

令和元年6月20日現在

機関番号：16301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16K09643
研究課題名(和文) インターロイキン(IL)-18の血圧調節機構の解明

研究課題名(英文) Role of IL-18 on blood pressure regulation

研究代表者

大蔵 隆文(Takafumi, Okura)

愛媛大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：40260385

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧患者では、炎症性サイトカインの上昇が認められ、これによりさらなる血圧上昇をきたす。私たちは、Interleukin (IL)-18欠損マウスでは、高血圧を誘導しても、血圧上昇が軽度であることを報告した。また、NaCl co-transporter (NCC)がIL-18の受容体の一つであることが報告されている。そこで、IL-18はNCCと会合し、NCCを活性化することで血圧上昇に関与している可能性を考えた。しかしながら、本研究では、NCCの活性化が血圧調節に関与していることを明らかにすることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧患者では、血圧が高いだけでなく、様々な炎症性サイトカインが増加しており、動脈硬化促進に関与している。また、増加したサイトカインが直接血圧を上昇させることも知られている。本研究では、IL-18がNaCl-co-transporter (NCC) を介して、血圧調節に関与している可能性を考え研究を行った。本研究で、IL-18とNCCとの直接の関連性を明らかにすることはできなかったが、両者の関係が血圧に関連している可能性は極めて高く、今後のさらなる研究の発展が望まれる。

研究成果の概要(英文)：An increase in inflammatory cytokines is observed in hypertensive patients, which results in a further increase in blood pressure. We have reported that in Interleukin (IL)-18 deficient mice, even with induction of hypertension, the rise in blood pressure is mild. It is also reported that NaCl co-transporter (NCC) is one of the receptors for IL-18. Therefore, we considered that IL-18 might be involved in elevated blood pressure by activating NCC. However, in this study, it was not possible to clarify that activation of NCC is involved in blood pressure regulation.

研究分野：高血圧

キーワード：高血圧 Interleukin-18 NaCl-co-transporter

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

1. 研究開始当初の背景

高血圧は心血管病の最も重大の危険因子であり、そのコントロールは心血管病の発症を予防する。現在様々なクラスの降圧薬が開発され、血圧コントロールは比較的容易になってきている。しかしながら、高血圧患者では Interleukin (IL)-6、tumor necrosis factor- α や IL-18 などのサイトカインの上昇が認められ、これに伴い惹起される慢性炎症によって内皮機能障害、動脈硬化や臓器障害が進行し、さらなる血圧上昇を来す。したがって、血圧コントロールとともに、慢性炎症のコントロールは高血圧性臓器障害の進展抑制に重要であると考えられているが、現在のところ抗炎症薬が血圧コントロールや心血管病の発症抑制に有効であった報告は1つのみである。IL-18 は炎症性サイトカインの1つで、T細胞やマクロファージなどの免疫担当細胞だけでなく内皮細胞、血管平滑筋細胞、線維芽細胞で発現が認められる。このため様々な炎症性疾患(関節リウマチ、炎症性腸疾患、多発性硬化症など)に関与していることが報告されている。さらに IL-18 は、腎臓および心臓の線維化に関与すること、生活習慣病である高血圧・糖尿病・肥満に関与すること、アンジオテンシン II やアルドステロンで誘導されることなどが報告されている。私たちは IL-18 欠損および野生型マウスを用いて 1K/ALD/salt 負荷高血圧モデルを作成し、腎線維化の程度を比較した。その結果、IL-18 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して線維化が著明に抑制されていた。アルドステロン負荷後 4 週後にテレメトリーシステム法で測定した血圧に関しては、野生型マウスでは 127 ± 7.4 mmHg であったのに対して、IL-18 欠損マウスでは 105 ± 5.9 mmHg と有意に血圧が低値であった。最近 IL-18 が NaCl の再吸収に関与している Na-Cl co-transporter (NCC) と結合することが報告された。ヒトの NCC の遺伝子変異は、尿細管での NaCl の再吸収が抑制されるため低血圧を来す Gitelman 症候群として知られている。これらのことから、血圧制御に IL-18 と NCC との関連性が示唆された。

2. 研究の目的

IL-18 欠損マウスでの血圧上昇抑制の機序の1つとして、NCC の作用低下による尿細管での NaCl の再吸収障害が考えられる。逆に言えば IL-18 は NCC の活性化を介して血圧を制御していることが考えられる。本研究では NCC の活性化を介した IL-18 の血圧調節機構を明らかにすることである。

3. 研究の方法

Recombinant (r)IL-18 を用いた IL-18 と NCC の関連性の検討

【使用動物】8週令の野生型マウス

【方法・処置】浸透圧ミニポンプで rIL-18 ($0.5 \mu\text{g} / \text{body}$) もしくは vehicle を1週間投与する。

【検討項目】rIL-18 および vehicle 投与後、腎臓を摘出し、NCC の発現量を RT-PCR 法および免疫組織法によって2群間で比較し、IL-18 と NCC の関連を検討する。血圧もそれぞれ投与前、投与後で測定を行なった。

