

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09724

研究課題名(和文)血管拡張障害による食塩感受性高血圧発症メカニズムの解明

研究課題名(英文)Salt-sensitive hypertension and vascular dysfunction

研究代表者

下澤 達雄(Shimosawa, Tatsuo)

国際医療福祉大学・医学部・主任教授

研究者番号：90231365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では食塩感受性高血圧の発症メカニズムが体液量の増加にあるか、血管拡張機能の低下にあるかを検討した。低用量のL-NAMEは食塩感受性高血圧を発症させること、また、食塩負荷後1日は体液量の増加は差がないにもかかわらず血圧が上昇することが確認された。一方、NCC欠損マウスでは高血圧が維持されないことを見出した。さらにNOの欠損は酸化ストレスを介してNCCのリン酸化を生じていることを明らかにした。これらの検討から正常血圧から食塩による血圧上昇のメカニズムにおいて、初期の血圧上昇には血管拡張機能がかわり、高血圧の維持には腎臓の機能がかわることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者、糖尿病、動脈硬化疾患など食塩感受性を呈しやすい病態に血管拡張機能低下が関与することを示唆するものである。予後不良の食塩感受性高血圧の治療には腎臓ならびに酸化ストレス、血管反応性を考慮することが必要である。

研究成果の概要(英文)：To investigate the cause of salt sensitivity, we used low-dose L-NAME. A high salt diet increased the circulating blood volume regardless of the L-NAME-treatment for the first 24 hours but it returned to the baseline in nontreated group. In contrast to the blood volume changes, blood pressure was higher only in the L-NAME-treated group. An increase in natriuresis was observed after treatment with hydrochlorothiazide, but not amiloride, and this change was observed in parallel with increases in phosphorylated NCC. A change in blood pressure was not observed in the L-NAME-treated NCC-deficient mice fed a high salt diet. Moreover, L-NAME-induced NCC activation was demonstrated in mDCT cells. The effect of L-NAME on phosphorylated NCC was blocked by both the SPAK inhibitor and TEMPO. TEMPO also attenuated salt-induced hypertension. In conclusion, even slightly impaired NO may be important in salt sensitivity.

研究分野：高血圧

キーワード：食塩感受性高血圧 血管内皮機能 遠位尿細管 ナトリウム 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人を対象とした研究から(Morimoto A et al. Lancet 1997)、血圧が同程度であっても食塩感受性高血圧患者では心血管予後が不良であることが示されて久しい。また、遺伝子の網羅的解析からいくつかの候補遺伝子や性別、年齢、人種差といった介入不可能な因子が食塩感受性高血圧にかかわることが知られている(日本高血圧学会ガイドライン 2014)。しかし、その一方で同一患者を4年間経過観察した研究では食塩感受性と非感受性は一部の患者では可逆的に行き来するものであることも示されている(Gu D, et al. Hypertension 2013)。この知見は予後の悪い食塩感受性高血圧を治すことができる可能性を示すもので、そのターゲット因子に我々は興味をもち、交感神経系、酸化ストレスに着目して研究を行ってきた。その結果、これらの因子の亢進が腎臓でのナトリウム共輸送体(NCC, ENaC)の活性化を介して食塩感受性高血圧を発症しうることを明らかにした(Mu S. et al. Nat Med 2011, Shibata S et al. J Clin Invest 2011)。

一方、多くの臨床試験のメタ解析から心血管イベントのリスク軽減における降圧の重要性が報告されている(Thomopoulos C et al. J Hypertens. 2014)。この報告によると心血管リスクが高くなると降圧の寄与度が少なくなり残余リスクが高くなることがわかる。このことは血圧制御はリスクが低いうちに行うことが有効であることを示唆する。

