

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590908

研究課題名（和文）幼若期高脂肪食負荷の高血圧・腎障害メカニズムの検討

研究課題名（英文）Evaluation of the mechanisms to progress hypertension and kidney injury in high fat loading during young age

研究代表者

安東 克之（ANDO KATSUYUKI）

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：60184313

研究成果の概要（和文）：幼若期における肥満並びに過食にともなう食塩過剰摂取の役割を調べる目的で、幼若期から肥満・高血圧・腎障害等が顕著であるモデル動物DahlS.Z-Lepr<sup>fa</sup>ラットに対して、食餌制限、低塩食、食餌制限＋低塩食を行った。その結果、いずれの処置も高血圧・腎障害進展を改善し、幼若期における肥満・食塩過剰の重要性が示唆された。アルドステロンに関与に関するデータも得た。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the relationship of obesity and high salt intake due to overeating during young age in the progress of hypertension, the effects of restriction of dietary amount, salt, and both were examined in DahlS.Z-Lepr<sup>fa</sup> rats, which show obesity, hypertension, and kidney injury during young age. As a result, these treatments ameliorate hypertension and the associated kidney injury. Thus, dietary factors during young age may play an important role of hypertension. In addition, the present data suggests contribution of aldosterone in development of hypertension at young age.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学(高血圧)

キーワード：肥満、高血圧、腎障害

### 1. 研究開始当初の背景

心血管病発症の重要なリスクである高血圧の発症要因には遺伝因子と環境因子があるが、環境因子（生活習慣）のうちでとくに重要なものは食事要因である。なかでも食塩過剰摂取とエネルギー過剰摂取（肥満）の役割は確立されている。食習慣は小児期に形成されることから、小児期に正しい食事を摂取することは高血圧予防に必須である。しかし、小児期の食事内容に基づく身体的障害が生

涯持続する高血圧やそれに基づく臓器障害に影響を残しうる可能性も見逃すことはできない。とくに、食塩過剰摂取についてはいくつかの報告があり、われわれも食塩感受性モデル動物を用いて、成人期と比較して幼若期における食塩負荷の方が顕著な昇圧反応が得られ、腎障害も顕著であることを示した(Kawarazaki H, Ando K, et al. Nephrol Dial Transplant 2010; 25: 2879)。すなわち、この腎障害が生涯にわたる高血圧や臓器障

害の要因となっている可能性が考えられた。さらに、これにはアルドステロンの増加とそれに基づくミネラルコルチコイド受容体(MR)活性亢進が関与していると考えられた。さらに、酸化ストレス(ROS)やrac1の関与を示唆する所見も得ている。

ここで、小児期の食習慣と高血圧に関していま一つの重要な問題であるのがエネルギー過剰摂取に基づく肥満である。しかし幼若期のエネルギー過剰摂取が、成人期のそれよりも顕著な血圧上昇を呈するか否かについては、あまり検討がなされていない。われわれは肥満モデルとして比較的幼若な4週齢からの高脂肪食負荷をSprague-Dawley (SD)ラットに行い、軽度高血圧、中枢交感神経亢進、中枢酸化ストレス亢進を示すという成績を得ている(Nagae A, Ando K, et al. *Circulation*. 2009; 119: 978)。一方、成人期になってから高脂肪食を負荷したDobrianらの報告(*Hypertension* 2001;37:554)では、高脂肪食負荷によって肥満になるものとならないものがあり、肥満になったものでは高血圧や酸化ストレス亢進を認めたという。この2論文を単純に比較はできないが、エネルギー過剰摂取に対する反応が食塩過剰摂取の場合と同様に幼若期で過剰で成人期で緩徐である可能性が推測される。

