

## 食塩感受性高血圧において糸球体上皮細胞傷害を誘導する セリンプロテアーゼの検索と新規尿蛋白抑制療法の検討

柿添 豊

熊本大学大学院生命科学研究部腎臓内科学分野

**概要** 高血圧は慢性腎臓病(CKD)の主たる増悪因子であるが、特に食塩感受性高血圧(SSHT)においては尿蛋白を伴うことが多く、腎機能障害の進行が早い。糸球体上皮細胞(ポドサイト)は糸球体のバリア機能に重要であり、その傷害は蛋白尿の主因となる。申請者はこれまで腎尿細管の上皮型 Na チャネルとその活性化因子であるセリンプロテアーゼの SSHT における役割について検討を行い、セリンプロテアーゼ阻害薬(SPI)の降圧効果を報告してきた。また SSHT モデルラットの腎組織中でセリンプロテアーゼ・プラスミンが活性化されており、腎間質の線維化を誘導することを報告した。さらに SSHT ラットにおいて SPI は著明な尿蛋白減少作用を持つが、ポドサイト傷害を誘導する SP は不明であった。

本研究の目的は、食塩負荷によるポドサイト傷害に関与する SP を尿中より同定し、SPI が SSHT における尿蛋白減少効果を持つ新規 CKD 治療薬となる可能性を検討することである。

合成 SPI であるメシル酸カモスタット(CM)を用い、Dahl 食塩感受性ラットを、Control 群、HS (8.0% NaCl 食)群、HS+CM (0.1%混餌)群に分け、血圧測定と24時間蓄尿を行ない7日間飼育し、蛋白尿、組織学的変化、SP 活性を評価した。Day7 では HS による有意な血圧変化を認めなかったが、既に HS により尿中のアルブミン排泄は亢進しており、CM はこれを著明に抑制した。HS による糸球体過剰濾過を反映し Ccr が増加したが、CM による変化は認めず、糸球体内血行動態に非依存的なアルブミン尿減少効果と考えられた。HS により尿中のプラスミン活性の亢進を認め、CM はこれを抑制した。より早期の HS 負荷後 Day1-2 においては、HS 群の尿中にプラスミンやその他の SP 活性の亢進を認めなかったが、尿中アルブミン排泄は増加しており、CM はアルブミン排泄を抑制した。

これらの結果から、CM の糸球体保護効果の一部はプラスミン活性抑制によることが示唆された。SPI が SSHT において降圧のみならず尿蛋白減少効果を持つ新規 CKD 治療薬となる可能性が示唆された。

### 1. 研究目的

高血圧は慢性腎臓病(CKD)の主たる増悪因子であるが、特に食塩感受性高血圧(SSHT)においては尿蛋白を伴うことが多く、腎機能障害の進行が早い。糸球体上皮細胞(ポドサイト)は糸球体のバリア機能に重要であり、その傷害は蛋白尿の主因となる。

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おり、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)・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、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、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>。

また、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ている<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(CM)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>。

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 80kDa)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ている<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(SPI)が ENaC 活性と高血圧を抑制することを報告した<sup>(6,7)</sup>。

また SSHT モデルラットの腎組織中でセリンプロテアーゼ・プラスミンが活性化されており、腎間質の線維化を誘導することを報告した(J Pharmacol Sci 2016, 助成番号 1532)。これまでに SSHT ラットにおける SPI の著明な尿蛋白減少効果を確認しているが、ポドサイト傷害を誘導する SP は不明であり、未解決な問題として残されていた。

現在進行中の研究において、SSHT ラットでは、尿中に複数の SP の活性亢進を認め、アルブミン尿、糸球体硬化を呈し、SPI は SP 活性の抑制とともに降圧効果非依存的にポドサイトのアポトーシスを抑制し腎障害を軽減した(助成番号 1632)。さらに SSHT ラットでは食塩負荷開始後早期の血圧上昇を認める前からアルブミン尿を呈し、SPI は尿中アルブミン排泄を著明に抑制した。このことから、SSHT では食塩負荷早期より糸球体内で何らかの SP が活性化され、ポドサイト傷害を惹起するとともに、その後 SP は尿中に排泄されていると考えられる。

本研究の目的は、食塩負荷によるポドサイト傷害に関与する SP を尿中より同定し、SPI が SSHT における降圧のみならず尿蛋白減少効果を持つ新規 CKD 治療薬となる可能性を検討することである。さらに高血圧・腎疾患患者において、尿中 SP が病態・疾患活動性・治療効果判定のバイオマーカーとなる可能性を検討する。

