

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461249

研究課題名(和文) 交感神経によるエピジェネティック制御と心腎連関

研究課題名(英文) Epigenetical regulation in cardiorenal syndrome by sympathetic nerve activity

## 研究代表者

下澤 達雄 (Shimosawa, Tatsuo)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90231365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：慢性腎機能障害モデルラットを用いて腎機能低下にともなう心機能、特に拡張機能の低下メカニズムを検討した。特に腎臓交感神経活動に着目し、腎交感神経活動を抑制すると心機能が改善すること、さらにそこには心臓内カルシウムチャンネルSERCAのmRNA発現が関与することを明らかにした。十分な結果を得るに至らなかったが、交感神経活動のうち腎臓から中枢へのシグナルが重要である可能性ならびに腎臓由来プロスタグランジンEが作用している可能性を示唆する所見も得られた。

研究成果の概要(英文)：Using chronic kidney disease (CKD) model rat, we clarified renal sympathetic nerve is important in regulating cardiac calcium channel, SERCA, and controlling cardiac diastolic function. Our CKD model is uni-nephrectomized and high salt loaded rat and it developed diastolic dysfunction along with renal dysfunction. When renal sympathetic nerve is cut, cardiac dysfunction was recovered independent from blood pressure and renal function. mRNA expression of SERCA was also recovered by mechanical sympathectomy. Our preliminary study indicated that afferent sympathetic nerve is essential in this recover of cardiac function. In addition, prostaglandin E from kidney may modulate cardiac function.

研究分野：腎臓

キーワード：心腎連関 カルシウムチャンネル 交感神経 拡張機能障害

1. 研究開始当初の背景

多くの臨床研究からは高血圧症、慢性腎臓病(CKD)が心血管イベントと密接に関連することが知られており、降圧、あるいは尿たんぱくの減少につながる治療が心血管イベントを抑制できる可能性について基礎および臨床試験で検討されてきた。各種の検討からCKDにおける心機能低下や血管病変予防と治療における降圧の重要性は論を待たないが、最近では炎症の関与も注目されており、レニン・アンジオテンシン系、酸化ストレスなどを介した炎症が心血管イベントにかかわることが明らかになった。この他にもCKDにおける心血管障害に関わる因子が数多く報告され、心腎連関の原因は多岐にわたると考えられている。近年腎臓交感神経終末を電気的に焼灼する治療法が薬剤抵抗性高血圧患者の血圧コントロールに有効であることが報告され、また本治療が腎機能の維持にも有効であることが報告されている。これらのことからCKD患者の臓器障害発症、心腎連関における交感神経活動の重要性が考えられる。

我々は各種モデル動物における腎交感神経切除術の効果を検討したところ、DOCA食塩高血圧ラット、Dahl食塩感受性ラットでは腎交感神経切除が食塩感受性を軽減することを明らかにした。続いて、CKDモデルとして片腎摘出食塩負荷ラットで検討したところ、やはり腎交感神経切除が若干の降圧効果を示すものの、DOCA食塩高血圧ラットやDahl食塩感受性ラットに比べその効果が小さいことを予備実験で確認している。また、Dahl食塩感受性ラットのうち、腎機能は低下しないが、心機能の低下のみが認められる週齢では腎交感神経切除による降圧に比して心機能改善効果は弱かった。このことは腎機能低下時の心機能低下と高血圧に合併する心機能の低下では交感神経の果たす役割が異なることが考えられる。

2. 研究の目的

腎機能低下時に併発する心機能低下には腎臓交感神経活動が関与し、血圧値とは独立して心筋の遺伝子転写を変化させることが考えられる。そこで、本研究では心拡張能に関係するカルシウムチャンネルSERCAやナトリウムチャンネルNHE-1などの遺伝子の発現を確認する。そして、これらの標的遺伝子調節にかかわる因子として我々が今までに行ってきた手法を用いてエピジェネティクス制御に着目し、腎交感神経がエピジェネティクス修飾に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

CKDモデル動物作成方法 4週令オスラット

の片腎を摘出後に8%食塩食を1か月間負荷した。

腎交感神経除去術 片腎摘出術時に残存腎動脈周囲の交感神経を機械的に切断した。心機能は観血的に血行動態を麻酔下で測定し、かつ心臓の病理所見を検討する。腎機能は尿たんぱく並びに腎病理所見で評価した。心機能に関連する各種チャンネル、線維化に関連する遺伝子発現をmRNA、たんぱくレベルで評価し、標的遺伝子の転写調節領域のDNAメチル化およびヒストン抗体を用いたChIPによりヒストン修飾の関与を検討した。さらにin silicoで候補となるmicroRNAを絞り込み、microRNAの関与の可能性についても探る。