アルドステロン誘発性高血圧症モデルの作成

【使用動物】8週令 C57BL/6 マウスおよび IL-18 KO マウス

【方法・処置】片腎摘出後、以下2群に分けて処置を行う。

浸透圧ミニポンプを用いてそれぞれを腹腔内にアルドステロン ($0.75 \mu\text{g} / \text{hour}$) および Vehicle を持続注入する。

【検討項目】腎臓を摘出し、NCC の発現量を RT-PCR 法および免疫組織法によって2群間で比

較・検討する。

4. 研究成果

Recombinant IL-18 を用いた IL-18 と NCC の関連性の検討

図 1

体重 (g)	WT	WT+rIL-18
ベースライン	22.7 ± 0.8	23.0 ± 1.2
4日目	20.0 ± 0.6	20.1 ± 0.3
7日目	23.3 ± 0.3	23.7 ± 2.2

4日目	WT	WT+rIL-18
Cre (mg/dL)	0.16 ± 0.05	0.13 ± 0.01
Na (mEq/L)	157.0 ± 4.0	153.3 ± 1.3
U-Na (mEq/L)	378.7 ± 87.5	590.0 ± 88.9
U-Na/Cre	12.6 ± 3.6	14.4 ± 1.30
U-Cl (mEq/L)	340.0 ± 76.4	570.0 ± 86.2
U-Na/K	1.4 ± 0.3	1.7 ± 0.1

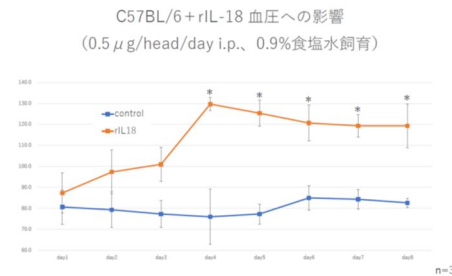
7日目	WT	WT+rIL-18
Cre (mg/dL)	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.02
Na (mEq/L)	153.3 ± 2.4	151.7 ± 0.9
U-Na (mEq/L)	410.0 ± 52.9	493.3 ± 112.9
U-Na/Cre	17.3 ± 0.9	17.0 ± 1.5
U-Cl (mEq/L)	356.7 ± 37.6	460.0 ± 119.3
U-Na/K	1.7 ± 0.0	1.7 ± 0.1

ベースラインはn=6
day5, day8はn=3

n=3

n=3

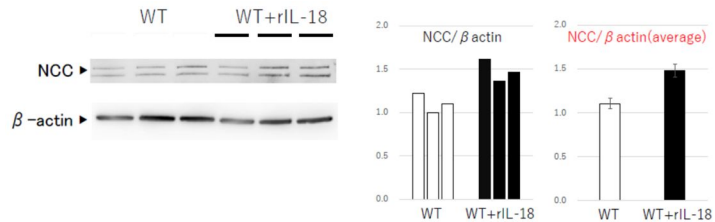
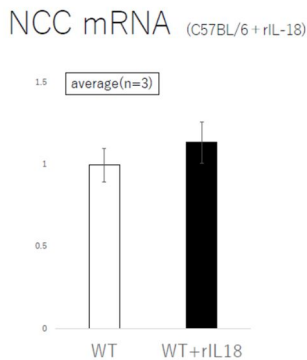
図 2



野生型のマウスに食塩負荷 (0.9%食塩水飼育) + r IL-18 (0.5μg/day 腹腔内投与) を 7 日間行った。図 1 に体重およびクレアチニン (Cr)、血清 Na、尿中 Na、尿中 Cl 排泄量を示す。血圧は図 2 に示すように

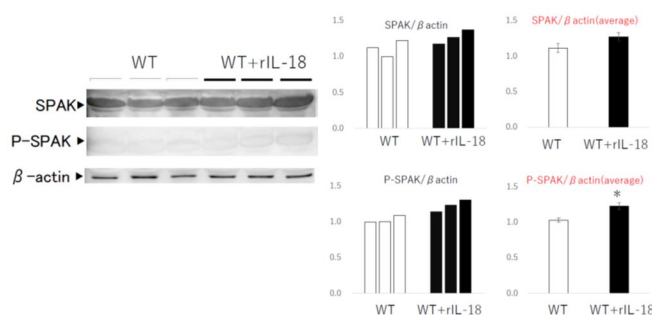
約 40mmHg 上昇した。

図 3



NHE3、NKCC2、ENaC および NCC を含めたナトリウムチャネルの発現を免疫組織法によって検討したが、明らかな差はなかった。また、腎での NCC mRNA 発現量 (図 3) および蛋白発現量 (図 4) を比較したが、recombinant IL-18 投与群で増加傾向にあったが、

図 5



有意な差は認められなかった。さらに、NCC の活性化に關する SPAK のリン酸化も検討したが、2 群間で差を認めなかった (図 5)。内皮機能障害の可能性を考え、血清の NO 産生量および尿中 NO 排出量を比較したが、差を認めなかった。