## 2. 研究方法

### 2.1 糸球体上皮細胞(ポドサイト)傷害を誘導する SSHTラット尿中SPの探索・同定

4 週齢の Dahl 食塩感受性ラットに 0.3%NaCl 食(NS)、8.0%NaCl 食(HS)、HS+合成 SPI 混餌(HS+CM)を開始し、連日蓄尿と血圧測定(tail cuff)を行い7日間飼育した。尿中 SP 活性は SP 特異的な合成基質を用いた double layer fluorescent zymography(DLFZ)法で観察した<sup>(8)</sup>。HS による早期ポドサイト傷害(尿の銀染色でアルブミン尿を指標とする)と SPI による SP 活性抑制・アルブミン尿減少効果を確認できた時点で、尿サンプルを十分に収集し、尿中 SP の同定に使用した。DLFZ で SP 活性を確認した後、同じゲルを用いて Western blotting を施行し SP の同定を行った。

### 2.2 SSHT ラットにおける糸球体内 SP の局在評価とポドサイト傷害の分子機序解明

SSHT において実験 1 で同定した SP によるポドサイト傷害の分子機序を解明するため、光学顕微鏡にて腎臓の組織学的変化を、real-time PCR にてポドサイト傷害マーカーの発現変化を確認した。また、SP の腎臓での局在性と SPI による変化・反応性を確認するため腎臓の免疫染色を行い検討した。

## 3. 研究結果

### 3.1 SSHT ラットにおける SPI の降圧非依存的な尿蛋白抑制効果の検討

食塩負荷開始後 1 週間の時点では、NS、HS、HS+CM の 3 群間で食事摂取量や体重に有意差は認めなかった。食塩負荷を反映して、HS 群では尿量の増加を認めたが、HS+CM 群での有意な変化はなく、血圧も 3 群間で差を認めなかった(Figure 1)。

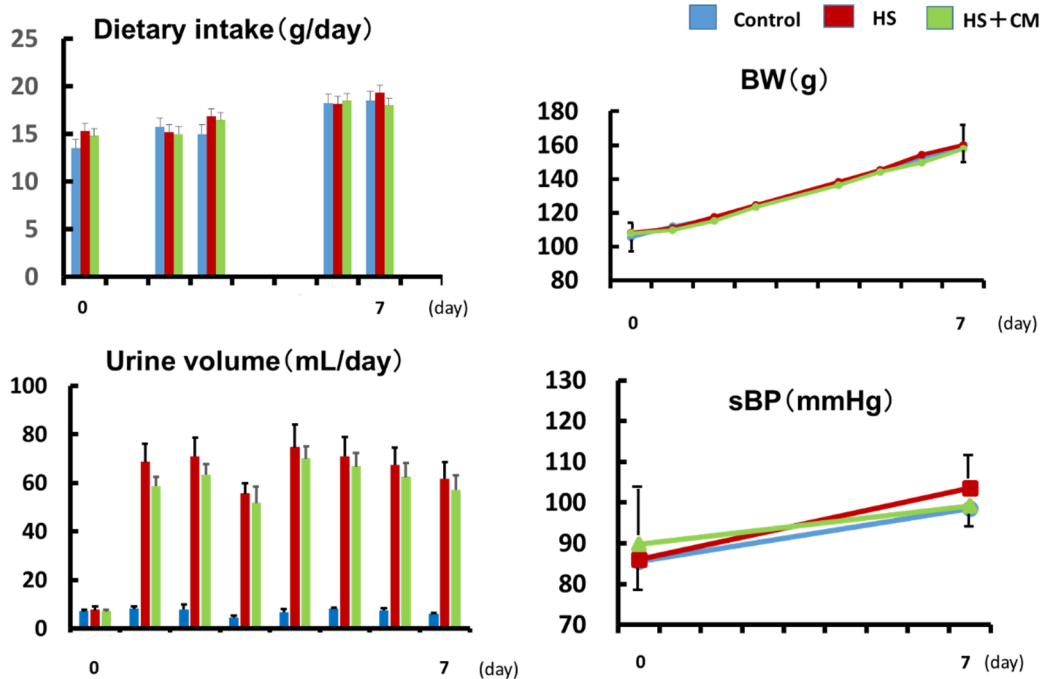
食塩負荷により糸球体過剰ろ過を反映しクレアチニンクリアランス(Ccr)の増加を認めたが、CM による変化は認めなかった。しかし、CM は食塩負荷による尿蛋白の増加を著明に抑制しており、銀染色でも同様に尿中アルブミン排泄を抑制した(Figure 2)。