尿中プロスタグランジン排泄についてはLC-MSを用いて網羅的に解析を行った。

4. 研究成果

腎徐神経の影響の確認

腎不全モデルラットの腎交感神経を切断前後で心筋のカテコラミン濃度、チロシン水酸化酵素、1、2受容体、受容体発現をmRNAおよびタンパクレベルで検討したが、有意な変化は認めなかった。また、腎徐神経は血圧、尿タンパク排泄量には影響せず、高血圧、腎機能障害を改善できなかった。一方、腎不全モデルでは心拡張機能の低下が認められ、心筋においてSERCA2amRNAの低下が認められた。腎徐神経

図1 腎不全モデルラットの心臓拡張能低下と腎徐神経(RDx)による改善

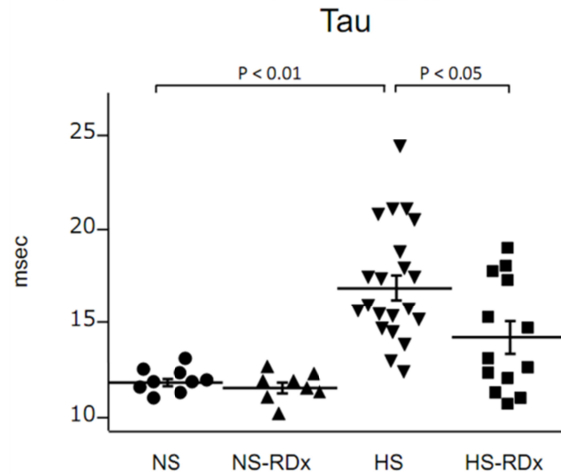
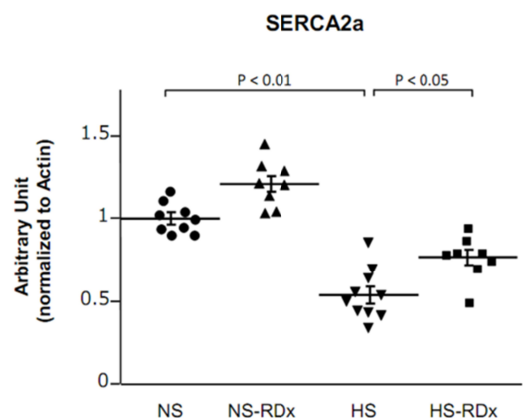


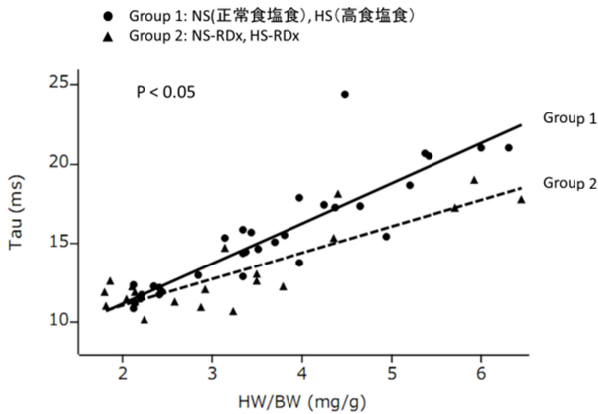
図2 腎不全モデルラットのSERCA2a発現低下と腎徐神経(RDx)による改善



により心機能の改善と SERCA2a mRNA 低下を改善した(図1、2)

また、腎徐神経後にも心肥大、心線維化、BNP などのマーカーには変化が認められなかった。このことは心機能の改善は心臓の形態学的変化、血圧、腎機能とは独立して、交感神経系を抑制したものと考えられた(図3)。

図3腎徐神経(RDx)による心機能の改善は心形態の変化とは独立した効果である。



十分なデータ数がそろっていないが、予備実験では腎交感神経の求心繊維をカプサイシンで薬理的に遮断することにより同様の心機能の改善が認められたことから腎臓から中枢への求心シグナルが重要であると考えられる。

### エピゲノム変化

SERCA2a の発現に変化が認められたことからバイサルファイト処理後パイロシークエンス法にてプロモーター部位の DNA メチル化を検討したが PCR が成功した部位での有意な差を認めなかった。またヒストンタンパクのアセチル化、メチル化を Western blot にて検討したが、有意な変化を見出すことはできなかった。

このことから、腎臓徐神経による心機能改善、SERCA2a 遺伝子発現にかんしてエピゲノム調節の関与は限定的と考えられる。

### その他遺伝子発現

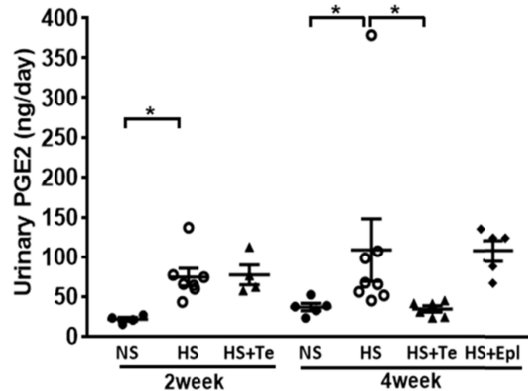
レニンアンジオテンシンアルドステロン系関連遺伝子発現に差を認めなかったが、NHE-1 遺伝子は腎不全で亢進した。腎臓徐神経では影響を受けなかった。これは腎臓徐神経により不適切に NHE-1 遺伝子が活性化されていることを示唆するものである。また腎不全でアルドステロンは変化しないにもかかわらず NHE-1 が亢進したことから SERCA2a と共通の遺伝子調節の可能性を検索したが、本研究内では調節機構を明らかにすることはできなかった。

