

発表番号 53

食塩感受性高血圧の発症・進展における1型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の役割の解明

助成研究者: 岩本 隆宏 (国立循環器病センター研究所)
(現在:福岡大学医学部薬理学)

共同研究者: 喜多紗斗美 (福岡大学医学部薬理学)
松村 靖夫 (大阪薬科大学病態分子薬理学)
小室 一成 (千葉大学大学院循環病態医科学)

【目的】 食塩過剰摂取が高血圧の原因になることは広く知られている。しかし、この食塩感受性高血圧の発症機序ならびに原因遺伝子については未だ明確になっていない。今回の研究では遺伝子改変マウスおよび特異的阻害薬を用いることにより、食塩感受性高血圧の発症・進展における1型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX1)の関与について検討した。

【方法】 NCX1 ヘテロノックアウト(KO)マウスおよび野生型(WT)マウスを用いて、定法に従って deoxycorticosterone acetate (DOCA)食塩誘発性高血圧モデルを作製し、両者の高血圧発症の程度を比較した。また、種々高血圧ラットに選択的 NCX1 阻害薬 SEA0400(SEA)を急性あるいは慢性的に投与し、血圧および臓器障害に及ぼす影響を調べた。

【結果】 KO マウスと WT マウスで正常時の血圧に有意差は無かった。WT マウスは片腎摘出後、DOCA食塩を4週間負荷することにより有意な血圧上昇(収縮期血圧変化: 27 ± 1 mmHg)を示したが、KO マウスは同処置により顕著な血圧変化を示さなかった。SEA(経口投与、1~10mg/kg)は DOCA 食塩高血圧ラットおよび Dahl 食塩感受性ラットの血圧を用量依存性に低下させた。一方、SEA は正常血圧ラット(WKY)、高血圧自然発症ラット(SHR)、Dahl 食塩非感受性ラットおよび2腎1クリップ型腎性高血圧ラットの血圧には有意な影響を与えなかった。さらに、DOCA 食塩負荷1週間より4週間までラットにSEAを3週間連続投与すると、DOCA 食塩で誘発される血圧上昇および臓器障害(心肥大、血管肥厚、腎組織障害、腎機能低下)は著明に抑制された。また、SEAの血管拡張作用を評価するため、DOCA 食塩高血圧ラットの大腿動脈に低用量のSEA ($10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)を持続注入すると、大腿動脈血流量は著明に増加した。一方、SEAの同処置は正常血圧ラット(sham)の大腿動脈血流量には影響を与えなかった。

【考察】 以上の結果は、食塩感受性高血圧の発症にNCX1が関与することを示唆している。

2

助成番号 0233

食塩感受性高血圧の発症・進展における1型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の役割の解明

助成研究者：岩本 隆宏 (国立循環器病センター研究所)
(現在:福岡大学医学部薬理学)

共同研究者：喜多紗斗美 (福岡大学医学部薬理学)
松村 靖夫 (大阪薬科大学病態分子薬理学)
小室 一成 (千葉大学大学院循環病態医科学)

1. 研究目的

高血圧は虚血性心疾患、脳血管障害などの致死性の血管病変の最大危険因子である。この高血圧の成因に食塩摂取が関わることは広く知られている。高血圧は数多くの環境的因子と遺伝的因子の複雑な相互作用により発症すると考えられているが、本態性高血圧症も含めて高血圧症の約半数が食塩感受性高血圧に属している。一般に、食塩感受性高血圧では非感受性高血圧に比べ尿中への Na^+ 排泄量が減少しており、この発症には体内への Na^+ 貯留と体液量の増加が深く関わっていると考えられている。古くから、その成因に種々細胞膜イオン輸送体の異常が関与している可能性が推定されているが、その真否は確定していない。また、これまでに食塩感受性に関わる候補因子として、内因性 Na^+ ポンプ抑制因子¹⁾、 α -アデュシン²⁾、アンジオテンシン変換酵素³⁾、アルドステロン合成酵素⁴⁾などが報告されているが、食塩感受性高血圧の発症機序はいまだに不明である。

