

発表番号 67 (0327)

食塩感受性高血圧における relaxin の関与の検討

助成研究者：池谷直樹（静岡大学保健管理センター）

共同研究者：高坂哲也（静岡大学農学部応用生物化学科）

鈴木 歩（静岡県立大学食品栄養科学部臨床栄養科学科）

熊谷裕通（静岡県立大学食品栄養科学部臨床栄養科学科）

【目的】

Relaxin(RLX)は妊娠時に増加し、排卵、分娩、授乳に関して作用する IGF ファミリーに属するホルモンである。RLX には近年、多様な生理作用が報告されており、特に血管拡張作用や抗線維化作用が注目されている。今回、食塩感受性高血圧においてその成因ならびに診断、治療法を考える上で、妊娠ホルモンの RLX 検討を行った。食塩感受性高血圧モデルにおいて、腎内 RLX の発現を食塩感受性モデルと食塩抵抗性モデルにおいて検討すると共に、RLX を投与して RLX の関与ならびに治療薬としての可能性を探った。

【方法】

Dahl salt-sensitive ラット(DS)、正常対照群である Dahl salt-resistant ラット(DR)、DS 群に RLX を投与した DS-RLX 群の 3 群として全群ともに塩分負荷食(8%)を投与した。経時的に体重測定,血圧,蓄尿を行い、8 週間後採血し腎臓を摘出した。尿中総タンパク量などの変化を検討し、さらに免疫組織化学的染色において腎内受容体の有無や腎内 RLX の発現を検討した。

【結果】

Dahl salt-sensitive ラットに 8%NaCl を負荷させると、Dahl salt-resistant ラットに比べて血圧が有意に上昇した($p<0.01$)。また Dahl salt-sensitive ラットにおいては腎内 RLX は salt-resistant rat に比べて有意に減少しており($p<0.05$)、Relaxin を持続投与させると血圧の低下や腎機能や腎組織の改善も見られた。

【考察】

上記から、Relaxin の欠乏が食塩感受性高血圧の発症に関与し、その投与により降圧作用と腎組織の改善を認めたことより RLX の高血圧治療薬としての可能性が示唆された。

1

助成番号 0327

食塩感受性高血圧における relaxin の関与の検討

助成研究者 池谷直樹 (静岡大学保健管理センター)

共同研究者 高坂哲也 (静岡大学農学部応用生物化学科)

鈴木歩、熊谷裕通 (静岡県立大学食品栄養科学部臨床栄養科学科)

研究目的

慢性腎不全の治療において、その原因や増悪因子となる高血圧は重要な管理目標である。慢性腎不全に合併する高血圧は食塩感受性といわれるが、そのコントロールは食事療法に加えて薬剤投与をしても難しいのが現状で、新たな治療法が期待される場所である。

平均血圧の値は心拍出流量と血管抵抗で規定され、高血圧の発症には拍出量の増大もしくは血管抵抗の増加のどちらかかまたは両方が関与する。一方、ヒトの妊娠の状態では心拍出量は非妊娠時に比べて50%程度の増加を認める[1]が、殆どの場合に血圧の上昇は認めずにむしろ軽度の低下が観察される。そのために妊娠時には抵抗血管は非妊娠時より過度に拡張した状態と考えられる。拡張させる原因としてはNOの産生増加等が指摘されているが[2,3]、Novakらは妊娠ホルモンとして知られるRelaxin(RLX)が妊娠時の腎血管拡張に作用していることを報告した[4]。RLXには近年、多様な生理作用が報告されており、特に血管拡張作用や抗線維化作用が注目されている[5]。食塩感受性高血圧は容量依存性高血圧で、塩分負荷による循環血液量の増加がその発症の一因であるが、これまで成因に関して妊娠ホルモンの関与を検討した研究は無かった。食塩感受性高血圧においてその成因ならびに診断、治療法を考える上で、RLXの関与の可能性やその応用を考えて今回の研究を行った。まず、腎内RLXの発現を食塩感受性モデルと食塩抵抗性モデルにおいて検討すると共に、RLXを投与してRLXの関与ならびに治療薬としての可能性を探った。

