食塩感受性と腎障害の分子機構

北村 健一郎

要 旨

現在、腎・高血圧疾患の克服は医療にとって重要な課題であるにもかかわらず、その治療選択肢は十分とはいえない。私たちはこれまでに、食塩感受性高血圧症および慢性腎臓病（chronic kidney disease：CKD）の発症進展メカニズムにおいてセリンプロテアーゼが非常に多彩で重要な役割を果たしていることを多くの基礎的検討から明らかにしてきた。そして、セリンプロテアーゼ阻害薬が実験動物モデルにおいて降圧効果ならびに腎障害進展抑制効果を発揮することも示してきた。本稿では、腎・高血圧疾患の病態におけるセリンプロテアーゼの関与について、私たちの研究成果を中心に紹介する。

〔日内会誌 105：300～306, 2016〕

Key words セリンプロテアーゼ, 上皮型Naチャネル, 食塩感受性高血圧, 慢性腎臓病, 尿細管間質線維化

はじめに

高血圧症は先進国の成人人口の約25%に発症し、脳卒中や心筋梗塞、心不全、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。このように高血圧症が種々の疾患の重要な原因であることは十分解明されているが、多くの高血圧症の原因はいまだ不明である。長期的な血圧レベルの決定には血圧調節機構のうち腎臓によるNa（ナトリウム）排泄と体液量の調節が最も重要であり、高血圧患者の90%以上を占める本態性高血圧症においてもその病因に腎臓が寄与する証拠が得られている。通常、腎臓は1日で血漿を170 l以上も濾過しており、体内の塩分バランスの恒常性を維持するために腎臓は濾過された塩分の99.5%を再吸収しなければなら

ない。この腎臓でのNaCl（塩化ナトリウム）再吸収は種々のイオンチャネルや交換輸送体、トランスポーターの協調的な作用により達成されている（図1）。糸球体で濾過されたNaClの70%は近位尿細管で主に Na^+/H^+ 交換輸送体（NHE）により再吸収される。続いてHenleの太い上行脚では、20%のNaClが $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共輸送体（NKCC2）により再吸収される。さらに遠位尿細管で5%のNaClが Na^+-Cl^- 共輸送体（NCC）により吸収され、残りの4%が皮質集合尿細管の上皮型Naチャネル（ENaC）で再吸収される。この最後のNaCl再吸収のステップはNaCl再吸収量全体のわずか4%にすぎないが、皮質集合尿細管は最終的なNaバランスを決定する場所であり、ここに発現するENaCの活性は各種ホルモンにより厳密にコントロールされている。こ

山梨大学内科学講座第3教室

The Cutting-edge of Medicine；Molecular basis of salt-sensitivity and renal injury.

Kenichiro Kitamura：Third Department of Internal Medicine, University of Yamanashi School of Medicine, Japan.

図1 尿細管各セグメントにおけるNa再吸収機構

AQP1: aquaporin 1, CLCNKB: chloride channel Kb, ROMK: renal outer medullary potassium channel, WNK4: WNK lysine deficient protein kinase 4, sgk: serum- and glucocorticoid-regulated kinase, MR: mineralocorticoid receptor, HSD2: hydroxysteroid dehydrogenase 2

のネフロンにおけるそれぞれのNa再吸収のステップやENaCの活性を調節する因子に突然変異が生じることによって重症高血圧症が発症することが明らかとなっている。遺伝性食塩感受性高血圧症の1つであるLiddle症候群においてENaCのgain-of-function mutationが発見されたことから、集合尿細管におけるNa再吸収と高血圧症の強い因果関係が示唆されている。このような高血圧が長期間続くと、血管内皮障害から糸球体高血圧を来とし、糸球体硬化などの糸球体障害を惹起するようになる。糸球体障害は、濾過されたアルブミンや高分子蛋白による直接的な障害や糸球体から漏れてくるサイトカインや増殖因子による障害、尿細管間質の慢性的な低酸素による障害などにより、二次的に尿細管障害を生じることが知られている。このよ

