

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17276

研究課題名(和文)炎症と免疫システムが寄与する慢性腎臓病の塩分感受性高血圧の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis of salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease caused by inflammation

研究代表者

橋本 博子 (Hashimoto, Hiroko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：60846062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CKD マウスモデルを用いて、WNK シグナルと塩分感受性を評価した結果、CKD マウスモデルの一部で WNK1-SPAK シグナルが亢進し塩分感受性高血圧発症に関わっていることを発見した。炎症性サイトカインの一つである TNF が WNK1-SPAK シグナルの亢進に関わっていることが示唆され、WNK1-SPAK シグナルが亢進している CKD マウスモデルに TNF阻害薬を投与したところ、CKD 腎臓で産生が増加した TNF は WNK1 蛋白の分解を担うNEDD4-2の発現を抑制し、増加した WNK1 蛋白が塩分再吸収を増加させて塩分感受性高血圧を惹起していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、WNK シグナルが免疫機構による血圧制御メカニズムの一端を担っており、CKD の塩分感受性亢進に関わっていることを世界に先駆けて明らかにした。CKDではNCCの阻害薬であるサイアザイド系利尿薬の効果に個人差があることが知られており、サイアザイドの有効なCKDでTNF α -WNK1-SPAK-NCC シグナルが活性化している可能性が示唆された。そのため、腎臓でのTNF α 産生の評価は腎機能の低下した患者個々に対する適切な降圧療法選択に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although chronic kidney disease (CKD) is a common cause of salt-sensitive hypertension, the involvement of the WNK phosphorylation cascade is unknown. Here we demonstrate that the protein abundance of WNK1, but not of WNK4, was increased at the distal convoluted tubules in the aristolochic acid nephropathy mouse model of CKD. We hypothesized that tumor necrosis factor (TNF)- α regulates WNK1 protein expression. In fact, TNF- α increased WNK1 protein expression in cultured renal tubular cells by reducing the transcription and protein levels of NEDD4-2 E3-ligase, which degrades WNK1 protein. Furthermore, the TNF- α inhibitor etanercept reversed the reduction of NEDD4-2 expression and upregulation of the WNK1 cascade in distal convoluted tubules in vivo in CKD model. Thus, salt-sensitive hypertension is induced in CKD via activation of the renal WNK signal by TNF- α , reflecting a link with the immune system.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病 塩分感受性 WNK 炎症

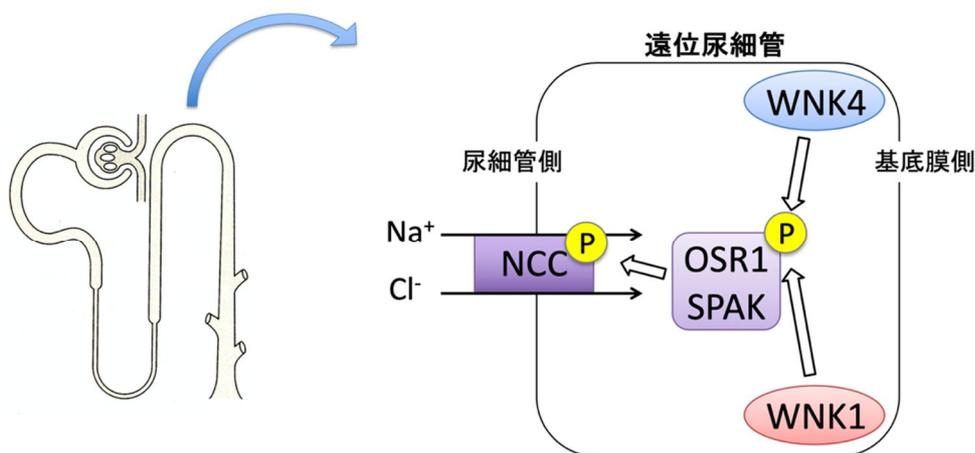
1. 研究開始当初の背景

本邦における高血圧に起因する死亡者数は年間約 10 万人と推定され、高血圧は心血管病の最大の危険因子である。塩分摂取は直接的な血圧増悪因子の一つであり、日本人において塩分摂取過多は高血圧治療における大きな課題である。特に、塩分摂取過多によって血圧が上昇する反応を塩分感受性と呼ぶ。一般に高血圧患者の 30-50%が塩分感受性であるが、同程度の血圧であっても塩分感受性の場合、抵抗性に比べて心血管系疾患発症や死亡のリスクが高いことが知られており、治療法という点でも塩分制限がその他の降圧療法に優先される。しかしながら、塩分感受性高血圧のメカニズムについては不明な点が多い。