研究方法

1. 実験デザイン

実験には、5週令のDahl salt-sensitive(DS)、Dahl salt-resistant(DR)ラット(Japan SLC, Hamamatsu, Japan)を用いて行った。実験群はDS群とDS群にRLXを投与したDS-RLX群の2群に、正常対照としてDR群を加えた3群として全群に塩分負荷食(8%)を投与し、水は自由に与えた。8%食塩食開始後2週間の時点でDSラットをランダムにDS群とDS-RLX群に分け、DS-RLX群にはosmotic minipump(model 2002; Alzet, Cupertino, CA)を皮下に埋め込んだ。このminipumpに0.6%食塩水で希釈したRLXを0.5mg/kg/dayの濃度で持続投与するように注入し、4、6週間の時点でminipumpを続けて埋め込み8週間の経過を見た。すべてのラットにおいて毎週体重を測定した。収縮期血圧は2週間ごとに非観血圧

測定装置(BP-98; Softron, Tokyo, Japan)を用いて尻尾で測定を行った。また、2週間ごとに代謝ケージに入れ24時間尿を採取した。得られた尿は、尿中総蛋白質排泄量、尿中クレアチニン排泄量の測定を行った。8週間後、すべてのラットを開腹し、腹部大動脈から採血を行った。その後すみやかにPBSにより両腎臓を5分間灌流後に腎臓の摘出を行った。左腎臓はパラフィン切片による組織学的検討や酵素抗体法染色を行うために、メチルカルノア液、または4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した。

2. 生化学的検討

クレアチニンはJaffe反応を用いた。尿中総蛋白質量の測定は、ピロガロールレッド法による総蛋白質測定用キット(マイクロTP-テスト; Wako, Osaka, Japan)を用いて行った。

3. 組織学的検討

3.1 組織染色

組織学的検討をするために、メチルカルノア溶液で固定した組織をパラフィン包埋し、3 μm に薄切し、PAS(periodic acid Schiff)染色とマッソン・トリクローム(MT)染色法を行った。尿細管間質病変は、MT染色において、1検体当たり顕微鏡400倍で15視野を無作為に選び、写真を撮ってpoint counting法により評価をして次式により tubulointerstitial injury index (TII)を算出した[6]。

$$\text{TII} = \text{points on interstitium} / (\text{points on interstitium} + \text{points on tubular epithelial cells})$$

3.2 免疫組織学的検討

メチルカルノア溶液で固定した組織でRLXの染色を行い、パラホルムアルデヒドで固定した組織においてRLX受容体のLGR7、LGR8の染色を行った。使用した抗体は、一次抗体として抗RLX抗体(Kohsaka T, et al. [7])、抗LGR7、抗LGR8抗体(Phoenix, Belmont, CA)を、二次抗体としてはbiotin-conjugated mouse IgGまたはbiotin-conjugated rabbit IgG (Chemicon, CA)で、それぞれ適宜希釈して使用した。前処理としてLGR8はプロテアーゼ処理を用いた(その他の抗体は省略した)。免疫組織学的染色はABC法によった。

RLX陽性尿細管数は、顕微鏡20視野(400倍、1視野=0.16mm²)中の陽性尿細管数をカウントした。RLXの受容体であるLGR7、LGR8は、定性的に局在を観察した。

4. 統計処理

各項目の分析結果は、mean \pm SDで表した。2群間の比較はnonparametric statisticsにより行った。またグループ間での比較は、BonferroniテストによるANOVAにより行った。P<0.05を統計的に有意差があるとみなした。全ての統計計算は、GB-STAT software (Dynamic Microsystems, Silver Spring, MD)を用いて行った。

研究結果

1. 体重、血圧等の変化

表1に3群のデータを示した。DR群が体重は8週間で有意に高値を示した。またDS群とDS-RLX群との間に有意な差は見られなかった。体重に対する腎臓の重量比はDR群が