さらに、食塩感受性高血圧と肥満高血圧は共通のメカニズムがその背景にある可能性が指摘されている。われわれのこれまでの検討ではDahl食塩感受性(S)ラットに対する食塩負荷は血圧上昇とともにインスリン抵抗性亢進を来した(Ogihara T, Ando K, et al. *Hypertension* 2002; 40: 83)。逆に、肥満高血圧自然発症ラット(肥満SHR)では食塩負荷によって臓器障害はさらに進展した(Matsui H, Ando K, et al. *Hypertension* 2008; 52: 287)。このように肥満(メタボリックシンドローム)と食塩感受性亢進の関連を指摘する報告は多い。とくに、最近の報告では、アルドステロンが食塩感受性高血圧と同様に肥満高血圧において重要な役割を果たしている可能性が指摘されている。

以上より、肥満高血圧も食塩感受性高血圧と同様にRAAS亢進状態と考えられる幼若期に臓器障害増悪を来しやすく、これが生涯にわたる高血圧の原因となる可能性が推測される(レビュー: Ando K, et al. *Free Radic Biol Med*. 2009;47:213)が、この点についてはまだ証明されていない。

## 2. 研究の目的

エネルギー過剰摂取に基づく肥満も幼若期から生じると、不可逆的な腎障害に基づく高血圧を生じる可能性があるのかを検討する。また、そのメカニズムとしてアルドステロンおよびMRが重要な役割を果たしている

のか否かを調べる。

## 3. 研究の方法

### (1)高エネルギー食の効果

1-a. 幼若ならびに成人期のSDラットに対する高エネルギー食(高脂肪食+高フルクトース水)負荷

幼若(3週齢)ならびに成人期(10週齢)SDラットに高(45%)脂肪食+20%フルクトース水を6週間負荷する。対照群としては低(10%)脂肪食+水道水を投与した3ならびに10週齢SDラットとする。

### 1-b.片腎摘Zucker肥満ラット

幼若片腎摘Zucker肥満ラットにおいても高エネルギー食の影響を見た。3週齢のZucker肥満ラットにおいて片側腎の摘除を行い、4週齢から高エネルギー食を10週間負荷した。(2)肥満に基づく高血圧・腎障害モデルにおける幼若期食餌制限の影響

幼若期から肥満を伴い、高血圧を発症し、腎障害等が顕著であるモデル動物として、Dahl SラットとZucker肥満ラットを合わせて作成されたDahlS.Z-Lepr<sup>fa</sup>(DS/fa)ラットを用いた。5週齢より10週齢まで5週間飼育し、Zucker肥満ラットとDS/faラットの通常食における比較を行うとともに、自由摂食時の60%に抑えた食餌制限群、極めて厳しい食塩制限(0.05%食塩食)を施行した低塩食群、これらを同時に施行した食餌制限+低塩食群、さらに抗アルドステロン薬エプレレノンの影響を見たエプレレノン投与群(0.125%エプレレノン食)について検討を加えた。

## 4. 研究成果

### (1)高エネルギー食の効果

1-a. 幼若ならびに成人期のSDラットに対する高エネルギー食負荷

6週間の高カロリー食負荷は幼若ラット、成人ラットと同程度の軽度の体重増加傾向を示した。収縮期血圧は幼若期・成人期いずれのラットも高エネルギー食にて増加またはその傾向を示したが、週齢による増加の差異はなかった。尿蛋白は幼若ラットでは高エネルギー食の影響は明らかでなく、成人ラットでもやや増加傾向を認めたが、有意差を認めなかった。尿アルブミンでみると、幼若ラットは有意の増加を示した。成人ラットも増加はしたが、その程度は幼若ラットより小さかった。血糖(BS)、インスリン(IRI)、中性脂肪(TG)、総コレステロール(T-cho)は差異を認めなかった。以上より、高エネルギー食は幼若ラットで腎障害を来しやすい傾向はあるものの、食塩負荷に見られるような顕著な腎障害進展作用や高血圧を認めなかった。1-b.幼若 Zucker 肥満ラットにおける高エネルギー食負荷

高エネルギー食はSDラットに対してそれほど明確な血圧上昇、腎障害促進作用を認めなかった。幼若肥満モデルにおいて高エネルギー食が血圧上昇、腎障害促進作用を認めるかを検討した。なお、腎障害の影響をやすくする目的で片腎摘を行った。また、負荷の期間も10週間と長期にとった。しかし、軽度の肥満増加傾向を認めるものの収縮期血圧や尿蛋白は増加しなかった。尿アルブミンでも、軽度の増加しか認めず、詳細な検討を行う意義はないと考えられた。

