

---

---

# 助成研究報告書

---

---

医学プロジェクト研究

(2004－2006年度)

心・血管系における食塩感受性を規定する因子の解明

Project Research on Factors That Contribute to the Salt Sensitivity  
in the Cardio-Vascular System

The Salt Science Research Foundation  
Project Research Report

平成20年3月



財団法人ソルト・サイエンス研究財団

# プロジェクト研究報告書 目次

## 医学分野

### 04C-06C 心・血管系における食塩感受性を規定する因子の解明

1	はじめに 菱田 明 (浜松医科大学) .....	1
2	食塩感受性規定因子としての腎・糸球体フィードバックの役割 (04C2-06C2) 西山 成 (香川大学) .....	3
3	食塩感受性高血圧の中樞性昇圧機序における酸化ストレスの役割 (04C3-06C3) 藤田 敏郎 (東京大学) .....	13
4	食塩感受性における relaxin の関与の検討 (04C4-06C4) 池谷 直樹 (静岡大学) .....	23
5	食塩感受性を規定する遺伝的素因の解明 (04C5-06C5) 岩井 直温 (国立循環器病センター) .....	33
6	食塩感受性高血圧の遺伝子指標としての G 蛋白質共役型受容体キナーゼ 4 (GRK4) 遺伝子多型の意義 (04C6-06C6) 眞田 寛啓 (福島県立医科大学) .....	41
7	疾患モデル動物を用いた食塩負荷に伴う心肥大・心不全発症関連遺伝子の同定 (04C7-06C7) 間野 博行 (自治医科大学) .....	51
8	まとめ 菱田 明 (浜松医科大学) .....	61



## 1. はじめに

プロジェクト研究リーダー 菱田 明 (浜松医科大学)

ソルト・サイエンス研究財団は、平成16～18年度の医学分野プロジェクト研究課題として「心・血管系における食塩感受性を規定する因子の解明」を取り上げた。

食塩は生体に必須のミネラルであるが、海中とは違って、陸上ではその入手が必ずしも容易でない状況がある。そのため、海で誕生した生命が陸地に上がった時から、食塩を体内に保持する(食塩を節約する)システムが我々の体内に発達してきた。

しかし、最近では、高血圧・肥満・糖尿病などの生活習慣病に神経を使うことになり、食塩摂取の弊害が喧伝されるようになってきた。確かに、少ない食塩摂取で生きていけるように食塩の保持能力を高めた人類にとって、美味を追求するグルメブームの中で多くの食塩を摂取することはその貯留による弊害を招きかねない。その一つが高血圧であるが、食塩の過剰摂取が高血圧を介さずに心・腎・脳などの臓器障害の原因になるとの報告もある。

過剰となる食塩摂取レベルに関しては、年齢、性別、体格、腎機能、その他によって異なると考えられている。最も有名なものが食塩感受性高血圧と食塩非感受性高血圧という概念である。この概念に基づき、極端な食塩過剰や食塩欠乏は血圧に影響することは当然としても、通常の摂取範囲内に関する限り、食塩感受性高血圧の人

は食塩摂取に神経質になる必要があるが、非感受性高血圧の人は食塩摂取量にそれほど神経を使う必要がない、と考えられている。

一方、高齢化社会の到来のなかで、食塩欠乏の課題も明らかになってきた。加齢に伴う腎機能の変化は食塩保持能の低下を招くうえ、高血圧治療としての利尿薬や食塩保持に中心的な役割を果たすレニン・アルドステロン系の阻害薬を降圧薬として服用していることが多く、尿中への食塩喪失に対する防御機構は十分ではない。また、高齢者は発熱などわずかなストレスで食事摂取量の減少を招きやすい。また、高齢者は、健康に対する意識が強く、また、律儀に厳格な食塩制限を守る傾向にある。こうしたことから、風邪その他の軽いストレスで脱水に傾き、脱水が更なる食塩摂取の減少にいたる、という悪循環を招いているケースが少なくなく、食塩摂取量に対する正確な認識を持つ必要がある。

食塩感受性集団における食塩誘発高血圧の健康に及ぼす被害を考えると、食塩感受性高血圧に傾く集団と、日常摂取レベル内での食塩摂取の増加が高血圧や臓器障害に結びつかない集団を区別する簡単な指標が発見され、個人個人にあった適正な食塩摂取ができる時代の到来を引き寄せることが緊急の課題と考えられ、本プロジェクトが企画された。



## 2. 食塩感受性規定因子としての腎・糸球体フィードバックの役割

西山 成<sup>1</sup>, 安部 陽一<sup>1</sup>, 岩尾 洋<sup>2</sup>, 玉置 俊晃<sup>3</sup>, 小堀 浩幸<sup>4</sup>, 山本 徳則<sup>5</sup>, 片岡 則之<sup>6</sup>

<sup>1</sup> 香川大学医学部薬理学, <sup>2</sup> 大阪市立大学大学院研究科分子病態薬理学,

<sup>3</sup> 徳島大学医学部病態情報医学講座情報伝達薬理,

<sup>4</sup> チュレーン大学ヘルスサイエンスセンター腎臓高血圧 COE,

<sup>5</sup> 名古屋大学医学部泌尿器科, <sup>6</sup> 川崎医療短期大学臨床工学科

**概要** 本プロジェクト研究では、食塩感受性高血圧を規定する因子としての糸球体尿細管フィードバック (Tubuloglomerular feedback: TGF) 機構異常の役割を明らかにすることを目的としている。我々は TGF 機構がマクラデンサ細胞から遊離される細胞外 ATP によって制御されていることを明らかにしていることから、特に腎間質 ATP の役割に注目して実験を行なった。実験は Dahl 食塩感受性 (DS) ラットと、その対照として Dahl 食塩抵抗性 (DR) ラットに、high salt diet (H: 8%) もしくは low salt diet (L: 0.3%) 添加飼料を 4 週間給飼して行った。TGF 機構の評価は、in vivo dynamic analysis 法により糸球体血行動態を直接測定して行われた。腎臓間質中 ATP 濃度は腎微小透析法にて測定した。DS ラットでは高血圧の進展に先立って TGF 活性が亢進しており、輸入細動脈が異常に収縮していることが明らかとなった。また、DS/H ラットの腎間質 ATP 濃度は、DS/L ラット、DR/L ラット、DR/H ラットと比較して非常に高いレベルであった。アセタゾラミドの急性投与によって TGF 活性を亢進させると、DS/L ラットの腎間質 ATP 濃度は有意に増加した。これに対して DS/H ラットにアセタゾラミドを投与しても腎間質 ATP 濃度に変化は認められなかった。DS/L ラットに非選択的 P2 受容体拮抗薬である suramin (20 mg/kg/day, i.p.) を投与しても血圧に影響は認められなかったが、DS/H ラットの高血圧の進展は著明に抑制された。一方、このような suramin の降圧作用は本態性高血圧ラットでは観察されなかった。Suramin を投与した DS/H ラットの輸入細動脈径は DS/L ラットや DS/H ラットの対象値よりも有意に拡張していたが、アセタゾラミドによって輸入細動脈径に変化は認められなかった。さらに、suramin は DS/H ラットの腎間質 ATP 濃度に影響を与えなかった。これらの研究結果より、腎間質内 ATP の P2 受容体活性化による TGF 機構の亢進が糸球体濾過量の減少を引き起こし、それによって生じる食塩・体液の貯留が食塩感受性高血圧の発症・進展に密接に関連しているのではないかと考えられた。

### 1. 研究の背景と目的

腎臓の糸球体における濾過は、食塩を体内より尿中へ排泄する過程において最も影響力の大きい調節機構である<sup>1)</sup>。したがって、ひとたびこの恒常性が破綻すると、体液循環調節の異常を生じて食塩感受性高血圧症の発症・進展に直結すると考えられている<sup>1-3)</sup>。糸球体濾過は、腎輸入細動脈抵抗の変化による糸球体内圧の変化とメサンギウム細胞収縮による濾過係数の変化により制御されているが、近年、尿細管糸球体フィードバック (Tubuloglomerular feedback: TGF) 機構がこれらの制御に中心的な役割を果たしていることが明らかとなってきた<sup>1,4)</sup>。そこで、本プロジェクトでは、食塩感受性高血圧を規定する因子としての TGF 機構異常の役割を明らかにすることを目的とした。TGF 機構の異常と高血圧発症・進展との関連は、これま

でにその可能性については幾度か論じられてきたものの<sup>2,3)</sup>、TGF 機構の評価自体が非常に困難であるため、いまだ実証されていない。

TGF 機構はマクラデンサ細胞が尿細管腔内の Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup> 濃度の変化を感知することにより、選択的に腎輸入細動脈の血管抵抗値およびメサンギウム細胞の収縮を調節して、腎血流量・糸球体濾過量を糸球体レベルで制御している腎固有の自己調節機構である<sup>2,4,5)</sup>。最近の我々の研究により、TGF 機構の反応はマクラデンサ細胞より腎臓間質に ATP が分泌され、それが腎輸入細動脈に存在する P2 受容体に結合して調節されていることが明らかとなってきた。一方、本プロジェクト研究に先立って我々は、特殊ペンシル型のレンズを装着した高感度 CCD カメラを駆使して腎微小循環の観察を直接可能とするシステムを確立

し、TGF 反応の評価を可能とした<sup>6)</sup>。この新しい手法を用い、食塩感受性高血圧ラットで生じる高血圧の進展過程における TGF 機構異常の関与を、腎間質 ATP の役割に注目して実験を行なった。

## 2. 研究方法

### 2.1 腎微小循環観察システム

本研究で使用した腎微小循環観察システムは、川崎医科大学泌尿器科学・医用工学教室にて開発されたものを応用した<sup>6)</sup>。特殊ペンシル型レンズ(日本光電, PL-240S)に高感度 CCD カメラ (SONY, XC-E150) を装着し、得られた画像はカメラコントローラ (日本光電, CB-240S) を通じてイメージエンハンサー (浜松フォトニクス, C6086) で画像処理した。次いで画像はアップスキャンコンバーターユニット (マイコンソフト, XVGA-1pro) およびビデオスキャンコンバーターユニット (マイコンソフト, XRGB-2plus) を通じて拡大された。その後、映像はビデオデッキ (SONY, DVCAM-DSR-20) にて録画され、モニター (SONY, PVN-20M2MDJ) に映し出された。映像は同時にコンピューターに保存され、血管径の計測は NIH イメージもしくは WinRoof Professional (Mitani Co., Ltd) を使用して行われた。尚、本システムの最終的な倍率は、最大で 4,200 倍となった (Figure 1)。

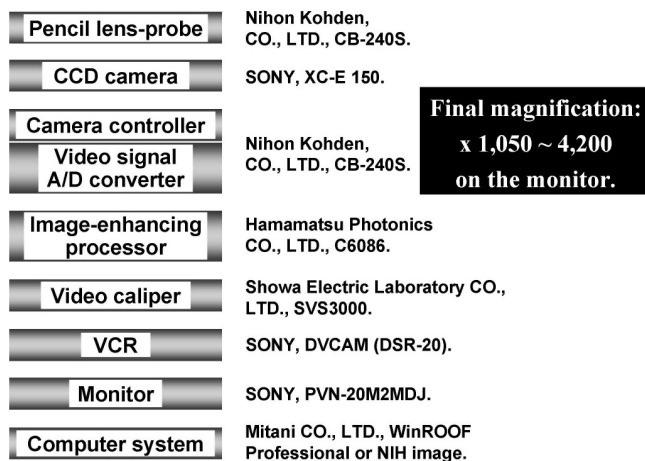


Figure 1. CCD camera system for determining the TGF activity in vivo.

