

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11716

研究課題名(和文) 食塩過剰摂取による腸粘膜Naイオン輸送異常は食塩感受性高血圧発症に関与するか？

研究課題名(英文) High-salt diet induced inconsistent intestinal transepithelial sodium transport contributes Dahl salt-sensitive hypertension

研究代表者

晝間 恵 (HIRUMA, Megumi)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・生理学・講師)

研究者番号：30572870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食塩過剰摂取による高血圧発症に、過剰なNaイオンを尿中に排泄する腎臓の機能不全が関与することは周知である。体液量調節の主軸は腎臓だが、体内循環水およびNaイオンの吸収の場は腸である。そこで、腸粘膜での水およびNaイオンの輸送異常を検討した結果、正常で起こる食塩過剰摂取による腸粘膜細胞膜上のナトリウム・カリウム(NKA)ポンプの活性の抑制が、Dahl食塩感受性(DSS)高血圧ラットでは起こらないこと、さらに、腸粘膜細胞間隙透過性が亢進していることが分かった。以上より、食塩過剰摂取時にDSSラットの腸粘膜細胞でのNaイオンの吸収が亢進することが、高血圧発症の一因になっている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血圧発症 = 循環血液量 × 総末梢血管抵抗で表される。これより、高血圧症の研究分野では体液量調節に主に関与する腎臓、および、末梢血管抵抗に関与する血管平滑筋に焦点が当てられてきた。本研究では、関連性が検討されてこなかった腸と高血圧との関係に注目した。体液量調節は腎臓が主体であるが、体内循環水の吸収の場である腸粘膜でのNaイオン、それに伴う水の吸収亢進も体液量および血中Naイオン濃度に影響する。本研究により、食塩過剰摂取時の腸でのNaイオンの吸収調節異常が高血圧発症に関与することが明らかとなった。本研究により、腸をターゲットとした高血圧予防の可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：It is evident that the impairment of natriuresis in the renal epithelia induces salt-sensitive hypertension. The renal epithelia play pivotal role in the regulation of sodium balance and blood pressure, however, the intestinal epithelia, which absorb the body fluid and sodium, also play important role in sodium homeostasis. It has been proposed that Na/K-ATPase (NKA) is one of the most important factors for the susceptibility of high-salt diet in hypertensive Dahl salt-sensitive (DSS) rats. Therefore, we investigated whether high-salt diet affect NKA activity of intestinal epithelial. We demonstrated that high-salt diet decreased NKA activity and led the increased secretion of sodium in normotensive rats, but not in hypertensive DSS rats. Furthermore, the permeability in the intestinal epithelia increased in hypertensive DSS rats. These results imply that inconsistent sodium ion transport contributes salt-induced hypertension.

研究分野：食塩感受性高血圧

キーワード：腸粘膜Naイオン輸送 食塩感受性高血圧 ナトリウム・カリウムポンプ(NKAポンプ) 食塩過剰摂取 細胞間隙結合タンパク質 c-Src リン酸化

1. 研究開始当初の背景

食塩と高血圧との関連を明らかにする目的で作製された Dahl 食塩感受性(DSS)ラット(Dahl et al, 1960)は、ヒト本態性高血圧の中でも食塩感受性高血圧のモデルとされた。DSS 高血圧ラットを用いて食塩過剰摂取と食塩感受性高血圧との因果関係の解明が進められ、細胞膜に普遍的に存在し、細胞内外の Na⁺能動輸送に関わる Na⁺/K⁺-ATPase(NKA)ポンプのイオンポンプとしての役割と細胞内シグナル伝達を担う受容体としての役割が重要であることが分かった(Blaustein, 2018)。食塩過剰摂取は、ウアバインやマリノブファゲニンなどの Cardiotonic Steroids(CTS)の分泌を促進する(Manunta et al, 2006)。これらは NKA ポンプのリガンドであり、生理的濃度で NKA に作用すると細胞内部分に結合している c-Src を活性化する。正常ラット腎臓近位尿細管(RPT)上皮細胞では、食塩過剰摂取により c-Src 活性化(リン酸化)を介して NKA ポンプのエンドサイトーシスが促進される(図 1B)。その結果、Na⁺再吸収が減少して血圧上昇を回避する機構が働く。しかし、DSS ラットではエンドサイトーシスが促進されず、NKA ポンプ活性が抑制されないため、高 Na⁺と高体液量が維持される。これが高血圧発症の一因とされた(図 1C、Liu et al, 2012)。