他の群に比して有意に低値を示した。図1に実験期間中における収縮期血圧値の経時的変化を示した。DRラットは殆ど変化を認めなかったが、DSラットは8%食塩食開始後より進行性に血圧上昇を認めた。実験開始4週間目から、RLXの投与によってDS-RLX群のSBPはDS群と比較して有意に低値を示した。また、DS-RLX群は、DR群に近いレベルまで血圧値の低下が見られた。

2. 生化学的検討

生化学的検査の結果は表1に示した。DR群の尿中クレアチニンは他の群と比較して有意に高値を示した。DS群とDS-RLX群ではほぼ同程度の値を示した。血清クレアチニン値は、DS-RLX群がDS群と比較して有意に低下し、DR群に相当する低下が見られた。クレアチンクリアランスはDS群がDR群より、有意に低値を示した。一方、DS群とDS-RLX群との間に有意な差はなかった。実験開始2週間目からRLXの持続投与を行ったDS-RLX群の尿中総蛋白排泄量はDS群に比して上昇は軽度で、8週間目で有意に低値を示した。また、DS-RLX群とDR群との間に有意な差は見られなかった。

3. 組織学的検討

3.1 組織染色

図2に各群のMT染色標本像を示す。DS群においてはDR群に比べて明らかに糸球体像は肥大化を示したが、硬化像は少なかった。DS-RLX群はDS群に比して糸球体の肥大は抑制されていた。血管系の変化はDS群では弓状動脈や小葉間動脈、輸入細動脈において著明な中膜と内膜の肥厚を認め、殆ど閉塞している血管も多数認められた。これに対し、DR群ではこれらの血管系には変化を認めなかった。DS-RLX群ではDS群に見られた著明な肥厚は認めなかった。尿細管間質はDS群で著明な線維化と尿細管内円柱と拡大した尿細管を高頻度に認めたが、DR群では変化は殆ど認めなかった。DS-RLX群では尿細管間質の変化は抑制されていた。TIIはDS群(0.491 ± 0.100)は他の2群に比して有意に増加が見られ、DR群(0.314 ± 0.030)はDS-RLX群(0.382 ± 0.060)にくらべると有意に尿細管間質の障害度は減少していた。

3.2 免疫組織学的染色

図3にRLX染色結果を示した。RLX染色は遠位尿細管の細胞質の核近傍に陽性所見を認め、陽性尿細管数はDS群(20.9 ± 7.2)に比べてDR群(38.4 ± 12.1)が有意に高く、DS-RLX群(32.6 ± 10.0)はDS群に比べて増加していた。RLX受容体のLGR7とLGR8は共に糸球体内では上皮細胞と尿細管上皮細胞の管腔側に陽性所見を認めた。図4にLGR7の染色を示す。各群間での差は明らかでなかった。

考察

今回の研究で食塩感受性高血圧モデルにおけるRLXの関与を検討した結果、次の3つの新たな事実を認めた。第一にはRLXの腎内発現を遠位尿細管に認めた。第二にDS ratとDR ratに食塩負荷をしたところ、腎臓内RLXの発現はDS ratではDR ratに比べて有意に

減少を認めていた。第三に DS ラットに食塩負荷をした上で RLX を投与することにより非投与群に比べて血圧の降下作用と腎機能と腎組織病変の改善を認めた。上記の結果は RLX が食塩感受性高血圧の発症に関与していることを初めて明確に示したものである。

RLX の腎内発現分布に関してこれまで検討はされていなかったが、今回、RLX の遠位尿細管における発現を認めた。次に食塩負荷をした上での DS rat では DR rat に比べて RLX の発現の減少を認めるという結果を得た。この点は妊娠時において食塩感受性高血圧の発症に妊娠ホルモン RLX の低下が関与しているのではないかという今回の研究の仮説に一致した結果である。

