

岡本系枝賞受賞論文

レニンの活性化機構に関する免疫化学的研究

東京女子医大第2内科学教室(主任:出村 博教授)

¹⁾同 第4内科学教室(主任:杉野信博教授)²⁾東京工業大学理学部化学科(主任:広瀬茂久教授)³⁾米国バンダービルト大学生化学, 高血圧センター(Director:稲上 正教授)

ナルセ	キヨコ	ナルセ	ミツヒデ	ユムラ	ワコ	ヒロセ	シゲヒサ
成瀬	清子	成瀬	光榮	湯村	和子 ¹⁾	広瀬	茂久 ²⁾
スギノ	ノブヒロ	イナガミ	タダシ	デムラ	ヒロシ		
杉野	信博 ¹⁾	稲上	正 ³⁾	出村	博		

(受付 平成元年12月18日)

**Immunochemical Investigation of Activation Mechanisms of
Renin in Human Kidney and Plasma**
**Kiyoko NARUSE, Mitsuhide NARUSE, Wako YUMURA¹⁾, Shigehisa HIROSE²⁾,
Nobuhiro SUGINO¹⁾, Tadashi INAGAMI³⁾ and Hiroshi DEMURA**

 Department of Medicine II, Institute of Clinical Endocrinology, ¹⁾Department of Medicine IV, Kidney Center,
Tokyo Women's Medical College, ²⁾Department of Chemistry, Tokyo Institute of Technology, and

³⁾Department of Biochemistry and Hypertension Center, Vanderbilt University (USA)

Although human plasma contains a large amount of inactive renin (prorenin), the details of its processing and pathophysiologic significance have not been elucidated. To clarify whether the post-translational modification of prorenin occurs inside the kidney, we applied the immunohistochemical technique using anti-prorenin antibodies with different site-specificity. Biopsy and surgical specimens of human kidney obtained from 11 patients with various diseases were stained immunohistochemically using the avidin-biotin complex method. Specific immunostaining of prorenin was demonstrated by anti-prorenin antibodies in the JG cells of all kidney tissue specimens. The intensity of the prorenin immunostaining, however, was always greater by antibody against COOH-terminus of the prosegment than by antibodies against NH₂-terminus and mid-portion of the prosegment. In addition, we have determined plasma inactive renin levels by a combination of direct immunoradiometric assay for active renin and trypsin activation in normal and various disease states. Inactive renin concentrations were markedly elevated in renin-producing tumor, whereas it did not show a significant change in high-renin essential hypertension and renovascular hypertension. Furthermore, inactive renin concentrations were increased in diabetes mellitus, especially in that with diabetic neuropathy. All these results suggest that 1) post-translational modification of NH₂-terminus of prorenin occurs inside the JG cells and 2) determination of plasma inactive renin concentrations is useful for a differential diagnosis of high-renin type hypertension, especially renin-producing tumor and also for a biochemical detection of neuropathy in diabetic patients.

緒 言

レニン・アンジオテンシン系は血圧, 体液量の調節に重要な役割を担う。本調節系の主要な規定因子であるレニンは腎で生成, 分泌された後, ア

ンジオテンシノーゲン(レニン基質)に作用し, ロイシン・バリン結合を切断することにより10個のアミノ酸からなるアンジオテンシンIを生成する。このアンジオテンシンIはさらに変換酵素に

より2個のアミノ酸が切断されてアンジオテンシンIIとなり、血管平滑筋の収縮および副腎皮質からのアルドステロン分泌促進により、血圧上昇、体液量の増大をもたらす¹⁾(図1)。

このレニンは腎の傍糸球体細胞内で前駆体であるプロレニンとして合成されるが、このプロレニンは生物活性を持たないいわゆる不活性型レニンであり、そのN末端側の43個のアミノ酸が切断されて活性型レニンになると考えられている²⁾が、その過程の詳細は不明である。さらに、ヒト血中には多量の不活性型レニンの存在が報告³⁾⁴⁾されているが、その病態生理学的意義も明らかではない。

本研究では不活性型レニンの活性化機構およびその病態生理学的意義を解明する目的で、レニンおよびプロレニンに対する特異的抗血清を用いて腎内でのレニンのプロセッシングを免疫組織化学的に検討すると共に、immunoradiometric assay (IRMA)によるレニンの直接測定法を応用して血

中不活性型レニンの動態を定量的に検討したので報告する。

対象と方法

1. 腎組織における免疫組織化学的検討

ヒト腎生検に際して得られた腎組織 (n=11: 血尿1例, 慢性腎不全2例, 慢性糸球体腎炎2例, 多発性動脈炎1例, 溶血性尿毒症症候群1例, バーター症候群2例, 偽性バーター症候群2例), 手術に際して得られた腎傍糸球体細胞腫組織および剖検に際して得られた精巣組織を用いた。組織はDubosque-Brazil液あるいはPerfix[®]にて固定後、パラフィン包埋し3~5 μ mの連続切片を作製し、アビディン・ビオチン法にて免疫組織化学的染色を行なった。