### 3.2 ポドサイト傷害を誘導する SSHT ラット尿中 SP の探索・同定

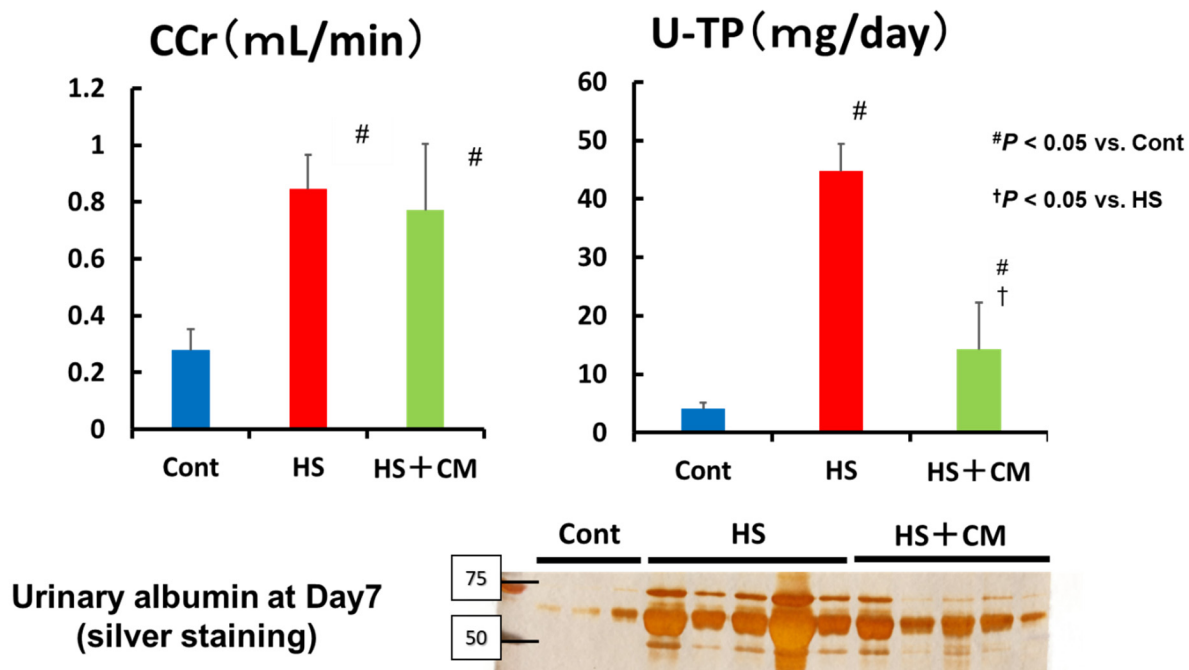
DLFZ 法にてプロテアーゼ活性を確認したところ、腎組織中では有意な変化を認めることはできなかったが、Day7 の尿中では HS 群で約 80kD のプロテアーゼの活性を認め、CM はこれを抑制した。DLFZ を行った後、同じゲルを用いて Western Blotting を行いこのプロテアーゼがプラスミンであることを同定した(Figure 3)。

さらに食塩負荷開始直後 (Day1-2) での評価を行うと、すでに HS で尿中アルブミンの増加を認めており、CM はこれを有意に抑制した。しかしながら、Day7 で認められた

尿中 SP 活性の変化は捉えることができなかった (Figure 4)。



**Figure 1.** Comparison of change in dietary intake, urine volume, body weight, blood pressure during 1 week after salt loading