8%の高食塩食により、DS ラットはこれまで報告されているように、血圧の上昇を認めた。食塩感受性ラットにおける RLX による血圧降下作用は結果に示したように、投与直後から有意な減少を認め、投与8週間まで減少が持続した。食塩感受性高血圧における高血圧発症のメカニズムとして、これまで NO 産生の障害、または NO 利用の、TGF- β の産生亢進、renin-angiotensin 系の腎内活性の変化が挙げられる。Castrop らは DS rat では腎内の nNOS mRNA の発現が DS rat に比べて低下しているが eNOS mRNA の変化は認めなかったことより、nNOS 発現の低下が腎内 NO 産生低下につながり、高血圧となるであろうと報告している[7]。また、Ichihara らは、nNOS の発現が輸入細動脈の収縮、拡張を調節していることを報告している[8]。

腎組織の検討では DS rat では著明な血管壁肥厚と尿細管間質の線維化を認め、RLX 投与により有意にその改善を認めた。RLX による改善の理由としてはまず血圧の降下による腎への有利な作用が考えられる。しかし RLX 受容体を腎内に認めていることから直接的な効果も否定できない。この点は RLX 投与量を変更して、血圧に影響を与えない量などを検討して明らかにする必要がある。

以上の結果から、食塩感受性高血圧ラットにおいて RLX の減少が認められ、RLX を持続投与させると血圧が降下し、さらに腎機能や腎組織を保護したことが明らかとなった。高血圧における RLX の関与についての検討は、食塩感受性高血圧に対する今後の新たな診断法や治療法につながるものと期待される。

今後の課題

今回の実験において、Dahl 食塩感受性モデルでの RLX 投与の有効性が示されたが、より直接的に RLX の関与を明らかにするためには、今後以下の実験が有効と考えている。DS rat において内因性 RLX の増加が認められていたことより、DR rat に RLX 中和抗体を投与して作用を阻害して抵抗性から感受性に変化して血圧上昇を認めるか否かを明らかにするものである。また、妊娠時に短期間に RLX 中和抗体を投与することにより、糸球体濾過量や腎血流量増加を抑制した実験は行われているが、持続的に RLX の作用を阻害して全身血圧の変化を検討していくという実験も意味があると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御支援を頂きましたソルト・サイエンス研究財団に深甚の謝意を表します。

文献

1. Bader, R.A., Bader, M.E., Rose, D.J., and Braunwald, E. Hemodynamics at rest and during exercise in normal pregnancy as studied by cardiac catheterization. *J. Clin Invest.* 34:1524-1536, 1955
2. Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, Chavez JE, Mosher MD. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J.* 7:566-71, 1993
3. Conrad, KP, Gandley RE, Ogawa T, Nakanishi S, and Danielson LA. Endothelin mediates renal vasodilation and hyperfiltration during pregnancy in chronically instrumented conscious rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 276: F767-F776, 1999
4. Novak J, Danielson LA, Kerchner LJ, Sherwood OD, Ramirez RJ, Moalli PA, Conrad KP. Relaxin is essential for renal vasodilation during pregnancy in conscious rats. *J Clin Invest.* 2001 Jun;107(11):1469-75, 2001
5. Sherwood OD. *Endocr Rev.* 25:205-34. Relaxin's physiological roles and other diverse actions, 2004
6. Kumagai H, Katoh S, Hirosawa K, Kimura M, Hishida A, Ikegaya N. Renal tubulointerstitial injury in weanling rats with hyperhomocysteinemia. *Kidney Int.* 62(4):1219-28, 2002
7. Kohsaka T, Hamano K, Sasada H, Watanabe S, Ogine T, Suzuki E, Nishida S, Takahara H, Sato E. Seminal immunoreactive relaxin in domestic animals and its relationship to sperm motility as a possible index for predicting the fertilizing ability of sires. *Int J Androl.* 26:115-20, 2003
8. Castrop H, Kurtz A. Differential nNOS gene expression in salt-sensitive and salt-resistant Dahl rats. *J Hypertens.* 19: 1223-31, 2001
9. Ichihara A, Inscho EW, Imig JD, Navar LG. Neuronal nitric oxide synthase modulates rat renal microvascular function. *Am J Physiol.* 274(3 Pt 2): F516-24, 1998

Table 1 Basic parameters in rats at 8 weeks.

