

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461262

研究課題名(和文) 睡眠時無呼吸症候群における腎交感神経と高血圧のメカニズム解明

研究課題名(英文) THE MECHANISM OF SALT SENSITIVE HYPERTENSION IN INTERMITTENT HYPOXIA

研究代表者

小山 彩世子(オグラサヨコ)(KOYAMA, Sayoko)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：30618202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：間欠的低酸素は腎臓尿細管においてNCC(The thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter)の膜への移行を増加させ、食塩負荷によっても持続的に活性化していることが明らかとなった。そのほかの腎臓NaCl輸送体については検討したがNCCの様な変化は認められなかった。またHCTZ(サイアザイド)負荷試験においても間欠的低酸素ではNa排泄が亢進し、NCCが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intermittent hypoxia (IH) increases membrane protein of NCC (The thiazide-sensitive Na⁺-Cl⁻ cotransporter) in Kidney tubules. It remain by salt loading diet. The other Sodium Chloride channel in Kidney ENaC(Epithelial sodium channel),NHE3(Na⁺/H⁺ exchange),NKCC-2 (Na-K-Cl cotransporter) were not changed after IH. Challenge test of Amiloride showed no difference between Control and IH group, but Thiazide test showed remarkably increased IH group. These data suggested NCC is key for salt sensitive hypertension by IH.

研究分野：高血圧

キーワード：間欠的低酸素 食塩感受性高血圧 NCC

1. 研究開始当初の背景

睡眠時無呼吸症候群(SAS)は高血圧の独立した危険因子と認識されている。SAS患者は、SASでない人と比べて高血圧症(約2倍)、虚血性心疾患(約2-3倍)、脳血管障害(約3-5倍)の合併率が高い。しかし、SASにおける心血管病および高血圧の発症のメカニズムについては未解明のことが多い。その最も大きな理由は、動物モデルの作製が難しいことにある。そこで我々は窒素ガス発生装置を用い、通常の飼育箱のガス注入条件を詳細に検討し改良した結果、同時にラット10匹を長期間、低経費・労力で飼育できる装置の開発に成功しており、H24-25年度の科学研究費補助金・若手研究(B)において、間欠的低酸素曝露と交換神経活動および血圧の変化の検討を行ってきた。テレメリー装置を用いて持続的な血圧の測定を行った結果、間欠的低酸素時(light cycle:8hour)よりも、常酸素時(dark cycle:16hour)に血圧が上昇する事を確認し、間欠的低酸素では血圧変動が大きくなることが確認することができた。Guyton説に従うと、腎臓から尿中へ排出されるNa量と全身血圧はほぼ直線的関係にある。圧利尿曲線が変化しない限り、血圧は平衡状態である。これはNa排泄と摂取が平衡に達しているために、血圧への反映が少ないと考えられる。そこで高食塩(8%NaCl)負荷により腎臓でのNa排泄機構の変化を著明にし、血圧への関与を検討したところ高食塩食負荷では血圧の上昇が著明となり、常酸素時においても平均血圧が上昇した。これにより、間欠的低酸素負荷により食塩感受性高血圧を呈する可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は、睡眠時無呼吸の病態である間欠的低酸素がどのように食塩感受性高血圧を引き起こすのか腎臓でのNa再吸収分子機構から解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 腎臓でのNa排泄機構の変化

間欠的低酸素を高食塩食で2週間飼育したラットに食塩(NaCl)の再吸収を抑制し、利尿作用を示す利尿剤を投与し、どの利尿剤に反応を占めるかを検討する。これにより腎臓内のNa再吸収に關与しているトランスポーターのHCTZ(Hydrochlorothiazide)およびAmiloride, Vehicleを投与する。ポールマネージに固定したラットに頸静脈からカテーテルを挿入し、生理食塩水(Vehicle)を持続投与する。ラットが安定した状況で薬剤(HCTZ, Amiloride)をショット注入する。膀胱内にカテーテルを留置し、30分毎の尿を採取する。尿中Na排泄量を測定し、30分毎のNa排泄量を解析する。

