

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08028

研究課題名(和文) 加齢に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明と新規治療戦略

研究課題名(英文) Elucidation of the Mechanism of Age-Related Salt-Sensitive Hypertension and Novel Therapeutic Strategies

研究代表者

河原崎 和歌子 (Kawarazaki, Wakako)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：50424594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴い高血圧の罹患率が増加し、食塩感受性も亢進することが疫学研究で知られていたが、その機序は不明であった。私達は高齢マウスを用いて、加齢に伴い血中の抗加齢因子Klothoが減少した状況下で食塩を過剰に摂取すると、血管収縮経路のWnt5a-RhoA系が活性化して血管収縮反応が亢進し高血圧を発症する機序を明らかにした。また、加齢性高血圧はKlothoの補充やWnt阻害薬、Rhoキナーゼ阻害薬により有意に抑制されることを示した。本研究により高齢者高血圧の新規治療法を提示するとともに、減塩の重要性を発信した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義としては、Wnt non-canonical経路が加齢現象や高血圧発症に関わる事、重要な血管収縮物質であるアンジオテンシン (Ang )による血管収縮にはWnt5aが必要でありWnt5a-RhoA経路の活性化を介して生じ、Klothoにより抑制されることを初めて明らかにした。また、高齢マウスの腎動脈ではAng への感受性が増大しており、食塩摂取時にWnt-RhoA経路活性化による血管収縮性の増強が腎動脈で生じ、腎血流が低下して高血圧を発症する機序を証明し、Klotho補充にて正常化することを示した。また社会に高齢者高血圧の新規治療法を提示するとともに、減塩の重要性を発信した。

研究成果の概要(英文)：It has been known from epidemiological studies that both the incidence of hypertension and salt sensitivity increase with age, but their mechanisms have been unclear. Using aged mice, we clarified the mechanism by which excessive salt intake in the presence of decreased Klotho in the blood causes activation of the Wnt5a-RhoA system in the vasoconstrictor pathway, resulting in increased vasoconstrictor response and development of hypertension. In addition, we showed that age-related hypertension was significantly suppressed by Klotho supplementation, Wnt inhibitors, and Rho kinase inhibitors. This study provides a novel therapeutic strategy for hypertension in the elderly and emphasizes the importance of salt reduction.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：加齢 食塩感受性 高血圧 Wnt Rho Klotho

### 1. 研究開始当初の背景

加齢と共に高血圧が増加し、食塩感受性も亢進することが疫学研究から知られていたが、その機序は不明であった。一方、加齢と共に血中の抗加齢因子 Klotho が減少し、動物実験では血中 Klotho が減少すると食塩感受性高血圧を呈することが報告されていたが、詳細な機序は不明であった。申請者は予備実験にて加齢マウスや Klotho hetero KO マウスでは血中 Klotho 濃度が低下し、食塩感受性高血圧を呈することを認めており、加齢に伴う血中 Klotho 減少が起因となり食塩感受性を増加させているのではないかと考えた。今まで申請者は、食塩感受性高血圧の発症機序において、高食塩摂取時のミネラルコルチコイド受容体(MR)の亢進が関与しており、食塩摂取によりリガンドである血中アルドステロンが抑制されている状況でも、低分子量 GTPase である Rac1 が活性化し、MR を活性化して高血圧の形成に関わることを報告してきた(Nat Med 2008, J Clin Invest 2011, J Am Soc Nephrol 2012)。そこで高齢マウス腎臓の Rac1 活性を調べたところ Rac1 ではなく、RhoA の活性化を認めた。RhoA の活性化は血管平滑筋の収縮に重要であり、加齢性高血圧の発症には血管の RhoA 活性化が関与するのではないかと考えられた。加齢マウスや Klotho hetero KO マウスに食塩を与えると、血管で RhoA が活性化し、血管収縮反応も亢進しており、その活性化因子を検討した結果 Wnt 経路が活性化し、血管収縮性亢進に関わることが想定された。

### 2. 研究の目的

加齢マウスでは、血中 Klotho が減少している状態で血管の Wnt-RhoA 経路が活性化し、血管収縮反応が亢進し、食塩感受性高血圧を生じる原因になっているかを検証した。また、加齢に伴う食塩感受性高血圧が Wnt-RhoA 経路の阻害や Klotho 補充により抑制され、高齢者高血圧の新規治療標的をなりうるかを検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 食塩感受性高血圧の発症における Klotho-Wnt-RhoA 経路の関与を詳細に検証するために、血中 Klotho が減少している Klotho hetero KO マウスや加齢マウスに Wnt 阻害薬や Rho キナーゼ阻害薬投与、Klotho 補充による介入を行い、持続的な血圧モニターが可能なテレメトリー法を用いて血圧を評価するとともに、採取した腸骨動脈の ex vivo での血管収縮性の検証や RhoA 蛋白発現の評価を行った。

