

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590907

研究課題名（和文） 食塩感受性高血圧における炎症シグナルとリンパ管再構築に対する高張性Na蓄積の意義

研究課題名（英文） Role of interstitial sodium accumulation on inflammatory cytokines and lymphcapillary reconstruction in salt-sensitive hypertension.

研究代表者

中村 哲也（NAKAMURA TETSYA）

群馬大学・医学部・准教授

研究者番号：10272238

研究成果の概要（和文）：

ウシ大動脈血管内皮細胞において、野生型 heat shock factor 1(HSF1)は、血管拡張因子 endothelial nitric oxide synthase と抗血液凝固因子 thrombomodulin を増加させた。肥満糖尿病ラットの腎髄質で、活性酸素種産生の遺伝子発現が亢進していた。腎リンパ管再構築により腎髄質血流量が低下し、食塩感受性高血圧を発症させることを示唆する結果であった。

研究成果の概要（英文）：

In vascular endothelial cells, the active form of human heat shock factor-1 (HSF1) raised the levels of endothelial nitric oxide synthase (relaxation factor) and thrombomodulin (anticoagulation factor). The gene expression of oxidative stress was elevated in renal medulla in salt-sensitive hypertensive rats. The results suggest that renal lymphcapillary reconstruction should reduce renal medullary blood flow, induce the rightward shift of the pressure-natriuresis curve and lead to the development of salt-sensitive hypertension.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：高血圧学、圧ナトリウム利尿曲線

1. 研究開始当初の背景

高血圧発症においては、腎の圧ナトリウム(Na)利尿曲線の set point と傾きの変化が必須の条件である。圧Na利尿は血圧の上昇、すなわち腎灌流圧の上昇が尿中Na排泄量を

増加させる現象を意味する。腎灌流圧の上昇は、皮質表層ネフロンでは自動調節能により、その血流量を変化させないが、傍髄質ネフロンでは、輸出細動脈から腎髄質に伸びる直細動脈の血流量を増加させる。そこで、圧Na

利尿機序には、腎灌流圧上昇による直細動脈血流量増加が、腎臓全体の間質圧を上昇させ、上昇した腎間質圧が水と Na を尿細管細胞間隙から直接押し出す、または、Na 再吸収に関与する尿細管イオンチャネルの活性を変化させるなどが想定されている。直細動脈の収縮・弛緩は、腎髄質血流量を調節するが、これは内皮細胞をとりまく一層の壁細胞の収縮・弛緩による。我々は、圧 Na 利尿を仲介する腎間質圧の調節に一酸化窒素(NO)が重要な役割を有することを報告してきた(Nakamura T, Alberola AM, Granger JP. Role of renal interstitial pressure as a mediator of sodium retention during systemic blockade of nitric oxide. *Hypertension* 21: 956-960, 1993.)。一方、直細動脈の壁細胞には、血管平滑筋の収縮蛋白であるミオシンが存在するが、そのタイプや収縮特性は明らかにされていない。

食塩感受性高血圧では、組織での Na 蓄積にともなって、体液の等張性を維持するのにつり合った水分保持が起こる。最近、ラットの高食塩食によって皮膚間隙に高張性 Na 蓄積が起こり、毛細リンパ管ネットワークの密度の増加と過形成がもたらされることが報告された (Machnik et al. *Nat Med* 15:545-552, 2009)。さらに、リンパ系に対するこのような作用の基盤には、組織間隙に浸潤するマクロファージなどの単核食細胞系 (MPS) 細胞の浸透圧応答配列結合タンパク質 (TonEBP) の活性化が関わっていることも示された。TonEBP は、マクロファージにおいて高張性 Na 蓄積によって浸透圧感受性に発現し、血管内皮細胞増殖因子 C (VEGF-C) をコードする遺伝子 VEGF-C のプロモーターに結合し、マクロファージからの VEGF-C 分泌を引き起こす。Machnik によると、単核食細胞系 (MPS) 細胞の激減あるいは可溶性 VEGF 受容体による VEGF-C の捕捉は、VEGF-C シグナル伝達を遮断し、組織間隙の高張性容積維持を増強し、炎症シグナルを介して、内皮型一酸化窒素合成酵素の発現を減少させ、高食塩食に応答して血圧を上昇させた。