### SERCA2a 遺伝子発現制御因子の探索

本検討では腎臓徐神経が直接心筋での交感神経活動を変化させないことが明らかになったため当初予想した心機能改善における心臓交感神経の役割は小さいと考えた。そこで、さらに SERCA2a 制御因子の同定へと研究を進めた。腎不全時に増加するホルモンを探索するために LC-MS を用いて尿中プロスタグ

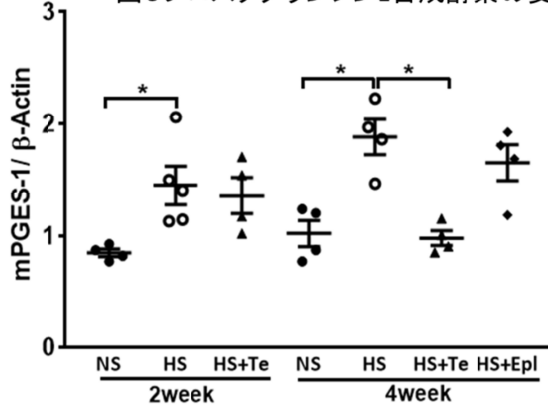
ランジン系の網羅的探索を行ったところ、プロスタグランジン E の代謝物が大きく変化することが明らかとなった(図4)。またプロ

図4尿中プロスタグランジンE代謝物排泄



スタグランジンはミネラルコルチコイド受容体拮抗薬では変化せず、酸化ストレスの除去により変化することが明らかになった。さらに腎臓内のプロスタグランジン経路を検討したところ、COX1,2 には差を認めず、PGE 産生酵素が特異的に増加することが示めされた。(図5)

図5プロスタグランジンE合成酵素の変化



今後本研究をもとにプロスタグランジンによる SERCA2a 遺伝子調節、並びに心機能調節メカニズムの解明へとつなげていく。

### 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4件)

Hirohama D, Kawakami-Mori F, Ogura S, Mu S, Jimbo R, Uetake U, Yatomi Y, Nangaku M, Fujita T, Shimosawa T. 査読あり

Renal Denervation Improves Cardiac Diastolic Dysfunction by Restoring Serca2a Transcription in Uninephrectomized Rats. J Hypertens (Los Angel) 5:225. 2016.

doi:10.4172/2167-1095.1000225

下澤達雄. 慢性腎臓病. 検査と技術. 44:648-653, 2016. 査読なし

丸茂丈史, 下澤達雄. 腎臓病にかかわ

るエピゲノム異常. 医学のあゆみ. 255:691-696, 2015. 査読なし  
下澤達雄. 高血圧治療における検査・診断の意義: バイオマーカー. 日本臨牀. 73:1833-1835, 2015. 査読なし  
〔学会発表〕(計 5件)

Reheman L, Hirohama D, Wang C, Mori F, Ogura S, Jimbo R, Fujita T, Yatomi Y, Shimosawa T. Torasemide dual blockade of PGE synthesis and sodium channel in renal failure model. The 26<sup>th</sup> Scientific meeting of the International Society of Hypertension, 2016年9月ソウル(大韓民国)

レヘマン ラタパティ, 広浜大五郎, 森典子, 小倉彩世子, 王聰慧, 下澤達雄, 矢富裕, 藤田敏郎. 高血圧モデルでの利尿剤による腎保護効果. 第19回日本心血管内分泌代謝学会学術総会, 2015年12月 神戸国際会議場(兵庫県神戸市),

下澤達雄, 広浜大五郎, Latapati Rehman, 上竹勇三郎, 王紅

食塩と臓器障害

第37回日本高血圧学会総会 2014年10月17日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

広浜大五郎, 森典子, 小倉彩世子, 神保りか, 上竹勇三郎, 矢富裕, 南学正臣, 藤田敏郎, 下澤達雄. 腎除神経術はSERCA2a発現回復を介して心拡張障害を軽減させる. 第57回日本腎臓学会学術総会, 2014年7月パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Hirohama D, Mori F, Ogura S, Mu S, Uetake Y, Jimbo R, Reheman L, Wang C, Yatomi Y, Fujita T, Nangaku M, Shimosawa T. Renal denervation attenuates cardiac diastolic dysfunction. Joint meeting ESH-ISH Hypertension, 2014年6月 アテネ(ギリシャ共和国)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

下澤 達雄(SHIMOSAWA, Tatsuo)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号:90231365

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

小倉 彩世子(OGURA, Sayoko)

日本大学・医学部・助教

研究者番号:30618202