### 2.2 食塩感受性ラットにおける TGF 機構の評価

雄性 DS ラットと、その対照として Dahl 食塩抵抗性 (DR) ラットに、high salt diet (H: 8%) もしくは low salt diet (L: 0.3%) 添加飼料を給飼し、tail-cuff plethysmography

(BP-98A, Softron Co.) にて経時的に血圧を測定した。別の Dahl 食塩感受性 (DS) ラットに high salt diet とともに、ATP の P2 受容体に対する非選択的拮抗薬である suramin<sup>7)</sup> (20 mg/kg/day, i.p.) を連日投与し、上記と同様の方法にて経時的に血圧を測定して 4 週後に麻酔下に TGF 機構を評価した。

処置 1 週後と 4 週後にラットをペントバルビタール麻酔下に、薬剤投与および動脈圧モニター用として大腿動・静脈にそれぞれカテーテルを留置した。後腹膜切開により左腎露出後、腎被膜を約 3 mm x 3 mm の径で切除して腎表面に高感度 CCD カメラ付きペンシル型レンズを装着し、まず糸球体・ネフロン形態変化を観察した。その後血管径を測定する腎輸入・輸出細動脈を特定して対照時の血管径を測定した。引き続き、静脈内にアセタゾラミド (2 mg/kg, bolus + 4 mg/kg/H, infusion) およびフロセミド (1 mg/kg, bolus + 4 mg/kg/H, infusion) を投与して、それぞれ TGF 活性を亢進・減弱させ<sup>8-10)</sup>、輸入・輸出細動脈径を直接計測することで糸球体レベルにおける TGF 反応の変化を観察した。

### 2.3 Dahl 食塩感受性ラットの腎間質内 ATP 濃度

処置 1 週後と 4 週後に各群のラットをペントバルビタール麻酔して左腎露出後、当研究室で開発した実質臓器用ファイバー型微小透析プローブを腎皮質に刺入し、接続チューブの一端から透析液を 2 μL/min の速度で灌流した<sup>8,9)</sup>。サンプル回収後 ATP を luciferin-luciferase 法にて測定した。また、各ラットにアセタゾラミド (2 mg/kg, bolus + 4 mg/kg/H, infusion) を静脈内投与し、処置前値との比較検討を行った。

### 2.4 Dahl 食塩感受性ラットの腎組織 ATP 含有量

処置 4 週後に各群のラットをペントバルビタール麻酔し、左腎摘出後皮質組織を取り出して ATP 含有量を HPLC 法にて測定した。右腎は同様に全組織をホモジナイズして ATP 含有量を測定した。

### 2.5 Dahl 食塩感受性ラットに対する選択的 P2 受容体拮抗薬の効果

Suramin は非選択的 P2 受容体拮抗薬であることから、より選択性の高い P2X 受容体拮抗薬の効果を検討する必要がある。そこで、選択的 P2X 受容体拮抗薬である NF279 (8',8'-[carbonylbis(imino-4,1-phenylenecarbonylimino-4,1-phenylenecarbonylimino)] bis-1,3,5-naphthalenetrisulfonic acid hexasodium salt)<sup>11)</sup> の効果を検討した。DS ラットに high salt diet (H: 8%) とともに、

NF279 を 1 mg/kg/day あるいは 10 mg/kg/day を経口投与した。また別の DS/H ラットに、NF279 を 1 mg/kg/day あるいは 10 mg/kg/day を腹腔内投与し、上記と同様の方法にて経時的に血圧を測定した。

## 2. 6 本態性高血圧ラットに対する suramin の効果

12 週齢雄性の Wister-Kyoto ラットを対象群として、同週齢の本態性高血圧ラットに対して suramin (20 mg/kg/day, i.p.) を 4 週間投与し、毎週血圧を測定した。

## 2. 7 統計検定

成績は mean $\pm$ SEM で表示し、統計学的検討には one-way もしくは two-way analysis of variance と Newman-Keuls post hoc test を用いた。

## 3. 研究結果

### 3. 1 食塩感受性ラットにおける、高血圧の進展に対する P2 受容体拮抗薬の作用

DR ラットに低食塩・高食塩を給飼しても血圧に変化は認めなかった。同様に、DS ラットに低食塩を給飼しても血圧に変化は認めなかった。一方、DS ラットに高食塩を給飼すると血圧の上昇を認めた(収縮期血圧 124 $\pm$ 2 から 4 週後 217 $\pm$ 13 mmHg への上昇)。DS/H ラットに suramin を

連日投与すると、有意に高血圧の進展が抑制された(4 週後 152 $\pm$ 8 mmHg, Figure 2)。一方、DS/H ラットに NF279 を 1 mg/kg/day あるいは 10 mg/kg/day の用量で経口投与しても高血圧の進展は抑制できなかった。同様に、NF279 を 10 mg/kg/day 1 mg/kg/day あるいは 10 mg/kg/day の用量で腹腔内投与しても高血圧の進展は抑制できなかった (data not shown)。

### 3. 2 食塩感受性ラットにおける糸球体血行動態および TGF 機構

ペントバルビタール麻酔 DS/H ラット(4 週後)の平均動脈圧は 148 $\pm$ 9 mmHg であり、DS/L ラットは 102 $\pm$ 5 mmHg であった。CCD カメラにて直接映し出された DS/H ラットの糸球体形態では、糸球体内硬化に伴う無機能糸球体がいくつか観察された。また、DS/H ラットの機能している糸球体においても、ボーマン腔の異常な拡大などの形態異常が観察された。これに対し DR ラットに高食塩・低食塩投与しても血圧の上昇は認められず、糸球体形態の異常も認められなかった (Figure 3 上)。

DS ラットに高食塩を給飼すると、1 週後より輸入細動脈径の減少が見られた。処置 1 週後での DS/H ラットの機能糸球体の輸入細動脈径は 9.7 $\pm$ 0.2  $\mu$ m であり、DS/L ラット

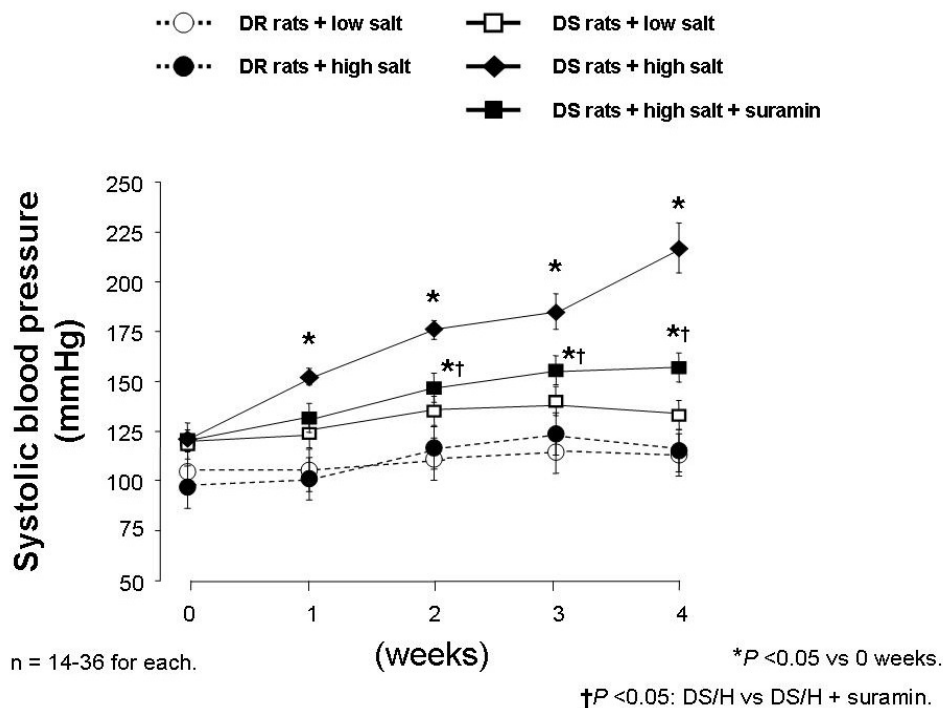


Figure 2. Changes in systolic blood pressure in Dahl salt-resistant (DR) and Dahl salt-sensitive (DS) rats fed on a low (0.3%) or high (8%) salt diet. Effects of suramin are also shown. Treatment with suramin attenuates the development of hypertension in DS rats fed on a high salt diet. \* $P < 0.05$  vs. the same strain on a low salt diet. † $P < 0.05$ ; DS rats fed on high salt diet vs. DS rats fed on high salt diet + suramin. n = 7-12 for each.



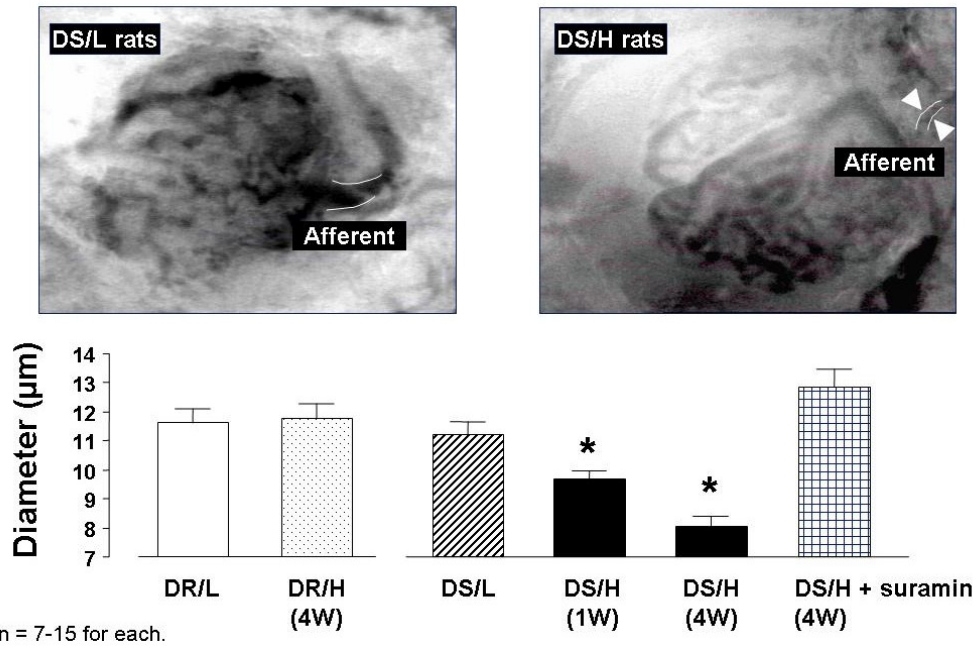


Figure 3. Glomeruli of DS rats fed on a low (L) or high (H) salt diet for 4 weeks are shown (top). Basal afferent arteriolar diameters in DR and DS rats are also shown (bottom). DS rats fed on a high salt diet elicit lower afferent arteriolar diameters. \* $P < 0.05$  vs. the same strain on a low salt diet.  $n = 7-12$  for each.