抗レニン抗体は精製ヒト腎レニンを用いて作製された抗血清⁵⁾を、抗プロレニン抗体は図2に示したごとくそのプロセグメント部分の異なる部位(N端側, 中間部, C端側)に相当するフラグメントペプチドを合成し、それを家兎に免疫して作製された4種の抗血清(Pro-1, Pro-2A, Pro-2B, Pro-3)⁶⁾を用いた。

2. IRMAによるレニン直接測定法を応用したヒト血中不活性型レニンの検討

健常者(n=16)と共に各種疾患即ち本態性高血圧症(n=27), 原発性アルドステロン症(n=9), クッシング症候群(n=6), 腎血管性高血圧症(n=4), レニン産生腫瘍(n=3), バーター症候群(偽性を含む, n=6)および糖尿病(n=52)患者から得られたEDTA血漿を用いた。

活性型レニンはIRMAを用いた直接ラジオイムノアッセイ(Diagnostic Pasteur社製)を用いて測定した。不活性型レニン濃度は、血漿をトリプシンにて前処理後、前述の直接法にてレニン濃

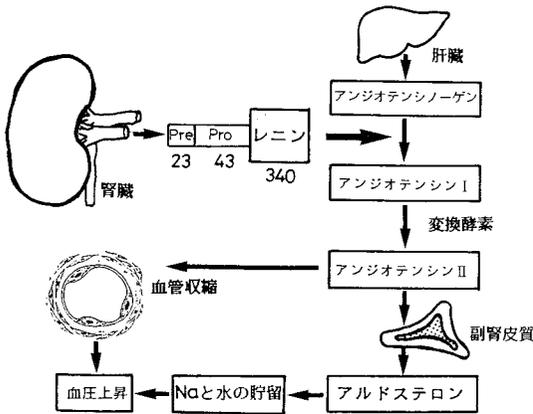


図1 The renin · angiotensin · aldosterone system

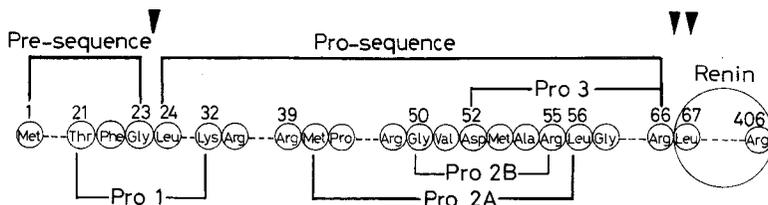


図2 Amino acid sequence of prorenin for synthesis and preparation of antibody

度を測定し(総レニン濃度), 活性型との差から算定した。即ち, 250 μ lの血漿を25 μ lのトリプシン溶液(10mg/ml: Sigma Chemical Co.)と共に室温にて30分間インキュベートし, 25 μ lのソイビントリプシンインヒビター液(Type II-S, 100mg/ml, Sigma Chemical Co.)にて反応を停止後, 活性型レニンを測定した。

結 果

1. 免疫組織化学的検討

血尿, 慢性腎不全, 傍糸球体細胞腫組織におけるレニン, プロレニンの免疫染色の結果を示す(写真1~3)。いずれの例もレニン, プロレニンが同一細胞内に染色されたが, 後者の染色濃度はC末端部分に対する抗体(Pro-3)による染色が他部位に対する抗体によるそれよりも強く, レニンとはほぼ同程度であった(写真1, 2, 3-b, c, d)。

各疾患の傍糸球体細胞におけるレニン, プロレニンの染色濃度をその強さに応じて判定的に表現しまとめたのが表1である。基礎疾患によりその染色程度は異なったが, その染色動態はほぼ同様の傾向を示し, Pro-1, Pro-2A, 2BよりもPro-3でより強く染色された。