また、本邦では CKD 患者数は 1330 万人と推計され、CKD が進行し末期腎不全で維持透析を施行中の患者は 35 万人をこえて、現在も増加している (2017 年 日本透析医学会)。CKD 患者の予後や QOL の改善は、医療費削減の面からも非常に重要な課題となっている。一方で高血圧患者は 4500 万人を超えるとされており、CKD と高血圧はともに罹患患者数の非常に多いまさに国民病といえる疾患である。さらに塩分感受性高血圧は CKD に高率に合併し、CKD の進行および心血管病変を引き起こす。

我々は、塩分感受性高血圧を呈する遺伝性疾患である偽性低アルドステロン症 II 型の分子病態を遺伝子改変マウス作成と解析により明らかにしてきた。近年、塩分感受性調節機構として腎臓尿細管での塩分再吸収を担う輸送体を制御する WNK (With no lysine kinase) シグナルに注目が集まっている。腎臓遠位尿細管では、WNK1、WNK4 の二つの WNK アイソフォームが oxidative stress-responsive kinase 1 (OSR1) と STE20/ SPS1-related proline/alanine-rich kinase (SPAK) をリン酸化することによって活性化し、リン酸化された OSR1、SPAK はさらに Na-Cl cotransporter (NCC) をリン酸化・活性化するという WNK-OSR1/SPAK-NCC リン酸化カスケードを我々は報告した (図)。我々はこのカスケードが亢進すると腎臓の遠位尿細管におけるナトリウム再吸収が亢進し、塩分感受性高血圧を呈することが確認してきている。興味深いことに、臨床的に塩分感受性を呈することが明らかとなっているメタボリック症候群やカリウム摂取不足といった病態においてもこの WNK シグナルが亢進しており偽性低アルドステロン症 II 型という限られた病態だけでなく、種々の塩分感受性高血圧を呈する病態に関わることを我々は明らかにしてきた。

一方で慢性腎臓病 (CKD) では塩分感受性が亢進していることが知られている。CKD には高血圧が高率に合併し、心血管疾患発症のリスクになるとともにさらなる腎障害進行につながる。しかし CKD における血圧コントロールは難しく、塩分感受性の亢進が一因と考えられている。CKD における塩分感受性亢進には糸球体濾過量の減少が原因と考えられてきたが、尿細管でのナトリウム再吸収増加が関わるということが報告されている。しかしながらその詳細なメカニズム、特に WNK シグナルの関与については不明であった。また、免疫機構による塩分感受性の制御が近年報告され、骨髄系細胞、T 細胞、そして炎症性サイトカインが高血圧発症に関わるということが報告された。しかし、詳細なメカニズムや、免疫機構と WNK シグナルの関わりは不明であった。



図：WNK-OSR1/SPAK-NCC カスケードによる Na 再吸収調節機構

2. 研究の目的

本研究の目的は、免疫学的機序と WNK シグナルの関連に着目し、CKD の塩分感受性高血圧の全く新しい機序を世界に先駆けて解明することである。現時点では免疫学的機序による腎臓の Na 輸送体の調節機構を解明した報告はなく、将来的に CKD の血圧制御における新規治療法の開発につながると考えられた。

3. 研究の方法

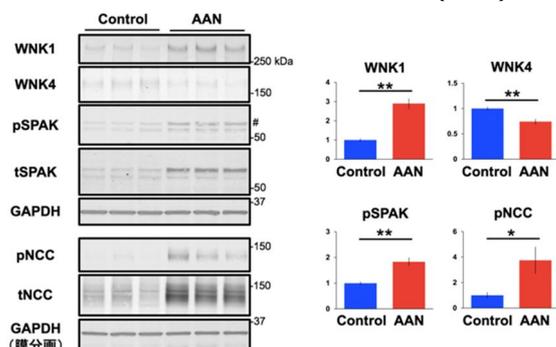
本研究ではアリストロキア酸腎症モデル、アデニン腎症モデル、5/6 腎摘モデルの 3 種類の CKD マウスモデルを用いて、CKD と WNK シグナル、免疫機構について、その関連を検討した。

