

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08280

研究課題名(和文) 浸透圧応答転写因子NFAT5による腎間質の微小環境と血圧の調節機序の検討

研究課題名(英文) Investigation of the role of NFAT5 in the regulation of renal interstitial microenvironment and blood pressure

研究代表者

泉 裕一郎 (Izumi, Yuichiro)

熊本大学・病院・特任准教授

研究者番号：20736243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,600,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤誘導性、尿細管細胞特異的NFAT5ノックアウト(KO)マウスの血圧、水・電解質代謝について、テレメトリー法による血圧測定や24時間蓄尿検査、血液検査などを行い詳細に検討した。その結果、KOマウスは上皮型NaチャンネルENaCの過剰発現を原因とした食塩感受性高血圧を呈することが明らかとなった。また、KOマウスでは腎髄質の免疫応答関連遺伝子の発現が亢進しており、髄質内のNa濃度と浸透圧が上昇する一方で、尿素濃度は低下していた。尿細管細胞のNFAT5の欠損が腎髄質の間質の微小環境の変化を介した免疫応答の異常を引き起こし、その結果、食塩感受性高血圧を引き起こすことが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ゲノム関連解析で示唆されているヒトの血圧高値と血清ナトリウム濃度高値へのNFAT5の関連を、尿細管細胞特異的NFAT5欠損(KO)マウスを用いて実証したものである。本研究により、正常な水・電解質代謝に必須の腎臓の尿細管細胞において、NFAT5の機能異常が食塩感受性高血圧を呈し、さらにヒトの食塩感受性高血圧の原因の一つとされる上皮型ナトリウム(Na)チャンネル(ENaC)を介した尿中Na再吸収亢進と腎組織内の免疫応答の異常を合併することが明らかになった。NFAT5 KOマウスのさらに詳細な解析を進めることで、食塩感受性高血圧の発症・進展機序の解明とその治療法の開発が大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：Blood pressure and water and electrolyte metabolism of drug-inducible and renal tubular cell-specific NFAT5 (nuclear activated T-cells 5) KO mice were examined by telemetry method and measurement of urine and blood parameters. The effects of high-salt diet and sodium channel inhibitor on the blood pressure and water and electrolyte metabolism were examined. The results indicated that the KO mice exhibit salt-sensitive hypertension which is accompanied by the over expression of epithelium sodium channel (ENaC). The activation of immune responses and excessive interstitial osmolality caused by the accumulation of sodium in the renal medulla were observed. In contrast, the interstitial urea level was significantly decreased. We hypothesize that the deficit of NFAT5 in renal tubular cells induces a change of interstitial microenvironment followed by the activation of immune responses, resulting in salt-sensitive hypertension.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：食塩感受性高血圧 NFAT5 上皮型ナトリウムチャンネル

1. 研究開始当初の背景

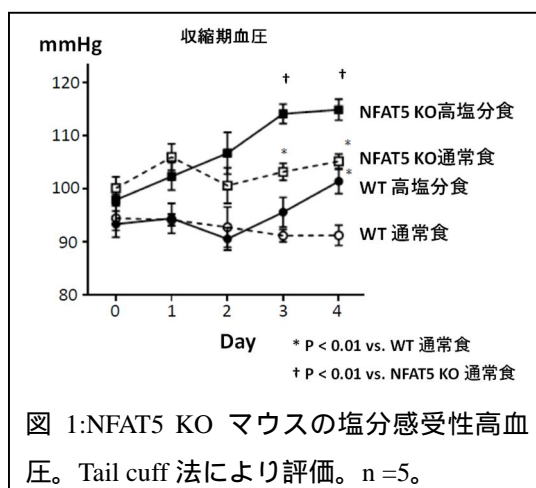
高血圧は、我が国で有病者が推定 4000 万人を超える国民病であり、心血管疾患、脳卒中、慢性腎臓病の発症、進展の強いリスク因子である。そのほとんどは本態性とされ、半数近くが塩分感受性を示すとされる。塩分感受性高血圧では、過度の塩分摂取に対して腎臓の Na 排泄の不足を認める。その原因として、尿中の Na 再吸収を担う遠位尿細管のナトリウム - クロール (Na-Cl) 共輸送体 NCC や集合尿細管の上皮型 Na チャネル ENaC の発現亢進が指摘されている。また、過剰な塩分摂取は腎組織にマイルドな慢性炎症を引き起こし、高血圧を増悪させることが指摘されている。しかし、塩分の過剰摂取が却って Na の再吸収を亢進させる機序については、十分に解明されていない。