このような知見から我々は心血管イベントのリスクである交感神経活動や酸化ストレスの増大がさらに食塩感受性を悪化させる可能性を考えた。実際、従来のガイド博士の仮説では食塩感受性高血圧は腎臓でのナトリウム排泄機構の低下による体液量の増大が原因とされており、心血管リスクである腎機能の低下は食塩感受性高血圧に寄与する。一方、最近正常血圧者を対象として食塩負荷時の血圧変化をみると、正常血圧で腎機能が正常であっても食塩感受性を示す群があり、この群では体液量の増加は認められずむしろ血管抵抗が不適切に高いことが原因であることが示されている(Schmidlin O, et al. Hypertension 2007)。このことは高血圧による血管障害はさらに食塩感受性を惹起することを示唆する。

2. 研究の目的

そこで、本研究ではリスクの重層化による食塩感受性高血圧発症のメカニズムを明らかにすることを計画した。すでに血管障害のモデルとしてNOを薬物的に抑制、すなわちL-NAME投与下では正常マウスが食塩感受性高血圧を発症することを確認し、その際にサイアザイドに大きく反応することからNCCの活性化があることを確認している。

そこで、血管障害のモデルとしてNOを薬物的、腎臓特異的遺伝子改変動物を用いて抑制し、血管拡張不全状態を作成する。これらのモデル動物を用いて食塩負荷時の血圧変化を検討する。特に本研究ではNO抑制下におけるNCCの活性化メカニズムをNCCの転写、リン酸化に着目して明らかにする。In vivo 検討に加え遠位尿細管由来細胞株mDCT細胞を用いてL-NAME投与時のNCCの変化を確認する。また、腎臓内局所NOの役割をNO産生酵素のeNOS, iNOS, nNOSのそれぞれを腎臓内でノックアウトすることで明らかにする。

この成果によりレニン・アンジオテンシン系阻害薬では十分に抑制できなかった心血管イベントに対しNOをターゲットとすることによる食塩感受性の解除の有効性を示唆する根拠を提示できる。

3. 研究の方法

L-NAMEによる薬物的NO阻害時の食塩感受性を正常ラット、マウスで確認する。同時に体液量を測定し、体液量と血圧上昇の関係を明らかにする。In vitroの実験として腎臓遠位尿細管細胞mDCT細胞を用いてNOとナトリウム-クロライド共輸送体NCCの活性の関連を転写制御、リン酸化の観点から明らかにする。転写制御においては我々の研究室で行ってきたエピゲノム調節に注目する。リン酸化についてはWNK, SPAKといったすでに知られているNCCのリン酸化酵素の活性に注目して解析を進める。NCCを介したナトリウム再吸収の血圧に与える影響はNCC欠損マウスを用いて検証する。

4. 研究成果

L-NAME投与による食塩感受性と体液量変化

塩分負荷24時間はL-NAME処理の有無にかかわらず体液量が増大したが、血圧はL-NAME投与群でのみ上昇した。24時間後からはL-NAME非投与群では体液量が正常食塩食時と同等に戻ったが、L-NAME投与群は増加を維持し、血圧も高かった。この血圧の変化は正常マウスでも同様に認められた(高食塩食: 108.7 ± 3.7 vs. 高食塩食+L-NAME投与群: 130.5 ± 2.9 mmHg)