更に, 剖検例の精巣 Leydig 細胞中にもレニンと共にプロレニンが認められ, その染色性も腎組織と同様で, Pro-3により最も強く染色された(写真4)。

2. 血中不活性型レニンの動態

各種疾患における血中活性型および不活性型レニン濃度を図3および表2に示す。健常者での不

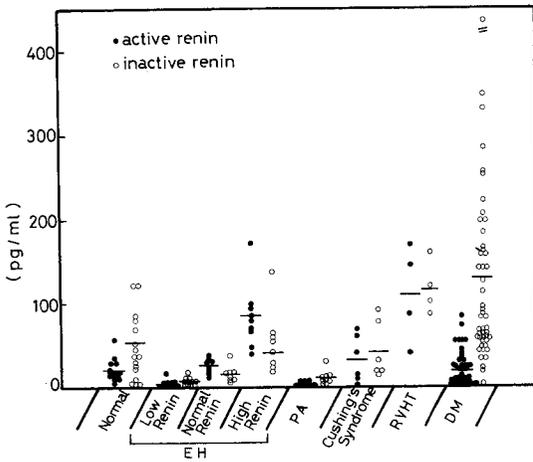


図3 Plasma active and inactive renin concentrations in various diseases

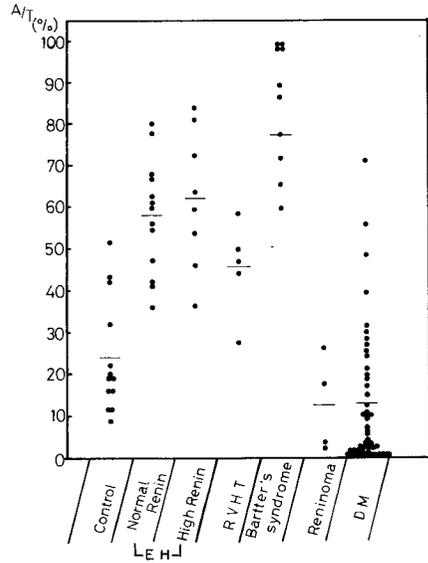


図4 Ratio of active renin (A) to total renin (T) in various diseases

表1 Intensity of the immunostaining of renin and prorenin in juxta-glomerular cells in various disease

	Antiserum				
	Renin	Pro 1	Pro 2A	Pro 2B	Pro 3
Hematuria	++	±	+	-	+
Chronic glomerulonephritis	++	+	+		++
Chronic renal failure	##	+	+	±	++
Polyarteritis nodosa	##	+	±		++
Hemolytic-uremic syndrome	++	+	±	±	++
Bartter's (like) syndrome	++	+	+		++

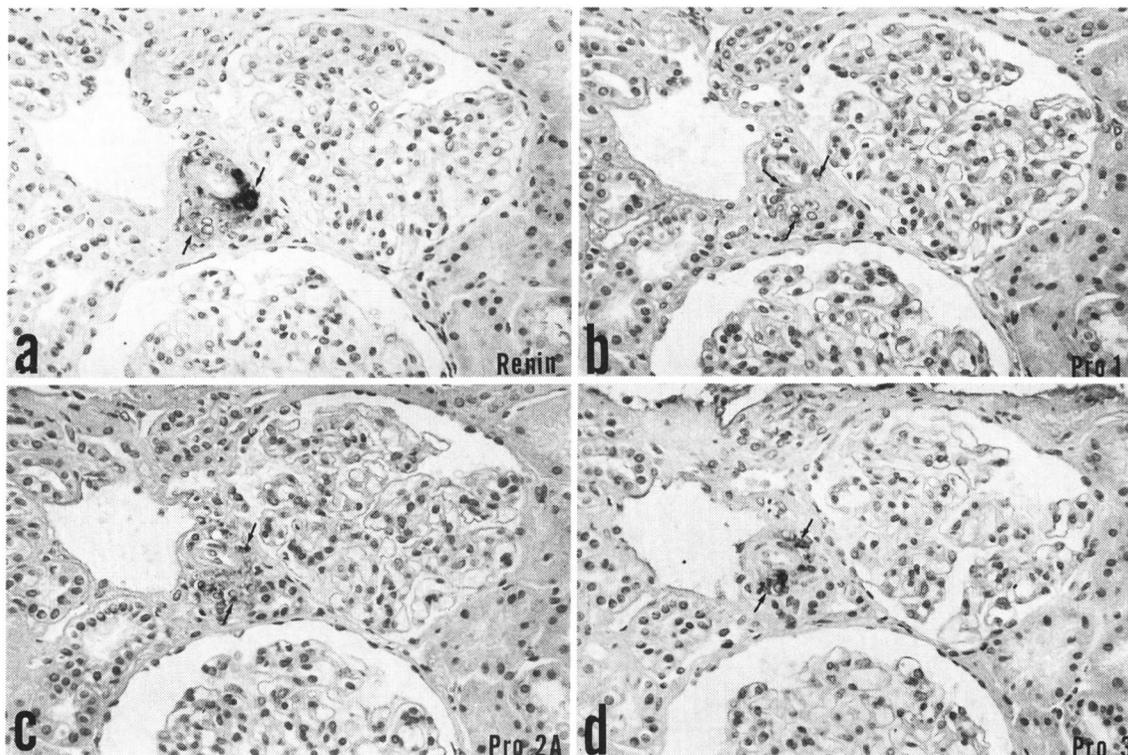


写真1 Immunohistochemical staining of renin (a) and prorenin (b, c, d) in renal biopsy specimen from patient with hematuria (nuclei were stained with Hematoxyllin)

表2 Plasma active and inactive renin concentrations in Bartter's syndrome

Case	Active renin (pg/ml)	Inactive renin (pg/ml)	Active/Total (%)
1	5340	840	86
2	1605	517	60
3*	918	258	65
4*	569	220	72
5*	273	33	89
6	204	59	78

*Bartter's-like syndrome associated with diuretics abuse.