うな間質障害の進展メカニズムにTGF- β (transforming growth factor- β) を介したシグナル伝達機構が深く関与していることは多くの研究によって証明されている。私たちは、これまでにENaCを介する食塩感受性高血圧症および高血圧性腎障害、尿細管間質線維化のメカニズムに種々のセリンプロテアーゼが関与していることを明らかにしてきた。本総説では、それらについて私たちのデータを中心に紹介したい。

1. プロスタシンによるENaCの活性化

遺伝性食塩感受性高血圧の1つであるLiddle症候群の責任遺伝子であるENaCは皮質集合尿細管主細胞の管腔側細胞膜上に発現するチャンネルで、アルドステロンの下流に存在して尿細管

におけるNa再吸収を担っている。1994年にスイスのBernard Rossierらのグループは、ENaCのcDNA (complementary deoxyribonucleic acid) をクローニングし、ENaCが α , β , γ の3つの相動性の高いサブユニットから構成され、各サブユニットが細胞外に大きなループを持つ2回膜貫通型の蛋白質であることが明らかとなった¹⁾。現在、ENaCの α , β , γ サブユニットは1:1:1の構成比で3量体を形成して機能していると考えられている。このチャンネルは低濃度のアミロライドにより抑制され ($K_i < 0.5 \mu\text{M}$)、ナトリウムに対し高選択性をもち ($P_{\text{Na}}/P_{\text{K}} > 10$)、チャンネルコンダクタンスは小さく (4~5 pS)、ゆっくりとした開閉機構 (平均開口時間2~5秒) をもつ。チャンネル活性はアルドステロンおよび抗利尿ホルモンによって厳密に調節され、生体のNa代謝および血圧調節に重要な役割を果たしている。このENaCのSNPs (single nucleotide polymorphisms) が本態性高血圧と関連するという報告がなされ、Liddle症候群のみならず本態性高血圧症へのENaCの関与が注目されている。

プロスタシンは、1994年に米国のJulie Chaoらのグループがヒト精液より精製した分子量40 kDaのトリプシン様酵素活性をもつセリンプロテアーゼである²⁾。腎臓以外にも前立腺や膀胱、肺、大腸など、多くの上皮組織に発現が認められる。1995年にcDNAがクローニングされ、light chainおよびheavy chainから構成されるGPI (glycosylphosphatidylinositol)-anchored proteinであることが判明した。1997年にRossierらのグループがENaCを活性化するセリンプロテアーゼとしてCAP-1 (channel-activating protease-1) をクローニングし、そのmammalian homologueがプロスタシンであることが判明した³⁾。腎臓においてプロスタシンは集合尿細管および近位尿細管の管腔側膜に多く発現している。私たちはプロスタシンがENaCを活性化するという仮説を立て、アフリカツメガエル卵母細胞にプロスタシンとENaCを共発現させたとき

るアミロライド感受性Na電流が約2~3倍に増加することが判明し、この活性化はセリンプロテアーゼ阻害薬であるアプロチニンの前投与で完全に抑制された (図2A)⁴⁾。このことはプロスタシンのセリンプロテアーゼ活性がENaCの活性化に關与していることを示唆する。米国のThomas Kleymanらのグループは、セリンプロテアーゼのfurinとプロスタシンがENaC γ サブユニットの細胞外ループのN末端側に存在する内因性活性抑制ペプチド (43アミノ酸) を二重切断により切り離し、チャンネルを活性化するという詳細な分子メカニズムを*in vitro*の系を用いて明らかにした⁵⁾。現在では、この切断がチャンネルの成熟および活性化に必須のステップであると考えられている (図2B)。

2. アルドステロンによるENaC活性化におけるプロスタシンの関与

ラットにアルドステロンを投与するとENaCの発現が誘導され、Na再吸収の亢進が認められる。このとき、腎臓の尿細管においてENaCの各サブユニットの発現をウエスタンブロットで検討すると、 α サブユニットの発現増強を認めるが、 β サブユニットの発現量には変化を認めなかった。 γ サブユニットは、非刺激時には85 kDaのバンドとして同定されるが、アルドステロン刺激によって85 kDaのバンドが減少し、新たに70 kDaのバンドが出現する。先述のKleymanらの*in vitro*の実験結果から、この現象は γ サブユニットがfurinとプロスタシンによって切断を受けたことを反映しており、85 kDaは前駆体、70 kDaは活性型のENaCであると考えられている。しかしながら、このENaC γ サブユニットのプロセッシングを*in vivo*で検証した報告はなかった。私たちは、SD (Sprague Dawley) ラットにアルドステロンを負荷したモデルを用いて、強力なプロスタシン阻害活性をもつ合成セリンプロテアーゼ阻害薬であるメシル酸カモスタット