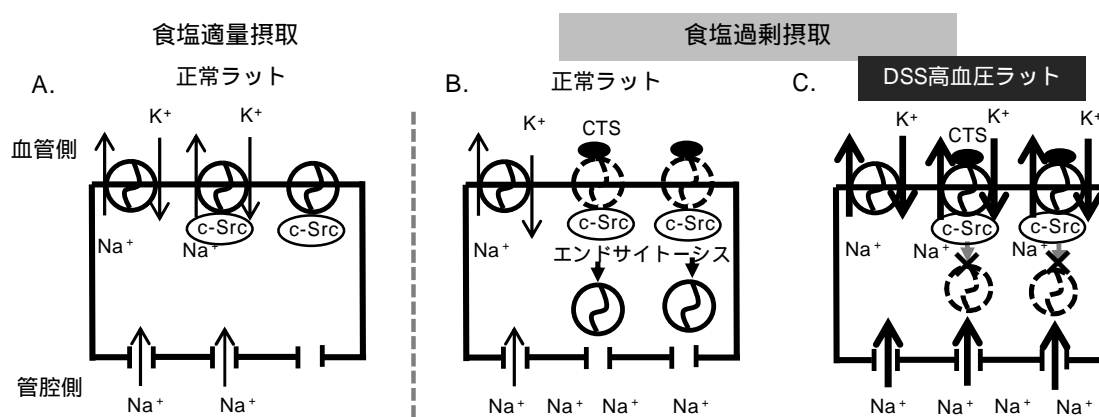


図 1 RPT上皮細胞におけるNKAポンプ活性抑制のメカニズム。A. 食塩適量摂取時、NKAポンプはNa⁺の血管側への内向き勾配を維持する。食塩過剰摂取時、B. 正常ラットではNKAポンプのエンドサイトーシスが促進される。C. DSS高血圧ラットでは促進されない。||; Na⁺チャネル、⊗; NKAポンプ、●; CTS。

近年、体内循環水の吸収の場である腸の高血圧発症への関与が注目されてきたが、まだ詳細は分かっていない。申請者らは、上皮膜の電解質輸送を電気生理学的に測定する短絡電流法を用いて、食塩過剰摂取により、正常(SD)ラットでは細胞膜を介した Na⁺能動輸送が低下するのに対し、DSS ラットでは変化しないことを明らかにした。従って、DSS 高血圧ラットでは腸粘膜上皮細胞においても NKA ポンプのエンドサイトーシスが抑制されていることが推測された。さらに、DSS 高血圧ラットでは腸粘膜細胞間隙の Na⁺透過性も増加していることが分かった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、食塩過剰摂取による DSS 高血圧ラットの腸粘膜 Na⁺イオン輸送異常の機構を解明し、高血圧発症との関連を探ることである。血圧 = 循環血液量 × 総末梢血管抵抗で表される。このことより、高血圧症の研究分野では、体液量調節に関与する腎臓、および末梢抵抗に関与する血管平滑筋に焦点が当てられてきた。本研究では、関連が検討されてこなかった腸と高血圧との関係に注目する。体液量調節は腎臓が主役であるが、体内循環水の吸収は腸で行われていることより、腎臓のみならず腸粘膜での水および Na⁺の吸収亢進も体液量および血中 Na⁺濃度に関与すると思われる。

