

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591225

研究課題名(和文) 高血圧発症における「塩分メモリー」の解析とその分子機序の検討

研究課題名(英文) Analysis of salt memory in hypertension and its molecular mechanism

研究代表者

篠村 裕之 (Sasamura, Hiroyuki)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：00235293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧の発症には遺伝素因と環境因子の双方が重要な役割を担うことが知られている。環境因子の中でも特に塩分が重要な役割を担うことが示されているが、塩分が高血圧の発症とどのように関連するのかについては不明な点が多い。本研究では2つの高血圧モデル動物に対して、6週齢から14週齢まで高食塩食を投与すると、高血圧が持続する、すなわち「塩分メモリー」が存在することを明らかとした。また、腎臓の交換移植実験を行った結果、その主座が腎臓に存在することを明らかにし、またその機序を検討した結果、腎臓の細動脈のリモデリングと全身および局所のレニン-アンジオテンシン系の亢進がこの現象に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypertension is known to occur because of an interplay between genetic and environmental factors. Of these environmental factors, changes in salt balance are thought to play a major role in the pathogenesis of hypertension, but the precise mechanisms by which the changes in salt balance cause elevations in blood pressure are still unclear. In this study, we show that transient treatment with a high-salt diet from age 6 to age 14 weeks causes hypertension which is sustained even after the high-salt diet is changed to a normal diet. Analysis of the mechanisms involved by renal cross-transplantation revealed an important role for the kidney in the salt memory phenomenon and also revealed that changes in renal vascular hypertrophy and a sustained increase in the systemic and local renin-angiotensin system were involved in the molecular mechanism.

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：塩分 高血圧

1. 研究開始当初の背景

高血圧は本邦において最も有病率の高い疾患であり、約 4000 万人が罹患していることが様々な疫学的検討から示されている。高血圧は遺伝素因と環境因子の相互作用により発症することが知られており、環境因子の中でも特に塩分バランスが重要な役割を担うことが知られているが、食塩摂取の変化が高血圧の発症や維持にどのような影響を与えるのかについての詳細は不明な点が多い。

以前に研究代表者は高血圧モデル動物である高血圧自然発症ラット(SHR)やDahl食塩感受性(DS)ラットに、高血圧発症早期の‘critical period’にレニン-アンジオテンシン系(RAS)抑制薬を3-10週齢に投与すると、血圧は薬剤投与期間中のみならず、薬剤中止後も6カ月以上も血圧低下が続くことを報告してきた(J Am Soc Nephrol 2001, Nephron 2002)。その機序として、腎臓の血管障害とレニン-アンジオテンシン系の活性化が重要な役割を担うことが明らかとなった。ヒトにおいても同様な現象を認めることをJuliusらが報告した(N Engl J Med 2006)。最近の我々の予備検討では、塩分感受性高血圧のモデル動物として知られているDahl食塩感受性(DS)ラットに生後6週齢から14週齢における塩分バランスの変化は、その後も「記憶」され、持続性の高血圧をもたらす可能性を示唆する実験結果を得た。そこで、本研究では各種高血圧モデル動物における「塩分メモリー」の存在を明らかにし、その機序を腎交換移植実験等を用いて検討することを目的とした。

2. 研究の目的

(1) 食塩感受性高血圧のモデル動物であるDahl食塩感受性ラット(DS)における「塩分メモリー」の存在を検討し、その機序を検討すること。具体的には「塩分メモリー」の出現にはクロールイオンが必要か否かを検討し、更に各種降圧薬を投与することにより「塩分メモリー」出現における血圧依存性と非依存性の機序の関与を調べる。また腎臓における組織学的変化や蛋白尿の変動についても検討する。

(2) 本態性高血圧症のモデル動物である高血圧自然発症ラット(SHR)における「塩分メモリー」の存在を検討し、その機序を検討すること。具体的には、「塩分メモリー」出現にはナトリウム、クロール両イオンの存在の必要性を検討する。

(3) 腎臓の交換移植実験を行うことにより、「塩分メモリー」における腎臓の役割を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 「塩分メモリー」を検討するために、DSラットを用いた。雄DSラット(n=24)を4群に分け、コントロールを除く群では各々6週齢から14週齢まで低食塩食(0.12% NaCl)、高NaCl食(7% NaCl)、また高NaCl食と同等のNa負荷となる高Na/アミノ酸食(12.7% NaAA:リン酸・アスパラギン酸・グリシン酸Na)を与えた後、正常食に戻し、その後約3カ月間、定期的にtail-cuff法で血圧測定を行い、24時間蓄尿にて尿蛋白の変動、Na、Cl排泄量を測定した。