Groups	DS	DS+RLX	DR
n	6	6	3
Body weight(g)	348.3±19.8	359.8±25.1	400.2±10.7 ^d
Kidney weight(g)	1.936±0.200	1.939±0.258	1.552±0.088
Systolic blood pressure(mmHg)	227.0±18.9 ^a	166.7±18.5	126.0±2.7
Diet intake(g)	22.8±4.9	24.7±6.1	28.2±1.8
Water intake(ml/day)	76.0±15.3	63.2±18.6	90.7±16.0
Urinary volume output(ml/day)	59.5±10.0	48.8±15.2	74.7±13.3 ^e
Urine creatinine(mg/day)	17.88±1.19	16.92±1.46	21.879±1.09 ^a
Serum creatinine(mg/dl)	1.14±0.21	0.90±0.18 ^d	1.10±0.08
Urinary protein(mg/day)	228.0±162.7	87.5±54.2 ^d	65.85±26.1 ^d
Creatinine clearance(l/day)	0.95±0.21 ^c	1.043±0.49	1.44±0.30

a; p<0.01 vs. other groups, b; p<0.01 vs. DS rats, c; p<0.02 vs. Group 3, d; p<0.05 vs. Group 1, e; p<0.05 vs. Group 2.

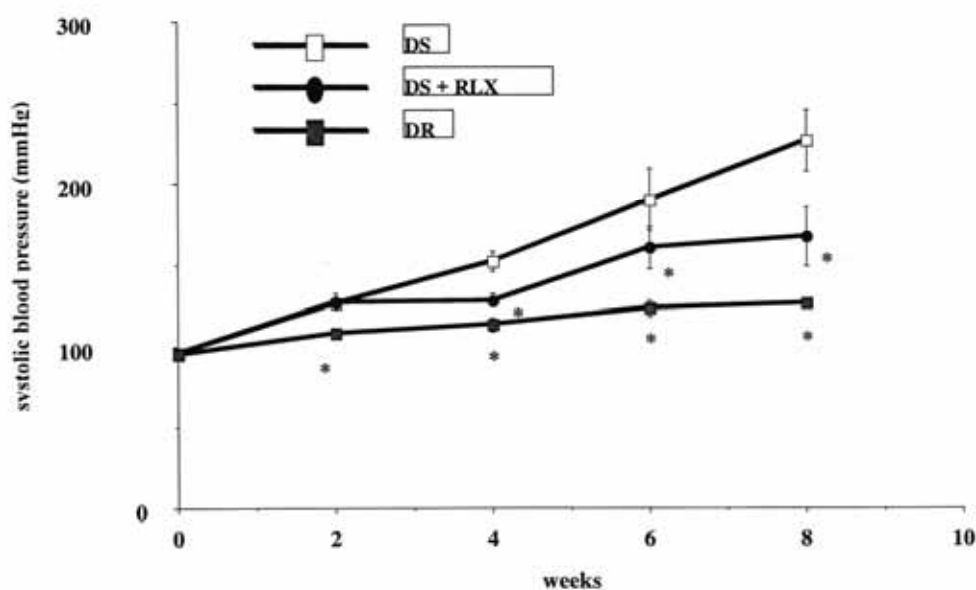


Fig. 1. Systolic blood pressure in Dahl salt-sensitive (DS), Dahl salt-resistant (DR) rats and DS rats receiving RLX. All rats were placed on 8% NaCl for 8 weeks. RLX was administered in the osmotic minipump at a dose of 5 mg/day. Systolic blood pressure did not increase in DR rats. DS rats showed a progressive increase in blood pressure. Rats receiving RLX also developed a progressive increase in blood pressure, although this increase was not as large in DS rats. * vs.DS p < 0.05.