現在、塩分感受性高血圧に対する治療としては、塩分摂取制限などの食事療法を基本とし、NCC や ENaC などを阻害するナトリウム利尿薬を中心とした降圧薬の投与を行う。その治療の問題点は、特に高齢者において、腎機能の低下とともに体液恒常性の維持が困難となり、塩分摂取の増加により容易に体液過剰になる一方で、利尿薬により容易に脱水になる危険もあることである。血圧管理のみならず良好な全身状態を安定的に保つには、腎臓による体液恒常性の維持に基づく新たな治療法の開発が求められる。

また、我が国では高齢者や慢性腎不全患者においてサルコペニアが問題となっており、その一因として蛋白質の不足が挙げられる。最近、長期の高塩分食は、筋肉の蛋白異化亢進を生じ、産生される尿素を腎間質に貯留する代わりに、過剰な Na を尿中に排泄する機序が報告された (Kitada K et al. *J Clin Invest.* 2017)。尿素の貯留は、腎髄質の間質浸透圧を保つために Na の貯留と共に必須であり、尿濃縮機構の原動力となる。このことより、腎臓における尿素と Na の代謝には密接な関わりがあることが示唆される。高齢者と慢性腎不全患者は、塩分感受性高血圧を多く認める集団でもある。申請者らは、これまでの知見から、サルコペニアや慢性腎不全の患者は、蛋白質不足から腎間質の尿素が不足する代わりに Na 再吸収が亢進し、そのために塩分感受性高血圧の増悪を生じるものと推測する。

NFAT5 は、免疫反応の制御に重要な役割を果たす NFAT ファミリーの一員であり、腎臓で発見され、ファミリーで最後にクローニングされた転写因子である。NFAT1~4 とは異なりカルシニューリンにより活性化せず、代わりに高浸透圧環境で強く活性化し、細胞の生存と機能維持に関わる遺伝子群の発現を誘導する、ユニークな性質を持つ。NFAT5 の全身性ノックアウトマウスは胎生致死であり、かろうじて出生した仔は腎臓の髄質形成不全を呈する。そのため腎臓についての研究では、これまでヘテロの全身性ノックアウトマウスが用いられてきた。腎生理的な役割としては、集合尿細管主細胞に発現する尿素トランスポーター UT-A1 の発現を調節し、間質の尿素貯留に貢献するとされるが、その他の役割についてはまだ十分に明らかではない。

そこで申請者らは、腎臓における NFAT5 の生理的役割を検討するために、尿細管細胞特異的薬剤誘導性 NFAT5 ノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型の解析を行ってきた。その中で、KO マウスは、野生型 (WT) に比べ血圧高値を呈することを見出した (図 1)。また、KO マウスは尿中 Na 排泄量が有意に減少し、血清 Na 値の高値を認めた。高塩分食を与えるとその表現型はさらに増強した。さらに KO マウスでは、UT-A1 の発現減少とともに間質の尿素貯留が著しく減少し、一方で、ENaC の発現増加とともに間質の Na 貯留が増加していた。Basal condition の腎髄質組織を用いた transcription start site-sequencing (TSS-Seq) を行ったところ、KO マウスでは免疫応答に関連する遺伝子群の発現亢進を認めた。



近年のゲノムワイド関連解析 (GWAS) において、脈圧や血清 Na 値が高値の集団で NFAT5 の多型を有意に多く認めることが報告された (Böjer CA et al. *J Am Soc Nephrol.* 2017; Tragante V et al. *Am J Hum Gen.* 2014)。NFAT5 のエピジェネティックな変化が塩分感受性高血圧の一因となる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