(図 1) 4 週間の投与後でも腎臓に病理学的変化は認められなかった。

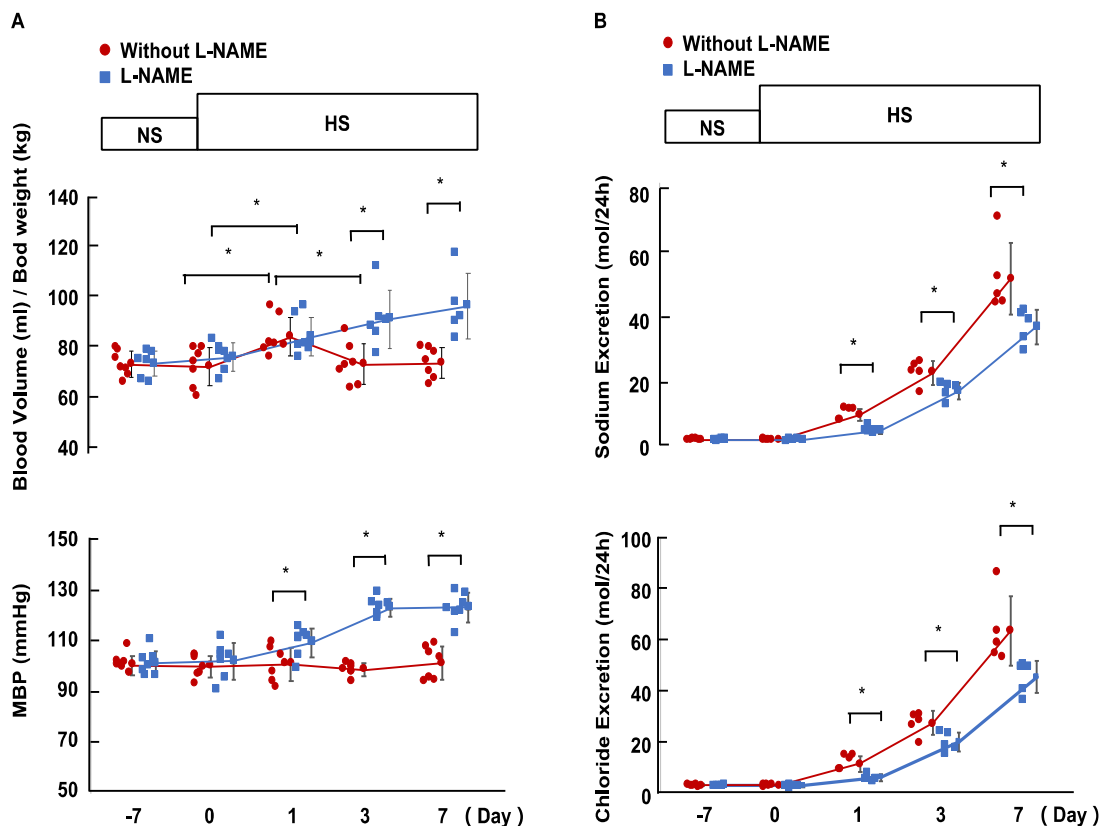


図 1 L-NAME 投与下での体液量と血圧 (A) 並びに尿中 Na,Cl 排泄量 (B) の経時的変化

ナトリウムチャネルの活性化

ヒドロクロロチアジド投与時のナトリウム利尿は L-NAME 投与群で有意に大きく、NCC の活性化を示唆した (HS vs HSL: Na^+ fold change 1.07 ± 0.21 vs 1.72 ± 0.37 ; Cl^- fold change 1.01 ± 0.19 vs 1.98 ± 0.42)。NCC のたんぱく量には変化がなく転写レベルでの調節ではなくリン酸化が関与することが示唆されたためリン酸化 NCC を検討したところコントロール群では食塩負荷により NCC のリン酸化が抑制されるのに対し L-NAME 群でリン酸化が維持された。これに対し、アミロライドによるナトリウム利尿に差はなく、ENaC の活性化は認められなかった (図 2)。

NCC 欠損マウスでの血圧変化

野生型マウスでは高食塩食+L-NAME で血圧が 117.1 ± 2.7 mmHg に上昇したのに対し NCC 欠損マウスでは 103.8 ± 1.8 mmHg であり、NCC が食塩感受性高血圧の維持に重要であることが示された。

NCC リン酸化についての mDCT 細胞を用いた検討

L-NAME 10, 20, 40 μM を 10 分 から 30 分処理したところリン酸化 NCC は容量依存的、時間依存的に増加した。一方 NO 供与により NCC のリン酸化が抑制された (図 3)。

さらに酸化ストレスの関与の検討として SOD 様物質 TEMPO を用いて検討したところ L-NAME による NCC のリン酸化亢進が抑制された。同様に SPAK のリン酸化も抑制された。STOCK2S-26016 により SPAK を抑制したところ NCC のリン酸化は抑制された。一方我々が既報の WNK4 あるいは AT1 受容体拮抗薬投与では NCC のリン酸化に変化がなかった。