3. 研究の方法

- (1) DSS 高血圧ラットでは腸粘膜上 NKA ポンプの発現と活性が変化しない(SD ラットでは減少する)ことを明らかにする。
 - a) 食塩過剰摂取による NKA ポンプの発現抑制が DSS 高血圧ラットでは起こらないことを Western blotting および蛍光免疫組織染色-共焦点レーザー顕微鏡にて明らかにする。さらに、食塩過剰摂取による NKA の ATPase 活性の変動を明らかにする。
 - b) SD ラットでの食塩過剰摂取による NKA ポンプの発現抑制に c-Src リン酸化が関与していること、一方、DSS 高血圧ラットでは c-Src リン酸化が低下していることを免疫沈降-Western blotting により明らかにする。DSS ラットの血圧は高食塩負荷後 7 日目以降から上昇し始める。c-Src リン酸化は速やかに起こるため、血圧上昇が急峻である食塩過剰摂取後 14 日目のラットから腸粘膜筋板試料を採取する。

- (2) DSS 高血圧ラットの腸粘膜細胞間隙透過性亢進のメカニズムを明らかにする。
- 食塩過剰摂取により、非イオン性分子 (7kDa デキストラン) の細胞間隙透過性が増加することを短絡電流法にて明らかにする。
 - 食塩過剰摂取による細胞間結合形成タンパク質(バリアマーカー)の発現促進が DSS 高血圧ラットでは起こらないことを Western blotting、real time RT-PCR にて明らかにする。

4. 研究成果

本研究は、食塩過剰刺激における腸の対処異常の機構を解明し、高血圧発症との関連を探る目的で行い、以下のことが分かった。

- 食塩過剰摂取により、SD ラット (コントロール) では、腸粘膜細胞膜上 NKA ポンプの発現量が減少するが、DSS 高血圧ラットでは変化しないことが分かった。さらに、SD ラットでは NKA ポンプの ATPase 活性が低下するが、DSS 高血圧ラットでは変化は認められなかった。
- 食塩過剰摂取による NKA ポンプの腸粘膜細胞における局在変化を見ると、SD ラットでは細胞膜上 NKA ポンプの局在が減少し、細胞質での局在の増加が認められたが、DSS 高血圧ラットでは局在の変化は認められなかった。
- 食塩過剰摂取により腸粘膜上 NKA ポンプの発現が減少する SD ラットでは c-Src リン酸化が促進していること、一方、DSS 高血圧ラットでは、腸粘膜上 NKA ポンプ発現に変化がなく、また、c-Src リン酸化は促進されないことが分かった。
- DSS 高血圧ラットでは、腸粘膜細胞間隙の透過性が亢進していることが分かった。
- 腎臓由来培養細胞では NKA ポンプに結合している c-Src の活性化による細胞間結合タンパク質の発現レベルや分布パターンの制御が報告されている (図 2)。DSS 高血圧ラット腸粘膜細胞の細胞間隙タンパク質である Occludin と Claudin-1 の発現が減少していることが分かった。c-Src リン酸化が促進されないことが一因と推測される。

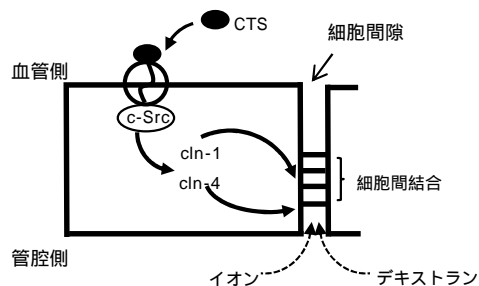


図2 CTSによるMDCK細胞の細胞間結合形成タンパク質発現促進のメカニズム。CTSはその受容体であるNKAに結合するとc-Srcのリン酸化を介してcln-1およびcln-4の細胞間隙への発現を促進する。○;NKAポンプ、●; CTS、○; cln-1; claudin-1、○; cln-4; claudin-4。

以上より、NKA ポンプを介した腸粘膜 Na イオン輸送異常が食塩感受性高血圧発症に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 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
研究分担者	栗原 千枝 (KURIHARA Chie) (90532515)	防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・助教） (82406)	

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