これまでに得られた知見より、申請者らは次の仮説（図2）証明するための新たな知見を得ることを本研究の目的とした。

正常状態では、集合尿細管細胞の NFAT5 は、UT-A1 の発現調節を介して間質の尿素貯留を維持し、尿濃縮に貢献する。一方、NFAT5 は高浸透圧環境の免疫応答の制御に關与する。NFAT5 は転写を促進する因子であり、KO マウスの ENaC の発現増加は NFAT5 の直接作用ではないと思われる。正常な尿素の貯留と免疫応答の動態により形成される間質の微小環境が、ENaC の発現と尿中 Na 排泄に貢献すると考える。尿細管細胞の NFAT5 に異常が生じると、UT-A1 の発現低下から間質の尿素が失われるとともに、間質内にマイルドな慢性炎症が惹起される。この炎症には、間質細胞の NFAT5 の活性化が關与するものと思われる。その結果、ENaC の発現と Na 再吸収の亢進が生じる。高塩分食は微小環境の免疫応答と Na 再吸収を増強し、高血圧を増悪させるものとする（図2）。

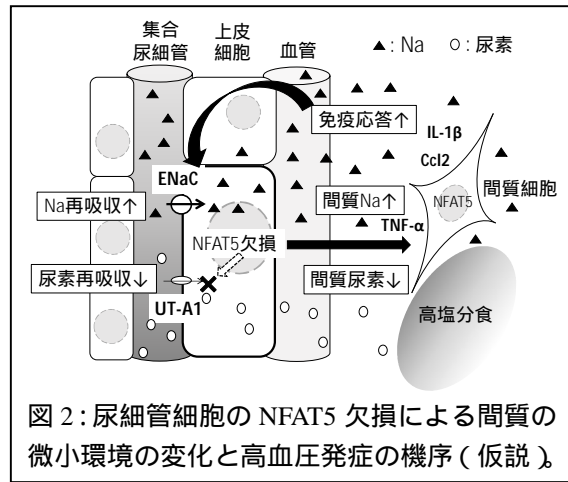


図2: 尿細管細胞の NFAT5 欠損による間質の微小環境の変化と高血圧発症の機序 (仮説)

3. 研究の方法

本研究において、次のことを検討した。

(1) NFAT5 KO マウスの血圧変化とナトリウム代謝の詳細な検討

テレメトリー法を用いて、無拘束で持続的に血圧を測定した。Basal condition で血圧を評価後、8%食塩含有食餌を与え、さらに血圧をモニターした。その後、ENaC の直接阻害薬であるアミロライドの腹腔内投与を行い、血圧に対する効果を検討した。また、血液・尿パラメーターの測定により、水・電解質代謝について検討した。

(2) 間質浸透圧、Na 濃度、尿素濃度の測定による腎間質の微小環境の検討

KO マウスの腎組織の間質浸透圧、Na 濃度、尿素濃度を測定し、野生型 (WT) マウスのそれと比較した。また、高食塩食の効果を検討した。

(3) NFAT5 KO マウスの腎組織の遺伝子発現の網羅的解析

Basal condition 下のマウスの腎髓質組織を用いて行った transcription start site sequencing (TSS-Seq) により発現変動を示した遺伝子群について、詳細な解析を行った。clusterProfiler による gene ontology (GO) 解析の後、さらに STRING を用いて遺伝子間の相互作用の解析を行った。