本研究では、重要な細胞内 Ca^{2+} 濃度調節系である $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体に焦点を絞り、この輸送体と食塩感受性高血圧との関わりについて検討を行った。現在、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体には3種の分子種(NCX1、NCX2、NCX3)が同定されている。心臓にはNCX1のみが発現しているが、血管平滑筋にはNCX1が主に発現し、NCX2も少量発現している。血管平滑筋において、この輸送体は通常 Na^+ の濃度勾配に従って細胞内 Ca^{2+} を細胞外へ汲み出す役割を担っており、細胞内 Ca^{2+} 濃度を静止レベルに維持するように機能している⁵⁾。一方、内因性 Na^+ ポンプ抑制因子が増加した高血圧患者では、血管平滑筋の細胞内 Na^+ 濃度が増加し、脱分極が起り、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体が逆回転して Ca^{2+} 流入が起り、血管緊張が高まっている可能性が考えられている¹⁾。本研究では、NCX1 遺伝子改変マウスおよび特異的 NCX 阻害薬を用いることにより、食塩感受性高血圧の発症・進展における1型 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体(NCX1)の関与について検討した。

2. 研究方法

2. 1. NCX1 遺伝子改変動物を用いた解析

最近、開発された NCX1 ノックアウトマウス⁶⁾のホモ接合体 (NCX1^{-/-}) は心拍動停止および心筋アポトーシスにより胎生 9.5 日に死亡する⁶⁾。そこで、ホモ接合体を用いた動物実験は実施できない。一方、そのヘテロ接合体 (NCX1^{+/-}) は正常に親まで発育する。我々は、このヘテロ接合体の心臓、腎臓、脳および大動脈の NCX1 発現量を Western blot により調べることにより、それらの発現レベルが野生型の半分に減少していることを見出した (Fig. 1、2)。また、胸部大動脈より培養血管平滑筋細胞を調製し、Na⁺依存性⁴⁵Ca²⁺取り込み量を調べることにより、ヘテロ接合体では最大 Ca²⁺輸送活性 ($V_{max}=0.71\text{nmol}/30\text{s}/\text{mg}$) が野生型 ($V_{max}=1.35\text{nmol}/30\text{s}/\text{mg}$) に比べて半減していることを明らかにした。これらの結果は、このヘテロ接合体が NCX1 低発現動物モデルとして有用であることを示している。

本研究では、このヘテロ接合体に食塩感受性高血圧を誘導し、高血圧の発症・進展における NCX1 の役割について検討した。さらに、本研究では、常法に従って血管平滑筋 α アクチンプロモーターを用いた平滑筋特異的 NCX1 トランスジェニックマウスを作製した。この NCX1 高発現マウスについても食塩感受性高血圧を誘導し、高血圧と NCX1 の役割について検討した。

2. 2. DOCA-食塩高血圧動物およびその他高血圧動物の作製

SD 系雄性ラットおよび C57BL/6J 雄性マウスをペントバルビタール Na (50mg/kg, i.p.) で麻酔し、右腎を摘除した。右腎摘出1週間後より、飲料水として1%NaCl を与え、コーンオイルに懸濁した DOCA (deoxycorticosterone acetate) を週2回 15~75mg/kg の用量で皮下投与し、DOCA-食塩高血圧動物を作製した。

その他の高血圧動物(高血圧自然発症ラット (SHR)、Dahl 食塩感受性ラット、Dahl 食塩非感受性ラット)は日本エスエルシー株式会社もしくはセアック吉富株式会社より購入した。また、2腎1クリップ (2K1C) 型腎性高血圧ラットは、左腎動脈を間隙 0.2mm の銀クリップで狭窄して作製した。

2. 3. NCX 阻害薬の降圧効果の評価

種々実験高血圧動物に選択的な NCX 阻害薬 SEA0400 を経口投与し、tail-cuff 法により血圧を測定した。また、高血圧性臓器障害を調べるため、腎機能試験および組織学的な検討(胸部大動脈および腎臓の形態学的観察)を行った。

2. 4. 統計処理

統計学的有意差検定は、一元配置分散分析の後、Dunnett 検定を行い、 $P<0.05$ の場合、有意差ありと判定した。

3. 実験結果および考察

まず、NCX1 ノックアウトマウスのヘテロ接合体を用いて、高血圧と NCX1 の関係を検討した。片腎を摘出したマウスに DOCA を皮下投与して食塩負荷をかけると、野生型マウスでは血圧が経時的に上昇したが、ヘテロノックアウトマウスでは血圧は有意に上昇しなかった (Fig.2)。従って、NCX1 が高血圧の発症に関与していると考えられた。