近年、グラム陰性桿菌の菌体成分である lipopolysaccharide (LPS) をリガンドとする受容体 Toll-like receptor family が、炎症反応のメディエーターであることが明らかにされた。なかでも Toll-like receptor 4 (TLR4) は LPS による炎症反応のシグナル伝達を仲介し、炎症性サイトカインの monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 や tumor necrosis factor (TNF) α の産生を引き起こす。初期動脈硬化病変において、TLR4 の発現が確認されたことから、TLR4 は炎症と組織傷害を結びつける key molecule として、その働きが注目されている。

2. 研究の目的

本研究計画においては、高食塩食によって、組織間隙に高張性ナトリウム (Na) 蓄積が起こり、単核食細胞系細胞における炎症シグナルを介した毛細リンパ管ネットワークの再構築 (密度増加と過形成) が引き起こされることを示す。この毛細リンパ管ネットワーク再構築に異常が生じると、腎間質圧調節異常、腎髄質血行動態変化、尿細管 Na 再吸収低下、圧 Na 利尿曲線右方偏位により、食塩感受性高血圧が発症進展することを明らかにする。

食塩と炎症反応、リンパ管再構築の分子的な関わりについて、TonEBP-VEGF-C シグナル伝達と TLR4 に焦点を当てて解明する。特に、単核食細胞系細胞における血管内皮細胞増殖因子 C (VEGF-C) のプロモーター結合タンパク (TonEBP) が、浸透圧感受性に Na イオン高浸透圧によって発現される遺伝子であり、TonEBP-VEGF-C を介したシグナル伝達が、細胞外液量と血圧の恒常性維持の主要な決定因子であることを示す。

高齢化や生活習慣の欧米化を背景に、循環器疾患が急増し、健康寿命に大きな影響を及ぼしている。高血圧は、主要な循環器疾患危険因子であり、環境因子特に食塩と複数の遺伝子の相互作用から発症する。一方、高血圧の発症・進展要因は非常に多様であり、炎症や酸化ストレスなどの非古典的な危険因子も知られるようになった。本研究計画の目的は、全身血圧を規定する圧ナトリウム(Na)利尿を直接仲介する腎髄質循環の調節機序を、食塩と炎症シグナルに焦点を当てて、分子レベルで解明し、原因が特定されていない本態性高血圧症における意義を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

本研究計画は、これまでその正体が十分明らかにされていなかった食塩と炎症、さらにリンパ管ネットワーク再構築の関係を分子レベルで解明し、食塩感受性高血圧の発症・進展における意義を明確にする。単に少数の遺伝子発現レベルを検討するのみでなく、TLR4 遺伝子や TonEBP 遺伝子、VEGF-C 遺伝子、PPAR γ 遺伝子などの鍵となる遺伝子に焦点をあてつつ、ゲノム全体を網羅する。遺伝子発現レベルを、疾患モデル動物や培養血管平滑筋細胞において並行して測定し、蛋白質レベルでの検討も加えて、病態発症との関係を解析する。

高食塩食負荷の遺伝子発現に対する効果について、高血圧モデルラットにおける高食塩食負荷が遺伝子発現に及ぼす影響について検討する。肥満糖尿病を呈する OLETF ラット (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty Rat)、正常対照の LETO ラット (Long Evans

Tokushima Otsuka Rat)、高血圧自然発症ラット (SHR)、Dahl 食塩感受性ラットの腎臓、大動脈、心臓から mRNA を抽出し、TaqMan probe を用いたリアルタイム reverse transcription-polymerase chain reaction 法 (RT-PCR 法) により、遺伝子発現を定量する。

食塩感受性高血圧の発症・進展に関与すると予想される TonEBP-VEGF-C、炎症を仲介する Toll-like receptor 4 (TLR4)、インスリン感受性に関与する Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)、炎症性サイトカインの tumor necrosis factor (TNF) α や monocyte chemoattractant protein (MCP)-1、さらに酸化ストレスに関係する NADH oxidase や NO 合成酵素の各遺伝子発現を測定し、その相互関係を解明する。各疾患モデルラットの血圧 (Tail Cuff 法)、心機能 (心エコー法)、内皮依存性血管弛緩反応 (アセチルコリンに対する血管弛緩反応)、インスリン、血糖を測定し、遺伝子発現レベルと対比する。