図2 プロスタシンによるENaCの活性化機構

A：アフリカツメガエル卵母細胞にENaCおよびプロスタシンを発現させた際のNa電流

B：フーリンとプロスタシンによるγサブユニットの二重切断を介したENaC活性化機構の模式図

(CM) がENaC γサブユニットのプロセッシングを抑制し、チャネル活性を著しく阻害することを *in vivo* で初めて明らかにした⁶⁾(**図3A**)。私たちは、アルドステロンが腎臓におけるプロスタシンの発現を増強することをラットならびに原発性アルドステロン症患者において報告しており、プロスタシンがENaCを活性化するという事実とともに考え合わせると、プロスタシンはアルドステロン過剰の病態において高血圧の発症に深く関与していることが想定され、CMのよう

なセリンプロテアーゼ阻害薬が新規作用機序の降圧利尿薬になり得る可能性が示唆された。

3. 食塩感受性高血圧症とセリンプロテアーゼ

私たちは、食塩感受性高血圧モデルである Dahl食塩感受性 (DS) ラットを用いて、ENaCおよびプロスタシンの発現レベルを検討したところ、高食塩負荷4週後には著明な血圧の上昇と

図3 食塩感受性高血圧症におけるセリンプロテアーゼの関与

A: アルドステロン刺激時のENaCγサブユニットの切断およびメシル酸カモスタットによる部分抑制

B: Dahl食塩感受性高血圧ラットにおけるENaCの活性化とプロスタシン発現の亢進

C: Dahl食塩感受性高血圧ラットにおけるメシル酸カモスタットの降圧効果

ともにENaCβ, γサブユニットとプロスタシンの発現増強およびγサブユニットの70 kDaへのプロセッシングの亢進を認めた⁷⁾(図3B)。通常、高食塩食負荷下ではアルドステロンの抑制が認められるにもかかわらず、DSラットではなぜENaCとプロスタシンの発現増強を認めるのかは明らかにできていないが、高食塩食負荷によるミネラルコルチコイド受容体の奇異的な活性化が原因かもしれない。高食塩食負荷による著明な高血圧は、ENaCの直接の阻害薬であるアミロライドはもちろん、プロスタシンの阻害薬であるCMの投与によっても有意に改善したことから(図3C)、CMは食塩感受性高血圧症においてプロス

タシン活性を阻害することによってENaCを介したNa再吸収を抑制し、その結果血圧を低下させることが示された。また、CMはこのモデルラットにおいて蛋白尿ならびに糸球体硬化、間質線維化を有意に抑制していた。興味深いことに、蛋白尿の改善効果は血圧の改善よりも早期に認められ、CMには降圧非依存的な蛋白尿改善効果がある可能性も示唆された。

4. 慢性腎臓病(chronic kidney disease: CKD)の進展とセリンプロテアーゼ

腎疾患においてCMが蛋白尿抑制効果を呈し、

図4 腎障害の進展におけるセリンプロテアーゼの関与

A：慢性腎不全モデルラットの蛋白尿および血清Cr値に対するメシル酸カモスタットの効果

B：慢性腎不全モデルラットの糸球体ネフリン発現および腎組織内酸化ストレスに対するメシル酸カモスタットの効果

C：一側尿管結紮モデルラットの腎間質線維化に対するメシル酸カモスタットの効果

腎保護的に作用する可能性があるとする報告は複数みられるものの、実際にCMが蛋白尿ならびにCKDの進展を抑制するか否かについての検討はいまだなされていなかった。そこで私たちは、5/6腎摘 (Nx) ラットを用いてCKDに対するCMの効果を検討した。その結果、Nx群において認められた尿蛋白増加、血清Cr (クレアチニン) 値上昇、糸球体硬化および間質線維化をCMは有意に抑制することが明らかとなった⁸⁾ (図4)。CMは、糸球体におけるネフリン発現を回復させ、腎組織における線維化マーカー、炎症マーカー、NADPH (reduced form of NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)) オキシダーゼ構成蛋白の発現、ROS (reactive oxygen species) 産生、単球/マクロファージ浸潤を全て低下させ、腎保護効果を発揮していること