次に、特異的な NCX 阻害薬 SEA0400 の実験高血圧動物に対する作用を検討することにした。これまでに、我々は SEA0400 の作用機序について解析し、本阻害薬が NCX サブタイプの中で NCX1 に対して特異的に作用すること、また Ca^{2+} 取り込みモードを特異的に抑制することを明らかにしている^{7,8)}。SEA0400 (1~10mg/kg) を DOCA 食塩誘発性高血圧ラットに経口投与したところ、用量依存的に血圧が低下し、その効果は 8 時間以上持続した (Fig.3)。一方、自然発症高血圧ラット (SHR) に SEA0400 を投与して検討したところ、血圧に変化は認められなかった (Fig.4)。さらに、詳細に検討すると、SEA0400 は正常血圧ラット (WKY)、Dahl 食塩非感受性ラット、2 腎 1 クリップ型腎性高血圧ラットなどの血圧に変化を及ぼさず、食塩感受性高血圧ラット (食塩負荷した Dahl 食塩感受性ラットなど) のみ特異的に降圧させることがわかった。

次に、高血圧性臓器障害とそれに対する SEA0400 の効果について DOCA 食塩高血圧ラットで検討した。SEA0400 3 mg/kg 投与群、同 10mg/kg 投与群ともに SEA0400 無投与群と比べて 4 週間後の収縮期血圧が有意に低下した (Fig.5)。その際、腎機能を調べると、クレアチニンクリアランスの低下や尿細管のナトリウム再吸収能の低下、尿蛋白量の増加が、SEA0400 投与により有意に改善していた。さらに、胸部大動脈の血管肥厚も SEA0400 投与により有意に改善することが示された (Fig.6)。

さらに、SEA0400 の降圧効果がどのような作用機序に基づいているかを検討した。DOCA 食塩高血圧ラットの大腿動脈内に SEA0400 を $10 \mu\text{g/kg/min}$ で持続注入したところ、血圧、心拍数はほとんど変化しなかったが、大腿動脈血流量は 20 分後から有意に増加し、血管抵抗は有意に減少した。一方、Sham ラットに同様に注入しても、血流量、血管抵抗はほとんど変化しなかった。従って、SEA0400 の降圧作用には末梢血管拡張作用が関与していると考えられた。

また、NCX1 遺伝子と食塩感受性高血圧の関係を調べるために、NCX1 遺伝子を血管平滑筋に高発現させたトランスジェニックマウスを作製した。野生型マウスでは食塩負荷により血圧はほとんど変化しないが、トランスジェニックマウスでは食塩負荷により血圧が有意に上昇した。

以上の結果は、食塩感受性高血圧の発症・進展に NCX1 が密接に関与していることを示唆している。 Ca^{2+} 流入モードを特異的に阻害する NCX1 阻害薬 SEA0400 が食塩感受性高血圧に有効なこと、また SEA0400 が食塩感受性高血圧動物の血管抵抗を低下させること、さらに NCX1 の低発現マウスで食塩感受性が低下し、かつ NCX1 トランスジェニックマウ

スで食塩感受性が亢進することから、おそらく平滑筋における NCX1 の Ca^{2+} 流入モードが血圧上昇に関与していると推察される。この上流にはおそらく、内因性の Na^+ ポンプ抑制因子が存在すると考えており、現在、この関係をさらに詳細に検討中である。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を頂いた(財)ソルト・サイエンス研究財団に心より感謝いたします。

4. 文献

- 1) Blaustein MP, Hamlyn JM: Pathogenesis of essential hypertension. A link between dietary salt and high blood pressure. *Hypertension* 18, III184-III195, 1991.
- 2) Cusi D, Barlassina C, Azzani T, Casari G, Citterio L, Devoto M, Glorioso N, Lanzani C, Manunta P, Righetti M, Rivera R, Stella P, Troffa C, Zagato L, Bianchi G: Polymorphisms of alpha-adducin and salt sensitivity in patients with essential hypertension. *Lancet* 349, 1353-1357, 1997.
- 3) Hiraga H, Oshima T, Watanabe M, Ishida M, Ishida T, Shingu T, Kambe M, Matsuura H, Kajiyama G: Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension*: 27, 569-572, 1996.
- 4) Matsubara M, Kikuya M, Ohkubo T, Metoki H, Omori F, Fujiwara T, Suzuki M, Michimata M, Hozawa A, Katsuya T, Higaki J, Tsuji I, Araki T, Ogihara T, Satoh H, Hisamichi S, Nagai K, Kitaoka H, Imai Y: Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-334T polymorphism, ambulatory blood pressure and nocturnal decline in blood pressure in the general Japanese population: the Ohasama Study. *J Hypertens*: 19, 2179-2184, 2001.
- 5) 岩本隆宏 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の構造・機能とその病態 *血管* 24, 101-113, 2001.
- 6) Wakimoto K, Kobayashi K, Kuro-O M, Yao A, Iwamoto T, Yanaka N, Kita S, Nishida A, Azuma S, Toyoda Y, Omori K, Imahie H, Oka T, Kudoh S, Kohmoto O, Yazaki Y, Shigekawa M, Imai Y, Nabeshima Y, Komuro I: Targeted disruption of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger gene leads to cardiomyocyte apoptosis and defects in heartbeat. *J Biol Chem.* 275, 36991-36998, 2000.
- 7) Iwamoto T, Kita S, Uehara A and Shigekawa M: Inhibitory mechanism of a novel $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitor SEA0400. *Biophys J (Abst)* 84 (Suppl): 189a, 2003.
- 8) Iwamoto T, Kita S: Development and Application of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Exchange Inhibitors. *Mol. Cell Biochem.* (in press)