**Figure 2.** The effect of CM on Ccr and urinary protein in Dahl S rats with high-salt diet

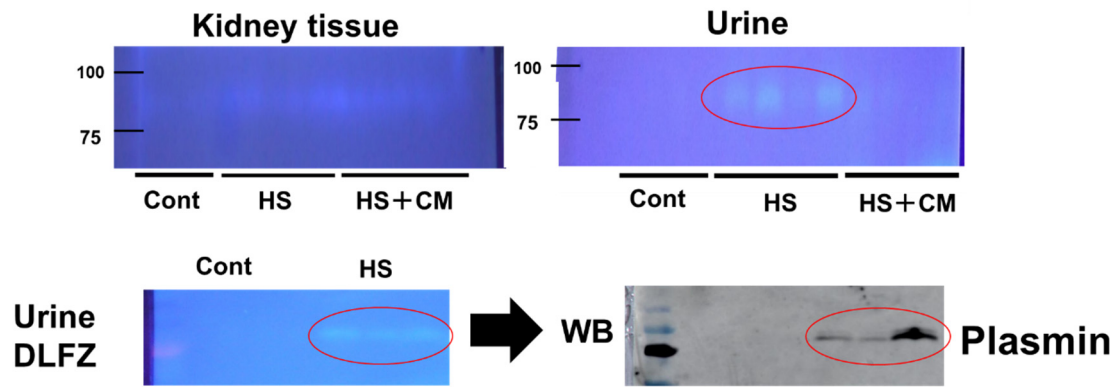


Figure 3. Serine protease activities at Day 7 (DLFZ)

Urinary SP activity in HS group was strongly enhanced at Day 7 when renal SP was not clearly activated. The treatment with CM suppressed urine plasmin activation by HS diet.

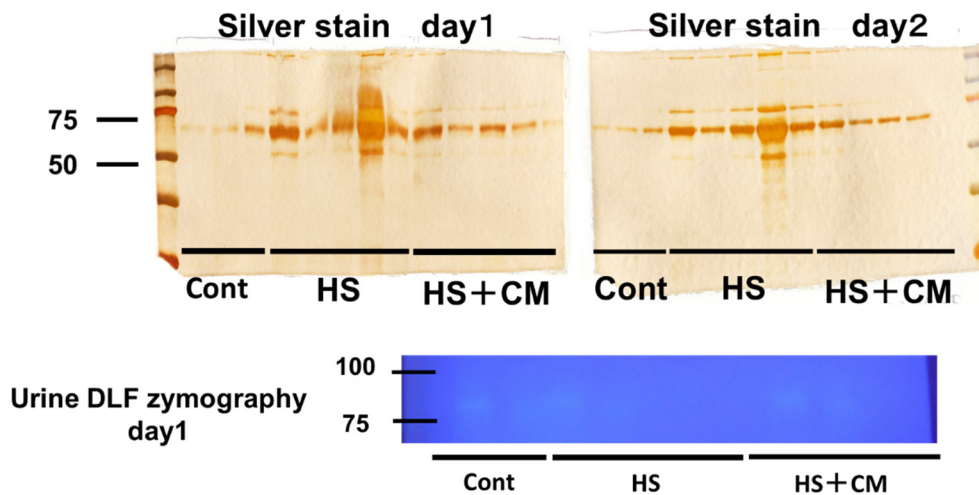


Figure 4. Urinary protein and Serine Protease changes after salt roading at early phase

CM suppressed albuminuria as early as at Day 1-2 even when any apparent activation of urinary plasmin was not detected.

### 3. 3 SSHTラットにおけるSPの局在とポドサイト傷害の分子機序解明

光学顕微鏡にて腎臓組織の評価を行ったが、食塩負荷開始後 1 週間の時点では明らかな組織学的変化は認められなかった (Figure 5)。real-time PCR では、有意なポドサイト傷害マーカーの発現変化は捉えられなかった (Figure 6)。

抗プラスミノーゲン抗体を用い腎臓組織の免疫染色 (蛍光抗体法) を行ったところ、HS 群で糸球体内に一部染色性を認めた。CM でも一部染色を認めたが、HS と比較しその程度は弱いものであった (Figure 7)。

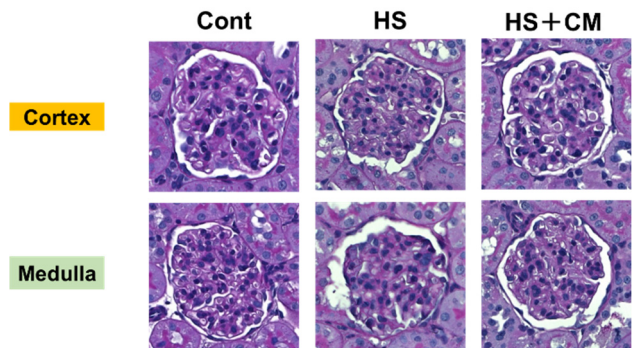


Figure 5. Renal histology

Histological changes in glomeruli were not apparent at Day 7.