また高食塩食と降圧薬投与の影響を検討した実験ではDSラット(n=72)を5群に分けた。コントロールラットは無処置とし、他の群には各々高食塩食とともに血管拡張薬(VD)(ヒドララジン25 mg/kg/d)、カルシウム拮抗薬(CCB)(ニフェジピン50mg/kg/d)、アンジオテンシン受容体拮抗薬(カンデサルタン2mg

/kg/d)、CCB+ARBの各降圧薬を6週齢から14週齢まで8週間投与し、その後は正常食にもどした。血圧と尿蛋白は24 - 28週齢まで経時的に測定し、半数のラットを14週齢、残りのラットを28週齢で屠殺し、組織学的・生化学的解析を行った。

(2)雄 SHR(n=30)を5群に分け、コントロールを除く群では同様に6週齢から14週齢まで一過性に、低食塩食(0.12%NaCl)、高NaCl食(7%NaCl)、高NaAA食(12.7%NaAA)、また高NaCl食と同等のCl⁻負荷となる高Cl⁻/アミノ酸(AACl)食(11.6%AACl:グリシン・コリンCl)を与えた後、正常食に戻し、その後約3カ月間、定期的にtail-cuff法で血圧測定を行い、24時間蓄尿にて尿蛋白の変動、Na、Cl排泄量を測定した。28週齢で全群屠殺し、組織学的・生化学的解析を行った。

(3)腎移植はLeeらやMorganらの方法に準じて行った。すなわち、ドナーの腎臓をヘパリンで灌流した後に大動脈と下大静脈とともに除去し、レシピエントの左腎臓は摘出し、大動脈・大静脈と尿感の吻合を行った。すべての手術でイソフラン吸入麻酔(2L/min)を用いた。腎移植のプロトコールとして、(i)高NaCl食を高血圧発症時期の6週齢から14週齢まで投与し、「塩分メモリー」が確立されたラットの腎臓を、無処置のラットに移植する。(ii)反対に無処置ラットの腎臓を、同様に高食塩食を高血圧発症早期に8週間投与し、「塩分メモリー」が確認されたラットに移植した。腎移植後1週間後に、対側腎を摘出した上で血圧の変動をtail-cuff法にて観察した。また、移植腎が、移植時と変わりなく移植後も機能することを確認するため、移植時のドナーで移植後90日の時点で腎機能をBUN、Cr採血にて評価した。サクリファイス前にテレメトリーカテーテルを大動脈に挿入し、tail-cuff法と血圧の相違がないか検討した。

サクリファイスを行い、また、腎組織PAS染色にて、移植後の腎細動脈の変化、拒絶反応が生じていないことを観察した。

(4)測定系

ラットの収縮期血圧はtail-cuff法にて測定した。また、腎移植実験では動脈血圧はTA1 1PA-C40テレメトリーシステムにて測定した。測定は2時間の間行い、その平均の値を利用した。尿中電解質や蛋白質は24時間蓄尿にて測定し、既報の方法で測定した。腎臓のAng IIは腎臓のホモゲネートの上清をRIA法で測定した。腎臓の組織はパラホルムアルデヒド固定した後にパラフィン包埋し、糸球体や腎細動脈の変化を鏡検した後に、メサングウム領域の拡大や細動脈の肥大を定量した。

4. 研究成果

(1)高NaCl食群では、収縮期血圧200前後に上昇し、正常食に戻したあとも他群に比べて有意に血圧上昇を認めた。高NaAA群では投与中、投与後ともコントロール群に比して血圧上昇傾向を認めたが、高NaCl群に比して有意に低値であった(コントロール群 140 ± 6 , 高NaCl群 $198\pm 8^{**}$, 高NaAA群 162 ± 4 , 低食塩群 144 ± 4 mmHg, $^{**}p<0.01$)。また、24時間蓄尿蛋白量は高NaCl食群では投与中・投与終了後ともに有意に高値を認めた。高NaAA食群では投与中は軽度高値となるも、投与終了後は低下し、コントロール群と同等であった。24時間蓄尿Na排泄量は高いNaClまたはNaAA食投与中はコントロール群に比して尿中ナトリウムの有意な上昇を認め、両群間に差を認めなかった。尚、実験終了時に測定したクレアチンクリアランス、BUN・Cr値に関しては、群間で有意差を認めなかった。一方、実験終了時の糸球体所見は、高NaCl食群でメサングウム基質の拡大がコントロール群に比して有意に上昇しており、腎細動