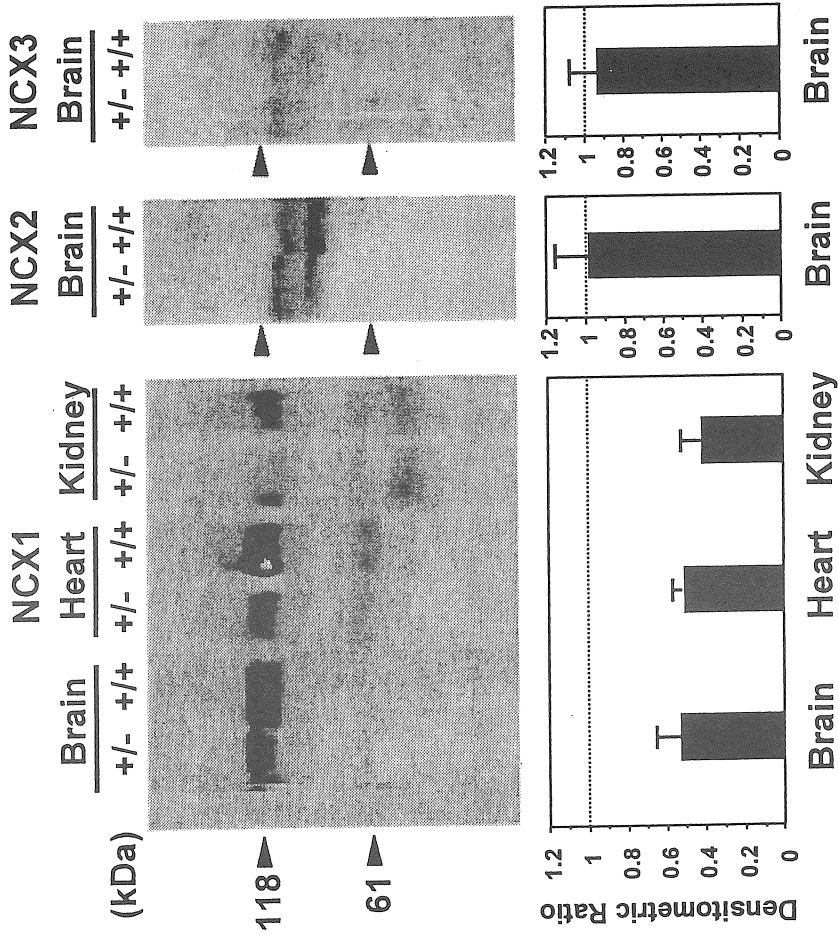


Fig. 1 Expression of NCX isoforms in brain, heart, and kidney of NCX^{+/+} and NCX^{+/-} mice. Lysates (100 µg/lane) prepared from these tissues were subjected to immunoblot analyses with polyclonal antibodies against NCX1, NCX2 and NCX3 proteins (upper panel). Densitometric estimates of the band from NCX^{+/-} mice are presented as ratio of the value for NCX^{+/+} mice (lower panel). Each column and bar represents means±S.E.