活性型レニン濃度は活性型の2～3倍であったが、低レニン性本態性高血圧症や原発性アルドステロン症などでは活性型レニンと共に不活性型レニン濃度も健常者に比べ低下を示した。また、高レニン性疾患の内、高レニン性本態性高血圧症、腎血管性高血圧症およびバーター症候群では、不活性型レニンに比べ活性型レニンの増加がより明らかであったのに対して、レニン産生腫瘍では、活性型レニンと共に不活性型レニンの著明な増加が特徴的であった(表3)。さらに、糖尿病患者で

表3 Plasma active and inactive renin concentrations in renin-producing tumor

	Age	Sex	Tumor	Active renin (pg/ml)	Inactive renin (pg/ml)	Active/Total (%)
Case 1	27	F	JG cell tumor	57.1	1172	5
2	27	F	Adrenal tumor	3640	10180	26
3	23	M	Hepatoma	145	3825	2
Control (n=16)				4.8-55.4	20.3-127	9-52

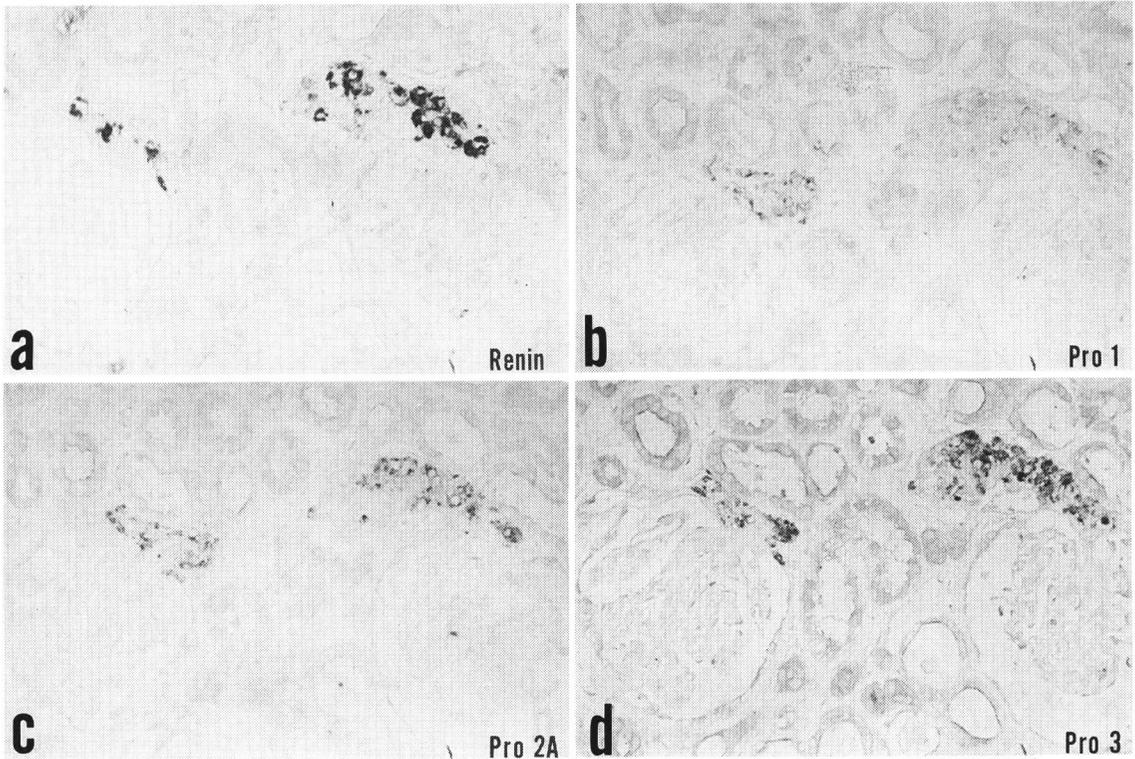


写真2 Immunohistochemical staining of renin (a) and prorenin (b, c, d) in renal biopsy specimen from patient with chronic renal failure