脈における中膜内腔比も有意に高値を認めた。実験終了時には、血漿レニン活性ならびにアルドステロン濃度は高 NaCl 群でのみ上昇もしくは上昇傾向を認めた(血漿レニン活性: コントロール 2.3 ± 0.6 , 高 NaCl 群 $4.2 \pm 0.7^*$, 高 NaAA 群 1.4 ± 0.2 , 低食塩群 2.4 ± 0.5 ng/ml/h, $^*p < 0.05$)、腎臓の Ang II 濃度にも同様の傾向を認めた。

次に、高食塩食の投与と同時に各種降圧薬を投与した場合の効果を検討した。その結果、高 NaCl 群では前回と同様に血圧の持続上昇を認めた。ARB 投与群では高 NaCl 群に比して軽度の血圧低下しか認められなかった。それに対して、VD 群、CCB 群、CCB+ARB 群ではコントロールと同等の値まで低下した。薬剤を中止したあとの経過は薬剤の種類によって様々であった。ARB 群と VD 群は高 NaCl 群に比して血圧の低下傾向を認めたが、有意差には至らなかった。CCB 群では高 NaCl 群に比して低下していたが、完全には抑制されなかった。CCB+ARB 群ではコントロールと同等の値まで低下した。

一方、腎臓の組織の変化では、腎臓の細動脈については、ARB 群、VD 群では高 NaCl 群に比して低下傾向を認め、CCB 群では有意な低下を認めたもののコントロール群まで低下しなかった。一方、CCB+ARB 群ではコントロール群までの完全な低下を認めた。心臓の細動脈を検討した場合は各群で明らかな差を認めなかった。

高 NaCl 投与群では 14 週齢の時点で糸球体硬化を認めた。この糸球体硬化は CCB 群や VD 群では抑制を認めず、ARB 群では有意に低下したもののコントロール群までの低下を認めず、CCB+ARB 群でコントロール群と同等に低下していた。26 週齢でも同様の傾向を認めた。尿蛋白については、実験 1 と同様に、高 NaCl 食投与群では尿蛋白は高 NaCl 食投与期

間のみならず、正常食にもどしたあとも高値が持続していた。ARB 群では尿蛋白は 14 週齢まで低下傾向を認めたが正常食塩食にもどしたあとは高食塩食群と同様な傾向を認め、CCB と VD 群では低下傾向、CCB+ARB 群では完全に抑制されていた。

全身の RAS については、14 週齢の時点で高 NaCl 群で有意に上昇、ARB 群では抑制されず、CCB 群、VD 群および CCB+ARB 群で抑制傾向を認めた。26 週齢の時点では高 NaCl 群で有意に上昇、ARB 群では抑制されず、CCB 群、VD 群および CCB+ARB 群で有意な抑制を認めた。腎内の Ang II 濃度については高 NaCl 群で有意に上昇、VD 群では高 NaCl 群に比して抑制を認めず、CCB 群では高 NaCl 群に比して抑制を認めるものの、コントロール群まで抑制されず、ARB 群、CCB+ARB 群ではコントロール群まで抑制を認めた。

(2) 高食塩食を投与した SHR では血圧が AACI 群とも投与中、投与後ともコントロール群とほぼ同様な血圧上昇を示し、高 NaCl 群に比して明らかに低値であった。(コントロール群 245 ± 3 、高 NaCl 群 285 ± 2 、高 NaAA 群 245 ± 3 、高 AACI 群 247 ± 5 、低食塩食群 243 ± 3 mmHg)。24 時間尿蛋白量は、高 NaCl 群では投与中・投与終了後とも高値を示し、腎臓のメサンギウム基質の増大と細動脈肥厚も認めた。また、Dahl 食塩ラットと同様、血漿レニン活性、アルドステロン濃度ともに高 NaCl 群が高値の傾向を示した(コントロール 4.1 ± 0.7 、高 NaCl 群 5.1 ± 1.1 、高 NaAA 群 3.4 ± 0.3 、高 AACI 群 3.5 ± 0.6 、低食塩食群 3.2 ± 0.5 ng/ml/h)、正常食にもどしたあともその上昇は持続した。一方、NaAA 食や AACI 食を投与したラットではその上昇が抑制されていた。クレアチンクリアランス、BUN・Cr 値ともに各群間で有意差を認めなかった。