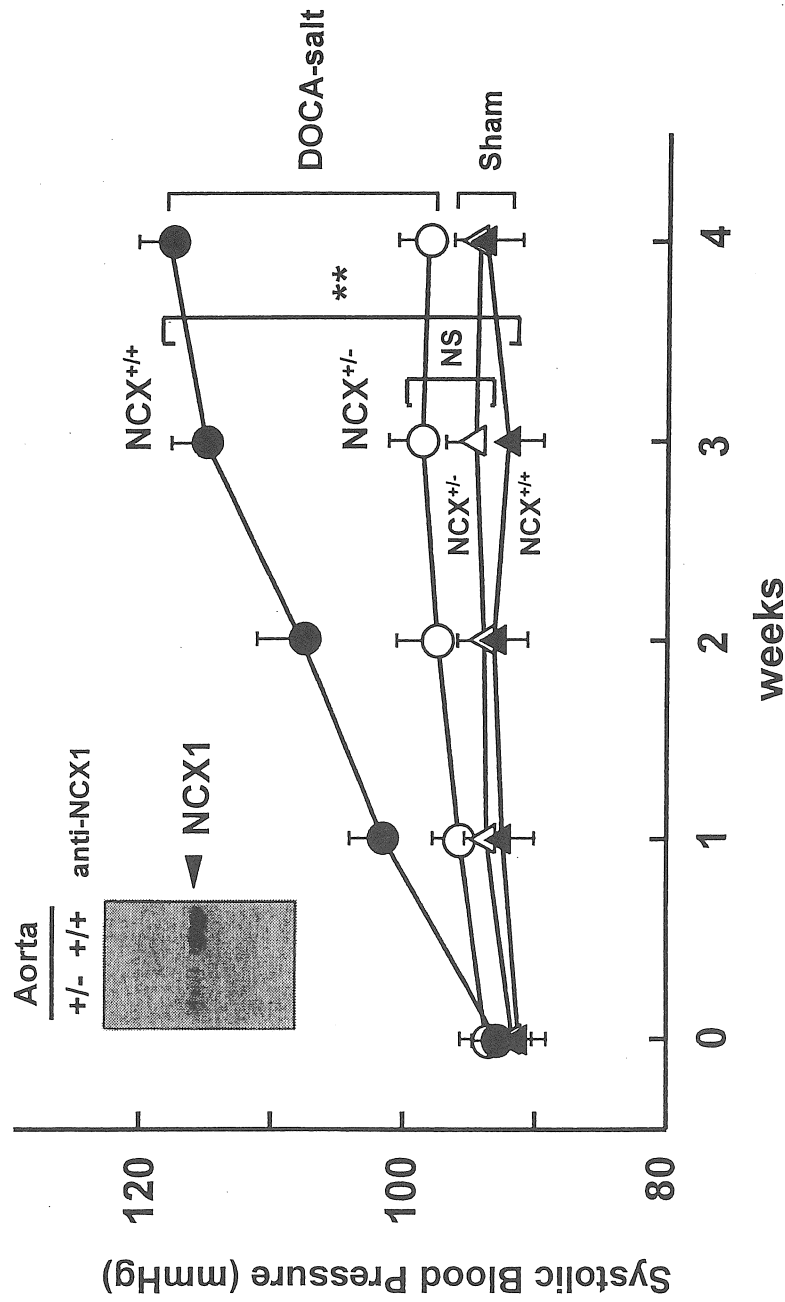


Fig. 2 Time course for systolic blood pressure in DOCA-salt treated mice (NCX^{+/+} ● and NCX^{+/-} ○) and uninephrectomized mice (sham, NCX^{+/+} ▲ and NCX^{+/-} △). Values are mean±S.E. (n=5-6) **P<0.01 vs uninephrectomized mice. Inset: Lysates (100 µg/lane) prepared from aorta were subjected to immunoblot analyses with anti-NCX1 polyclonal antibody (upper panel).