は活性型レニンは健常者よりも低値を示す例が比較的多く認められたが、不活性型レニンは明らかに増加していた(図3)。

総レニン濃度に対する活性型レニンの比率を図4に示した。本態性高血圧症や腎血管性高血圧症、バーター症候群では活性型レニンの占める比率が増加を示したのに対して、レニン産生腫瘍や糖尿病ではその比率の低下を認めた。

糖尿病における血中不活性型レニンの増加に関わる要因を明らかにするため、糖尿病のコントロールの状況や合併症との関連を検討した。その結果、HbA_{1c}が7.5mg/dl以上の例では、以下の例に比べ血中不活性型レニンが高値を示す傾向がみられたが、両群間で有意な差を認めなかった(図5)。糖尿病性合併症では、尿蛋白陽性例や糖尿病性網膜症を有する例とそれを認めない例とでは血中不活性型レニン濃度に有意差を認めなかったのに対して、糖尿病性神経症を有する例では、それ

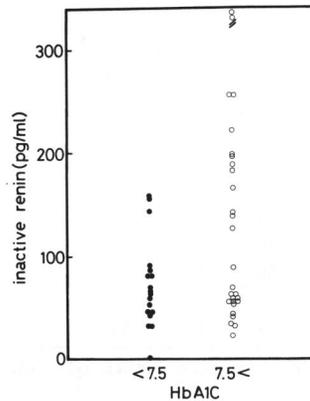


図5 Relation between serum HbA_{1c} concentration and plasma inactive renin concentration in diabetic patients

を認めない例に比べて有意に高い不活性型レニン濃度を示した(図6)。

考 察

レニンの不活性な前駆体であるプロレニンがど

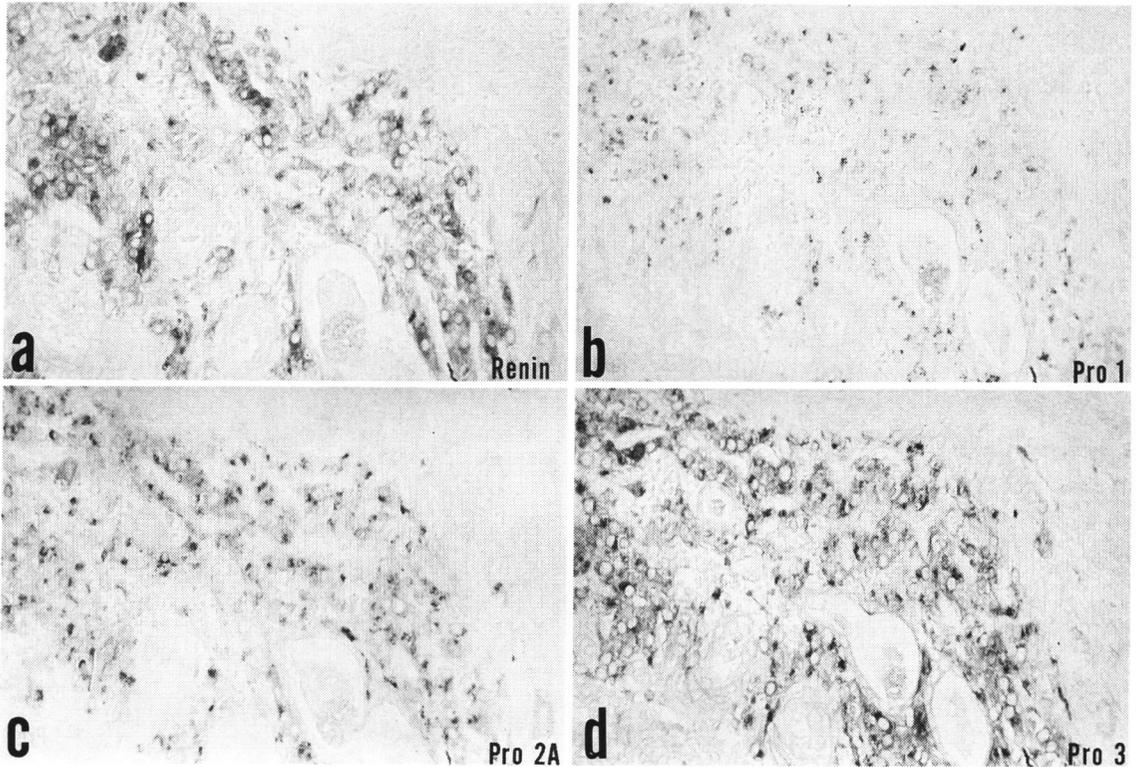


写真3 Immunohistochemical staining of renin (a) and prorenin (b, c, d) in juxtaglomerular cell tumor