以上より、高エネルギー食のみでは食塩負荷のように顕著な幼少期の昇圧並びに腎障害促進作用を見出すのは困難であると考えられた。

## (2) 肥満に基づく高血圧・腎障害モデルにおける幼若期食餌制限の影響

そこで、逆に、幼若期から肥満を伴い高血圧を発症し腎障害等が顕著であるモデル動物に対して、食餌制限などの処置を行いその影響をみることにした。モデルとして選んだのはDS/faラットである。

DS/faラットとDahl SラットやZucker肥満ラットの比較については以下の通りである。10週齢の時点で体重はDahl Sラットに対して、DS/faラットは顕著な増加を認めた。なお、Zucker肥満ラットの10週齢時の体重はこれよりも肥満はやや高値であった。収縮期血圧もDS/faラットでは著明な増加を認めた。なお、Zucker肥満ラットの収縮期血圧は上昇を認めず、Dahl Sラットより低値であった。空腹時BSはDahl Sラットに対して、DS/faラットはZucker肥満ラットと同程度まで上昇していた。IRIも同様でDS/faラットはZucker肥満ラットと同程度の高インスリン血症を呈した。すなわち、Dahl Sラットでは耐糖能異常を呈さなかったが、DS/faラット・Zucker肥満ラットともに2型糖尿病パターンを呈した。Zucker肥満ラットは脂質代謝異常を認めることが知られているが、DS/faラットはさらに顕著な脂質代謝異常を示した。すなわち、DS/faラットはZucker肥満ラットにくらべて糖代謝異常は同程度であったが、脂質代謝異常、とくにTGの著明増加を示すモデル動物であることが明らかになった。

レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系(RAAS)についても検討を行った。血漿アルドステロン濃度(PAC)はDahl SラットとDS/faラットは同程度であったが、Zucker肥満ラットは増加していた。血漿レニン活性(PRA)はDahl Sラットに比べて、DS/faラットで著明な抑制、Zucker肥満ラットで亢進を示していた。PAC/PRA比を計算すると、Dahl SラットとZucker肥満ラットは同程度であったが、DS/faラットのPAC/PRA比は著増し、アルドステロン産生の著明な亢進が示唆

された。DS/faラットではDahl SラットやZucker肥満ラットに比べて副腎重量の増加を認めたこともこの推測を支持する。

すなわち、DS/faラットはZucker肥満ラットにみられる脂質(TG)代謝異常が増強されているのみでなく、Dahl Sラットでみられる食塩感受性亢進がさらに促進されているために正常食に含まれる軽度の食塩も排泄できずにNa貯留を生じていることが予想された。このため、PACとPRAが抑制を受け、PACはDahl Sラットと同程度になっているが、実際は不適切な産生亢進を反映していると思われる。したがって、相対的な高アルドステロン状態を呈し、Na貯留を来していることが病態に大きく反映していると考えられた。実際血清K値を見ると、DS/faラットで低値であった。

尿蛋白はZucker肥満ラットに比べてDahl Sラットで増加していたが、DS/faラットでは極めて著明な増加を示していた。これらの所見は腎の組織学的所見と一致していた。すなわち、DS/faラットでは極めて進行の早い腎障害を呈することが明らかになった。以上の成績からこのDS/faラットは幼若期から著明な腎障害をとともなう高血圧を呈する肥満モデルであり、その病態には肥満のみでなく食塩貯留が重要で、この背景にはアルドステロン産生過剰・MR刺激亢進があると考えられた。そこで、食餌制限のみでなく、低塩食、食事制限+低塩食、抗アルドステロン薬投与の効果を見た。