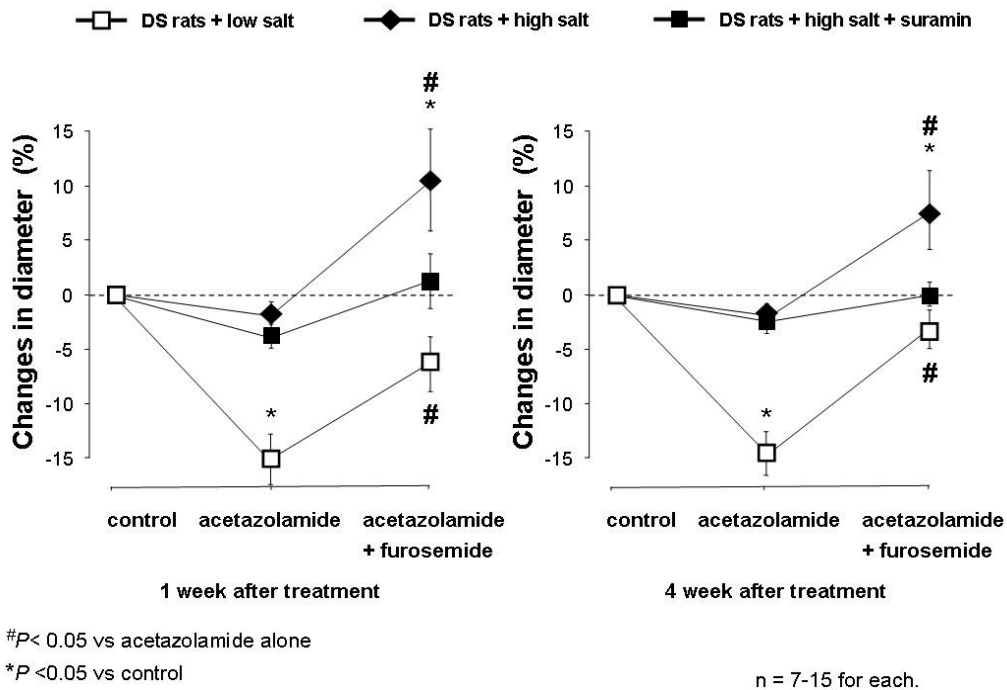


Figure 4. Effects of the TGF augmentation by acetazolamide and inhibition of the TGF activity by furosemide on afferent arteriolar diameters in DS rats. Acetazolamide decreases afferent arteriolar diameters in DS/L rats, whereas furosemide reverses the diameter in these animals. In DS/H rats, afferent arteriolar diameters are not changed by acetazolamide, increased by the addition of furosemide. On the other hand, neither acetazolamide nor furosemide change afferent arteriolar diameters in DS/H rats treated with suramin. \* $P < 0.05$  vs. control. # $P < 0.05$ ; acetazolamide vs. acetazolamide + furosemide.  $n = 7-12$  for each.

( $12.6 \pm 0.6 \mu\text{m}$ )と比較して有意に狭小していた。Suraminを投与した DS/H ラットの輸入細動脈径の対象値は  $13.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$  であり、DS/H ラットの対象値よりも有意に拡張しており、DS/L ラットの輸入細動脈径と差がなかった (Figure 3 下)。

Figure 4 に、処置開始 1 週後(左)と 4 週後(右)のアセタゾラミドによって TGF 活性を亢進させた場合の輸入細動脈径の変化を示す。アセタゾラミドの急性静脈内投与は、処置開始 1・4 週後の DS/L ラットの輸入細動脈径を有意に減少させた。また、アセタゾラミドによって収縮した輸入細動脈は、フロセミドによる TGF 反応の阻害によりコントロール値にまで復した。同様の変化が高食塩・低食塩投与 DR ラットでも観察された (data not shown)。これに対し、アセタゾラミドは DS/H ラットの機能糸球体における輸入細動脈径を減少させなかった。一方、DS/H ラットの輸入細動脈の異常収縮は、フロセミドの投与により DS/L 対象値と同程度のレベルまで解消された。これに対し、suramin を投与した DS/H ラットにアセタゾラミドやフロセミドを投与しても、輸入細動脈径に変化は認められなかった。尚、同様の変化が処置 1・4 週後の両方で観察された (Figure 4)。

### 3. 3 食塩感受性高血圧ラットの高血圧進展過程における、腎間質・腎組織中 ATP 濃度

Figure 5 に、処置開始 1 週後(左)と 4 週後(右)の腎間質 ATP 濃度を示す。DR ラットに低食塩・高食塩を給飼しても腎間質 ATP 濃度に差を認めなかった。同様に、DS ラ

ットに低食塩を給飼しても腎間質 ATP 濃度に変化は認めなかった。一方、DS ラットに高食塩を給飼すると腎間質 ATP 濃度の上昇を認めた。処置 1・4 週後の DS/H ラットの腎間質 ATP 濃度はそれぞれ、 $3.6 \pm 0.5$ ,  $4.3 \pm 0.6 \text{ nmol/L}$  であり、DS/L ラット ( $1.5 \pm 0.6$ ,  $1.2 \pm 0.9 \text{ nmol/L}$ ) や DR/L ラット ( $1.2 \pm 0.3$ ,  $1.7 \pm 0.3 \text{ nmol/L}$ )、DR/H ラット ( $1.0 \pm 0.3$ ,  $1.9 \pm 0.5 \text{ nmol/L}$ ) と比較して非常に高いレベルであった (Figure 5)。これに対し、DS/H ラットに suramin を投与しても腎間質 ATP 濃度に変化は認めなかった。処置 1・4 週後の suramin 投与 DS/H ラットの腎間質 ATP 濃度はそれぞれ  $2.9 \pm 0.4$ ,  $3.6 \pm 0.4 \text{ nmol/L}$  である。

Figure 6 に、DS ラットに処置を開始 1 週後(左)と 4 週後(右)にアセタゾラミドを急性静脈内投与した前後の腎間質 ATP 濃度の変化について示す。低食塩食を 1 週あるいは 4 週間与えた DS ラットに対し、アセタゾラミドによって TGF 活性を亢進させると、腎間質 ATP 濃度は有意に増加した。(Figure 6)。これに対し、高食塩食投与によって増加していた DS/H ラットの腎間質 ATP 濃度は、アセタゾラミドを投与してもさらなる変化は認められなかった (Figure 6)。同様に、DS/H ラットに suramin を投与したラットに対してアセタゾラミドを投与しても、腎間質 ATP 濃度に有意な変化は認められなかった。一方、腎臓皮質組織、あるいは腎臓全体の組織をホモジナイズした際の ATP 含有量は、いずれのラットにおいても差を認めなかった (Figure 7)。

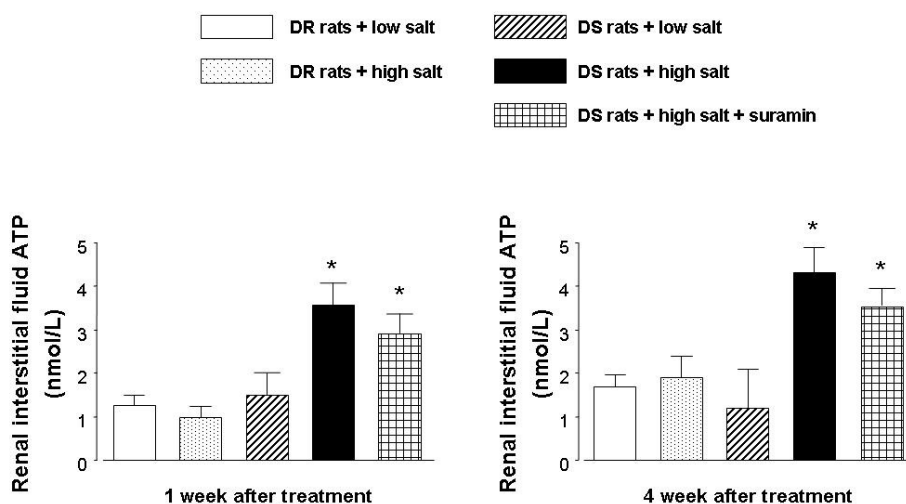


Figure 5. Renal interstitial concentration of ATP in DR and DS rats. Effects of suramin are also shown. DS/H rats show higher renal interstitial levels of ATP, compared with DS/L rats. Treatment with suramin does not alter renal interstitial ATP levels in DS/H rats. \* $P < 0.05$  vs. the same strain on a low salt diet.  $n = 7-12$  for each.

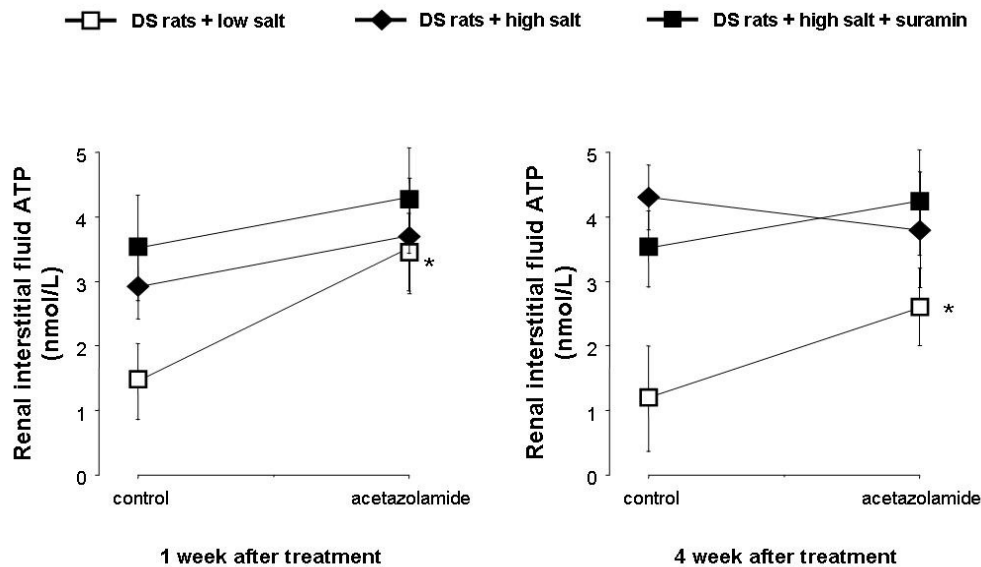


Figure 6. Effects of acetazolamide on renal interstitial fluid concentrations of ATP in DR and DS rats. Renal interstitial levels of ATP are significantly increased by augmentation of the TGF activity with acetazolamide. On the other hand, acetazolamide fails to change renal interstitial ATP levels in DS/H rats and DS/H rats treated with suramin. \* $P < 0.05$  vs. control.  $n = 7-11$  for each.

