaryな検討ではSP阻害薬の蛋白尿抑制効果は、血管拡張薬ヒドララジンをを用いて同等に血圧を低下させた群よりも優れていた。SP阻害薬は食塩負荷によって生じたポドサイトのアポトーシス・ポドサイトマーカーの発現低下・糸球体の硬化を著明に抑制したことから、食塩感受性高血圧においては何らかのSPが糸球体で活性化され、血圧非依存的にポドサイト傷害を誘導している可能性が考えられた。本研究では標的となるSPの検出、同定には至っておらず今後の検討が必要である。近年、尿蛋白を呈する病態においては糸球体から漏出したプラスミノゲンがポドサイト発現するウロキナーゼによりプラスミンとなり、プラスミンが直接ポドサイトに作用し、酸化ストレス・エンドセリン・スカベンジレセプターの発現亢進を介してポドサイト傷害を誘導することが報告された<sup>(13)</sup>。こうしたプラスミンも最終的には尿中へ漏出すると思われるが、本研究ではSP阻害薬で尿中プラスミン活性が著明に抑制されていたことから、ENaC活性化抑制のみならずポドサイト傷害抑制に対しても保護的に作用している可能性がある。平成27年度の助成研究においては、アルドステロン+食塩負荷ラットの腎組織中において活性が亢進するSPを検出し、蛋白精製と質量分析の手法によりプラスミンと同定し、SP阻害薬の腎保護効果を報告した<sup>(14)</sup>(助成番号1532)。培養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・線維化サイトカインの発現が亢進し、SP阻害薬はこれらを著明に抑制したが、ポドサイトにおいて同様の効果が認められるかは検討しておらず、本研究の結果を踏まえ、今後検討を行う予定である。

## 5. 今後の課題

本研究により進行した糖尿病性腎症のように蛋白尿を伴う病態では、尿中 SP 排泄が亢進し ENaC が活性化されており、食塩過剰摂取において高血圧が誘導されるが、SP 阻害薬は尿中 SP 活性の低下により降圧効果を持つこと、さらにポドサイトのアポトーシス抑制効果により著明な尿蛋白抑制効果を持つことが明らかとなった。しかし本研究ではポドサイト傷害を誘導する SP は未同定であり、この SP 群を同定し特異的阻害薬を用いた新規尿蛋白抑制療法の開発は今後の検討課題である(助成番号 1724)。