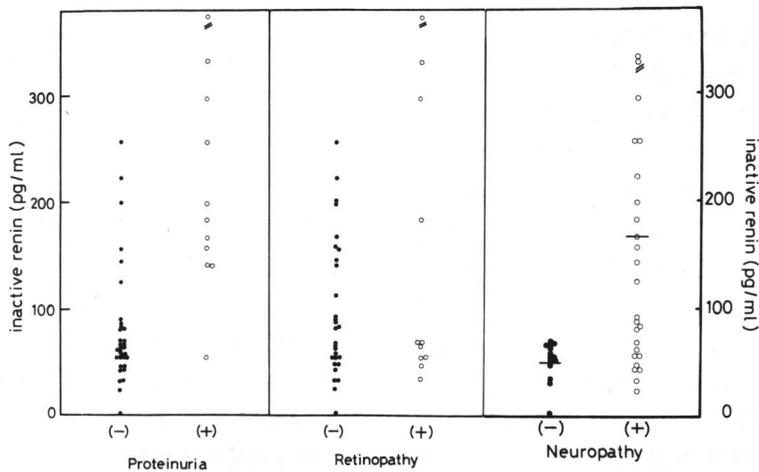


図6 Relation between diabetic complications and plasma inactive renin concentrations in diabetic patients

のようなプロセスで活性化されるのかその詳細は十分に明らかではない。Hiroseら⁷⁾は、immunoaffinity カラムを用いて、ヒト血中に存在

するプロレニンが、主にその N 末端部分がある程度切断された、プロレニンと活性型レニンの中間型であることを報告している。今回、私達はヒト

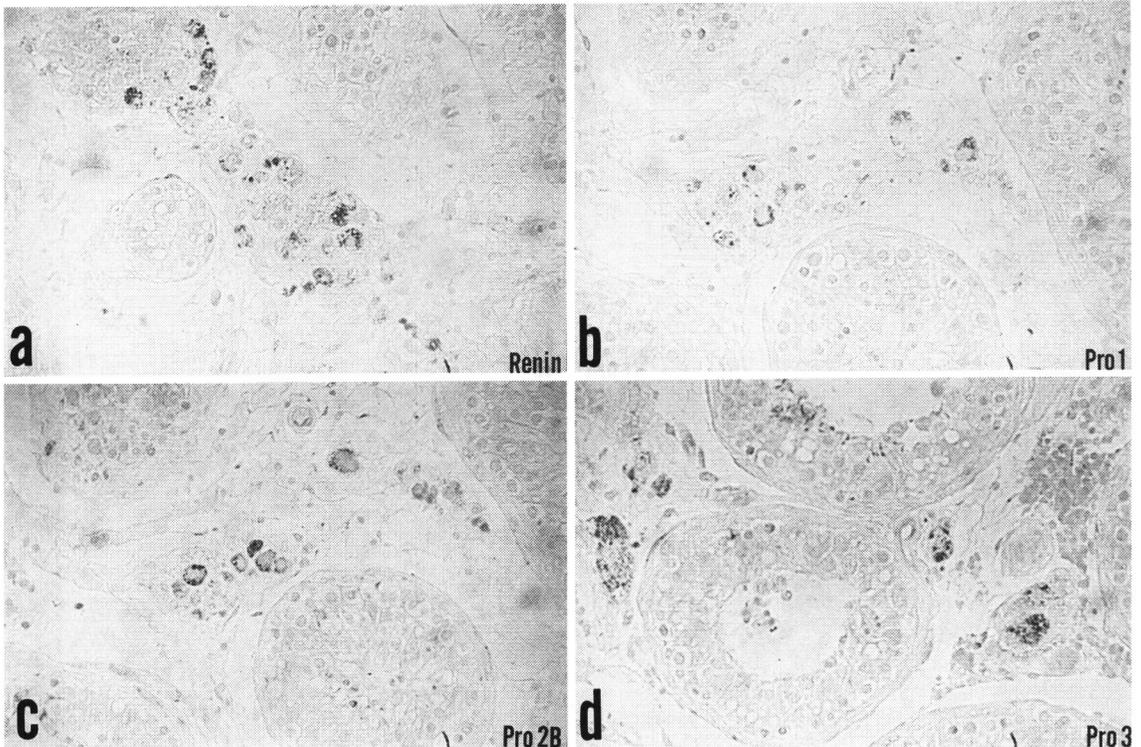


写真4 Immunohistochemical staining of renin (a) and prorenin (b, c, d) in autopsied specimen of testis

腎組織において認識部位の異なる4種の抗プロレニン抗体を用いて免疫組織化学的検討を行なった。その結果、基礎疾患によりその染色の程度は異なったが、常にプロセグメントN末端側(Pro-1)あるいは中間部分に対する抗体(Pro-2A, B)を用いた場合に比べて、C末端側に対する抗体(Pro-3)を用いた際に最も強い免疫染色を認めた。この染色動態は多発性動脈炎や溶血性尿毒症症候群、パーター症候群などの全身性疾患の腎組織やレニン産生腫瘍組織においてもほぼ同様に認められた。これらの結果は、腎傍糸球体細胞内においてプロレニンは先ずそのN末端側が切断された intermediate form になることを示唆している。