食餌制限：DS/faラットにおいて体重、収縮期血圧、尿蛋白、BUNいずれの指標もDahl Sラットと同程度まで回復した。糖・脂質代謝異常も改善を認めたが、Dahl Sラットよりは高レベルにとどまった。さらに、PRAはやや増加したが、PACは明らかに低下し、PAC/PRA比は減少した。副腎重量もDahl Sラットと同レベルまで抑えられ、アルドステロン産生の抑制が示唆された。したがって、DS/faラットでは過食に伴い、高血圧、糖・脂質代謝異常、腎障害が促進していると考えられた。なお、食餌制限はPRA上昇も軽度であるが認めるので、食塩貯留の軽減効果(食塩摂取量も60%に抑制されるはずである)も一部に関与したデータとなっている可能性がある。

低塩食：低塩食群では体重の減少を認めないばかりでなく収縮期血圧も軽度低下したに過ぎなかった。しかし、尿蛋白、BUNは食餌制限ほどではないもののある程度改善した。したがって、DS/faラットは正常食塩食においてもNa貯留を来してしまうような重度のNa排泄機能障害があり、肥満に基づく腎障害に拍車をかけているものと考えられた。糖代謝は改善を認めなかったが、脂質代謝は軽度の改善を認め、食塩過剰摂取と

脂質代謝の間に何らかの関連がある可能性が示唆された。PAC、PRA はいずれも上昇したが、PAC/PRA 比は低下した。以上より、食餌制限と減塩は一部共通の、また一部異なったメカニズムで血圧ならびに糖・脂質代謝異常、腎障害進行を抑制しているものと考えられた。

食事制限+低塩食：体重、血圧ともに Dahl S ラットと同程度まで改善した。さらに、尿蛋白は Dahl S ラットの半分程度まで低下し、BUN も正常化した。空腹時 BS、IRI、T-cho は食餌制限群以上の改善を認めなかったが、TG はさらなる改善を認めた。なお、PAC、PRA、PRA/PAC 比は Dahl S ラットとほぼ同様の成績となった。

抗アルドステロン薬投与：体重は変わらなかったが、収縮期血圧は低下した。尿蛋白は低塩食群と同程度まで改善した。空腹時 BS、IRI、T-cho は改善せず、TG も改善はしたもののまだかなり高い値を示していた。すなわち、MR 刺激状態は糖・脂質代謝とは別の機序で腎機能を改善している可能性が示唆され、食餌制限の病態改善にはこれ以外のメカニズムの関与もあるものと考えられた。

以上より、以下のようなことが考えられる。  
#1.高エネルギー食負荷は血圧を軽度上昇させるものの、腎障害を来すほどではなかった。

#2. DS/fa ラットにおける PRA 著明低下は Na 貯留によるものと考えられ、Na 貯留が肥満や MR 刺激に基づく血圧上昇、腎障害進行を促進する重要な因子である可能性が考えられた。

#4.食餌制限を行うと、低塩食よりも顕著な肥満・高血圧・腎障害の改善を認め、DS/fa ラットでは過食がとくに重要な腎障害・血圧上昇因子の一つであることが示唆された。

#5.食餌制限+減塩を行ったところ、減量・降圧・腎障害改善を認め、とくに尿蛋白の改善は DS ラットの尿蛋白を下回るまで低下した。すなわち、食塩過剰摂取は過食と相乗的に作用し、高血圧・腎障害の進展を促進しているものと考えられた。

#6.抗アルドステロン薬は高血圧を Dahl S ラットに近いレベルまで改善したが、腎障害改善の程度は食餌制限には及ばず、低塩食と同程度であった。したがって、高アルドステロン状態に基づく MR 亢進は DS/fa ラットの腎障害促進メカニズムの一部ではあるけれども、それ以外の機序も本モデルラットの腎障害促進は関与している可能性が示唆された。

以上のことから、幼若期の過食に基づく肥満の腎障害、高血圧の進展には食塩摂取量も関与し、その機序の一つとして MR 刺激状態が重要であることが証明された。

##### 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 16 件)

1. Ando K, Matsui H, Fujita M, Fujita T: Protective effect of dietary potassium against cardiovascular damage in salt-sensitive hypertension: Possible role of its antioxidant action. *Curr Vasc Pharmacol* 2010; 8: 59-63.