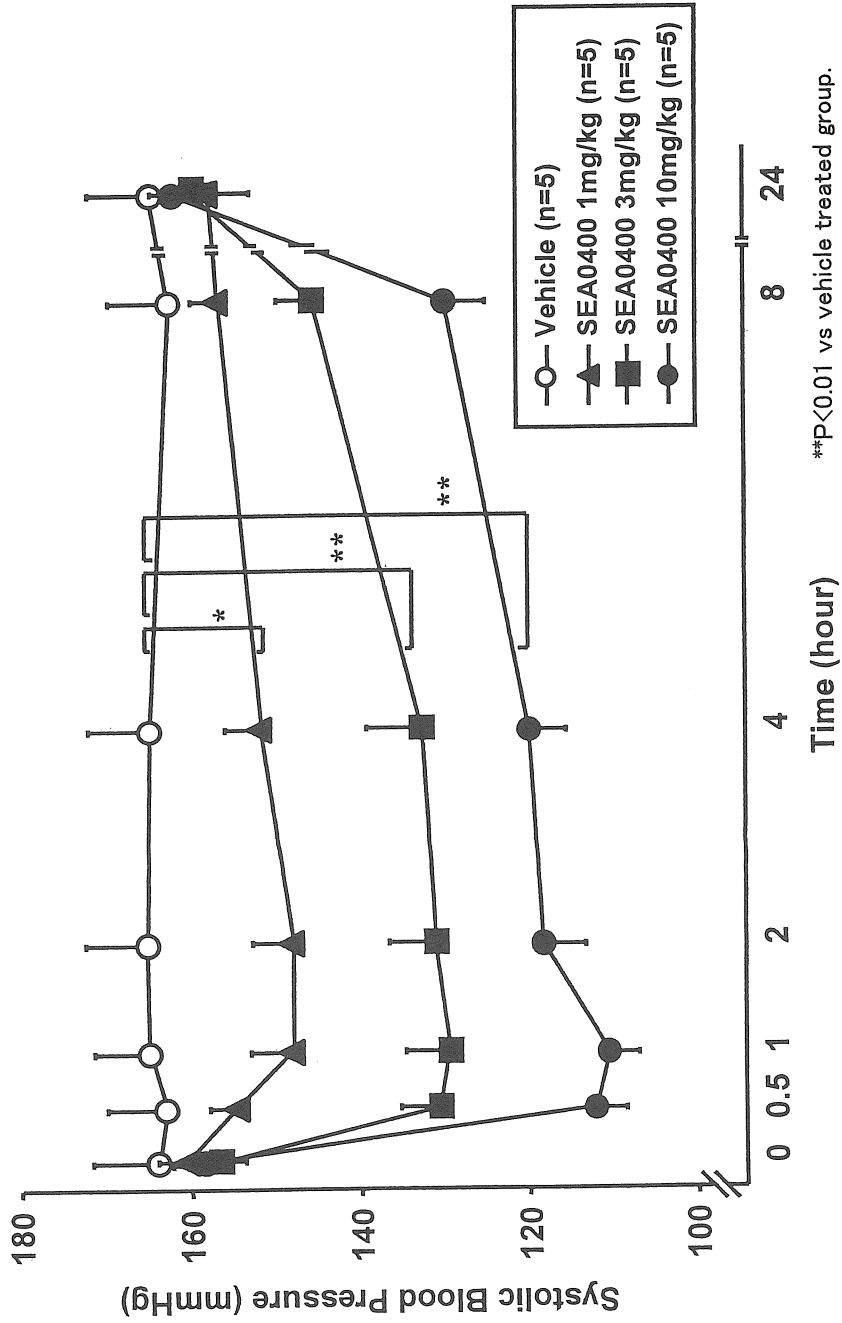


Fig. 3 The effect of SEA0400 on systolic blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats. SEA0400 was orally administered. Values are mean±S.E. (n=5-6) *P<0.05, **P<0.01 vs vehicle treatment.