## 6. 文献

- (1) Adachi M, Kitamura K, Miyoshi T, Narikiyo T, Iwashita K, Shiraishi N, Nonoguchi H, Tomita K. Activation of epithelial sodium channels by prostaticin in *Xenopus* oocytes. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(6):1114-1121.
- (2) Narikiyo T, Kitamura K, Adachi M, Miyoshi T, Iwashita K, Shiraishi N, Nonoguchi H, Chen LM, Chai KX, Chao J, Tomita K. Regulation of prostaticin by aldosterone in the kidney. *J Clin Invest* 2002; 109(3):401-408.
- (3) Carattino MD, Hughey RP, Kleyman TR. Proteolytic processing of the epithelial sodium channel gamma subunit has a dominant role in channel activation. *J Biol Chem* 2008; 283(37):25290-25295.
- (4) Uchimura K, Kakizoe Y, Onoue T, Hayata M, Morinaga J, Yamazoe R, Ueda M, Mizumoto T, Adachi M, Miyoshi T, Shiraishi N, Sakai Y, Tomita K, Kitamura K. In vivo contribution of serine proteases to the proteolytic activation of gammaENaC in aldosterone-infused rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012; 303(7):F939-F943.
- (5) Svenningsen P, Bistrup C, Friis UG, Bertog M, Haerteis S, Krueger B, Stubbe J, Jensen ON, Thiesson HC, Uhrenholt TR, Jespersen B, Jensen BL, Korbmacher C, Skott O. Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20(2):299-310.
- (6) Kakizoe Y, Kitamura K, Ko T, Wakida N, Maekawa A, Miyoshi T, Shiraishi N, Adachi M, Zhang Z, Masilamani S, Tomita K. Aberrant ENaC activation in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* 2009; 27(8):1679-1689.
- (7) Maekawa A, Kakizoe Y, Miyoshi T, Wakida N, Ko T, Shiraishi N, Adachi M, Tomita K, Kitamura K. Camostat mesilate inhibits prostaticin activity and reduces blood pressure and renal injury in salt-sensitive hypertension. *J Hypertens* 2009; 27(1):181-189.
- (8) Oxlund CS, Buhl KB, Jacobsen IA, Hansen MR, Gram J, Henriksen JE, Schousboe K, Tarnow L, Jensen BL. Amiloride lowers blood pressure and attenuates urine plasminogen activation in patients with treatment-resistant hypertension. *J Am Soc Hypertens* 2014; 8(12):872-881.
- (9) Kusche-Vihrog K, Jeggle P, Oberleithner H. The role of ENaC in vascular endothelium. *Pflugers Arch* 2014; 466(5):851-859.
- (10) Katunuma N, Le QT, Miyauchi R, Hirose S. Double-layer fluorescent zymography for processing protease detection. *Anal Biochem* 2005; 347(2):208-212.
- (11) Zachar RM, Skjodt K, Marcussen N, Walter S, Toft A, Nielsen MR, Jensen BL, Svenningsen P. The epithelial sodium channel gamma-subunit is processed proteolytically in human kidney. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26(1):95-106.
- (12) Svenningsen P, Andersen H, Nielsen LH, Jensen BL. Urinary serine proteases and activation of ENaC in kidney--implications for physiological renal salt handling and hypertensive disorders with albuminuria. *Pflugers Arch* 2015; 467(3):531-542.
- (13) Raji L, Tian R, Wong JS, He JC, Campbell KN. Podocyte injury: the role of proteinuria, urinary plasminogen, and oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 2016; 311(6):F1308-F1317.
- (14) Kakizoe Y, Miyasato Y, Onoue T, Nakagawa T, Hayata M, Uchimura K, Morinaga J, Mizumoto T, Adachi M, Miyoshi T, Sakai Y, Tomita K, Mukoyama

M, Kitamura K. A serine protease inhibitor attenuates aldosterone-induced kidney injuries via the suppression

of plasmin activity. *J Pharmacol Sci* 2016; 132(2):145-153.



## The Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension in Diabetic Nephropathy and Novel Antihypertensive Therapy Using Its Inhibitors

Yutaka Kakizoe<sup>1</sup> and Kenichiro Kitamura<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kumamoto University, <sup>2</sup>University of Yamanashi

### Summary

Chronic kidney disease caused by diabetic nephropathy (DN) is characterized by proteinuria, Na retention and hypertension. In the setting of proteinuria, serine protease such as plasmin filtered through damaged glomeruli could activate the epithelial Na channel (ENaC) leading to hypertension, independently of aldosterone. In this study, we evaluated effects of a synthetic serine protease (SP) inhibitor (SPI), camostat mesilate which inhibits the plasmin activity, on salt-sensitive hypertension in a rat model of DN with high-salt (HS) diet. In addition, we studied protective effects of SPI against podocyte injury in vitro.

Five-week-old SHR and control WKY were divided into WKY, SHR, and SHR+SPI (Experiment 1), and 13-week-old SHR/ND mcr-cp (model rats for DN) were divided into normal chow (NS), HS (8.0% NaCl diet), and HS+SPI (Experiment 2). After systolic BP measurement and 24h urine collection were performed for 4 weeks, rats were sacrificed for histological examination. Urinary serine proteases were evaluated by zymography and immunoblotting.

In Experiment 1, although SHR displayed hypertension, either urinary protein excretion nor urinary serine proteases were not substantially increased. Accordingly, SPI did not prevent hypertension in SHR. In Experiment 2, HS diet induced severe hypertension, marked proteinuria and plasmin activation as well as prostasin excretion in urine in SHR/ND mcr-cp. These changes were significantly suppressed by the treatment with SPI. SPI increased urinary sodium/potassium ratio, indicating that SPI inhibited the ENaC activity. Furthermore, SPI mitigated glomerular injuries by suppressing apoptosis of podocytes.

In conclusion, SPI could exert significant antihypertensive and renoprotective effects in a rat model of DN with HS diet, suggesting that SP inhibition could be a new therapeutic strategy against salt-sensitive hypertension in DN.