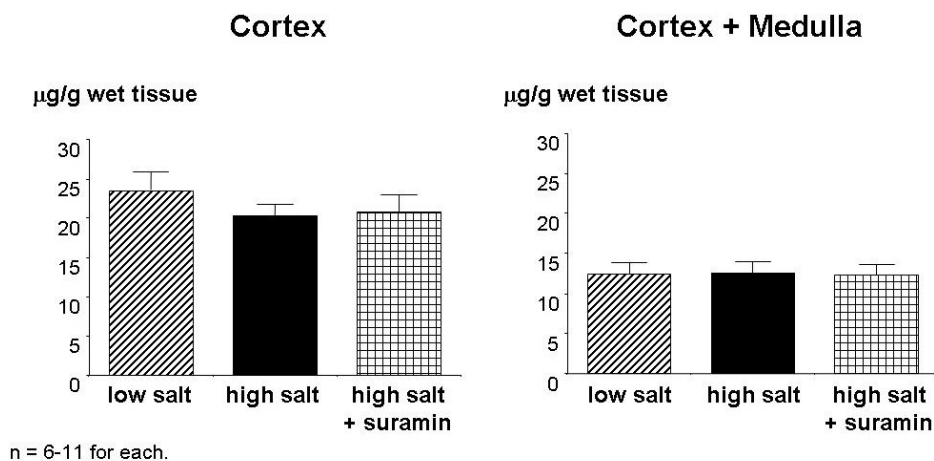


Figure 7. ATP contents in renal cortical tissues and whole kidney tissues in DS rats. Treatment with high salt does not alter ATP contents in renal cortical tissues and whole kidney tissues. Furthermore, treatment with suramin does not affect ATP contents in renal cortical tissues and whole kidney tissues in DS/H rats.  $n = 6-11$  for each.

### 3. 4 本態性高血圧ラットの 高血圧進展に対する suramin の効果

Suramin の降圧作用は、食塩感受性高血圧ラット特有な現象であるか否かを検討するため、本態性高血圧ラットに対して上記と同様に suramin を投与し、高血圧の進展を抑制しうるか否かについて検討した。12 週齢雄性の Wister-Kyoto ラットを対象群として ( $n = 5$ )、12 週齢の本態性高血圧ラットにピークルを投与すると収縮期血圧が 4 週

間で約 150 mmHg から 210 mmHg まで上昇した ( $n = 7$ )。これに対し、suramin の連日投与は本態性高血圧ラットの 高血圧進展を抑制できなかった ( $n = 7$ )。このように、suramin は本態性高血圧ラットの 高血圧進展に影響を与えなかったことから、suramin の降圧作用は、食塩感受性の改善によってもたらされているのではないかと考えられた。

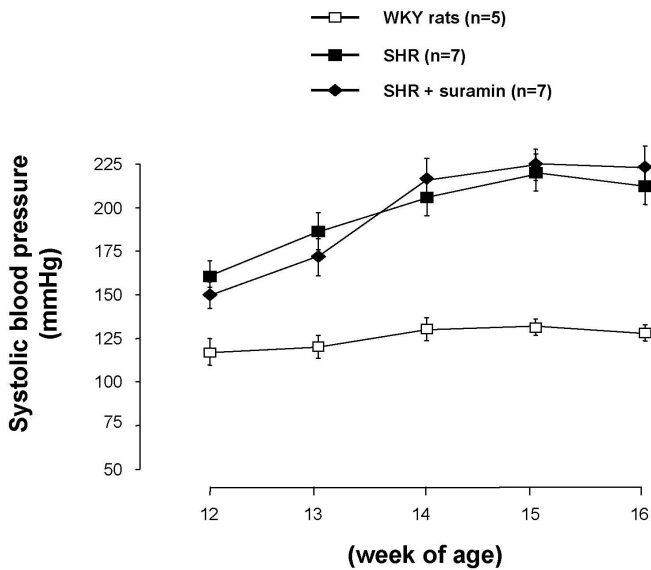


Figure 8. Effects of suramin on systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHRs). SHRs elicit the development of hypertension. Treatment with suramin does not affect the development of hypertension in SHRs.

#### 4. 考察

本プロジェクト研究では、特殊ペンシル型のレンズを装着した高感度 CCD カメラを使用して腎微小循環の観察を直接可能とするシステムを駆使し、TGF 活性の評価を行った。その結果、食塩感受性高血圧ラットでは、高血圧の進展初期より輸入細動脈が異常に収縮していることが判明した。さらに低食塩投与の正常血圧ラットと比較して、アセタゾラミドによる TGF 活性の亢進による輸入細動脈の収縮反応が減弱していることが明らかとなった。一方、フロセミドによって TGF 活性を遮断すると、食塩感受性高血圧ラットの輸入細動脈径は正常血圧ラットと同レベルにまで拡張した。これらの実験結果は、食塩感受性ラットでは TGF 反応が異常に増強されていることを示すものである。したがって、食塩感受性高血圧ラットでは TGF 反応が増強されて輸入細動脈が収縮し、糸球体内圧が減少に伴って糸球体濾過量が減少しており、これが食塩感受性高血圧の進展に関わっているのではないかと考えられた。このような TGF 反応の増強は、高食塩食負荷開始 1 週間より観察された。すなわち、TGF 反応の増強は高血圧の進展に先立って生じていることが示唆された。

従来より我々は、TGF 機構がマクラデンサ細胞から遊離される細胞外 ATP によって制御されていると提唱している<sup>8-10,13,14</sup>。したがって本研究では食塩感受性ラットに対する ATP の P2 受容体拮抗薬の TGF 機構ならびに高血圧

進展に対する影響を検討した。今回我々は、P2 受容体に対する非選択的拮抗薬として suramin を選択した<sup>12</sup>。本プロジェクト研究に際しての予備実験にて、suramin の急性投与は食塩感受性ラットに対して何ら影響を及ぼさないことを証明している。しかしながら、食塩感受性ラットに対して慢性的に suramin の連日投与を行なうと、輸入細動脈が正常血圧ラットよりも拡張した。また、suramin はアセタゾラミドやフロセミドに対する輸入細動脈の反応も消失させた。尚、予備実験により suramin の慢性投与が外因的に投与した ATP の P2X アゴニストによって生じる腎血管収縮反応を抑制することを確認している。以上の実験結果より、食塩感受性ラットでは輸入細動脈の P2 受容体が活性化されており、輸入細動脈が収縮しているのではないかと考えられた。さらに非常に興味深いことに、suramin は食塩感受性ラットで生じる TGF 活性の増強を抑制するのみならず、高血圧の進展を有意に抑制した。一方、suramin による高血圧の進展の抑制作用は、本態性高血圧ラットでは観察されなかった。すなわち、suramin による高血圧の進展の抑制作用は、食塩感受性高血圧モデルに対して特異的である可能性が示された。以上の結果より、食塩感受性ラットでは輸入細動脈の P2 受容体活性化を介して TGF 活性が増強しており、これが高血圧の進展に深く関わっている可能性が考えられた。

Suramin による ATP の P2 受容体阻害は、食塩感受性ラットで生じる TGF 機構の増強と高血圧の進展を抑制した。しかしながら、suramin は非選択的 P2 受容体拮抗薬であることから、より P2 受容体へ選択性の高い P2 受容体拮抗薬の効果を検討する必要がある。また、suramin は腹腔内への連日投与を行わないと作用が発揮されないため、経口・皮下投与が可能な薬剤が求められる。そこで、選択的 P2X 受容体拮抗薬である NF279<sup>11,12</sup>の効果について検討をおこなった。ところが、NF279 を suramin と同程度のモル濃度で投与しても、DS/H ラットの血圧上昇に影響は与えなかった。何故 NF279 が高血圧の進展を抑制できなかったのかについては、不明である。今回、ラットにこれ以上の用量で投与する十分量の NF279 を得られなかったため、より高用量での NF279 を投与はできなかった。今後検討していく必要があると考えられる。

P2 受容体拮抗薬である suramin は、食塩感受性ラットで生じる TGF 活性の増強を抑制し、高血圧の進展を有意に抑制した。そこで、腎間質 ATP 濃度が食塩感受性ラットで増加しているか否かについて検討をおこなった。DR ラ

ットに低食塩・高食塩を給飼しても腎間質 ATP 濃度に差を認めなかった。同様に、DS ラットに低食塩を給飼しても腎間質 ATP 濃度に変化は認めなかった。一方、DS ラットに高食塩を給飼すると、処置 1・4 週後で腎間質 ATP 濃度の上昇を認めた。これに対し、DS/H ラットに suramin を投与しても腎間質 ATP 濃度に変化は認めなかった。低食塩食を 1 週あるいは 4 週間与えた DS ラットに対し、アセタゾラミドによって TGF 活性を亢進させると、腎間質 ATP 濃度は増加した。これに対して、高食塩食投与によって増加していた DS/H ラットの腎間質 ATP 濃度は、アセタゾラミドを投与してもさらなる変化は認められなかった。同様に、DS/H ラットに suramin を投与したラットに対してアセタゾラミドを投与しても、腎間質 ATP 濃度に有意な変化は認められなかった。このように、食塩感受性ラットで高血圧の進展に先立って生じている TGF 反応の増強は、腎間質 ATP 濃度の上昇を伴っていることが示めされた。一方、腎臓皮質組織、あるいは腎臓全体をホモジナイズした際の腎組織 ATP 含有量は、いずれのラットにおいても差を認めなかった。恐らく、細胞内から腎間質へと分泌される間質 ATP は TGF 活性と比例しているが、組織全体を反映する腎 ATP 含有量は変化が認められないのであろうと考えられた。