(2) 腎臓での蛋白およびmRNA発現

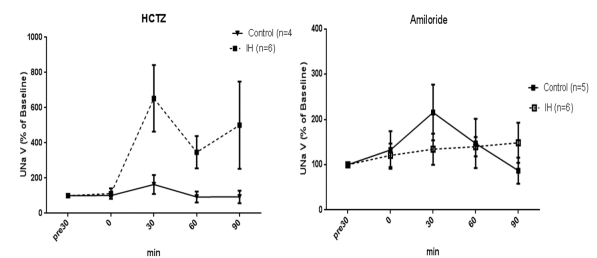
間欠的低酸素2週間負荷したラットの腎臓を

採取し、冷凍(-80℃)で保存する。その後膜タンパクキット(Invent)を用いて膜タンパクを抽出する。mRNAについてはIsogenに腎臓を保存し、RNeasyを用いてRNAを抽出する。cDNAを作成(High capacity cDNA kit)したのち、Realtime PCR(ABI 7500)を用いて定量を行う。

4. 研究成果

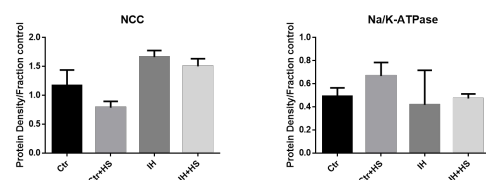
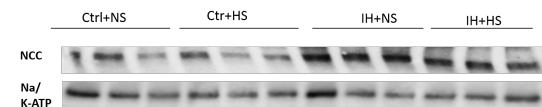
(1) 腎臓でのNa排泄機構の変化

長期間の間欠的低酸素によりHCTZ投与による尿中Na排泄量は常酸素よりも著明に増加した。しかしAmiloride投与では常酸素と変化なく、Vehicleとほとんど変わらない結果であった。このことから間欠的低酸素による腎Na排泄の変化はNCC(Na⁺/Cl⁻ Cotransporter)を介している可能性が示唆された。



(2) NCC (Na⁺/Cl⁻ Cotransporter) の変化

腎臓組織から細胞膜分画(Invent Membrane Isolation Kit)を抽出し、NCCの発現をウェスタンブロットで確認した(NCC antibody: Millipore AB3553)。2週間の間欠的低酸素負荷により、細胞膜分画でのNCCの発現は増加し、食塩負荷によって減少する発現変化も、間欠的低酸素負荷では持続的に発現が認められていることが確認できた。また他の腎Na排泄に關与するトランスポーター、チャンネルについても膜分画の変化をウェスタンブロットで確認したが、ENaC(epithelial sodium channel)(αENaC:Stressmark SPC-403D, βENaC:Stressmark SPC-404D)やNHE3(Na⁺-H⁺ Exchanger-3), NKCC2(Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter)(Millipore AB3562P)については、間欠低酸素の負荷によっても変化を認めなかった。



酸化ストレスによる関与の検討

NCC発現変化・活性化を起こすメカニズムとして、酸化ストレスによるOSR(oxidative

stress-responsive 1) などのリン酸化がある。そこで酸化ストレスによるNCC活性化を調べるため、酸化ストレスを消去するTempol (1-Oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine)を間欠的低酸素ラットに投与した。しかしTempol投与によってNCC発現は変化を認めなかった。

レニンアンジオテンシン・GR-MR系の関与の検討

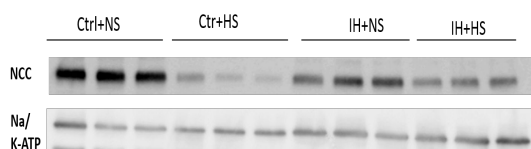
血中のレニン・アルドステロンは間欠的低酸素では変化を認めなかった。また腎臓でのACE,ACE2,Angiotensinogen,11bHSD2のmRNA発現をRT-PCR法で解析した。間欠的低酸素によってACE,ACE2,Angiotensinogen,11bHSDのmRNA発現には変化が見られなかった。さらにGR-MR系の関与を調べるため、GR-blocker (Mifepristone), MR-blocker (Eplerenone)を投与し、間欠的低酸素でのNCCの発現の変化を確認したが、GR-blocker, MR-blockerともにNCCの発現の変化を認めなかった。

(3) マウスの間欠的低酸素装置条件の検討

これまで使用してきたラットにおける間欠的低酸素装置を改良し、マウスでの間欠的低酸素装置の検討を行った。ラットでは90秒をサイクルとして、90秒で酸素濃度が4-5%となるように低下しその後90秒で常酸素(20%)に戻る条件で行っていた。しかしマウスでは流量が強くなることによるストレスや呼吸条件も考慮し30秒ごとに酸素濃度を5%まで低下させ、その後30秒で常酸素に戻す条件で検討を行った。