4. 研究成果

(1) NFAT5 KO マウスの血圧変化の詳細の検討

WT マウスに比べ KO マウスでは暗期（活動期）の平均血圧が有意に高値であった（図3）。高食塩食を与えると WT マウスに比べ KO マウスでさらに有意に上昇した。その後、高食塩食摂取下にアミロライドの腹腔内投与を行うと、KO マウスで血圧が有意に低下する一方で、WT マウスにおいてはその効果は認められなかった。明期（入眠期）においては、WT マウスと KO マウスいずれも高食塩食により血圧が上昇したが、両者に差異はなく、アミロライドの効果も認められなかった。血清 Na 濃度は KO マウスで有意に高値を呈し、高食塩食でさらに有意に上昇した。尿中 Na 排泄量は高食塩食摂取により WT、KO マウスいずれも増加したが、KO マウスの Na 排泄量は WT マウスよりも有意に少なかった。さらにアミロライドを投与すると、KO マウスの血清 Na 濃度は有意に減少する一方で、血清 K 濃度は有意に増加した。尿中 Na 排泄量は KO マウスで有意に増加した。一方、WT マウスでは、アミロライドは血清 Na、K 濃度、また尿中 Na 排泄のいずれにも明らかな効果は示さなかった。ヘモグロビン (Hb) 濃度を測定したところ、WT マウスに比べ KO マウスは通常食、高食塩食摂取のいずれにおいても、有意に低値であり、KO マウスでは循環血漿量が増加していることが推測された。

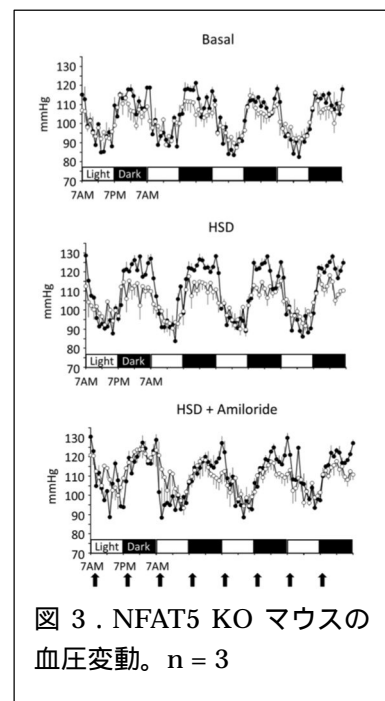


図3. NFAT5 KO マウスの血圧変動。n = 3

(Hiramatsu, Izumi, Mukoyama, et al. *Hypertension*. 2021)

(2) 間質浸透圧、Na 濃度、尿素濃度の測定による腎間質の微小環境の検討

WT マウスに比し、KO マウスでは腎髄質の Na 濃度が有意に高値であった一方で、尿素濃度は著しく低値であった。その結果、腎髄質の浸透圧は有意に高値であった。高食塩摂取により Na 濃度は WT マウス、KO マウスのいずれにおいても上昇した。尿素濃度は WT マウスで有意に上昇したが、KO マウスでは低値のままであった。その結果、浸透圧は WT マウスでは有意に上昇し、KO マウスでは通常食摂取下と同様に高値を維持していた (Hiramatsu, Izumi, Mukoyama, et al. *Hypertension*. 2021)

(3) 腎髄質組織の遺伝子発現について、TSS-Seq を用いて網羅的解析を行ったところ、NFAT5 KO マウスでは 532 遺伝子が有意に発現減少 ($\text{Log}_2 \leq -1.0$) し、944 遺伝子が有意に発現増加 ($\text{Log}_2 \geq 1.0$) していた。発現減少した遺伝子群には、NFAT5 が発現調節する既知の遺伝子が含まれる中、プロモーター領域に NFAT5 の結合モチーフを含む遺伝子も多く含まれ、NFAT5 の標的遺伝子として今後さらなる検討が期待される。発現増加した遺伝子群の GO 解析を行うと、innate immune response と adaptive immune response の活性化が強く示唆された (Ono, Izumi, Mukoyama, et al. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2024)