2. Teramoto T, Shimada K, Uchiyama S, Sugawara M, Goto Y, Yamada N, Oikawa S, Ando K, Ishizuka N, Yamazaki T, Yokoyama K, Murata M, Ikeda Y: Rationale, design, and baseline data of the Japanese Primary Prevention Project (JPPP)—A randomized open-label controlled trial of aspirin versus no aspirin in patients with multiple risk factors for vascular events. *Am Heart J* 2010; 159: 361-369.e4.

3 Ando K, Ohtsu H, Arakawa Y, Kubota K, Yamaguchi T, Nagase M, Yamada A, Fujita T: Rationale and design of the Eplerenone combination Versus conventional Agents to Lower blood pressure on Urinary Antialbuminuric Treatment Effect (EVALUATE) Trial: A double-blinded randomized placebo-controlled trial to evaluate the antialbuminuric effects of an aldosterone blocker in hypertensive patients with albuminuria. *Hypertens Res* 2010; 33: 616-621.

4. Kawarazaki H, Ando K, Nagae A, Fujita M, Matsui H, Fujita T. Mineralocorticoid receptor activation contributes to salt-induced hypertension and renal injury in prepubertal Dahl salt-sensitive rats. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25: 2879-2889.

5. Ishikawa A, Kawarazaki H, Ando K, Fujita M, Fujita T, Homma Y. Renal preservation effect of ubiquinol, the reduced form of coenzyme Q10. *Clin Exp Nephrol* 2011; 15: 30-33.

6. Kawarazaki H, Ando K, Fujita M, Matsui H, Nagae A, Muraoka K, Kawarazaki C, Fujita T. Mineralocorticoid receptor activation: a major contributor to salt-induced renal injury and hypertension in young rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 300: F1402-F1409.

7. Shibata S, Mu S, Kawarazaki H, Muraoka K, Ishizawa K, Yoshida S, Kawarazaki W, Takeuchi M, Ayuzawa N, Miyoshi J, Takai Y, Ishikawa A, Shimosawa T, Ando K, Nagase M, Fujita T. Rac1 GTPase in rodent kidneys is essential

for salt-sensitive hypertension via a mineralocorticoid receptor-dependent pathway. *J Clin Invest.* 2011; 121: 3233-3243.

8. Ando K, Haneda M, Ito S, Kashihara N, Node K, Nangaku M, Shimosawa T, Kishimoto J, Fujita T: Design and rationale of Japanese Evaluation between Formula of Azelnidipine and Amlodipine Add on Olmesartan to Get Antialbuminuric Effect Study (J-FLAG): Evaluation of the antialbuminuric effects between calcium channel blocker with sympatholytic action in hypertensive patients with diabetes and albuminuria. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011; 25: 341-7.

9. Kawarazaki H, Shibagaki Y, Fukumoto S, Kido R, Ando K, Nakajima I, Fuchinoue S, Fujita T, Fukagawa M, Teraoka S. Natural history of mineral and bone disorders after living donor kidney transplantation: One-year prospective observational study. *Ther Apher Dial.* 2011; 15: 481-487.

10. Matsuoka H, Ando K, Ueshima K, Babazono T, Kario K, Sato T, Nakao K, Fujita T, on behalf of the SAKURA Trial Investigators. Design and rationale of the Study of Assessment for Kidney function by Urinary microalbumin in RANdomized (SAKURA) trial: Comparison of the antialbuminuric effects between L-/N-type and L-type calcium channel blocker in hypertensive patients with diabetes and microalbuminuria. *Clin Exp Hypertens.* 2011; 33: 455-462.

11. Fujita M, Ando K, Kawarazaki H, Kawarasaki C, Muraoka K, Ohtsu H, Shimizu H, Fujita T: Sympathoexcitation by brain oxidative stress mediates arterial pressure elevation in salt-induced chronic kidney disease. *Hypertension* 2012; 59: 105-112.

12. Ando K, Fujita M. Reactive oxygen species and the central nervous system in salt-sensitive hypertension: possible relationship to obesity-induced hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012; 39: 111-116.