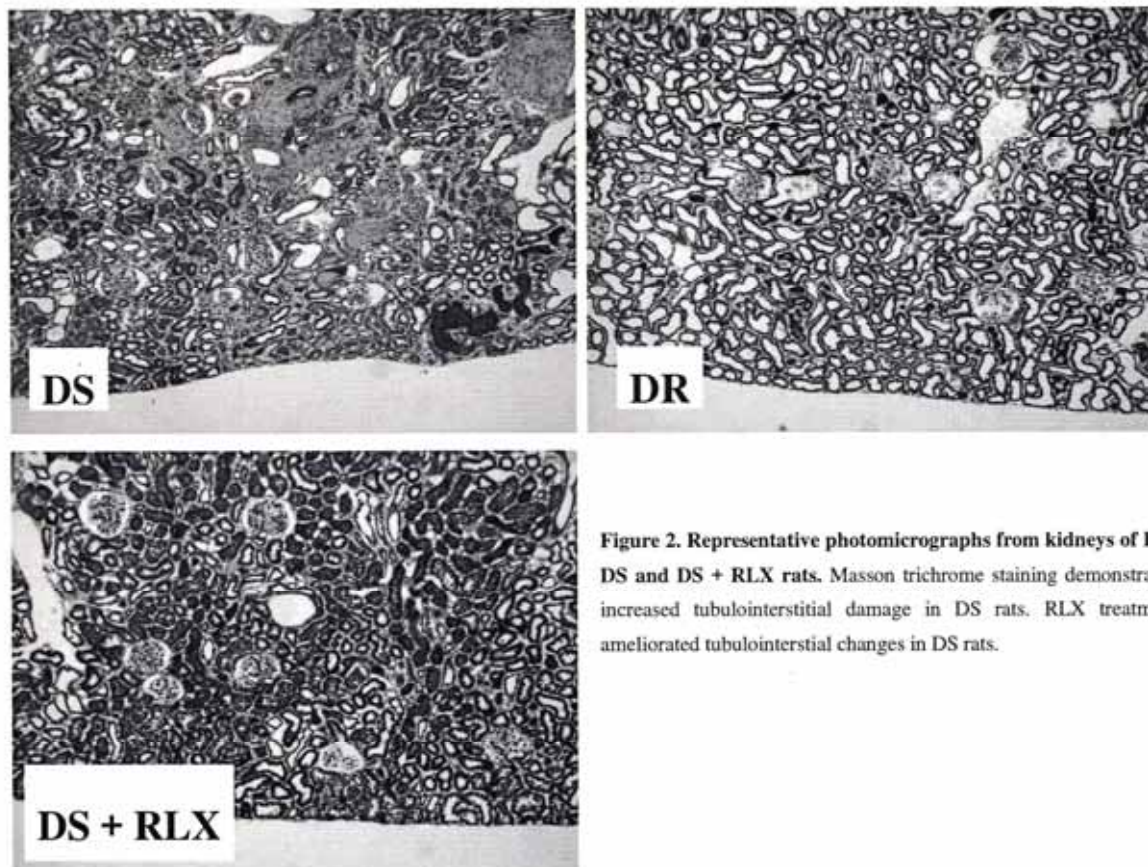


Figure 2. Representative photomicrographs from kidneys of DR, DS and DS + RLX rats. Masson trichrome staining demonstrated increased tubulointerstitial damage in DS rats. RLX treatment ameliorated tubulointerstitial changes in DS rats.