次に、in vitro の系として、マウス遠位尿細管細胞である mDCT に recombinant IL-18 (100ng/ml) を添加して、NCC の遺伝子発現量、蛋白発現

量を比較したが有意な上昇は認められなかった。

アルドステロン誘発性高血圧症モデルの作成

IL-18 投与で NCC の発現に差を認めなかったため、野生型マウスおよび IL-18 欠損マウスでアルドステロン食塩負荷高血圧モデルでの NCC を含めた各種ナトリウムチャネルの発現量を検討したが、それらの変化も認めなかった。

したがって、本研究から、アルドステロン食塩負荷高血圧モデルマウスにおいて、IL-18 欠損マウスは野生型マウスと比較して、血圧上昇が軽度である機序、さらに IL-18 投与による血圧上昇の機序として、少なくとも NCC の発現量は關与しないことが明らかとなった。ただし、今回の検討では、当教室では NCC 自身のリン酸化の測定系を持たず、この検討を行えなかった。このため、リン酸化に差を認める可能性は十分あると考えられた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1) Masayoshi Kukida, Masaki Mogi, Harumi Kan-no, Kana Tsukuda, Hui-YuBai, Bao Shuai Shan, ToshifumiYamauchi, Akinori Higaki, Li-Juan Min, Jun Iwanami, Takafumi Okura, JitsuoHigaki, Masatsugu Horiuchi.

AT2 receptor stimulation inhibits phosphate-induced vascular calcification.

Kindeg Int 95 : 138-148, 2019

DOI : 10.1016/j.kint.2018.07.028 (査読あり)

2) Akiko Tanino A, Takafumi Okura, Jun Irita, Tomoaki Nagao, Mie Kurata, Jun Suzuki, Masayoshi Kukida, Ken-ichi Miyoshi.

Neutralization of N-half Osteopontin Prevents Atherosclerotic Plaque Rupture in ApoE-/-Mice

J Cardio Vasc Med 4: 1-10, 2018. (査読あり)

3) Hiroshi Kawakami, Akiyoshi Ogimoto,Naohito Tokunaga,Kazuhisa Nishimura, Hideo Kawakami, Haruhiko Higashi, Chiharuko Iio, Tamami Kono, Jun Aono, Teruyoshi Uetani, Takayuki Nagai, Katsuji Inoue, Jun Suzuki, Shuntaro Ikeda, Takafumi Okura,Yasumasa Ohyagi, Yasuharu Tabara, Jitsuo Higaki

A novel truncating *LMNA* mutation in patients with cardiac conduction disorders and dilated cardiomyopathy.

Intern Heart J 59: 531-541, 2018.

DOI: 10.1536/ihj.17-377. (査読あり)

4) Kaori Fujimoto, Katsuji Inoue, Makoto Saito, Haruhiko Higashi, Tamami Kono, Teruyuki Uetani, Jun Aono, Takayuki Nagai, Kazuhisa Nishimura, Jun Suzuki, Takafumi Okura, Shuntaro Ikeda, Satoshi Nakatani, Jitsuo Higaki.

Incremental value of left atrial active function measured by speckle tracking echocardiography in patients with hypertrophic cardiomyopathy.

Echocardiography 35: 1138-1148, 2018.

DOI: 10.1253/circj.CJ-18-1018. (査読あり)

5) Katsuji Inoue, Toshihiko Asanuma, Kasumi Masuda, Daisuke Sakurai, Takafumi Okura, Jitsuo Higaki, Satoshi Nakatani.

Assessment of left atrial work during acute coronary occlusion.

Ultrasound Med Biol 45: 749-757, 2019.

DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.11.008. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

1) 莖田昌敬, 大蔵隆文, 長尾知明, 三好賢一, 檜垣彰典, 岩波純, 茂木正樹, 堀内正嗣, 檜垣實男
アンジオテンシン II 2 型(AT2)受容体刺激は LPS により誘導される急性腎障害に対して保護的に働く
日本腎臓学会学術総会 2018

〔図書〕(計 3 件)

1) 大蔵隆文

高血圧:エビデンスと推奨 -日常診療への提言-
高齢者
腎と透析 85: 251-255, 2018.

2)大蔵隆文

臨床シナリオに基づく外来診療スキルアップ
～こんな患者さん、先生ならどうしますか～
高度心肥大を呈する高血圧患者
Heart View 11: 93-97, 2018.

3)大蔵隆文, 檜垣實男

循環器疾患 最新の治療 2018-2019 永井良三 監修、伊藤浩、山下武志 編集
「起立性低血圧」
pp407-409、南江堂、東京、2018

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

https://www.m.ehime-u.ac.jp/data/course/list_detail.php?id=201100000067

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：三好賢一

ローマ字氏名：Miyoshi Ken-ichi

研究協力者氏名：長尾知明

ローマ字氏名：Nagao Tomoaki

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。