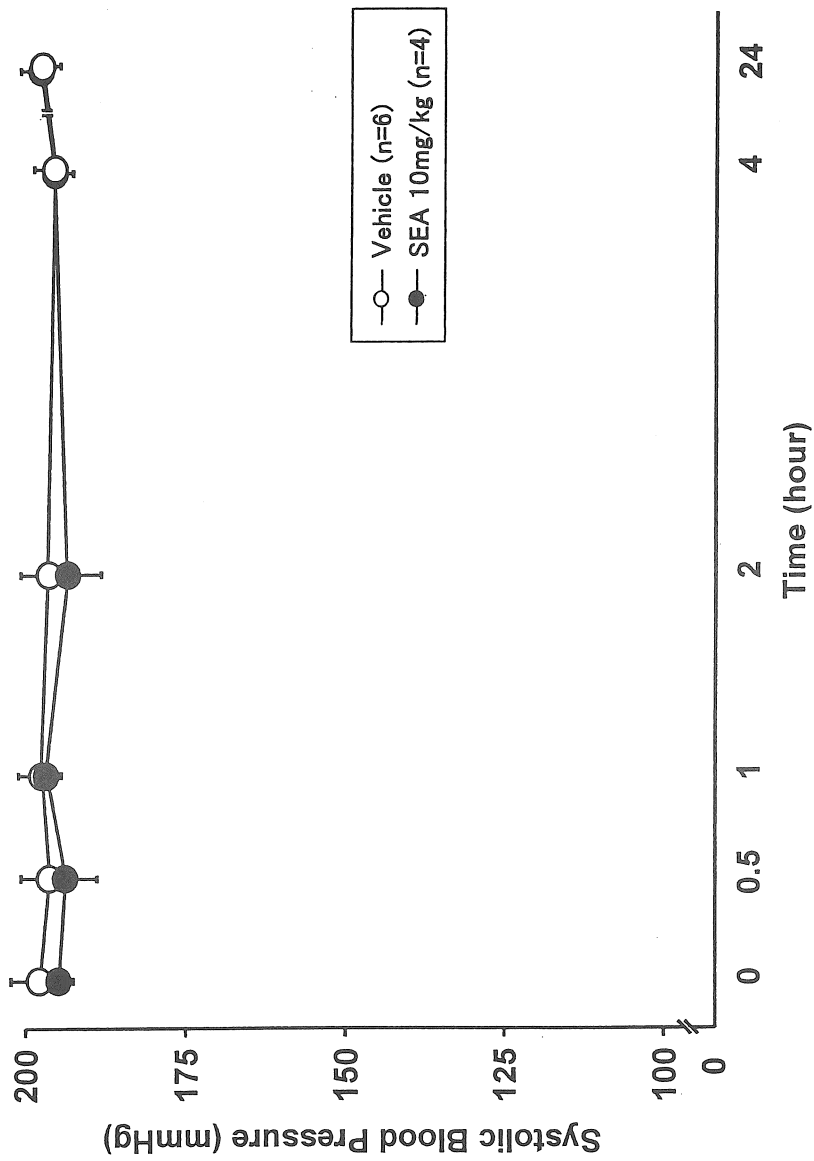


Fig. 4 The effect of SEA0400 on systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). SEA0400 was orally administered. Values are mean±S.E. (n=5-6)

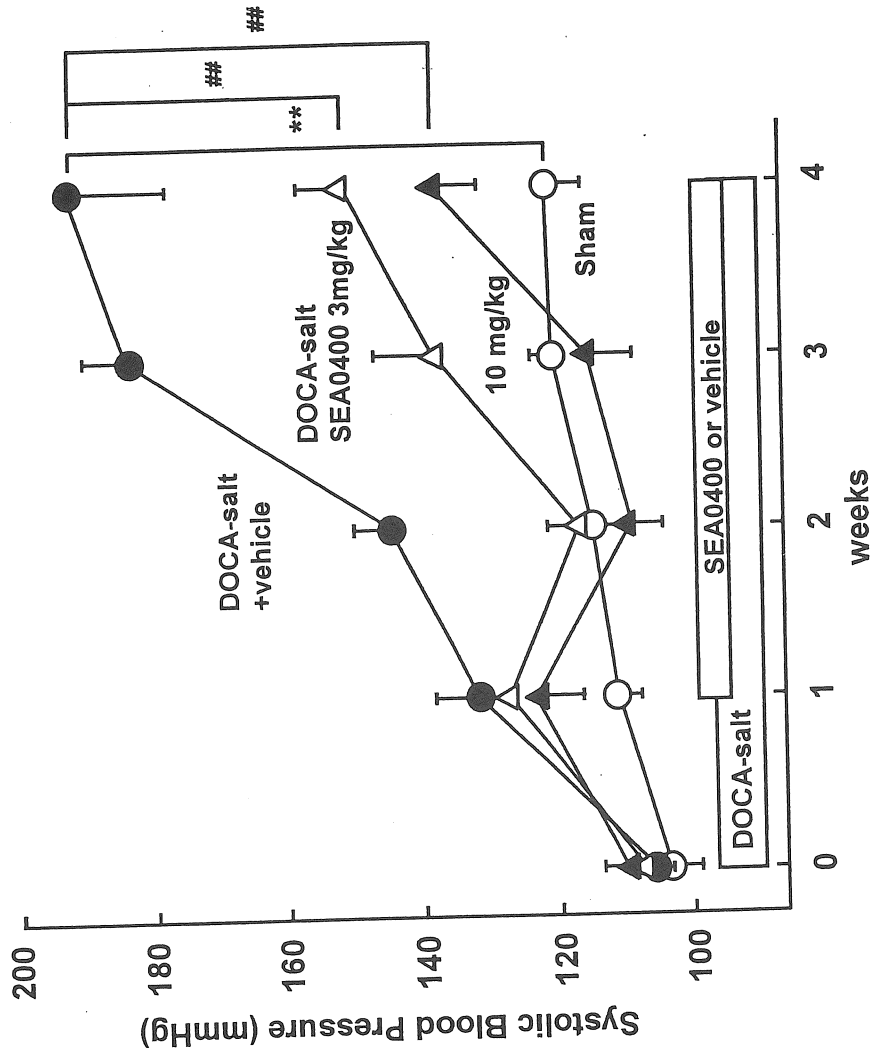
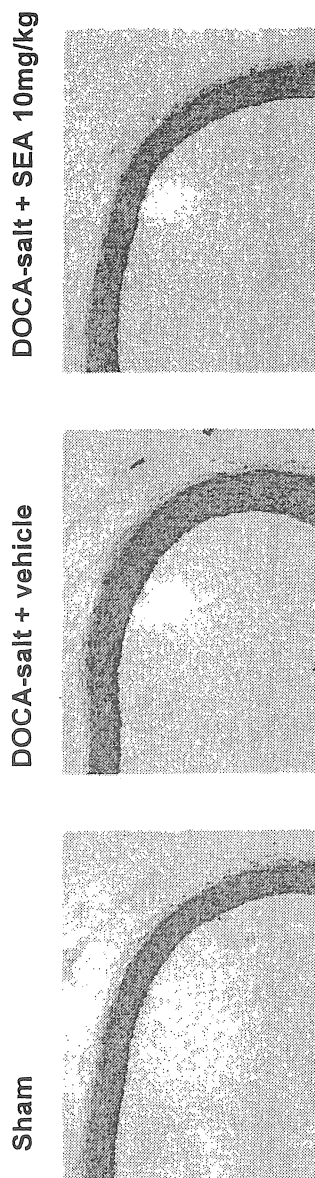