13. Ando K, Fujita T. Pathophysiology of salt-sensitive hypertension. *Ann Med* 2012; 44(suppl 1): S119-S126.

14. Kawarazaki H, Shibagaki Y, Kido R, Nakajima I, Fuchinoue S, Ando K, Fujita T, Fukagawa M, Teraoka S, Fukumoto S. Kidney transplantation restored uncoupled bone turnover in end-stage renal disease. *Clin Nephrol.* 2012; 78: 10-16.

15. Kawarazaki H, Ando K, Shibata S, Muraoka K, Fujita M, Kawarazaki C, Fujita T. Mineralocorticoid receptor-Rac1 activation and oxidative stress play major roles in salt-induced hypertension and kidney injury in prepubertal rats. *J Hypertens.* 2012; 30: 1977-85.

16. Sadanaga T, Ando K, Hirota S, Mitamura H, Tsuchihashi T, Kohsaka S, Fukuda K, Ogawa S. B-type natriuretic peptide levels are decreased by reducing dietary salt intake in patients with compensated heart failure with preserved ejection fraction. *Intern Med J.* 2013; in press

[学会発表] (計 37 件)

1. Kawarazaki H, Ando K, Fujita M, Fujita T: Mineralocorticoid receptor activation increases salt induced renal injury in young rats. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (Kyoto) P8-3-7 2010. 3. 26-30.

2. Fujita M, Ando K, Kawarazaki H, Fujita T: Sympathoexcitation by oxidative stress in the brain mediates arterial pressure elevation in metabolic syndrome. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (Kyoto) P9-6-1 2010. 3. 26-30.

3. Ando K, Fujita M, Nagae A, Kawarazaki H, Fujita T: High fat loading accelerates salt-induced development of hypertension and renal damage in Dahl salt-sensitive rats. 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology (Kyoto) P9-14-6 2010. 3. 26-30.

4. Fujita M, Ando K, Kawarazaki H, Fujita T: Sympathoexcitation by oxidative stress in the brain mediates arterial pressure elevation in metabolic syndrome. The 23<sup>rd</sup> Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (Vancouver) 2010. 9. 26-30.

5. Kawarazaki H, Ando K, Shibata S, Fujita M, Nagase M, Fujita T. Mechanism of increased salt-sensitivity in young uninephrectomized Sprague-Dawley rats. The 23<sup>rd</sup> Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (Vancouver) PS2/TUE/76 2010. 9. 26-30.

6. Fujita M, Ando K, Kawarazaki C, Muraoka K, Fujita T. Brain Mineralocorticoid receptor activation mediates arterial pressure elevation through brain oxidative stress-induced sympathoactivation in salt-sensitive and

obesity-induced hypertension. The 24th Meeting of the International Society of Hypertension (Sydney) 88. 2012. 9. 30-10.4.

7. Kawarazaki C, Fujita M, Shimizu H, Muraoka K, Hori Y, Kaname S, Nishiyama N, Kataoka K, Ando K, Fujita T. Glomerular targeted molecular therapy using tyrosin hydroxylase siRNA ameliorates glomerular damage in DOCA-salt rats. The 24th Meeting of the International Society of Hypertension (Sydney) 273. 2012. 9. 30-10.4.

8. Muraoka K, Ando K, Fujita M, Kawarazaki C, Shimizu H, Hirahashi J, Fujita T. The role of aldosterone in the development of murine lupus nephritis. The 24th Meeting of the International Society of Hypertension (Sydney) 450. 2012. 9.30-10.4.

9. Ando K, Ueshima K, Tanaka S, Kosugi S, Sato T, Matsuoka H, Nakao K, Fujita T. Comparison of the Antialbuminuric Effects between L-/N-Type and L-Type Calcium Channel Blockers in Hypertensive Patients with Diabetes and Microalbuminuria : the Study of Assessment for Kidney Function by Urinary Microalbumin in Randomized (SAKURA) Trial. The 24th Meeting of the International Society of Hypertension (Sydney) 543. 2012 .9.30-10.4 2011.11.25-26

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

安東克之 (KATSUYUKI ANDO)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：60184313