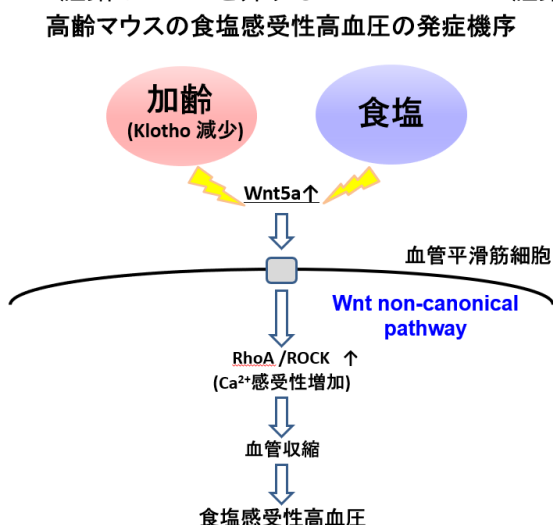
(2) 血管平滑筋収縮における Klotho 及び Wnt5a-RhoA 系の関与を検証するために、培養ヒト大動脈平滑筋細胞を用いて in vitro の実験を行った。

(3) 食塩感受性高血圧患者では食塩摂取時に腎血管抵抗が増大し腎血流量が低下することが、高血圧の発症に関与していると考えられているが詳細な機序は分かっていない。Klotho hetero KO マウスや加齢マウスにおいては食塩摂取時の血管収縮亢進が生じていることから、食塩摂取による血管収縮亢進が腎動脈でも生じ、腎血流に影響を及ぼしているかにつき検討した。

### 4. 研究成果

(1) 加齢性高血圧は Klotho 減少下での食塩摂取時に惹起される non-canonical Wnt5a-RhoA 経路が活性化により生じる。

Wnt 経路には下流に  $\beta$ -カテニンを介する canonical 経路と RhoA を介する non-canonical 経路があり、前者は細胞増殖や腫瘍形成に関わることが知られていたが、後者が加齢現象や高血圧発症に関わる事は知られていなかった。どちらが Klotho 減少下での食塩感受性高血圧発症に関わるかを検討するために、canonical 経路のみを抑制する  $\beta$ -カテニン阻害薬と、両経路を阻害する Wnt 阻害薬を、食塩を与えた加齢マウスに投与してテレメトリーで血圧を測定したところ、 $\beta$ -カテニン阻害薬では血圧上昇や血管収縮反応亢進、血管の RhoA 活性化が抑制されなかったが、Wnt 阻害薬により全て抑制された。また、Wnt non-canonical 経路の代表的リガンドである Wnt5a の発現をマウスの大動脈を用いて調べたところ、野生型マウスでは食塩摂取により変化はなかったが、加齢マウスでは食塩摂取時に有意に発現が亢進していた。そこで Wnt5a 阻害薬を加齢マウスに投与し、血圧をテレメトリーで測定したところ有意に抑制され、同時に腸骨動脈の RhoA 活性



化も抑制されていた。これらの所見は Klotho hetero KO マウスの実験でも同様に認めたことから、加齢に伴う高血圧は Klotho 減少下で高食塩を摂取すると血管の non-canonical Wnt5a-RhoA 経路の活性化が生じ、血管収縮反応を亢進させることにより生じていることが分かった ( 図 )。

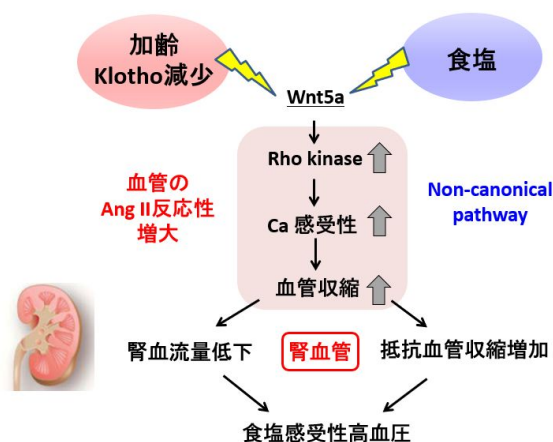
### ( 2 ) 血管平滑筋細胞における Wnt5a-RhoA 経路の活性化はアンジオテンシン ( Ang ) による血管収縮に必須であり、Klotho により抑制される。

培養ヒト大動脈平滑筋細胞を用いた in vitro の実験において、培養液中への Wnt5a 蛋白添加により RhoA 活性化が惹起される一方、siWnt5a を用いて内因性の Wnt5a をノックダウンすると RhoA の活性化が見られなくなることから、Wnt5a は RhoA の活性化に必須であることが分かった。また、Ang による血管収縮反応には RhoA が必須であることが知られているが ( Guilluy C et al, Nat Med 2010 ) Ang 刺激による RhoA 活性化は培養液中への Wnt5a 添加により生じるが、siWnt5a でノックダウンすると生じないことから、生理的に重要な血管収縮物質である Ang による血管収縮反応が Wnt5a-RhoA 系を介していることが明らかになった。