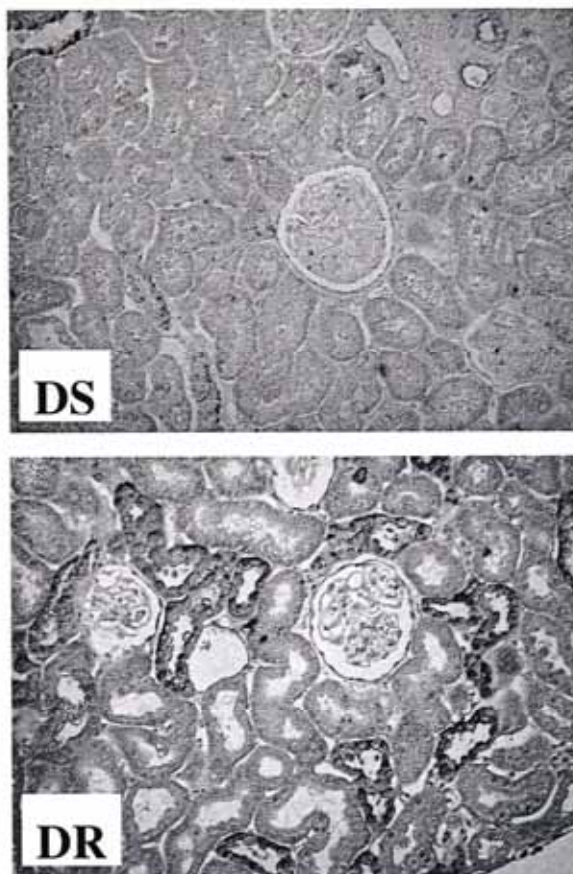


Fig. 3. Representative photomicrographs of RLX expression in DS and DR rats. DS rats show decreased expression of RLX compared to that of DR rats.

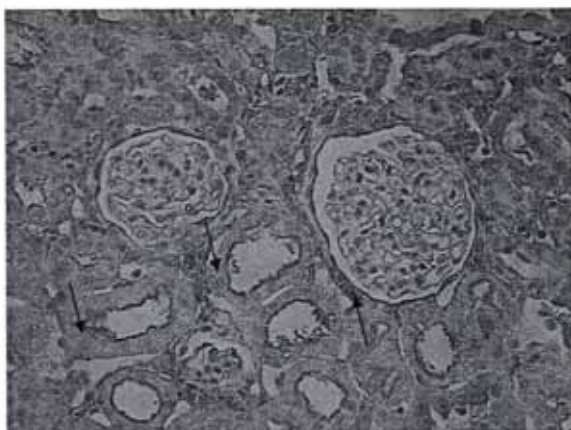


Fig. 4. Expression of RLX receptors. LGR 7 expression was observed in the luminal side of tubules and glomerular epithelial cells. Arrows show positive immunostaining for LGR 7.

INVOLVEMENT OF RELAXIN IN SALT-SENSITIVE HYPERTENSION

Naoki Ikegaya, Tetsuya Kohsaka, Ayumi Suzuki, Hiromichi Kumagai,

Med. Care Center, Dept. of Applied Biological Sciences, Shizuoka Univ., Dept. of Clin. Nutrition, Sch. of Nutritional Science, Univ. of Shizuoka, Shizuoka, Japan.

Summary

Relaxin (RLX), belonging to the insulin family, has been known as a hormone of pregnancy. Although potent antifibrotic and vasodilatory properties of RLX are recently reported, the involvement in salt-sensitive hypertension has not been elucidated. In this study, we examined the expression of RLX in kidneys of Dahl salt-sensitive (DS) and salt-resistant (DR) rats and effects of RLX treatment in DS rats placed on an 8% NaCl diet. When examined immunohistochemically, RLX was localized in the distal tubules. DS rats showed a significantly decreased expression of RLX compared to DR rats. The administration of RLX (4 microg/h) to DS rats significantly reduced systolic blood pressure (227.0 vs. 166.7 mmHg, $p<0.004$) and urinary protein (228.0 vs. 87.5 mg/day, $p<0.05$). Histologic studies revealed the amelioration of tubulointerstitial fibrosis and arterial thickening in rats received RLX.

These results indicate that RLX deficiency may play a significant role in the development of salt-sensitive hypertension and suggest that RLX can be a potential therapeutic tool for salt-sensitive hypertension.