4. 研究成果

本研究成果は、Kidney Int. 2020;97(4):713-727. doi: 10.1016/j.kint.2019.11.021 に報告した。

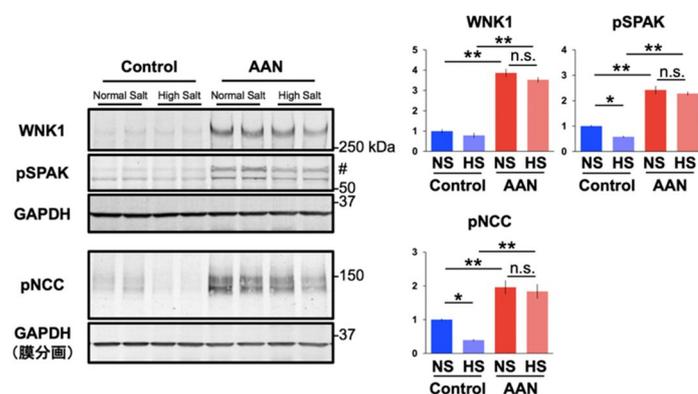
我々はまずアリストロキア酸腎症モデル (AAN) 腎臓において WNK1 蛋白発現が増加し、それに伴い下流の SPAK、NCC のリン酸化が亢進していることを確認した (図 1)。

図 1: アリストロキア酸腎症モデル (AAN) の腎では WNK1-SPAK-NCC シグナルが亢進している



次にアリストロキア酸腎症モデルに高塩食負荷したが、WNK1-SPAK-NCC シグナルの亢進は抑制されず、アリストロキア酸腎症マウスは塩分感受性高血圧を呈した (図 2)。一方で SPAK ノックアウトマウスを用いてアリストロキア酸腎症モデルを作成した所、WNK1 蛋白発現は増加していたものの NCC は活性化せず、塩分感受性高血圧も呈さなかったことからアリストロキア酸腎症マウスにおける NCC 活性化、塩分感受性高血圧は WNK1-SPAK シグナルの亢進によるものであると考えられた。

図 2: アリストロキア酸腎症モデル (AAN) では高塩食負荷下 (HS) でも WNK1-SPAK-NCC シグナルが抑制されない



WNK1 蛋白発現増加のメカニズムを明らかにするため、WNK シグナルを他の CKD モデルでも評価したところ、アデニン腎症モデル腎臓においてアリストロキア酸腎症と同様に WNK1 蛋白発現の増加を認めただ方、5/6 腎摘モデル (5/6Nx) では変化はなかった。そこで、我々は WNK1 の蛋白発現増加がモデルによって異なることに注目した。近年、炎症性サイトカインが高血圧発症に関わることが報告されており、アリストロキア酸腎症、アデニン腎症が炎症性 CKD であるのに対して 5/6 腎摘モデルは代謝系の変化が強いと考えられている。

これを踏まえ、WNK1 蛋白発現増加に関わる因子の探索のため 3 種類の CKD モデル腎臓の mRNA 発現を炎症性サイトカインに注目して比較したところ、TNF がアリストロキア酸腎症、アデニン腎症でのみ増加していた。

TNF が遠位尿細管上皮細胞に与える影響を評価するため、フィルター上で培養した mpkDCT 細胞（遠位尿細管上皮培養細胞）に TNF を負荷したところ、TNF 負荷でのみ WNK1 蛋白発現の増加が観察された（図 3）。さらに、TNF による WNK1 蛋白発現の増加は転写の増加によるものではなかった。この結果を踏まえて、TNF の CKD 腎組織での役割を評価するためアリストロキア酸腎症モデルに対して TNF 阻害薬エタネルセプトを投与した所、エタネルセプトは亢進した WNK1-SPAK-NCC シグナルを抑制し（図 4）、高塩食負荷による血圧上昇を抑制した。以上より、CKD 腎臓において TNF が WNK1 蛋白発現を増加させ、下流の SPAK-NCC シグナルが亢進し塩分感受性高血圧を惹起することが明らかとなった。