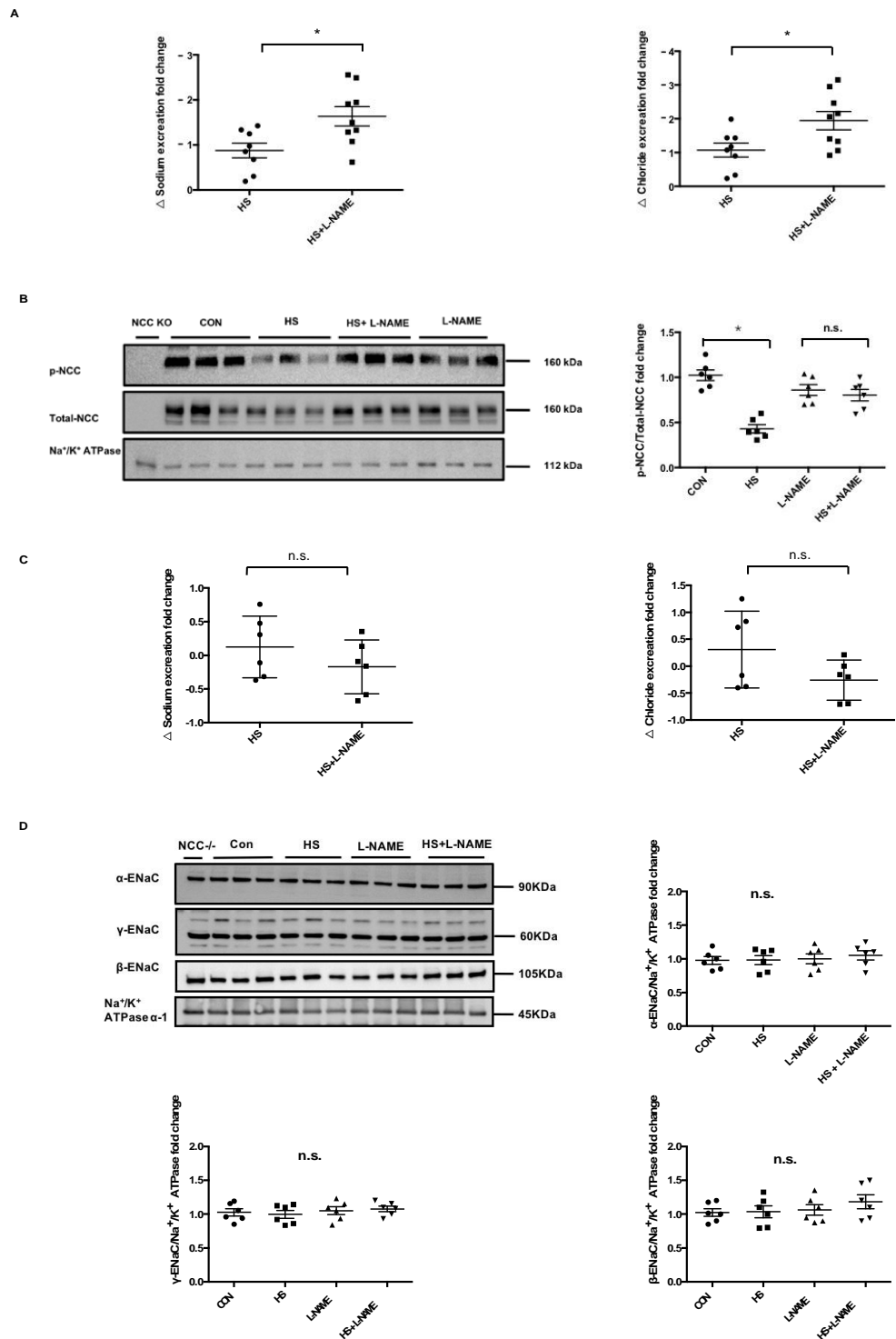


図2 L-NAME 投与、食塩食負荷による腎臓でのナトリウムチャネルの変化
 A) クロロサイアザイド投与時の Na, Cl 排泄量の変化
 B) リン酸化 NCC の変化
 C) アミロライド投与時の Na, Cl 排泄量の変化
 D) ENaC たんぱく量の変化