(3) 腎交換移植実験では、高 NaCl 食を高血

圧発症時期の6週齢から14週齢まで投与し、「塩分メモリー」が確立されたラットの腎臓を、無処置のラットに移植した場合、レシビエントの血圧が35 mmHg程度の血圧の上昇を認め、反対に無処置ラットの腎臓を、同様に高食塩食を高血圧発症早期に8週間投与し、「塩分メモリー」が管君されたラットに移植した結果、約45 mmHg程度の血圧の低下を認めた。血圧の変動は手術2か月後の時点でも明らかであった。血清BUNやCrは正常ラットとの明らかな差を認めなかった。また、高食塩食投与ラット同士の移植や正常食投与ラット同士の移植では明らか血圧低下は見られなかった。以上の結果より、「塩分メモリー」の首座は大部分が腎臓である可能性が示された。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計3件)

H. Sasamura, H. Nakaya, S. Julius, N Tomotusugu, Y Satoh, F Takahashi, M Takeuchi, M Murakami, M Ryuzaki, H. Itoh. Feasibility of regression of hypertension using contemporary antihypertensive agents. *Am J Hypertension* 26: 1381-1383, 2013 (査読あり)

DOI: 10/1093/ajh/hpt105

K. Hayashi, H. Sasamura, T. Azegami, H. Itoh. Regression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice is feasible using high-dose angiotensin receptor blocker candesartan. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 19:736-746, 2012 (査読あり)

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/19/8/19_12534/_article:

T. Azegami, H. Sasamura, K. Hayashi, H. Itoh. Vaccination against the angiotensin type 1 receptor for the prevention of

L-NAME-induced nephropathy. *Hypertension Research* 35:492-499, 2012 (査読あり)
DOI:10.1038/hr.2011.212

〔学会発表〕(計9件)

T. Azegami, H. Sasamura, K. Hayashi, H. Oguchi, H. Itoh. Vaccination against the angiotensin II type 1 receptor prevents L-NAME-induced nephropathy in SHR. 24th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. Sydney, October 3, 2012.

H. Nakaya, H. Sasamura, I. Saito, Y. Inoue, S. Kobayashi, T. Saruta, H. Itoh. Cost-effectiveness analysis of amlodipine/atorvastatin single-pill therapy for patients with hypertension and hyperlipidemia. 24th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. Sydney, October 3, 2012.

T. Azegami, H. Sasamura, K. Hayashi, H. Oguchi, H. Itoh. Efficacy of vaccination against the angiotensin II type 1 receptor and ApoB 100 for the prevention of atherosclerosis. 24th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, Sydney, October 3, 2012.

H. Sasamura, H. Nakaya, S. Julius, H. Itoh. Feasibility of regression of hypertension with an angiotensin receptor blocker. 23rd Scientific Meeting, European Society of Hypertension, Milan, June 15, 2013.

H. Sasamura. Studies on regression of hypertension. 2nd International conference on prehypertension and cardiometabolic syndrome., Barcelona, February 2, 2013.

H. Oguchi, H. Sasamura, K. Ishiguro, M. Nakamura, K. Hayashi, T. Azegami, H. Itoh
Salt memory of hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR) requires both sodium and chloride ions. 24th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. Sydney, October 2, 2012.

K. Ishiguro, H. Sasamura, H. Oguchi, M. Nakamura, K. Hayashi, T. Azegami, H. Itoh. Effects of brief exposure to a high-salt diet in Dahl salt-sensitive rats: evidence for 'salt memory' during hypertension development. 24th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension Sydney, October 2, 2012.

K. Hayashi, H. Sasamura, T. Azegami, H. Oguchi, H. Itoh. Regression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice is feasible using high-dose angiotensin receptor blocker. 24th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. Sydney, October 1, 2012.

H. Sasamura. Is regression of hypertension feasible? The rationale and design of the STAR CAST study. 1st International conference on prehypertension and cardiometabolic syndrome. Vienna, February 26, 2011

6 . 研究組織

(1)研究代表者

篠村 裕之(SASAMURA HIROYUKI)
慶應義塾大学・医学部・特任准教授
研究者番号：00235293

(2)研究分担者

伊藤 裕 (ITOH HIROSHI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：40252457