以上、これまでの実験結果をまとめると、食塩感受性ラットでは糸球体の形態異常のみならず、高血圧進展初期より TGF 活性の異常亢進に伴って輸入細動脈が収縮していることが明らかとなった。また、これらの変化は腎間質内 ATP 濃度の著明な増加を伴っていた。一方、ATP の P2 受容体阻害は食塩感受性ラットで生じる TGF 機構の増強と高血圧の進展を抑制した。これらの研究結果より、腎間質内 ATP の P2 受容体活性化による TGF 機構の増強が糸球体濾過量の減少を引き起こし、それによって生じる食塩・体液の貯留が食塩感受性高血圧の発症・進展に密接に関連しているのではないかと考えられた。

## 5. 今後の課題

今回のプロジェクト研究全体の目的は、「食塩感受性を簡単に判断、食塩制限を必要とする人と、必要としない人を見分ける指標の開発」であった。しかしながら、我々の研究結果は動物実験のみの評価で終了した。現在までの研究では、TGF 機構の増強や腎間質内 ATP 濃度の上昇をヒトで測定することは不可能である。尿中の ATP 排泄量の測定が最近おこなわれていることから<sup>15)</sup>、食塩感受性

患者における尿中の ATP 排泄量の測定などを今後検討し、腎間質内 ATP 濃度と相関するか否かを検討する必要があると考えられる。

## 文 献

1. Navar LG, Inscho EW, Majid DSA, Imig JD, Harrison-Bernard LM, Mitchell KD. Paracrine regulation of the renal microcirculation. *Physiol Rev.* 1996; 76: 425-536.
2. Wilcox CS. Redox regulation of the afferent arteriole and tubuloglomerular feedback. *Acta Physiol Scand.* 2003; 179: 217-223.
3. Kurokawa K. Tubuloglomerular feedback: its physiological and pathophysiological significance. *Kidney Int Suppl.* 1998; 67: S71-S74.
4. Vallon V. Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration rate. *News Physiol Sci.* 2003; 18: 169-174.
5. Bell PD, Lapointe JY, Peti-Peterdi J. Macula densa cell signaling. *Annu Rev Physiol.* 2003; 65: 481-500.
6. 山本徳則, 戸村裕一, 西山 成, 山森伸二, 森岡政明, 小笠原康夫, 梶谷文彦. 高血圧および糖尿病ラット病態モデルにおける生体腎微小循環の可視化. *日本バイオレオロジー学会誌*, 16: 91-100, 2003.
7. Inscho EW, Cook AK, Navar LG. Pressure-mediated vasoconstriction of juxtamedullary afferent arterioles involves P2-purinoceptor activation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1996; 271: F1077-F1085.
8. Nishiyama A, Majid DSA, Taher KA, Miyatake A, Navar LG. Relation between renal interstitial ATP concentrations and autoregulation-mediated changes in renal vascular resistance. *Circ Res.* 2000; 86: 656-662.
9. Nishiyama A, Majid DSA, Walker M, III, Miyatake A, Navar LG. Renal interstitial ATP responses to changes in arterial pressure during alterations in tubuloglomerular feedback activity. *Hypertension.* 2001; 37: 753-759.
10. Nishiyama A, Navar LG. ATP mediates tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 283: R273-R275; discussion, R278-R279.
11. Inscho EW, Cook AK, Imig JD, Vial C, Evans RJ. Physiological role for P2X1 receptors in renal

- microvascular autoregulatory behavior. *J Clin Invest.* 2003; 112: 1895-1905.
12. Guan Z, Osmond DA, Inscho EW. Purinoceptors in the kidney. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007; 232: 715-726.
13. Nishiyama A and Abe Y. Potential roles of interstitial adenosine in the regulation of renal hemodynamics. *Biogenic Amines.* 17: 459-474, 2003.
14. Nishiyama A, Rahman M, Inscho EW. Role of interstitial ATP and adenosine in the regulation of renal hemodynamics and microvascular function. *Hypertens Res.* 2004; 27: 791-804.
15. 新しい腎障害の尿中マーカー,ATP. 中島基雄, 江藤由紀, 矢内充, 川村理佐子, 金子一成, 青柳一正, 小磯健吉. *臨床病理*, 50: 513-518, 2002.

## Possible Role of the Tubuloglomerular Feed Back System in the Pathogenesis of Salt-Sensitive Hypertension

Akira Nishiyama<sup>1</sup>, Youichi Abe<sup>1</sup>, Hiroshi Iwao<sup>2</sup>, Toshiaki Tamaki<sup>3</sup>, Hiroyuki Kobori<sup>4</sup>,  
Tokunori Yamamoto<sup>5</sup>, Noriyuki Kataoka<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Pharmacology, Kagawa University Medical School,

<sup>2</sup> Dept. of Pharmacology, Osaka City University Medical School,

<sup>3</sup> Dept. of Pharmacology, The University of Tokushima School of Medicine,

<sup>4</sup> Hypertension and Kidney COE, Tulane University Health Sciences Center,

<sup>5</sup> Dept. of Urology, Nagoya University School of Medicine,

<sup>6</sup> Dept. of Medical Engineering, Kawasaki Medical School

### Summary

We investigated the possible contributions of renal interstitial fluid (RIF) ATP and tubuloglomerular feedback (TGF) mechanism to the development of salt-dependent hypertension. Dahl salt-sensitive (DS) rats were maintained on low (L: 0.3% NaCl) or high salt (H: 8% NaCl) diet for 4 weeks. Using an intravital tapered-tip lens-probe videomicroscopy with a CCD camera system, superficial afferent arteriolar diameter (AAD) was measured before and during TGF activity enhanced with acetazolamide (2 mg/kg, bolus + 4 mg/kg/h, infusion, i.v.) in anesthetized rats. RIF ATP levels were measured by a microdialysis method. At 1 and 4 weeks after high salt treatment, DS/H rats showed smaller basal AAD and higher RIF ATP levels and blood pressure, as compared to DR/S rats. Acetazolamide significantly decreased AAD in DS/L rats, but did not alter AAD in DS/H rats. Acetazolamide increased RIF ATP levels in DS/L rats, whereas ATP levels were not altered by acetazolamide in DS/H rats. Treatment with suramin (20 mg/kg/day, i.p.), a non-selective P2 receptor antagonist, markedly attenuated the development of hypertension in DS/H rats. Suramin also significantly increased basal AAD in DS/H rats. However, AAD and RIF ATP levels did not change during the administration of acetazolamide in suramin-treated DS/H rats. These results suggest that augmented TGF activity associated with increases in RIF ATP levels contributes to the increased afferent arteriolar tone and the development of salt-dependent hypertension. Future studies in human will be necessary.

### 3. 食塩感受性高血圧の中枢性昇圧機序における酸化ストレスの役割

藤田 敏郎<sup>1</sup>, 安東 克之<sup>2</sup>, 藤田 恵<sup>1</sup>, 下沢 達雄<sup>3</sup>, 一色 政志<sup>1</sup>, 高橋 克敏<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京大学大学院医学系研究科腎臓・内分泌内科,

<sup>2</sup> 東京大学大学院医学研究科分子循環代謝病学講座,

<sup>3</sup> 東京大学医学部附属病院検査部

**概要** われわれの所属研究室では以前より、食塩感受性高血圧における昇圧機序において中枢性のメカニズムによる交感神経活動の亢進が重要な役割を果たしている可能性を報告してきた。すなわち、食塩感受性高血圧の成因として重要な腎臓からのナトリウム排泄低下に、交感神経活動の亢進が関与している可能性を臨床研究にて示し(Fujita T, et al. *Am J Med* 1980; 69: 334)、食塩感受性高血圧モデルラットにおいて交感神経活動が亢進していることを報告した(sato Y, Fujita T, et al. *Hypertension* 1992; 20: 466)。さらに、この異常には交感神経の中枢特性の変化が関与していることを指摘した(Ono A, Fujita T, et al. *Hypertension* 1994; 24: 83)。近年、われわれ(Chiba Y, Fujita T, et al. *J Hypertens* 2002; 20: 2269, Matsui H, Fujita T, et al. *Hypertension* 2006; 48: 225)を含めて食塩感受性高血圧の病態において活性酸素種(ROS)が重要な働きを担っている可能性が報告されている。さらに、酸化ストレスが末梢交感神経活動を介する血圧調節に関与している可能性を示す成績が散見されるようになった。本プロジェクトの1年目においては、内因性抗酸化物質であるアドレノメデュリン(AM)が欠損したマウスにおいて高食塩食を摂取させ、高張食塩水の脳室内投与による血圧上昇・交感神経亢進反応をみると、高食塩食負荷 AM ノックアウトマウスでこれらの反応が亢進していることを示した。さらに、スーパーオキシドデスムターゼ類似物質 tempol の脳室内前投与による反応の抑制や摘出視床下部の ROS 産生能亢進を示した。以上の成績から、中枢性の酸化ストレス亢進による交感神経系を介した血圧上昇が明らかになった(Fujita M, Fujita T, et al. *Hypertension* 2005; 45: 1165-72)。2年目は、食塩感受性高血圧モデル動物の Dahl 食塩感受性(S)ラットにおいて食塩負荷時の血圧上昇は脳室内 tempol 投与時の降圧ならびに交感神経抑制反応の増強を認め、しかも単離視床下部における ROS 産生能の亢進を伴っていたことから、中枢酸化ストレス亢進の食塩感受性高血圧の血圧維持メカニズムにおける関与が示唆された。さらに3年目はその研究を推し進め、Dahl S ラットにおいて視床下部の NADPH oxidase 活性が亢進しており、しかも NADPH oxidase subunits の mRNA の発現が亢進していることを明らかにした。さらに、NADPH oxidase の関与を確かめるべく、その阻害物質である diphenyleneiodonium を脳室内に投与したところ食塩負荷 Dahl S ラットで正常食 Dahl S ラットに比較して降圧ならびに交感神経抑制反応の増強を認めた(Fujita M, Fujita T, et al. 60th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research [San Antonio, Texas] P223, 2006)。以上より、中枢性の酸化ストレス亢進による交感神経系を介した血圧上昇機序の存在を明らかにし、食塩感受性高血圧においてはこの機序に基づいて高血圧が発症維持されていることを示唆する所見を得た。

#### 1. 研究の背景と目的

われわれは以前より食塩感受性高血圧の病態生理について検討を重ねてきた。食塩感受性高血圧の成因として重要な腎臓からのナトリウム排泄低下に、交感神経活動の亢進が関与している可能性を臨床研究にて示し(Fujita T, et al. *Am J Med* 1980; 69: 334-44, Fujita T, et al. *Hypertension* 1990; 16: 235-244)、その後、いくつかの食塩感受性高血圧モデル、すなわち幼若高血圧自然発症

ラット(SHR) (Sato Y, Fujita T, et al. *Hypertension* 1992; 20: 466-472)やアンジオテンシン II 投与ラット(Ando K, Fujita T, et al. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1991; 261: R1070-R1074)においても交感神経亢進が血圧上昇に重要な役割を果たしている可能性を指摘した。さらに、食塩感受性高血圧動物では中枢性の交感神経活性(SNA)亢進がその発症維持に関与している可能性を示してきた。たとえば、高食塩食負荷により血圧上昇が促進さ



