

令和元年6月1日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09639

研究課題名(和文) 食塩感受性高血圧における炎症性シグナルと高張性ナトリウム蓄積の意義

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, TETSUYA)

群馬大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：10272238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：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、thrombomodulinの発現上昇を認め、Plasminogen activator inhibitor-1、Endothelin-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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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因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に発展する成果が得られた。

研究成果の概要(英文)： In bovine 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.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：高血圧 圧ナトリウム曲線

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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因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目指すものである。

2. 研究の目的

研究目的 (概要)

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。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。

研究の学術的背景

高血圧発症においては、腎の圧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合わせた水分保持が起こる。組織でのNa蓄積については、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、最近、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が明らかにされている。

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らによると、単核食細胞系(MPS)細胞の激減あるいは可溶性VEGF受容体3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ตอบสนอง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)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。

本研究計画では、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。単核食細胞系(MPS)細胞でのTonEBP-VEGF-Cシグナル伝達が、浸透圧感受性で高浸透圧によって発現される遺伝子で、食塩感受性高血圧と密接に関連し、細胞外容積と血圧の恒常性の主要な決定因子であることを明らかにする。

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 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 cDNA マイクロアレイの手法も組み合わせる。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

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 (PPAR)、炎症性サイトカインの tumor necrosis factor (TNF) 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。cDNA マイクロアレイにより遺伝子発現を定量し、遺伝子間の相互関係についても解析する。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。

高食塩食負荷の他、高脂肪食負荷、インスリン抵抗性改善薬 pioglitazone や HMG-CoA reductase 阻害薬を投与し、環境因子を変化させて同様に遺伝子発現を検討する。蛋白レベルについては、免疫蛍光染色法により、組織を検討する。

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

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、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、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

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。

高食塩食負荷の PPAR ヘテロ欠損マウスのリアルタイム RT-PCR 法による解析。

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)は、脂肪蓄積やインスリン感受性を調節する転写因子で、インスリン抵抗性改善薬 pioglitazone による PPAR 活性化は、インスリン抵抗性を改善させる。我々は、PPAR ヘテロ欠損マウスにおいて内皮依存性血管弛緩反応の低下と尿中一酸化窒素代謝物排泄量の減少を明らかにした。PPAR ヘテロ欠損マウスが食塩感受性高血圧を呈することも明らかにしている。

高食塩食や高脂肪食負荷、HMG-CoA reductase 阻害薬の投与が、食塩感受性遺伝子発現に及ぼす効果を検討する。PPAR ヘテロ欠損マウスの大動脈、心臓、腎臓の mRNA を抽出し、reverse transcription した後、TonEBP、VEGF-C、TLR4、PPAR の各遺伝子について、リアルタイム RT-PCR 法により発現量を解析する。さらに、cDNA マイクロアレイにより、各遺伝子の発現を解析する。さらに、これらの遺伝子欠損マウスの腎髄質循環を検討し、圧 Na 利尿の分子機序を解明する。

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

〔雑誌論文〕(計 3件)

Nguyen TC, Ohyama Yi, Taketomi-Takahashi A, Nguyen HT, Sugimoto A, Sato M, Sumiyoshi H, Nakamura T, Kurabayashi M, Tsushima Y. Influence of cardiac function on image quality in coronary computed tomography angiography. *Clinical Imaging*. 査読有, 53: 58-64, 2019. DOI: 10.1016/j.clinimag.2018.10.010

Nguyen-Thu H, Ohyama Y, Taketomi-Takahashi A, Nguyen-Cong T, Sugimoto A, Sato M, Sumiyoshi H, Nakamura T, Kurabayashi M, Tsushima Y. Association of aortic arch width assessed by noncontrast cardiac computed tomography with cardiac remodeling, cardiac function, and atherosclerosis in a Japanese cohort. *Journal of Thoracic Imaging*. 査読有, 33(4):240-245, 2018. DOI: 10.1097/RTI.0000000000000332

Ohyama Y, Ambale-Venkatesh B, Noda C, Chugh AR, Teixido-Tura G, Kim J-Y, Donekal S, Yoneyama K, Gjesdal O, Redheuil A, Liu C-Y, Nakamura T, Wu CO, Hundley WG, Bluemke DA, Lima JAC. Association of aortic stiffness with left ventricular remodeling and reduced left ventricular function

measured by magnetic resonance imaging. The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Imaging*. 査読有, 2016; 9: e004426. DOI: 10.1161/CIRCIMAGING.115.004426.

〔学会発表〕(計 6件)

Ohyama Y, Koitabashi N, Nakamura T, Sumita Y, Nakai M, Nakamura F, Nishimura K, Miyamoto Y, Kurabayashi M. Effect of a inferior vena cava filter on recurrent venous thromboembolism in the Japanese population. 第82回日本循環器学会学術集会 2018年3月23日(金)から3月25日(日)

Ohyama Y, Imai K, Ichikawa K, Sumiyoshi H, Kurabayashi M, Nakamura T. Waist to height ratio for predicting incident hypertension in the Japanese general population. 第82回日本循環器学会学術集会 2018年3月23日(金)から3月25日(日)

Ohyama Y, Ichikawa K, Imai K, Sumiyoshi H, Saito Y, Nakamura T, Kurabayashi M. Association of hemoglobin level with blood pressure in the Japanese general population. AHA Council on Hypertension, AHA Council on Kidney in Cardiovascular Disease, American Society of Hypertension, Joint Scientific Sessions 2017. Hyatt Regency San Francisco .5 Embarcadero Center, San Francisco, CA , 94111, USA. September 14-17th, 2017

Ichikawa K, Ohyama Y, Imai K, Sumiyoshi H, Saito Y, Nakamura T, Kurabayashi M. The sex-specific association of hemoglobin level with incident hypertension in the Japanese general population. 第81回日本循環器学会学術集会 2017年3月17日(金)～19日(日)

Ohyama Y, Imai K, Ichikawa K, Sumiyoshi H, Nakamura T, Kurabayashi M. Association of uric acid with incident metabolic syndrome in the Japanese general population. 第81回日本循環器学会学術集会 2017年3月17日(金)～19日(日)

Ohyama Y, Ambale-Venkatesh B, Yoneyama K, Nwabuo C, Noda C, Teixido Tura G, Redheuli A, Gomes A, Hundley G, Nakamura T, Bluemke D, Lima J. Impact of aortic size and function assessed by MRI on incident hypertension and blood pressure progression: the multi-ethnic study of atherosclerosis. European Society of Cardiology Congress Rome 2016. August 26-31, 2016. Fiera di Rome, Ingresso Nord, Via Portuense 1645/1647, 00148 Rome-Italy.

〔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〕

ホームページ等 該当なし。

6. 研究組織

(1)研究分担者 該当者なし。

(2)研究協力者 該当者なし。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。