### ( 3 ) 加齢マウスの腎動脈における Wnt-RhoA 系の活性化は食塩感受性高血圧の発症に寄与している。

食塩感受性高血圧患者では食塩摂取時に腎血管抵抗が増大し腎血流量が低下することが知られているが、同様の減少が加齢マウスの腎動脈でも生じているかを検討するために、腎血流量の測定を行った。若年野生型マウスに普通食または高食塩食を与え、麻酔下に腎動脈入口部から Ang を腎動脈に投与したところ、高食塩摂取の有無にかかわらず腎血流量や血圧は変化しなかった。しかし、加齢マウスでは、普通食群と異なり、高食塩群の腎動脈にて著明な腎血流量の低下を認め、血圧も有意に上昇した。しかし、Klotho 補充を行った高齢マウスの高食塩群ではこれらの現象は認められなかった。さらに、Rho 刺激薬である U46619 を腎動脈内に投与したところ、野生型マウスの普通食群と高食塩群ではどちらも腎血流量や血圧の変化を生じなかったが、加齢マウスの高食塩群では、普通食群と異なり、腎血流量の低下を認め、血圧も有意に上昇し、Klotho 補充を行った高齢マウス高食塩群ではこれらが正常化していた。同様の所見を Klotho hetero KO マウスを用いた実験でも認めた。これらのことより、血中 Klotho が減少している高齢マウスでは AngII への感受性が亢進しており、腎動脈の Wnt5a-Rho 経路を介した血管収縮反応の亢進が食塩感受性高血圧の発症に重要な役目を果たしていると考えられた ( 図 )。