れる幼若 SHR では腎交感神経活性(RSNA)の増大や、動脈圧受容器反射の減弱を伴っていた(Ono A, Fujita T, et al. *Hypertension*. 1994; 24: 83-90)。この食塩負荷幼若 SHR において交感神経の中樞特性を評価する目的で、大動脈神経を直接電気刺激した際の RSNA を測定すると、その抑制反応は明らかに減弱しており、食塩感受性高血圧では中樞性の交感神経刺激状態が動脈圧受容器反射の減弱の原因である可能性が示唆された(Ono A, Fujita T, et al. *Hypertension*. 1997; 29: 808-814)。すなわち、とくに食塩感受性高血圧では中樞交感神経の亢進があり、これが血圧上昇を引き起こす可能性が考えられた。

一方、近年になって食塩感受性高血圧の病態において活性酸素種(ROS)が重要な働きを担っている可能性が指摘されている。たとえば、遺伝性食塩感受性動物モデルとしてよく知られている Dahl 食塩感受性(S)ラット においては腸間膜動脈のスーパーオキシド(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)産生量や血液中の過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)濃度が対照動物の Dahl 食塩抵抗性(R)ラットよりも増加していた(*Hypertension*. 1997; 30: 1628-1633)。さらに後天性食塩感受性動物モデルである deoxycorticosterone acetate (DOCA)-食塩ラットにおいても動脈の ROS 産生量が増加しており(*Hypertension*. 2001; 37: 781-786)、NADPH oxidase のサブユニットである p22<sup>phox</sup> の mRNA 発現が増加しているという(*Hypertension*. 2001; 38: 1107-1111)。Dahl S ラットにおいて Dahl R ラットに比較し高食塩食摂取後に腎臓で産生される O<sub>2</sub><sup>-</sup>と酸化ストレスマーカーである血中・尿中 F2-isoprostane 値が上昇しているが、それらが superoxide dismutase(SOD)様物質である tempol により抑制されるとい報告もある(*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R732-738)。以上のように、酸化ストレスは高血圧、とくに食塩感受性高血圧の昇圧メカニズムに密接に関与している可能性が推測されている。

さらに、最近、酸化ストレスが交感神経活動を介する血圧調節に関与している可能性を示す成績が散見されるようになった。たとえば、循環調節中枢であり交感神経活動を制御する吻側延髄腹外側部(RVLM)に、O<sub>2</sub><sup>-</sup>代謝酵素である SOD を局所投与することで、血圧、RSNA が低下すること(*Pflug Arch Europ J Physiol* 2000; 439: 489-494)や、正常血圧 Sprague-Dawley(S-D)ラットや DOCA-食塩ラットにおいて、tempol の静脈内投与により血圧、心拍数(HR)、SNA が低下することなどが報告されている(*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H885-892)。また、

tempol の静脈投与による血圧、HR や SNA の低下率は Wistar-Kyoto ラット(WKY)に比し SHR で大きいという(*Hypertension*. 2003; 41: 266-273)。このように、酸化ストレスは高血圧、とくに食塩感受性高血圧の成因における交感神経活動を調節する可能性が考えられる。

そこで、われわれは、降圧作用を有する生体内の生理活性ペプチドであるアドレノメデュリン(AM) (*Biochem Biophys Res Comm* 1993; 192: 553-560)が内因性抗酸化物質であること(Ando K, Fujita T, et al. *Hypertens Res* 1998;21:187-191, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H1506-1514, *Circulation*. 2002; 105: 106-111)に着目した。実際、AM は脳内での発現が確かめられており(*Brain Res* 2000; 853: 245-68)、中樞におけるAMの生理作用に関しても血圧への影響を含めた多くの報告(*Regulat Pept* 2000; 89: 13-18, *Am J Hypertens* 1994; 7: 478-482, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1998; 274: R979-984)がある。われわれは AM ノックアウトマウス(AM(+/-))に食塩負荷を行い、酸化ストレス亢進状態にしてその際の中樞交感神経刺激としての側脳室内高張食塩水投与の成績とそれに対する tempol 側脳室内前投与の影響を見た(Fujita M, Fujita T, et al. *Hypertension* 2005; 45: 1165-1172)。さらに、食塩感受性高血圧モデルである Dahl S ラットにおいて脳室内 tempol ならびに NADPH oxidase 阻害薬 diphenyleneiodonium(DPI)投与に対する反応と視床下部におけるNADPH oxidaseの活性ならびに発現を調べて、食塩感受性高血圧において中樞 ROS 過剰産生が交感神経亢進を介して血圧上昇に寄与している可能性を検討した(Fujita M, Fujita T, et al. 60th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research [San Antonio, Texas] P223, 2006 [abstract])。

## 2. 研究方法

### 2.1 実験1

#### 【動物】

本実験で用いたのは、Shimosawaらが作成したAM ノックアウトマウス(AM(+/-))とその同腹子の野生型マウス(AM(+/+))である(Shimosawa T, Fujita T, et al. *Circulation* 2002; 105: 106-111)。AM ノックアウトマウスのホモ接合体は胎生致死であったが、ヘテロ接合体は正常に発育し、妊娠出産が可能であったので、ヘテロ接合体を用いて実験を行った。特異的抗体を用いて

radioimmunoassay (RIA) 法により臓器中の proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP)、AM 濃度を測定し、AM(+/-)の副腎、肺、血液中 AM 濃度は、AM(+/+)のほぼ半分量であったが、PAMP 濃度は等量であることを確認した。すべてのマウスは、午前7時点灯・午後7時消灯、23-25°C、湿度 40-60%に維持された部屋で自由な食餌と飲水下で飼育された。普通食(0.3% NaCl)もしくは高食塩食(8% NaCl)で4週間飼育した4~8ヶ月齢の雄性 AM(+/-)と AM(+/+)を用いた。各群マウスの体重は、普通食 AM(+/+) 29.1±0.99 g、高食塩食 AM(+/+) 27.4±0.52 g、普通食 AM(+/-) 28.7±0.84 g、高食塩食 AM(+/-) 27.4±0.63 g と、普通食に比較し高食塩食でやや低値を示したが4群間に有意差は認められなかった。ノックアウトマウスは、バッククロスを C57/BL6 と 10 世代以上行なったものを実験に用いた。すべての動物実験手技は東京大学医学部動物実験に関する倫理委員会の理念および日本生理学会の指針(日本生理学会)に従った。

#### 【麻酔マウスにおける脳室内投与】

平均血圧(MAP)・HR・SNA の記録は、既報の方法に従った(*Brain Res* 1998; 808: 238-249)。ウレタン(1.2 g/kg i.p.)麻酔下に、気管にカニューレーションを行い、人工呼吸器(Hugo Sachs Elektronik D-79232 March-Hugstetten / Germany)に接続し、実験が終了するまで酸素を50%程度補充した空気で換気し、呼吸終末 PCO<sub>2</sub> が3-5%になるように1回換気量と換気頻度を調節した(Respina IH26, 日本電気三栄)。必要な場合にはウレタン(0.1 g/kg)を追加投与した。右大腿動脈にカテーテルを挿入し、血圧を記録した。右大腿静脈にカテーテルを挿入し、非動化のために実験期間中すべてにわたり筋弛緩剤(pancuronium bromide, 0.1 mg/ml)をインフュージョンポンプ(Model 975E, Harvard Apparatus)を用いて持続注入(0.06-0.24 ml/hr)した。薬物を側脳室に投与するため、頭蓋骨を露出し bregma から右に1 mm の部位に穴を開けガイドカテーテルを刺入し、歯科用セメントで固定した。マウスを腹臥位にし、頭部を脳定位固定装置(ST-7, 成茂科学)に固定し、後腹膜腔アプローチにて、腹腔神経叢から直接分岐する大内臓神経を、腹腔大動脈背側上に同定した。その遠位発火を記録するため、神経を剥離し銀線双極電極上に留置した。電極をアンプ(AVB-8, Nihon Kohden)に接続し、増幅された信号を連続的にオシロスコープ(5113, Tectronix, Beaverton, OR)上に表示した。複合的な神経発火を全波整流し、10 秒毎に積分した(EI-601G, Nihon

Kohden)。大内臓神経は腎臓を含む多くの内臓諸器官の血流を支配しており、内臓諸器官の血流の総和としては常に減少、すなわち水分貯留方向の反応が観察できるものと考えられたので、交感神経活動として本研究では大内臓神経を選択した。手術および測定実験中、マウスを保温台に乗せ直腸に温度計を挿入し、体温測定維持装置(ATB-1100, 日本光電)により体温を 36.5-37.5°C に保温した。以上の手術が終了した後、少なくとも30分以上マウスの安定を待ち、測定・記録を開始した。MAP、HR、SNA および呼吸の各波形は、ポリグラフ(RM-7000, 日本光電)に表示するとともに、コンピュータ(Apple Macintosh)に取り込み、波形解析用ソフトウェア(Spike2, Cambridge Electronic Design)を用いて平均値およびピーク値を算出した。実験終了後には、側脳室内に設置したカテーテルから色素(2% エバンスブルー)を投与し、全例において色素が脳室内に分布しており脳実質内にカテーテル先端が留まっていないことを確認した。

#### 【無麻酔無拘束マウスにおける脳室内投与】

イソフルレン吸入麻酔下に、前述と同様の方法でマウスの大腿動・静脈と側脳室にカテーテルを導入した。静脈カテーテルは、phenylephrine, nitroprusside の投与に用いた。動・静脈カテーテルは背部皮下トンネルを通して頸部から体外に導出し、マウスの自由行動を妨げないようにした。技術的制約から、無麻酔無拘束では SNA の測定は行わなかった。血圧・HR の測定手技は前述の麻酔下での実験と同様である。

#### 【視床下部切片の調製】

酸化ストレス測定に使用するため、マウス視床下部標本を作製した。マウスを断頭し、まず骨鉗子を用いて頭蓋骨を剥離し全脳を取り出した。脳幹、小脳を切り離し、視交叉部に冠状断を入れて前脳を切断、更に前交連部で中脳を切り離し、視床下部標本とした。Krebs-Hepes buffer に入れる前に、重量を測定した。

#### 【実験プロトコール】

脳内 AM 含有量の測定:すでに報告されている方法(*FEBS Letters*. 1994; 352: 105-108)に従い、マウス全脳をホモジナイズし AM を抽出し、特異抗体を用いて radioimmunoassay (RIA) 法により測定を行った。

麻酔マウスにおける高張食塩水側脳室投与:側脳室に固定したカテーテルからインフュージョンポンプ(CFU-3200, 日本光電)を用いて、人工脳脊髄液(ACSF, 0.13 M NaCl を含む)または高張食塩水(0.3 M, 1.5 M)を、