以上の結果より、尿細管細胞特異的 NFAT5 KO マウスは、尿の濃縮障害と、食塩感受性高血圧を呈することが明らかとなった。食塩感受性高血圧の発症には、食塩負荷による腎組織の Na 貯留がマイルドな炎症を引き起こし、尿中 Na の再吸収を促進する機序が提唱されている。尿細管細胞の NFAT5 の欠損は、UT-A1 の発現減少により髄質内の尿素蓄積を減少させ、尿濃縮能を低下させる一方で、腎髄質内の免疫応答の異常を介して ENaC の発現と尿中 Na の再吸収を亢進させ、食塩感受性高血圧を呈することが推測される。腎髄質の Na 貯留と浸透圧上昇という微小環境の変化がさらに ENaC の発現を増強するものと推測されるが、その詳細な機序についてはまだ明らかではない。GWAS による検討で、NFAT5 の遺伝子多型が血圧と血清 Na 濃度の上昇に関連することが指摘されており、本マウスは、ヒトの食塩感受性高血圧の原因の一部を反映している可能性がある。本マウスを用いて、食塩感受性高血圧の発症機序をさらに検討し、新たな治療法の開発に取り組みたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hiramatsu Akiko, Izumi Yuichiro, Eguchi Koji, Matsuo Naomi, Deng Qinyuan, Inoue Hideki, Nakayama Yushi, Nonoguchi Hiroshi, Aramburu Jose, Lopez-Rodriguez Cristina, Kakizoe Yutaka, Adachi Masataka, Kuwabara Takashige, Kim-Mitsuyama Shokei, Mukoyama Masashi	4. 巻 78
2. 論文標題 Salt-sensitive hypertension of the renal tubular cell-specific NFAT5 (nuclear factor of activated T-cells 5) knockout mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 1335 ~ 1346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.17435	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

1. 著者名 Eguchi Koji, Izumi Yuichiro, Yasuoka Yukiko, Nakagawa Terumasa, Ono Makoto, Maruyama Kosuke, Matsuo Naomi, Hiramatsu Akiko, Inoue Hideki, Nakayama Yushi, Nonoguchi Hiroshi, Lee Hyun-Wook, Weiner I David, Kakizoe Yutaka, Kuwabara Takashige, Mukoyama Masashi	4. 巻 249
2. 論文標題 Regulation of Rhcg, an ammonia transporter, by aldosterone in the kidney	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 95 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-20-0267	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