高張性 Na イオン刺激に対する培養血管平滑筋細胞における遺伝子発現変化について、培養血管平滑筋細胞における TLR4 と炎症性サイトカイン、TonEBP-VEGF-C シグナルの相互作用について、高張性 Na イオン刺激の存在下、非存在下で比較する。TLR4 遺伝子を RNA 干渉によりノックダウンした培養血管平滑筋細胞に、高張性 Na イオン刺激や lipopolysaccharide (LPS) を添加し、TonEBP 遺伝子及び炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-6、IL-8、MCP-1 等) 遺伝子発現変化をリアルタイム RT-PCR 法にて観察する。炎症性サイトカイン (TNF α 、IL-6、IL-8、MCP-1 等) 蛋白レベルの測定は、マルチプレックス・ビーズ・アレイ法により多種類の炎症性サイトカインを 1 回の測定で行う。酸化ストレスマーカー、炎症性サイトカイン、一酸化窒素産生量についても測定する。酸化ストレスマーカーとして、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) (酸化ストレスによる DNA 傷害マーカー) と 8-isoprostane (酸化ストレスによる細胞膜傷害マーカー) を測定する。ノックダウンしていない培養血管平滑筋細胞での成績と比較する。

TonEBP-VEGF-C の腎リンパ管ネットワーク再構築における役割について、Na イオン高浸透圧刺激による TonEBP-VEGF-C を介したシグナル伝達が、細胞外液量と血圧の恒常性維持の主要な決定因子であることを示す。食塩感受性高血圧を呈するモデル動物において、TonEBP-VEGF-C の腎髄質内での発現量と分布、さらにリンパ管ネットワーク構築との関係について明らかにする。

高食塩食で飼育し、血圧が上昇した Dahl 食塩感受性ラットと同じ食餌で飼育した

Dahl 食塩非感受性ラット、高血圧発症前の幼若自然発症高血圧ラットと対照である幼若 Wistar Kyoto ラット、低食塩食で飼育され正常血圧の Dahl 食塩感受性ラットと対照である Dahl 食塩非感受性ラット、高血圧発症後の自然発症高血圧ラットと同週令の Wistar Kyoto ラットの腎臓切片を作成する。リアルタイム RT-PCR による TonEBP mRNA、VEGF-C mRNA の定量、TonEBP 抗体、VEGF-C 抗体による免疫組織学的検討、さらに毛細リンパ管ネットワークの形態学的構築を観察する。各群のラット腎臓において、腎髄質の TonEBP mRNA、VEGF-C mRNA の発現量、および TonEBP 蛋白、VEGF-C 蛋白の分布、さらに毛細リンパ管の形態学的構築に差があるかを検討する。

4. 研究成果

食塩感受性高血圧における腎臓のリンパ管再構築の機序を明らかにするため、血管内皮細胞機能に影響を与える因子の発現変化を検討した。ウシ大動脈血管内皮細胞及びヒト大動脈血管内皮細胞において、野生型 heat shock factor 1 (HSF1) の過剰発現により endothelial nitric oxide synthase (eNOS)、thrombomodulin (TM) の発現上昇を認め、Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)、Endothelin-1 (ET-1) の発現抑制を認めた。活性型 HSF1 では野生型 HSF1 に比べて発現変化がより強く認められた。

HSF1 によって誘導される各 heat shock proteins により、ET-1、TM、eNOS、PAI-1 の発現の変化を観察した。ET-1 は HSP90 の過剰発現により減少した。TM は HSP32 の過剰発現により上昇した。eNOS は、HSP70 と HSP90 の両者の過剰発現により発現が誘導された。逆に PAI-1 は、HSP70 と HSP90 の両者の過剰発現により抑制された。PAI-1 は HSP32 の過剰発現でも抑制された。

以上から、野生型 HSP1 及び活性型 HSF1 は heat shock proteins の発現を介して、血管拡張因子を増加させ、抗凝固系を増加させることにより、血管内皮細胞機能を改善させることが示された。このことは、食塩感受性高血圧における腎臓のリンパ管再構築においても、一定の機能を果たしていることを予想させる結果であった。

高血圧モデルラットにおける高食塩食負荷が遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。肥満糖尿病を呈する OLETF ラット (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty Rat)、正常対照の LETO ラット (Long Evans Tokushima Otsuka Rat) の腎臓、大動脈、心臓から mRNA を抽出し、TaqMan probe を用いたリアルタイム reverse transcription-polymerase chain reaction 法 (RT-PCR 法) により、遺伝子発現を定量した。