0.3  $\mu\text{l}/\text{min}$  の速度で 10 分間ずつ低用量から順に側脳室内に投与し、MAP、HR、SNA の変化を記録した。投与速度はマウスの脳脊髄液の産生速度 (0.33  $\mu\text{l}/\text{min}$ ) 以内とした。

無麻酔無拘束マウスにおける血圧上昇反応: 上記の実験においてウレタン麻酔の影響を除外するため、無麻酔無拘束状態のマウスでも検討を加えた。麻酔からの回復を 2 時間以上待った後、無麻酔無拘束の状態 MAP、HR を測定した。ACSF、高張食塩水を同様に側脳室に投与した際の MAP、HR の反応を記録した。さらに、各群マウス間での反応の相違が末梢血管の反応の相違に基づくものではないことを確認するため、phenylephrine、sodium nitroprusside の静脈内投与を行い、血圧・心拍数の反応を測定した。

高張食塩水側脳室投与時の反応における酸化ストレスの関与: 高張食塩水の側脳室投与前に、抗酸化剤である tempol または tempol と構造的に類似しているが抗酸化作用の少ない別のニトロ酸化化合物である 3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrroline-N-oxyl (3CP) を前投与し、その効果を観察した。まず、3CP (2 M) を 3  $\mu\text{l}$ 、用手法にて 1 分間かけて側脳室投与した後、10 分程度待ち、1.5 M NaCl をインフュージョンポンプにて側脳室投与し、MAP、HR、SNA の反応を記録した。3CP と同等量の Tempol (3 M) を前投与した際の 1.5 M NaCl に対する反応、さらに大量 Tempol (5 M) を前投与した際の 1.5 M NaCl に対する反応もそれぞれ同様に測定し、比較検討を行った。

視床下部における高張食塩水負荷による活性酸素産生の測定: 0.2 ml の modified Krebs-Hepes buffer (NaCl 99.01 mM, KCl 4.69 mM,  $\text{CaCl}_2$  1.87 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.20 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.03 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25.0 mM, Na-Hepes 20.0 mM, Glucose 11.1 mM) を測定チューブに入れ、その中にマウス視床下部 (33-47 mg) を浸し 37°C で 10 分間安定させた。その後、37°C の 3 M NaCl あるいはコントロールとして生理食塩水 (0.15 M NaCl) を測定全量 (0.5 ml) の半分 (0.25 ml) 加え、直ちに Lumat LB9507 (ベルトールド社) で化学発光を 30 秒間測定し background とした。さらに 30 秒後に、ROS と反応すると蛍光を発するようになる物質である lucigenin (Bis-N-methylacridinium) を最終濃度 25  $\mu\text{M}$  になるように注入し、15 分間の化学発光を測定した。なお、浸透圧は 3 M NaCl と同じであるがイオン種が異なる 3 M  $\text{LiNO}_3$  についても同様に検討を加えた。

## 2. 2 実験2

### 【動物】

5-6 週齢の Dahl S および R ラットを用い、実験 1 と同様の飼育条件で正常 (0.3%) および高 (8.0%) 食塩食を 4 週間投与した。また、一部の食塩負荷 Dahl S ラットに対して hydralazine (4 mg/ml 飲水) を投与し降圧の影響をみた。すべての動物実験手技は東京大学医学部動物実験に関する倫理委員会の理念および日本生理学会の指針 (日本生理学会) に従った。

### 【麻酔ラットにおける脳室内投与】

血圧・HR・RSNA の記録は、神経活動電位を腎神経から測定した以外は実験 1 とほぼ同様である。ウレタン麻酔下に、気管にカニューレーションを行い、人工呼吸器に接続し、実験が終了するまで酸素を 50% 程度補充した空気で換気し、呼吸終末  $\text{PCO}_2$  が 3-5% になるように 1 回換気量と換気頻度を調節した。右大腿動脈にカテーテルを挿入し、血圧を記録した。右大腿静脈にカテーテルを挿入し、非動化のために実験期間中すべてにわたり筋弛緩剤をインフュージョンポンプにて持続注入した。薬物を側脳室に投与するため、頭蓋骨を露出し当該の部位に穴を開けガイドカテーテルを刺入し、歯科用セメントで固定した。ラットを腹臥位にし、頭部を脳定位固定装置に固定し、後腹腔アプローチにて、腎神経に同定した。その遠位発火を記録するため、神経を剥離し銀線双極電極上に留置した。電極をアンプに接続し、増幅された信号を連続的にオシロスコープ上に表示した。複合的な神経発火を全波整流し、10 秒毎に積分した。手術および測定実験中、ラットを保温台に乗せ直腸に温度計を挿入し、体温測定維持装置により体温を 36.5-37.5°C に保温した。以上の手術が終了した後、少なくとも 30 分以上マウスの安定を待ち、測定・記録を開始した。MAP、HR、RSNA および呼吸の各波形は、ポリグラフに表示するとともに、コンピュータに取り込み、波形解析用ソフトウェアを用いて平均値およびピーク値を算出した。実験終了後には、側脳室内に設置したカテーテルから色素 (2% エバンスブルー) を投与し、全例において色素が脳室内に分布しており脳実質内にカテーテル先端が留まっていないことを確認した。

### 【実験プロトコール】

麻酔ラットにおける薬物側脳室投与: 側脳室に固定したカテーテルからインフュージョンポンプを用いて、人工脳脊髄液または抗酸化剤である tempol (20 または 40  $\mu\text{mol}$ ) あるいは DPI (0.5  $\mu\text{mol}$ ) を、0.3  $\mu\text{l}/\text{min}$  の速度で 10 分間ず

つ低用量から順に側脳室内に投与し、MAP、HR、RSNA の変化を記録した。投与速度はマウスの脳脊髄液の産生速度(0.33  $\mu\text{l}/\text{min}$ )以内とした。MAP、HR、RSNA の変化の程度は、反応が最大に達した時の値をとり、基礎値と比較した時の変化率(%)を求めて検討した。

視床下部における活性酸素産生(NADPH oxidase 活性)の測定:0.2 ml の modified Krebs-Hepes buffer を測定チューブに入れ、その中にラット視床下部(33-47 mg)を浸し37°Cで10分間安定させた。その後、NADPH oxidase の基質であるNADPH(最終濃度 100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ )を加え、直ちにLumat LB9507(バルトールド社)で化学発光を30秒間測定し background とした。さらに30秒後に、ROS と反応すると蛍光を発するようになる物質である lucigenin (bis-N-methylacridinium)を最終濃度 25  $\mu\text{M}$  になるように注入し、化学発光を測定した。

NADPH oxidase subunits mRNA の測定(real time RT-PCR):単離視床下部における p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup> mRNA の発現を real time RT-PCR で既報(Nagase M, Fujita T, et al. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3438-3446)に従って測定した。プライマーは Applied Biosystems 社(東京)のものを用いた。

交感神経亢進の程度の評価:覚醒状態のラットに対して30 mg/kg の節遮断薬 hexamethonium を投与し、降圧反応を比較して、交感神経活性の指標とした。

### 2.3 データ解析と統計学的手法

MAP、HR、(R)SNA の変化の程度は、反応が最大に達した時の値をとり、基礎値と比較した時の変化率(%)を求めて検討した。得られたすべての値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。2群間の比較には Student's t-test にて評価を行った。用量反応関係のマウス4群間の比較には、統計処理ソフト Statview を用い、分散分析(Tukey-Kramer 法)を行った。統計値  $p < 0.05$  を統計学的に有意と定義した。

## 3. 研究結果

### 3.1 実験1

#### 【脳内 AM 含量】

普通食 AM(+/-)の脳 AM 含量は、既報(*FEBS Letters*. 1994; 352: 105-108)のラットのデータとほぼ同様の値であった。しかし、高食塩食 AM(+/-)では高食塩食 AM(+/-)に比較し有意に少なかった( $p < 0.05$ )。

#### 【麻酔下における高張食塩水側脳室投与】

MAP と HR の基礎値には4群マウス間に有意差を認め

なかった。普通食マウスでは、高張食塩水投与により血圧は用量依存性に上昇し、その上昇率は AM(+/-) (0.3 M:  $13.2 \pm 3.1\%$ , 1.5 M:  $22.0 \pm 2.7\%$ )と AM(+/-) (0.3 M:  $10.9 \pm 2.0\%$ , 1.5 M:  $19.1 \pm 3.1\%$ ) の間に有意差は認められなかった。高食塩食では、AM(+/-)における血圧上昇率(0.3 M:  $22.5 \pm 2.7\%$ , 1.5 M:  $35.5 \pm 5.7\%$ )は、AM(+/-) (0.3 M:  $13.2 \pm 1.2\%$ , 1.5 M:  $20.0 \pm 2.1\%$ )よりも有意に大きかった( $p < 0.05$ )。高食塩食 AM(+/-)における血圧の用量反応曲線は他の3群と比較し有意に上方にシフトしていた。血圧と同様、高張食塩水投与により交感神経活動も用量依存性に上昇した。その上昇率は、普通食マウスでは AM(+/-) (0.3 M:  $13.7 \pm 2.2\%$ , 1.5 M:  $18.7 \pm 3.8\%$ )と AM(+/-) (0.3 M:  $13.5 \pm 1.2\%$ , 1.5 M:  $16.5 \pm 2.3\%$ )の間に有意差は認められなかったが、高食塩食では、AM(+/-)における上昇率(0.3 M:  $25.6 \pm 3.9\%$ , 1.5 M:  $30.3 \pm 4.8\%$ )は、AM(+/-) (0.3 M:  $14.0 \pm 0.9\%$ , 1.5 M:  $15.9 \pm 1.5\%$ )よりも有意に大きかった( $p < 0.05$ )。高食塩食 AM(+/-)における SNA の用量反応曲線も、他の3群と比較し有意に上方にシフトしていた。心拍数の反応は個体差が大きく、各群間で有意差は認められなかった。

#### 【無麻酔無拘束下における高張食塩水側脳室投与】

無麻酔無拘束マウスでも血圧の基礎値には差がなく、血圧上昇反応も、麻酔下マウスと同様の結果が得られた。普通食マウスでは高張食塩水投与により、AM(+/-)、AM(+/-)いずれの血圧も用量依存性に上昇し、血圧上昇率が AM(+/-) (0.3 M:  $2.6 \pm 1.2\%$ , 1.5 M:  $9.2 \pm 1.3\%$ )、AM(+/-) (0.3 M:  $5.9 \pm 1.7\%$ , 1.5 M:  $16.9 \pm 2.9\%$ )と AM(+/-) で大きい傾向が認められたが、両群間で有意差は認められなかった。一方、高食塩食マウスでは、AM(+/-) (0.3 M:  $8.1 \pm 1.5\%$ , 1.5 M:  $11.3 \pm 0.9\%$ )に比較し AM(+/-) (0.3 M:  $15.7 \pm 2.0\%$ , 1.5 M:  $19.1 \pm 1.8\%$ )において、血圧上昇率が有意に大きかった( $p < 0.05$ )。用量反応曲線の全体として、高食塩食 AM(+/-)のみが他の3群と比較し有意に上方にシフトしていた。心拍数は個体差が大きく有意差は認められなかった。