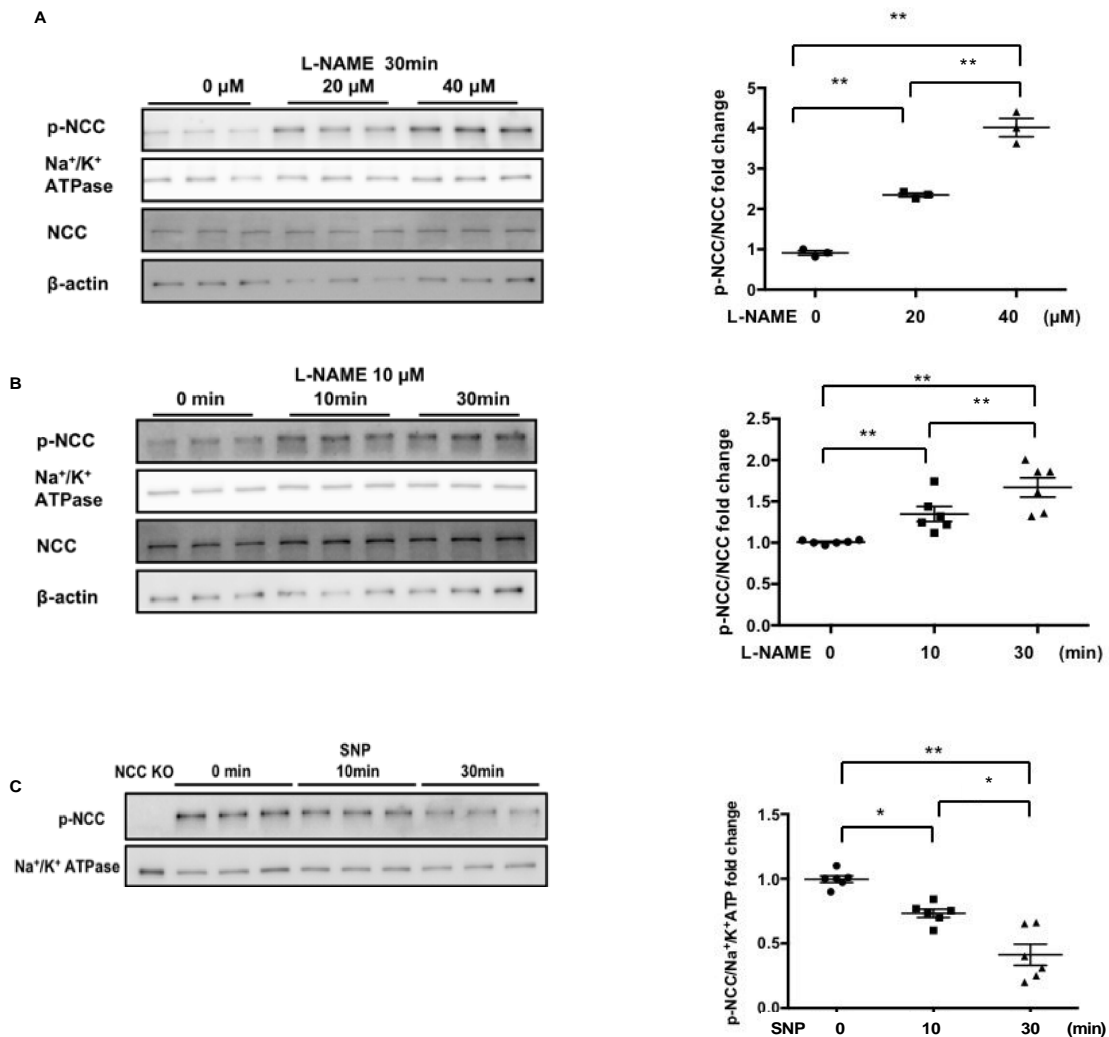


図3 mDCT細胞でのL-NAME, NO投与時のNCCリン酸化の変化
 A L-NAMEの容量依存性、B L-NAMEの時間依存性、C NO投与の時間依存性

酸化ストレスと食塩感受性高血圧の検討

mDCT細胞の検討から酸化ストレスがNCCの不適切なリン酸化をきたすことが示されたので、血圧に対する影響を確認した。マウスにTEMPOを投与したところ、L-NAMEと高食塩食による血圧上昇が抑制された。(平均血圧: HS=104.3 \pm 2.5 mmHg; HSL=128.9 \pm 4.7 mmHg; HSL + TEMPO=115.5 \pm 2.6 mmHg)