#### Klotho低下はAng IIに対する腎動脈収縮の過大反応を介して食塩感受性高血圧発症に関与する



これらの研究成果は高齢者高血圧の発症機序に食塩が深く関わることを示しており、減塩の重要性を社会に提唱するとともに、Klotho 補充やWnt 阻害薬、Rho キナーゼ阻害薬などが高齢者高血圧の新規治療法となることを示すとし論文化した他 ( J Clin Invest. 2020 ) 総説にまとめた ( Nat Rev Nephrol. 2021, Int J Mol Sci. 2021 )。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kawarazaki Wakako, Fujita Toshiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Kidney and epigenetic mechanisms of salt-sensitive hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Reviews Nephrology	6. 最初と最後の頁 350 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41581-021-00399-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawarazaki Wakako, Fujita Toshiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Role of Rho in Salt-Sensitive Hypertension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2958 ~ 2958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22062958	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawarazaki Wakako, Mizuno Risuke, Nishimoto Mitsuhiro, Ayuzawa Nobuhiro, Hirohama Daigoro, Ueda Kohei, Kawakami-Mori Fumiko, Oba Shigeyoshi, Marumo Takeshi, Fujita Toshiro	4. 巻 130
2. 論文標題 Salt causes aging-associated hypertension via vascular Wnt5a under Klotho deficiency	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 4152 ~ 4166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI134431	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hirohama D, Nishimoto M, Ayuzawa N, Kawarazaki W, Fujii W, Oba S, Shibata S, Marumo T, Fujita T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Activation of Rac1-mineralocorticoid receptor pathway contributes to renal injury in salt loaded db/db mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Marumo Takeshi, Hoshino Junichi, Kawarazaki Wakako, Nishimoto Mitsuhiro, Ayuzawa Nobuhiro, Hirohama Daigoro, Yamanouchi Masayuki, Ubara Yoshifumi, Okaneya Toshikazu, Fujii Takeshi, Yuki Kazunari, Atsumi Yoshihito, Sato Atsuhisa, Arai Eri, Kanai Yae, Shimosawa Tatsuo, Fujita Toshiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Methylation pattern of urinary DNA as a marker of kidney function decline in diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Research & Care	6. 最初と最後の頁 e001501 ~ e001501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjdr-2020-001501	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirohama Daigoro, Kawarazaki Wakako, Nishimoto Mitsuhiro, Ayuzawa Nobuhiro, Marumo Takeshi, Shibata Shigeru, Fujita Toshiro	4. 巻 21
2. 論文標題 PGI2 Analog Attenuates Salt-Induced Renal Injury through the Inhibition of Inflammation and Rac1-MR Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4433 ~ 4433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21124433	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ayuzawa Nobuhiro, Nishimoto Mitsuhiro, Ueda Kohei, Hirohama Daigoro, Kawarazaki Wakako, Shimosawa Tatsuo, Marumo Takeshi, Fujita Toshiro	4. 巻 31
2. 論文標題 Two Mineralocorticoid Receptor-Mediated Mechanisms of Pendrin Activation in Distal Nephrons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 748 ~ 764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1681/ASN.2019080804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimoto Mitsuhiro, Ohtsu Hiroshi, Marumo Takeshi, Kawarazaki Wakako, Ayuzawa Nobuhiro, Ueda Kohei, Hirohama Daigoro, Kawakami-Mori Fumiko, Shibata Shigeru, Nagase Miki, Isshiki Masashi, Oba Shigeyoshi, Shimosawa Tatsuo, Fujita Toshiro	4. 巻 42
2. 論文標題 Mineralocorticoid receptor blockade suppresses dietary salt-induced ACEI/ARB-resistant albuminuria in non-diabetic hypertension: a sub-analysis of evaluate study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 514 ~ 521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-018-0201-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oba Shigeyoshi, Ayuzawa Nobuhiro, Nishimoto Mitsuhiro, Kawarazaki Wakako, Ueda Kohei, Hirohama Daigoro, Kawakami-Mori Fumiko, Shimosawa Tatsuo, Marumo Takeshi, Fujita Toshiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Aberrant DNA methylation of Tgfb1 in diabetic kidney mesangial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34612-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami-Mori Fumiko, Nishimoto Mitsuhiro, Reheman Latapati, Kawarazaki Wakako, Ayuzawa Nobuhiro, Ueda Kohei, Hirohama Daigoro, Kohno Daisuke, Oba Shigeyoshi, Shimosawa Tatsuo, Marumo Takeshi, Fujita Toshiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Aberrant DNA methylation of hypothalamic angiotensin receptor in prenatal programmed hypertension	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e95625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.95625	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 河原崎和歌子
2. 発表標題 「加齢に伴う高血圧発症機序の解明～食塩の関与～」
3. 学会等名 CVMW2020 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河原崎和歌子
2. 発表標題 「加齢に伴う高血圧発症機序の解明～食塩の関与～」
3. 学会等名 第15回JJK 腎と高血圧フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河原崎和歌子
2. 発表標題 「加齢に伴う高血圧発症機序の解明～食塩の関与～」
3. 学会等名 Vascular Biology Innovationに関する研究助成第15回研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原崎 和歌子, 水野 理介, 西本 光宏, 鮎澤 信宏, 広浜 大五郎, 大庭 成嘉, 丸茂 丈史, 藤田 敏郎.
2. 発表標題 加齢に伴う食塩感受性高血圧発症における腎血管性機序の検討
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河原崎和歌子, 水野理介, 西本光宏, 鮎澤信宏, 広浜大五郎, 森典子, 大庭成喜, 丸茂丈史, 藤田敏郎.
2. 発表標題 「老化に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明」
3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原崎和歌子, 水野理介, 西本光宏, 鮎澤信宏, 広浜大五郎, 大庭成喜, 丸茂丈史, 藤田敏郎.
2. 発表標題 「加齢に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明」
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原崎和歌子, 水野理介, 西本光宏, 鮎澤信宏, 広浜大五郎, 大庭成喜, 丸茂丈史, 藤田敏郎
2. 発表標題 「加齢に伴う食塩感受性高血圧発症機序の解明」
3. 学会等名 第29回日本循環薬理学会・第55回高血圧関連疾患モデル学会合同学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河原崎和歌子
2. 発表標題 加齢に伴う食塩感受性高血圧発症機序の検討
3. 学会等名 第61回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河原崎和歌子
2. 発表標題 加齢に伴う食塩感受性高血圧発症におけるKlotho-Wnt-Rho pathwayの関与
3. 学会等名 第41回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>1) 東京大学先端科学技術研究センター臨床エビジェネティクスホームページ  <a href="http://www.c-epi.rcast.u-tokyo.ac.jp/">http://www.c-epi.rcast.u-tokyo.ac.jp/</a></p> <p>2) プレスリリース 高齢者高血圧の発症機序を解明 ～食塩の関与～  <a href="https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/release/20200630.html">https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/release/20200630.html</a></p> <p>3) プレスリリース 高血圧とエビジェネティクス～食塩と腎臓の役割～  <a href="https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/report/page_00040.html">https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/report/page_00040.html</a></p> <p>4) プレスリリース 尿への食塩排泄量を調節するPendrinにより 治療抵抗性の高血圧が起こる仕組みを解明  <a href="https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/release/20200208.html">https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/release/20200208.html</a></p> <p>5) 日本高血圧学会総会『Splendid basic Hypertension Research Award』を受賞  <a href="https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/report/191101.html">https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/report/191101.html</a></p> <p>6) プレスリリース 胎生期の悪環境が成人後に生活習慣病を発症させる記憶のメカニズムを解明  <a href="https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/release/201801102.html">https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/release/201801102.html</a></p>
--



6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------