腎からのプロレニンの分泌には2つの過程即ち“constitutive pathway”と分泌顆粒を介する“regulated pathway”があると考えられているが⁹⁾、各々の関与の程度は明らかではない。しかしながら、前者はプロレニンの活性化機構を持た

ないとされており、それ故、今回の私達の結果は後者即ち“regulated pathway”がプロレニンの主要な分泌過程であることを示唆している。このことはさらに、Hirose ら⁷⁾が報告したヒト血中中間型プロレニンは、プロレニンが血中で代謝されて生成されたのではなく、腎内で生成された後、血中に分泌されたものであることを示唆している。

ところで私達は腎以外の種々の組織即ち副腎、下垂体、精巣、血管などにおけるレニンの存在を明らかにし、それらが“tissue renin angiotensin system”として各臓器の機能の調節に重要な役割を担う可能性を指摘^{10)~13)}してきた。特に、下垂体レニンは gonadotroph に存在し、テストステロン依存性であること¹⁴⁾、一方、精巣内では Leydig 細胞にレニンが存在しそれがゴナドトロピン依存性であること¹³⁾を明らかにし下垂体一性腺機能の調節に局所のレニン・アンジオテンシン系が関与することを示唆してきたが、局所でのレニン生成

の有無は明らかではない。今回、Leydig 細胞内にプロレニンの免疫染色を認めたことは、精巣に存在するレニンが血液に由来するのではなく、Leydig 細胞内で合成されることを意味している。さらに、プロレニンのプロセグメント C 末端部分に対する抗体で最も強く染色されたことから、腎外組織中のレニンのプロセッシングも腎傍糸球体細胞におけるそれと同様であると考えられた。

ヒト末梢血中には、比較的多量の不活性型レニンが存在する³⁴⁾。従来、その測定は、レニン活性測定法とトリプシン処理により行なわれてきたが、本法は血中アンジオテンシノーゲン量の影響を受けると共に操作が複雑であるとの欠点を有している。今回、私達は IRMA によるレニンの直接測定法を応用することにより、簡便に且つより特異的に血中不活性型レニン濃度の定量を可能とした。その結果、高レニン性高血圧症の内、本態性高血圧症や腎血管性高血圧症では活性型レニンの増加が主であったのに対して、レニン産生腫瘍では不活性型レニンの増加が著明で、これらの病態の鑑別診断に有用であると考えられた。

このレニン産生腫瘍における血中不活性型レニンの増加は、Day & Leutscher¹⁵⁾による Wilms 腫瘍や Ruddy ら¹⁶⁾によるレニン産生腺癌においても観察されており、レニン産生腫瘍に特徴的な所見であると考えられる。その機序の詳細は明らかではないが、腫瘍細胞におけるレニン過剰産生と共に、プロレニンの活性化機構即ちレニンのプロセッシングに異常があるためと考えられる。

さらに血中不活性型レニンは合併症を有する糖尿病特に糖尿病性神経症を有する例において明らかな増加を示した。Leutscher ら¹⁷⁾は、従来のレニン活性測定法を用いて microvascular complication を有する糖尿病患者において血中不活性型レニンの増加を報告したが、その後、その増加は主に neuropathy と関連する¹⁸⁾あるいは nephropathy と関連する¹⁹⁾との異なる報告がなされている。今回、より直接的な定量法を用いて行なった検討結果は、前者の結果を支持するものであるといえる。

この不活性型レニン増加の機序の詳細は明らか

ではないが、 β 刺激剤が活性型レニンの増加と不活性型レニンの減少を生じる⁴⁾一方、 β 遮断剤やクロニジンの慢性投与が活性型レニンの低下と不活性型レニンの増加をもたらすことから²⁰⁾、プロレニンの活性化における交感神経刺激の役割が推測されており、神経症を有する糖尿病ではその障害が不活性型レニンの増加に関与すると考えられる。従来、糖尿病性神経症は、起立試験における心電図 (R-R 間隔の変化) や末梢神経伝導速度などにより電気生理学的に評価されてきたが、血中不活性型レニンの測定により生化学的、定量的にそれを評価することが可能と考えられ、今後その臨床的応用が期待される。