考察

以上の結果から従来言われていた食塩感受性高血圧は腎臓におけるナトリウム再吸収の亢進によって発症するとの説とは異なり、正常血圧から食塩による血圧上昇のメカニズムにおいては初期の血圧上昇には血管拡張機能がかかわり、高血圧の維持には腎臓の機能がかかわることが考えられた。このことは高齢者、糖尿病、動脈硬化疾患など食塩感受性を呈しやすい病態に血管拡張機能低下が関与することを示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Conghui Wang, Fumiko Kawakami-Mori, Lei Kang, Nobuhiro Ayuzawa, Sayoko Ogura, Suang Suang Koid, Latapati Rehemana, Alimila Yeerbolati, Beibei Liu, Yutaka Yatomi, Xiangmei Chen, Toshiro Fujita, Tatsuo Shimosawa	4. 巻 in press
2. 論文標題 In rodents, low dose L-NAME induces salt sensitivity in association with sustained increases in blood volume and in activity of the Na ⁺ -Cl ⁻ cotransporter (NCC)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Alimila Yeerbolati, Sayoko Ogura, Latapati Rehemana, Conghui Wang, Beibei Liu, Ichiro Kuwahira, Mikiyasu Shirai, Tatsuo Shimosawa, Toshiro Fujita.
2. 発表標題 The mechanism of Salt sensitive Hypertension in Intermittent Hypoxia.
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang C, Shimosawa T, Koid S S, Ogura S, Rehemana L.
2. 発表標題 Low dose N nitro arginine methyl ester(NAME) causes salt sensitive hypertension via activation of Na ⁺ Cl ⁻ cotransporter(NCC)
3. 学会等名 The 27th Scientific meeting of the International Society of Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang C, Shimosawa T, Rehemana L, Koid S S, Yeerbolati A, Liu B, Mori F, Fujita T.
2. 発表標題 Oxidative stress causes salt sensitive hypertension via activation of Na ⁺ -Cl ⁻ cotransporter(ncc).
3. 学会等名 Joint Hypertension Scientific Sessions of American Heart Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Conghui Wang, Sayoko Ogura, Fumiko Mori, Suang Koid, Alimila Yeerbolati, Latapati Reheman, Beibei Liu, Tatsuo Shimosawa.
2. 発表標題 Low dose L NAME causes salt sensitive hypertension via activation of NCC.
3. 学会等名 Joint Hypertension 2017 Scientific Session/AHA Council on Hypertension/AHA Council on Kidney in Cardiovascular Disease/American Society of Hypertension, (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Conghui Wang, Latapati Reheman, Sayoko Ogura, Suang Suang Koid, Fumiko Mori, Tatsuo Shimosawa.
2. 発表標題 Low Dose N - nitro - L - arginide Methyl Ester (L NAME) Causes Salt Sensitive Hypertension via Activation of Na ⁺ - Cl ⁻ - Cotransporter (NCC).
3. 学会等名 第40回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Conghui Wang, Sayoko Ogura, Fumiko Mori, Suang Koid, Alimila Yeerbolati, Latapati Reheman, Beibei Liu, Tatsuo Shimosawa.
2. 発表標題 Low dose L NAME causes salt sensitive hypertension via activation of NCC.
3. 学会等名 第34回国際心臓研究学会日本部会,
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 下澤達雄
2. 発表標題 血管内皮機能の低下と食洗感受性高血圧.
3. 学会等名 第42回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下澤達雄
2. 発表標題 MR活性にかかわる因子基礎的検討から
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shimosawa T	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Jaypee Brothers Medical Publishers	5. 総ページ数 398
3. 書名 Hypertension: A Case-Based Approach	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----