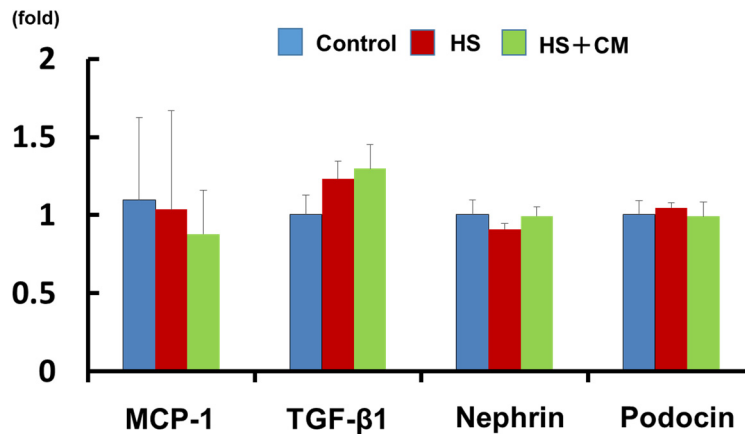


Figure 6. Renal injury markers in cortex (real-time PCR)

There were little changes in the expression of kidney injury markers among 3 groups.

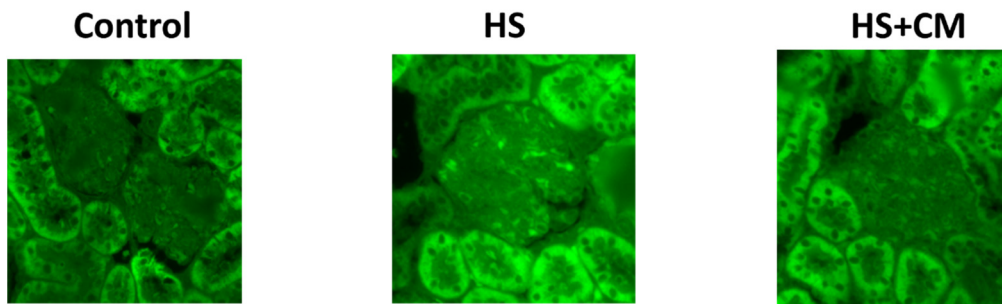


Figure 7. Plasminogen immunofluorescence staining

#### 4. 考 察

今回の研究では、SSHT モデルラットの尿中で活性亢進を認めるSPをプラスミンであると同定した。平成27年度の助成研究において、アルドステロン+食塩負荷ラットの腎組織中で活性が亢進する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、SPIの腎保護効果を報告した(助成番号1532)<sup>9)</sup>。また、近年、*in vitro*での検討で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ている<sup>10)</sup>。今回の研究においても同様にHS群で血圧が上昇するより早期の段階で尿中プラスミン活性の亢進を認め、SPI(CM)はそれを著明に抑制しており、CMはSP(プラスミン)の直接的なポドサイト傷害誘導に対して保護的

に働いたことが、降圧非依存的・糸球体血行動態非依存的に尿蛋白が減少した要因の一つであると考えられた。

この結果から、SPIがSSHTにおける降圧のみならず尿蛋白減少効果を持つ新規CKD治療薬となる可能性が示唆されるが、Day1やDay2といったより早期の段階では今回用いた手法では明らかな尿中SP活性の変化を捉えることができなかった。また、プラスミンのポドサイト局所での反応に関しても、十分に証明できてはおらず、SPがポドサイト傷害をどのように誘導しているのか、明らかな機序の解明には至っていない。

これまで当教室では合成SP阻害薬がSSHTモデルラットにおいてポドサイトのアポトーシスを著明に抑制することを確認している(助成番号1632)。また、SPは直接的な蛋白分解のみならず、特異的な受容体protease activated receptor (PAR)の活性化を介して炎症・アポトーシス等の細胞傷害シグナルを誘導することが報告されている。ポド

サイトには PAR-1,2 が発現しており、SP によるポドサイト傷害に対して PAR 活性化が関与しているかの検討も必要である。

また、高血圧・腎疾患患者において、尿中 SP が病態・疾患活動性・治療効果判定のバイオマーカーとなる可能性を検討するためには、他の SSHT モデルや高血圧関連疾患モデル以外の腎疾患モデル動物においても同様に SP が活性化しているかを確認し、SP が普遍的に活性化およびポドサイト傷害に関与しているかについて検討を行い、病勢と SP 活性の経時的な変化を捉えていく必要性がある。