結 論

1. 各種疾患の腎組織において、部位特異性の異なる数種の抗プロレニン抗体を用いた免疫組織化学的検討を行なった。その結果、プロレニンプロセグメントの C 末端部分に対する抗体で最も強い染色を認めたことから、プロレニンの活性化は傍糸球体細胞内で one step で起きるのではなく、N 末端側が切断された中間型プロレニンとなった後、それが活性型レニンと共に血中に分泌されたと考えられた。さらに、精巣の Leydig 細胞にもプロレニンの免疫染色を認め、局所でのレニンの合成が示唆されると共に、その染色動態から腎外レニンの活性化のプロセスも腎内と同様であることが示唆された。

2. レニンの直接測定法を応用して各種疾患における血中不活性型レニン濃度の動態を検討した。その結果、高レニン性高血圧症の内、本態性高血圧症や腎血管性高血圧症では活性型レニンの増加が主であったのに対し、レニン産生腫瘍では不活性型レニンの増加が著明で、鑑別診断上有用であると考えられた。さらに、糖尿病特に糖尿病性神経症を有する例で血中不活性型レニンの増加が認められたことから、本合併症の定量的、生化学的指標として臨床的に有用であると考えられた。

本研究を可能として頂きました前東京女子医大第 2 内科主任教授鎮目と夫先生 (現同学名誉教授) およ

び貴重なレニン産生腫瘍例において検討の機会を頂きました自治医科大学内科斉藤寿一先生、三井記念病院内科山門 実先生に深謝致します。

本研究は岡本系技学術研究助成の援助により行なわれた。

文 献

- 1) **Peach M**: Renin-angiotensin system: Biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* 57: 313-370, 1977
- 2) **Panthier JJ, Foote S, Chambrand B et al**: Complete amino acid sequence and maturation of the mouse submaxillary gland renin precursor. *Nature* 298: 90-92, 1982
- 3) **Skinner SL, Cran EF, Gibson R et al**: Angiotensin I and II, active and inactive renin, renin substrate, renin activity, and angiotensinase in human liquor, amni and plasma. *Am J Obstet Gynecol* 121: 626-630, 1975
- 4) **Derckx FHM, Gool JMGV, Wenting GJ et al**: Inactive renin in human plasma. *Lancet* 2: 496-498, 1976
- 5) **Yokosawa H, Holladay LA, Inagami T et al**: Human renal renin: Complete purification and characterization. *J Biol Chem* 255: 3498-3502, 1980
- 6) **Kim SJ, Hirose S, Miyazaki H et al**: Identification of plasma inactive renin as prorenin with a site-directed antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 641-645, 1985
- 7) **Hirose S, Kim SJ, Miyazaki H et al**: In vitro biosynthesis of human renin and identification of plasma inactive renin as an activation intermediate. *J Biol Chem* 260: 16400-16405, 1985
- 8) **Tartakoff A, Vassalli P**: Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. *J Cell Biol* 79: 694-707, 1978
- 9) **Galen FX, Devaux C, Houot AM et al**: Renin biosynthesis by human tumoral juxtaglomerular cells. Evidence for a renin precursor. *J Clin Invest* 73: 1144-1155, 1984
- 10) **Naruse M, Inagami T**: Markedly elevated specific renin levels in the adrenal in genetically hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 3295-3299, 1982
- 11) **Naruse K, Takii Y, Inagami T**: Immunohistochemical localization of renin in luteinizing hormone-producing cells of rat pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7579-7583, 1981
- 12) **Naruse K, Murakoshi M, Osamura YR et al**: Immunohistological evidence for renin in human endocrine tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 172-177, 1985
- 13) **Naruse M, Naruse K, Shizume K et al**: Gonadotropin-dependent renin in the rat testes. *Proc Soc Exp Biol Med* 177: 337-342, 1984
- 14) **Naruse K, Naruse M, Obana K et al**: Renin in the rat pituitary coexists with angiotensin II and depends on testosterone. *Endocrinology* 118: 2470-2476, 1986
- 15) **Day RP, Luetscher JA**: Big renin: A possible prohormone in kidney and plasma of a patient with Wilms' tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 923-926, 1974
- 16) **Ruddy MC, Atlas SA, Salerno FG**: Hypertension associated with a renin-secreting adenocarcinoma of the pancreas. *N Engl J Med* 307: 993-997, 1982
- 17) **Luetscher JA, Kraemer FB, Wilson DM et al**: Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 312: 1412-1417, 1985
- 18) **Misbin RI, Grant MB, Pecker MS et al**: Elevated levels of plasma prorenin (inactive renin) in diabetic and nondiabetic patients with autonomic dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab* 64: 964-968, 1987
- 19) **Atlas SA, Sealey JE, Laragh JH et al**: Plasma renin and prorenin in essential hypertension during sodium depletion, beta-blockade and reduced arterial pressure. *Lancet* 2: 785-788, 1977
- 20) **Antonipillai I, Tan SY, Suzuki S et al**: Active and inactive renin in low renin states: Studies in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 53: 694-697, 1981