酸化ストレス関連の遺伝子では、OLETF の腎髄質で、活性酸素種産生に関与する Gp91phox、p22phox の遺伝子発現が亢進していたが、活性酸素種消去に関与する Gpx、SOD1 の遺伝子発現は LETO と差がなかった。OLETF の左心室で Gp91phox、p22phox、GPx の産生が LETO より亢進していた。OLETF の大動脈では、Gp91phox の発現は増加したが、SOD1 の発現は LETO より低下していた。Catalase は、いずれの臓器でも、OLETF と LETO で差はなかった。

OLETF の腎髄質と左心室では、活性酸素種増加に作用する遺伝子発現が亢進しており、腎髄質の血流量低下と左心室の臓器障害に関与しているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Kobayashi T, Saji T, Otani T, Takeuchi K, Nakamura T, Arakawa H, Kato T, Hara T, Hamaoka K, Ogawa S, Miura M, Nomura Y, Fuse S, Ichida F, Seki M, Fukazawa R, Ogawa C, Furuno K, Tokunaga H, Takatsuki S, Hara S, Morikawa A, on behalf of the RAISE study group investigators. Efficacy of immunoglobulin plus prednisolone for prevention of coronary artery abnormalities in severe Kawasaki disease (RAISE study): a randomised, open-label, blinded-endpoints trial. *Lancet* 379: 1613-1620, 2012. 査読有

② Uchiyama T, Tomono S, Utsugi T, Ohyama Y, Nakamura T, Tomura H, Kawazu S, Okajima F, Kurabayashi M. Constitutively active heat shock factor 1 enhances glucose-driven insulin secretion. *Metabolism Clinical and Experimental* 60: 789-798, 2011. 査読有

[学会発表] (計5件)

① 内山強、伴野祥一、中村哲也、倉林正彦、岡島史和。常時活性型 Heat shock factor 1 は insulin 分泌を促進させる。糖尿病 55(Suppl 1): S-350, 2012. 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 2012 年 5 月 17 日から 5 月 19 日。

② Kobayashi T, Saji T, Takeuchi K, Nakamura T, Arakawa H, Ogawa S, Miura M, Nomura Y, Ichida F, Seki M, Morikawa A. Efficacy of immunoglobulin plus prednisolone for prevention of coronary artery abnormalities in severe Kawasaki

disease: a prospective, randomised, open, blinded-endpoint trial. *Circ J* 76(Suppl. 1):I-550, 2012 The 76th annual scientific meeting of the Japanese Circulation Society. 2012 年 3 月 16 日から 3 月 18 日。

③ Kobayashi T, Saji T, Otani T, Takeuchi K, Nakamura T, Arakawa H, Kato T, Hara T, Hamaoka K, Ogawa S, Miura M, Nomura Y, Fuse S, Ichida F, Seki M, Morikawa A, The RAISE Study Investigators. Abstract 9271: Significance of primary therapy with intravenous immunoglobulin plus prednisolone for severe Kawasaki disease: result from Japanese multicenter randomized clinical trial. *Circulation* 124: A17014, 2011. Scientific Sessions 2011, American Heart Association. 2011 年 11 月 12 日から 11 月 16 日

④ 中村哲也、小林徹、荒川浩一、佐地勉。重症川崎病患者に対する免疫グロブリンと免疫グロブリン・プレドニゾン初期併用投与のランダム化比較試験 (RAISE Study) - データセンターの取り組み - 第 38 回日本小児臨床薬理学会 2011 年 11 月 3 日から 11 月 4 日。

⑤ 内山強、中村哲也、斎藤勇一郎、伴野祥一、岡島史和、倉林正彦。Heat shock factor-1 と活性型 Heat shock factor-1 は血管内皮細胞機能を改善する。-プログラム・抄録集-394 頁。第 34 回日本高血圧学会総会 2011 年 10 月 20 日から 10 月 22 日。

[図書] (計2件)

① 中村哲也。高血圧治療における配合剤処方の方の意義 *高崎医学* 62: 100-103, 2011

② 斎藤勇一郎、中村哲也、倉林正彦。高血圧/セミナー 高血圧の発生機序とその治療ストラテジー これからの降圧薬の使い方最適な降圧薬の組み合わせ - 併用療法と合剤のこれから - *Medical Practice* 28(No. 5): 858-862, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)
該当なし

○取得状況 (計0件)
該当なし。

[その他]

ホームページ等
該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 哲也 (NAKAMURA TETSYA)

研究者番号：10272238

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

倉林 正彦 (KURABAYASHI MASAHIKO)

研究者番号：00215047

齋藤 勇一郎 (SAITO YUICHIRO)

研究者番号：30344922