## 5. 今後の課題

前述の通り、SP がポドサイト傷害をどのように誘導しているのか、明らかな機序の解明には至っていない。プラスミンを含めた標的 SP の活性化機序を検討するため、標的 SP のみではなく、その上流に位置する SP 群について発現および活性調整の機序を WB 法、real-time PCR 法、DLFZ 法で検討する。さらに標的 SP の内因性インヒビター (serpin) が明らかとなれば、その serpin の糸球体での発現状況についても検討を行う必要がある。

今回使用した CM を含め、これまで使用している SPI は SP に対する特異性が高いものではないため、獲得された治療効果が標的 SP を阻害したことによる効果であるかは不明である。今回同定されたプラスミンを含め特異的阻害薬の入手や SSHT モデル動物に対しての投与を現在検討中である。

また、各種腎疾患における新規尿中バイオマーカーを探索するため倫理委員会の承認のもと、患者の尿検体を収集中であるが、まだ十分な検体数の確保には至っていない。検体が揃った段階で、メタボリック症候群、糖尿病性腎症などの SSHT・尿蛋白を呈する患者の尿を抽出し、動物実験と同様の尿中 SP 活性亢進の有無を確認する。さらに尿中 SP 活性を臨床経過と併せて評価し、病勢や予後予測のマーカーとなる可能性を引き続き今後の検討課題とする。

## 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 prostasin 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 prostasin 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, Thieson 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 prostasin activity and reduces blood pressure and renal injury in salt-sensitive hypertension. *J Hypertens* 2009; 27(1):181-189.

(8) Katunuma N, Le QT, Miyauchi R, Hirose S. Double-layer fluorescent zymography for processing protease detection. *Anal Biochem* 2005;

347(2):208-212.

- (9) 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.
- (10) Rajj 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.

## Identification of Serine Proteases That are Involved in Podocyte Injuries in Salt-Sensitive Hypertension and Its Application for Anti-Proteinuria Treatment

Yutaka Kakizoe

Department of Nephrology, Kumamoto University Graduate School of Life Sciences

### Summary

**Background:** We previously reported that an orally active synthetic serine protease (SP) inhibitor, camostat mesylate (CM), suppressed epithelial sodium channel (ENaC) activation by SPs and exerted an antihypertensive effect in Dahl salt-sensitive (DS) rats. Furthermore, CM significantly attenuated proteinuria even before it exerted BP lowering effect, suggesting that some SPs are involved in glomerular injuries independently of BP. Recently, it was reported that plasminogen filtered through damaged glomeruli was activated to plasmin by uPA on the surface of podocytes, and that plasmin could directly cause podocyte injuries. We conducted this study to identify SPs which could be associated with glomerular injuries and to explore therapeutic effects of SP inhibition on glomerular injuries in salt-sensitive hypertension.

**Methods:** Four-week-old male DS rats were divided into following three groups: control group (0.3% NaCl), high-salt (HS) group (8% NaCl diet), and HS + CM group (HS + 0.1%CM diet). After systolic BP measurement and 24h urine collection were performed, rats were sacrificed at day 7. SP activities were evaluated by zymography.

**Results:** HS group did not develop hypertension and obvious renal histological changes but displayed significant proteinuria at day 7, which was attenuated in HS+CM (Urinary TP (mg/day); control  $4.09 \pm 1.17$ , HS  $42.01 \pm 3.72$ , HS+CM  $14.31 \pm 7.63$ ). CM did not mitigate glomerular hyperfiltration reflected by increased creatinine clearance (Ccr) with salt loading (Ccr (ml/h); control  $0.3 \pm 0.1$ , HS  $0.8 \pm 0.1$ , HS+CM  $0.8 \pm 0.2$ ). Urinary plasmin activation was induced by HS, which was substantially inhibited by CM. Furthermore, CM also suppressed albuminuria as early as at day 1-2 even when any apparent activation of SPs was not detected in urine.

**Conclusions:** Our current study indicates that plasmin and other unknown SPs would be involved in the pathogenesis of glomerular injuries, suggesting that SP inhibition could be a new strategy for the treatment of renal injuries in salt-sensitive hypertension.