1. 著者名 Ono Makoto, Izumi Yuichiro, Maruyama Kosuke, Yasuoka Yukiko, Hiramatsu Akiko, Aramburu Jose, Lopez-Rodriguez Cristina, Nonoguchi Hiroshi, Kakizoe Yutaka, Adachi Masataka, Kuwabara Takashige, Mukoyama Masashi	4. 巻 326
2. 論文標題 Characterization of gene expression in the kidney of renal tubular cell-specific NFAT5 knockout mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F394 ~ F410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00233.2023	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18件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 丸山功祐, 泉裕一郎, 小野真, 柿添豊, 栗原孝成, 向山政志
2. 発表標題 腎尿管細胞におけるNFAT5の加齢に伴う腎機能障害への関与の可能性
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 丸山功祐, 泉裕一郎, 小野真, 柿添豊, 栗原孝成, 向山政志
2. 発表標題 腎尿管細胞内NFAT5の加齢に伴う腎機能障害および食塩感受性高血圧への関与の可能性
3. 学会等名 日本高血圧学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Maruyama K, Izumi Y, Ono M, Kakizoe Y, Kuwabara T, Mukoyama M
2. 発表標題 Possible involvement of renal tubular NFAT5 in aging-associated renal phenotypes and dysfunction
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 泉裕一郎, 向山政志
2. 発表標題 浸透圧変化～もう一つの水・ナトリウム代謝調節因子～
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 泉裕一郎, 平松晶子, 江口剛人, 松尾尚美, 鄧欽元, 野々口博史, 柿添豊, 安達政隆, 柴原孝成, 光山勝慶, 向山政志
2. 発表標題 ENaC依存性の血圧と体液量調節における浸透圧応答転写因子NFAT5の意義
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 泉裕一郎, 向山政志
2. 発表標題 食塩感受性高血圧の病態～塩とNFAT5の関わりから～
3. 学会等名 日本腎臓学会西部学術大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Izumi Y, Hiramatsu A, Eguchi K, Matsuo N, Deng Q, Inoue H, Nakayama Y, Nonoguchi H, Aramburu J, Lopez-Rodriguez C, Kakizoe Y, Adachi M, Kuwabara T, Kim-Mitsuyama S, Mukoyama M
2. 発表標題 Involvement of renal tubular NFAT5 in the regulation of blood pressure and body fluid volume
3. 学会等名 International Society of Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Maruyama K, Izumi Y, Ono M, Kakizoe Y, Morinaga J, Kuwabara T, mukoyama M
2. 発表標題 Possible involvement of renal tubular NFAT5 in aging-associated renal dysfunction
3. 学会等名 International Symposium on Cardiovascular Endocrinology and Metabolism (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 泉裕一郎, 平松晶子, 江口剛人, 松尾尚美, 鄧欽元, 野々口博史, 柿添豊, 安達政隆, 桑原孝成, 光山勝慶, 向山政志
2. 発表標題 浸透圧応答転写因子NFAT5のENaCに依存した血圧と体液調節における意義の検討
3. 学会等名 臨床高血圧フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平松 晶子, 泉 裕一郎, 江口 剛人, 松尾 尚美, 小野 真, 丸山 功祐, 中山 祐史, 井上 秀樹, 柿添 豊, 桑原 孝成, 向山 政志
2. 発表標題 腎尿細管細胞内NFAT5の食塩感受性高血圧における意義の検討
3. 学会等名 日本高血圧学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉 裕一郎, 江口 剛人, 小野 真, 平松 晶子, 井上 秀樹, 中山 裕史, 柿添 豊, 桑原 孝成, 向山 政志
2. 発表標題 腎集合尿管管間在細胞のアルドステロンによる尿中酸排泄機序の検討
3. 学会等名 日本高血圧学会臨床高血圧フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野 真, 泉 裕一郎, 松尾 尚美, 江口 剛人, 平松 晶子, 丸山 功祐, 中山 裕史, 井上 秀樹, 森永 潤, 柿添 豊, 桑原 孝成, 向山 政志
2. 発表標題 尿細管細胞内NFAT5による腎間質線維化抑制の機序の検討
3. 学会等名 日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平松 晶子, 泉 裕一郎, 江口 剛人, 松尾 尚美, 小野 真, 丸山 功祐, 中山 裕史, 井上 秀樹, 柿添 豊, 桑原 孝成, 向山 政志
2. 発表標題 腎尿細管細胞内NFAT5の塩分感受性高血圧への関与の検討
3. 学会等名 日本心血管内分泌代謝学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akiko Hiramatsu, Yuichiro Izumi, Koji Eguchi, Naomi Matsuo, Makoto Ono, Yushi Nakayama, Hideki Inoue, Yutaka Kakizoe, Takashige Kuwabara, and Masashi Mukoyama
2. 発表標題 Involvement of renal tubular NFAT5, an osmosensitive transcription factor, in urine concentration and sodium reabsorption
3. 学会等名 International Society of Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuichiro Izumi, Koji Eguchi, Makoto Ono, Akiko Hiramatsu, Hideki Inoue, Yushi Nakayama, Hiroshi Nonoguchi, Yutaka Kakizoe, Takashige Kuwabara, and Masashi Mukoyama
2. 発表標題 Urinary ammonium excretion by aldosterone through the regulation of Rh C glycoprotein in the intercalated cells of the renal collecting duct
3. 学会等名 International Society of Hypertension (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akiko Hiramatsu, Yuichiro Izumi, Yutaka Kakizoe, Masataka Adachi, Hiroshi Nonoguchi, Takashige Kuwabara, and Masashi Mukoyama
2. 発表標題 Regulation of sodium excretion and blood pressure by the nuclear factor of activated T cells 5, NFAT5, in renal tubular cells
3. 学会等名 American Society of Nephrology Kidney Week (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 泉裕一郎、平松晶子、江口剛人、松尾尚美、鄧欽元、柿添豊、安達政隆、栞原孝成、光山勝慶、向山政志
2. 発表標題 腎集合尿管における新規転写因子の意義と食塩感受性高血圧の機序に関する研究
3. 学会等名 高血圧関連疾患モデル学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	向山 政志 (Mukoyama Masashi) (40270558)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	

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		
スペイン	Universitat Pompeu Fabra	Barcelona Biomedical Research Park	