が明らかとなった。これらの事実は、CKDの進展メカニズムの多くにセリンプロテアーゼが関与していることを強く裏づけるものである。残念ながら、CMは比較的広い範囲のセリンプロテアーゼに対して酵素活性阻害効果を呈するため、CKDの進展に寄与するセリンプロテアーゼの同定には至っていない。また、私たちはアデニン誘発性慢性腎不全ラットにおいても、CMは同様の腎保護効果を呈することを報告しており⁹⁾、CKDの普遍的な進展にセリンプロテアーゼが関与していることが示唆されている。CKDでは腎間質の線維化が重要な予後規定因子であり、この病態におけるセリンプロテアーゼの関与についても私たちは検討を加えた。SDラットに一側尿管結紮による間質の線維化を誘導してCMの効果を検討したところ、CMは著明な線維

化の改善とMMP-2 (matrix metalloproteinase) の発現抑制, TGF- β 1の活性化阻害とそれに引き続くTGF- β 1のシグナル抑制を示した¹⁰⁾。また, 腎由来の線維芽細胞を用いた系においてもCMはTGF- β 1刺激後のsmad2やERKリン酸化を有意に抑制し, CTGF (connective tissue growth factor) やPAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), α SMA (α -smooth muscle actin) の発現を抑制した。これらの結果から, CMはTGF- β 1の活性化とそのシグナル経路を直接的に阻害することで抗線維化作用を発揮する可能性が示唆された。

おわりに

これまで示した研究結果から, 食塩感受性高

血圧, アルドステロンによる腎障害, CKD, 腎線維化などの様々な病態においてセリンプロテアーゼが重要な役割を果たしており, セリンプロテアーゼ阻害薬が様々な作用機序を介して降圧効果ならびに腎保護効果を発揮することが明らかとなった。セリンプロテアーゼ阻害薬を腎・高血圧疾患の治療薬と位置づけるためには, さらなる基礎的, 臨床的なデータの蓄積が必要である。現在, 私たちが手にしている腎・高血圧治療の選択肢は十分とはいえない。しかし, 今後この領域の研究が飛躍的に進み, 将来的にセリンプロテアーゼ阻害薬が新たな治療の選択肢となり, 多くの患者に貢献できる日が来ることを期待したい。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示: 北村健一郎; 寄附金 (小野薬品工業)

文献

- 1) Canessa CM, et al : Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367 : 463–467, 1994.
- 2) Yu JX, et al : Prostaticin is a novel human serine proteinase from seminal fluid. Purification, tissue distribution, and localization in prostate gland. *J Biol Chem* 269 : 18843–18848, 1994.
- 3) Vallet V, et al : An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. *Nature* 389 : 607–610, 1997.
- 4) Adachi M, et al : Activation of epithelial sodium channels by prostaticin in *Xenopus* oocytes. *J Am Soc Nephrol* 12 : 1114–1121, 2001.
- 5) Bruns JB, et al : Epithelial Na⁺ channels are fully activated by furin- and prostaticin-dependent release of an inhibitory peptide from the γ -subunit. *J Biol Chem* 282 : 6153–6160, 2007.
- 6) Uchimura K, et al : *In vivo* contribution of serine proteases to the proteolytic activation of γ ENaC in aldosterone-infused rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 303 : F939–943, 2012.
- 7) Kakizoe Y, et al : Aberrant ENaC activation in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens* 27 : 1679–1689, 2009.
- 8) Hayata M, et al : Effect of a serine protease inhibitor on the progression of chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 303 : F1126–1135, 2012.
- 9) Ueda M, et al : The serine protease inhibitor camostat mesilate attenuates the progression of chronic kidney disease through its antioxidant effects. *Nephron* 129 : 223–232, 2015.
- 10) Morinaga J, et al : The antifibrotic effect of a serine protease inhibitor in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 305 : F173–181, 2013.