図 3 : TNF は mpkDCT 細胞において転写非依存的に WNK1 蛋白発現を増加させる

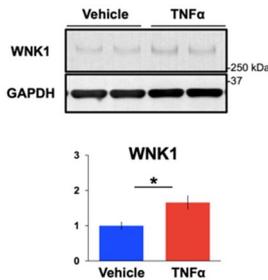
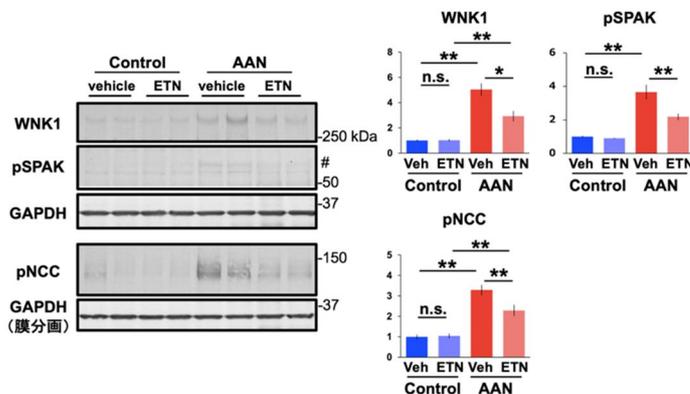


図 4 : TNF 阻害薬エタネルセプト (ETN) はアリストロキア酸腎症 (AAN) で亢進した WNK1 シグナルを抑制する



本研究により TNF が CKD 腎臓において WNK1 蛋白発現を増加させ、下流の SPAK-NCC シグナルを活性化し塩分感受性高血圧を惹起することが明らかになった（図 5）。炎症による塩分感受性の制御の一端を WNK シグナルが担っていた。一方で非炎症性の CKD である 5/6 腎摘モデルでは TNF の増加がなく、WNK シグナルの亢進を認めなかった。ヒト CKD でもサイアザイド系利尿薬の反応性に個人差があり、この反応性に腎臓での炎症の違いが影響している可能性が考えられた。

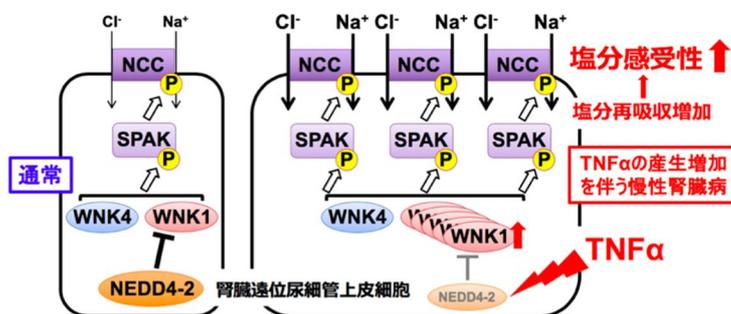


図 5 : CKD における TNF α による WNK シグナル亢進を介した塩分感受性高血圧のメカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Furusho Taisuke, Sohara Eisei, Mandai Shintaro, Kikuchi Hiroaki, Takahashi Naohiro, Fujimaru Takuya, Hashimoto Hiroko, Arai Yohei, Ando Fumiaki, Zeniya Moko, Mori Takayasu, Susa Koichiro, Isobe Kiyoshi, Nomura Naohiro, Yamamoto Kohei, Okado Tomokazu, Rai Tatemitsu, Uchida Shinichi | 4. 巻 97 |
| 2. 論文標題 Renal TNF activates the WNK phosphorylation cascade and contributes to salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Kidney International | 6. 最初と最後の頁 713 ~ 727 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2019.11.021 | 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 - |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Hashimoto Hiroko, Shikuma Satomi, Mandai Shintaro, Adachi Susumu, Uchida Shinichi | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Calcium-based phosphate binder use is associated with lower risk of osteoporosis in hemodialysis patients | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 e |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81287-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|