ラットと同様に2週間の間欠的低酸素および食塩(8%NaCl)の負荷を行い、腎臓で膜分画抽出(Invent Membrane Isolation kit)のNCC発現を確認した。ラットの結果と同じく、間欠的低酸素によりNCCの膜分画の発現は増加し、食塩負荷によっても継続して発現は増加していることが明らかとなった。

NCC, NaK-ATPase (plasma membrane)



【まとめ】

間欠的低酸素により腎臓(尿細管)におけるNCC (Na^+/Cl^- Cotransporter)の膜への発現が変化し活性化がおりNaの再吸収が促進されていることが明らかとなった。またNCCを活性化させる酸化ストレスやレニンアルドステロン系・GR-MR系について検討したがいずれも関与が認められず、今までの報告とは異なるNCCの活性化が関与している可能性があり、遺伝子改変動物(NCC KOマウ

ス)などを用いて今後さらに検討を進める。

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)

Nagai H, Kuwahira I, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Nara A, Ogura S, Sonobe T, Inagaki T, Fujii Y, Yamaguchi R, Wingenfeld L, Umetani K, Shimosawa T, Yoshida K, Uemura K, Pearson JT, Shirai M. Pulmonary Macrophages Attenuate Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction via β 3AR/iNOS Pathway in Rats Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia. PLoS One. 10:e0131923, 2015 (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0131923.

Nara A, Nagai H, Shintani-Ishida K, Ogura S, Shimosawa T, Kuwahira I, Shirai M, Yoshida KI. Pulmonary Arterial Hypertension in Rats Due to Age-related Arginase Activation in Intermittent Hypoxia. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 53:184-92, 2015 (査読有)

DOI: 10.1165/rcmb.2014-0163OC.

Nagai H, Kuwahira I, Schwenke DO, Tsuchimochi H, Nara A, Inagaki T, Ogura S, Fujii Y, Umetani K, Shimosawa T, Yoshida K, Pearson JT, Uemura K, Shirai M. β 2-Adrenergic receptor-dependent attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction prevents progression of pulmonary arterial hypertension in intermittent hypoxic rats. PLoS One. 9(10):e110693, 2014 (査読有)

DOI: 10.1371/journal.pone.0110693.

eCollection 2014.

Ogura S, Shimosawa T. Oxidative stress and organ damages. Current Hypertension Reports. (8):452. 2014 (査読有)

DOI: 10.1007/s11906-014-0452-x.

〔学会発表〕(計 5 件)

Alimila Yeerbolati, Sayoko Ogura,
Latapati Reheman, Tatsuo
Shimosawa THE mechanism of salt
sensitive hypertension in
intermittent hypoxia 第 40 回日本高
血圧学会総会 2017.10.20, 松山

Alimila Yeerbolati, Sayoko Ogura,
Latapati Reheman, Conghui Wang,
BeiBei Liu, Ichiro Kuwahira,
Mikiyasu Shirai, Tatsuo Shimosawa,
Toshiro Fujita. The Mechanism of
Salt Sensitive Hypertension in
Intermittent Hypoxia. The 26th
Scientific Meeting of International
Society of Hypertension, 2016.9.28
Seoul, KOREA,

小倉彩世子, Wang Conghui, Liu
BeiBei, Yeerbolati Alimila,
Rehaman Latapati, 下澤達雄, 藤田
敏郎 睡眠時無呼吸症候群におけ
る食塩感受性高血圧のメカニズム
解明 第 19 回日本心血管内分泌
代謝学会学術総会, 2015.12.11, 神
戸

小倉彩世子, Wang Conghui, Liu
BeiBei, Yeerbolati Alimila,
Rehaman Latapati, 広浜大五郎, 丸
茂丈史, 藤田敏郎 睡眠時無呼吸
症候群における食塩感受性高血圧
のメカニズム解明 第 38 回日本高
血圧学会総会 2015.10.10, 松江

Ogura, S., Shimosawa, T., Nagai H., Nara
A., Kuwahira I., Yoshida K., Shirai M.,
Different patterns of coronary
microvascular function induced by type
1 diabetes and intermittent hypoxia in
rats. Frontiers in CardioVascular

Biology. 2014.07.05, Balcerona,
SPAIN.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
小山 彩世子 (KOYAMA Sayoko)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：30618202
(2)研究分担者
なし
(3)連携研究者
下澤 達雄 (SHIMOSAWA Tatsuo)
国際医療福祉大学・医学部・教授
研究者番号：90231365
(4)研究協力者
Alimila Yeerbolati