Fig. 5 Time course for systolic blood pressure in DOCA-salt treated rats and uninephrectomized rats (sham) treated with vehicle or SEA0400. Values are mean±S.E. (n=5-6) **P<0.01 vs sham, ##P<0.01 vs DOCA-salt + vehicle treatment.

Table 1. Morphological analysis of aortas in uninephrectomized and DOCA-salt hypertensive rats. Lower panel: representative light micrographs showing cross sections of aortas.

	n	wall thickness (mm)	wall area (mm ²)	wall to lumen ratio
Sham	6	0.104 ± 0.003	0.563 ± 0.028	0.110 ± 0.003
DOCA-salt +vehicle	6	0.136 ± 0.005	0.722 ± 0.035	0.147 ± 0.006
+SEA0400 3mg/kg	6	0.115 ± 0.006**	0.627 ± 0.028	0.122 ± 0.005**
+SEA0400 10mg/kg	5	0.118 ± 0.002*	0.610 ± 0.015*	0.119 ± 0.002**

*P<0.05, **P<0.01 vs DOCA-salt +vehicle



Role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger type 1 in the development and maintenance of salt-sensitive hypertension

Takahiro Iwamoto*, Satomi Kita*, Yasuo Matsumura**, Issei Komuro***

*Department of Pharmacology, School of Medicine, Fukuoka University,

**Department of Pharmacology, Osaka University of Pharmaceutical Sciences,

***Department of Cardiovascular Science and Medicine, Graduate School of Medicine, Chiba University

Summary

It is widely known that excessive dietary salt may cause hypertension. However, the mechanism and target genes of salt-sensitive hypertension are not yet clear. In this study, we aim at clarifying the role of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) type 1 in the development and maintenance of salt-sensitive hypertension by using genetically NCX-engineered mice and specific NCX inhibitors. We first evaluated the pathological role of NCX1 in deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt-induced hypertension by using heterozygous NCX1-knockout mice, which are useful as a low NCX1-expressing animal model. There was no significant difference in blood pressure between heterozygous and wild-type mice. After treatment with DOCA-salt for 4 weeks, wild-type mice showed the significant increases in the systolic blood pressure (change: 27±1 mmHg), but heterozygous did not. Moreover, we examined the effects of NCX inhibitors on several hypertensive animal models. Specific NCX inhibitor SEA0400 (1-10mg/kg, p.o.) reduced the blood pressure in DOCA-salt hypertensive rats and Dahl salt-sensitive rats, whereas it did not significantly affect the blood pressure in WKY, SHR, Dahl salt-insensitive rats, and 2K1C hypertensive rats. Furthermore, chronic treatment with SEA0400 markedly suppressed DOCA-salt-induced hypertension, secondary renal dysfunction, and vascular hypertrophy. When the low-dose SEA0400 (10 µg/kg/min) was infused into femoral artery of DOCA-salt hypertensive rats in order to evaluate the vasodilation effect of SEA0400, the blood flow markedly increased. In contrast, SEA0400 did not affect the femoral blood flow of normal rats (sham). These results suggest that NCX1 participates in the development and maintenance of salt-sensitive hypertension.