#### 【Phenylephrine, sodium nitroprusside に対する反応】

Phenylephrine の静脈投与に対しては用量依存性に血圧上昇、sodium nitroprusside に対しては用量依存性血圧低下を認め、4群間で反応性に違いは認められなかった。

#### 【Tempol 前投与の影響】

3CPの前投与では、4群全てのマウスにおいて1.5 M 高張食塩水に対し MAP、SNA の上昇反応を示した。一方、

3CPと等量の tempol の前投与により、AM(+/)では普通食、高食塩食ともに 1.5 M 高張食塩水に対する MAP、SNA 上昇が抑制されたが( $p < 0.05$ )、AM(+/-)では抑制されなかった。AM(+/-)においても 3 M tempol 後には残存していた MAP・SNA 反応が、5 M tempol の前投与後にはほぼ完全に抑制された( $p < 0.05$ )。

#### 【視床下部の活性酸素産生能の測定】

まず、普通食 AM(+/)の視床下部に対し、1.5 M 高張食塩水を負荷した際の化学蛍光発光値を、生理食塩水又は 1.5 M LiNO<sub>3</sub> を負荷した際の化学蛍光発光値と比較検討した。生理食塩水負荷時と比較し高張食塩水負荷時の蛍光発光値は有意に高値であった( $p < 0.05$ )。高張食塩水と LiNO<sub>3</sub> との間にも同様に有意差が認められた( $p < 0.05$ )。次に、4 群マウスの視床下部に対し 1.5 M 高張食塩水を負荷した際の化学蛍光発光値を比較した。高食塩食 KO における高張食塩水負荷に対する酸化ストレス産生量は WT と比較して有意に大きい値が得られた( $p < 0.05$ )。

### 3.2 実験2

#### 【Tempol 脳室内投与】

食塩負荷により Dahl S ラットの血圧は著明に上昇したが、Dahl R ラットに血圧は変化しなかった。HR は全群間で差がなかった。Tempol 脳室内投与時により用量依存性の降圧、RSNA 低下、H 低下を認めた。降圧反応は Dahl S ラットでは食塩負荷により増強したが( $40 \mu\text{mol tempol}$ :  $-29.1 \pm 4.8\%$  vs.  $-10.6 \pm 3.3\%$ ;  $p < 0.01$ )、Dahl R ラットでは食塩負荷を行っても変化を認めなかった( $-9.6 \pm 1.7\%$  vs.  $-14.1 \pm 3.2\%$ )。RSNA 低下反応も同様で Dahl S ラットでは食塩負荷により増強したが ( $-18.7 \pm 2.0\%$  vs.  $-7.1 \pm 1.8\%$ ;  $p < 0.01$ )、Dahl R ラットでは変化しなかった ( $-6.7 \pm 2.5\%$  versus  $-8.0 \pm 0.7\%$ )。HR も同様であった (Dahl S ラット:  $-10.7 \pm 2.8\%$  vs  $-2.0 \pm 0.7\%$ ;  $p < 0.05$ 、Dahl R ラット:  $-3.0 \pm 1.9\%$  vs  $-6.0 \pm 3.1\%$ )。なお、Hydralazine 投与は食塩負荷 Dahl S ラットの tempol 脳室内投与に対する降圧、RSNA 低下、HR 低下の反応性に影響なく、血圧の変化自体がこのような結果を生じているのではないと考えられた。

#### 【DPI 脳室内投与】

DPI 脳室内投与は食塩負荷 Dahl S ラットでは降圧、RSNA 低下、HR 低下を認めたが、正常食塩食 Dahl S ラットではいずれも変化がなかった。

#### 【視床下部の NADPH oxidase 活性と mRNA 発現】

また、単離視床下部の NADPH 添加時の ROS 産生が食塩負荷 Dahl S ラットで他の群に比較して亢進しており、NADPH oxidase subunits である p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup> の mRNA の視床下部における発現も亢進していた。

#### 【Hexamethonium に対する反応】

Hexamethonium による降圧は食塩負荷 Dahl S ラットにおいて正常食 Dahl S ラットより著明であり、食塩負荷により交感神経亢進をきたすことが示唆された。

## 4. 考 察

### 4.1 実験 1

普通食に比較し高食塩食では、AM(+/)では有意に脳内 AM 含量は高値を示したが、AM(+/-)では有意な増加は認められなかった。そして、高食塩食の 2 群間で比較すると、高食塩食 AM(+/-)では高食塩食 WT に比較し有意な低値を示した。そこで、食塩負荷時の中枢性循環調節における脳内 AM の関与を探るため、各群マウスに高張食塩水の側脳室投与を行い、SNA、MAP、HR の反応を観察した(Fujita M, Fujita T, et al. *Hypertension* 2005; 45: 1165-1172)。高張食塩水投与前の各群マウス間の血圧、HR に有意差は認められなかったが、高張食塩水投与に対する SNA、MAP の上昇の程度は、いずれも高食塩食 AM(+/-)においてのみ、他の 3 群と比較し有意に大きかった。AM(+/-)における SNA ならびに血圧の上昇反応増強は、正常状態においては慢性高食塩食刺激によって脳内に増加した AM が、高張食塩水投与時の中枢性交感神経亢進に伴う血圧上昇反応に対し、抑制的に働いている可能性を示唆しており、AM(+/-)では脳内 AM の増加が不十分なためにこの抑制機構が十分働かず過大な交感神経亢進反応と血圧上昇が起こったものと考えられた。なお、phenylephrine、sodium nitroprusside の静脈投与に対する反応が 4 群間で差がなかったことから、高張食塩水側脳室投与時の反応の有意差が、末梢血管の反応性の相違に由来するものである可能性は否定的である。

AM(+/)において tempol を脳室内に前投与することにより、高張食塩水の側脳室投与に対する SNA、MAP の上昇がほぼ完全に抑制された。抗酸化作用の少ない構造類縁体である 3CP を前投与した場合には、前投与無しの場合と同様に、SNA と MAP を上昇させたことから、tempol

の非特異的毒性作用は否定できると考えられる。したがって、食塩負荷による中枢性交感神経亢進を介する血圧上昇反応に、酸化ストレスが関与している可能性が示唆された。本実験結果(Fujita M, Fujita T, et al. *Hypertension* 2005; 45: 1165-1172)は、高張食塩水投与という急性刺激の場合にも、酸化ストレスの増加を介してSNA、MAPが上昇することを初めて示したものである。さらに、AM(+/-)で同様の検討を行ったところ、AM(+++)で効果のあった量の tempol では、SNA、MAP の上昇反応は部分的に抑制されたのみであったが、より高用量の tempol では完全に抑制された。この結果から、AM(+/-)では高張食塩水側脳室投与によって、より多量の ROS が産生されている可能性が考えられた。この可能性を検証するため、lucigenin を用いた化学蛍光発光法によりマウス視床下部における ROS の産生量を測定した。高張食塩水負荷による ROS 産生量は、生理食塩水負荷時よりも有意に多く、食塩負荷により脳内で酸化ストレスが産生されることが確かめられた。そこで、高張食塩水負荷時の ROS 産生を 4 群のマウスで比較検討することにした。その結果、高食塩食 AM(+/-)における ROS 産生量は、AM(+++)よりも有意に大きく、AM が中枢において酸化ストレスの産生を抑制する働きを有する可能性が考えられた。AM の酸化ストレス抑制機序については本研究では検討を行っていないが、Shimosawa らの報告では AM(+/-)にアンジオテンシン II-食塩負荷を行った際に、冠動脈障害が増強するが、これにも酸化ストレスの関与が示されており、同部位における NADPH oxidase のコンポーネントである p67<sup>phox</sup> と gp91<sup>phox</sup> の発現の増強を伴っていた(Shimosawa T, Fujita T, et al. *Circulation*. 2002; 105: 106-111)。さらに、最近になって、ラット心臓虚血再灌流モデルで、AM の心保護効果は NADPH oxidase 活性抑制作用に基づくことが指摘され、一酸化窒素-cGMP 系を介した機序が関与している可能性が示唆されている。したがって、同様の機序が脳内においても関与している可能性が推測される。以上より、中枢神経系における NADPH oxidase を介した酸化ストレス亢進は交感神経活性を増強し、血圧上昇につながる可能性が推測された。

#### 4.2 実験2

実験 1 の結果を踏まえて、酸化ストレス亢進、交感神経活性亢進がよく知られている食塩感受性高血圧において脳内 NADPH oxidase 亢進に基づく ROS 増加が交感神経亢進を介して高血圧の発症・維持に関与している可能性

を検討した。その結果、食塩負荷を行なった Dahl S ラットでは脳室内に tempol または DPI を投与したときの MAP・SNA・HR の低下反応が亢進しており、しかも視床下部の NADPH oxidase の活性ならびに mRNA 発現が亢進していた(Fujita M, Fujita T, et al. 60th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research [San Antonio, Texas] P223, 2006 [abstract])。したがって、食塩負荷により Dahl S ラットでは中枢酸化ストレス増強に基づく交感神経系亢進が血圧上昇メカニズムに関与している可能性が推測された。しかも、食塩負荷で血圧上昇を生じない Dahl R においてはこれらの変化を認めなかった。したがって、食塩感受性高血圧においては脳内 NADPH oxidase 亢進に基づく ROS 増加が交感神経亢進を介して高血圧の発症・維持に関与しているものと考えられた。

このメカニズムについてはいくつかの可能性が推測される。食塩感受性高血圧では中枢においてレニン-アンジオテンシン系(RAS)が亢進してこれが交感神経系の中枢性刺激状態に関与しているかもしれない。実際、アンジオテンシンによる昇圧メカニズムとして ROS の関与を指摘する報告は多い。また、2型 11 $\beta$ hydroxysteroid dehydrogenase や上皮型ナトリウムチャンネルなども交感神経系興奮を引き起こす可能性が指摘されている。また、アディポサイトカインであるレプチンやレジスチンなども SNA 刺激状態に何らかの形で関与しているかもしれない。しかし、本研究ではこれらの因子の測定を行っていないので、現時点では結論はでない。

#### 5. 結論

脳内酸化ストレス亢進が中枢性に交感神経活性を刺激してその結果、血圧上昇を生じることが明らかになった。さらに、交感神経亢進・酸化ストレス亢進をその特徴の一つとする食塩感受性高血圧においては高血圧の発症・維持にこの中枢性の酸化ストレス亢進を介する交感神経活性増強が関与しているものと考えられた。

#### 6. 今後の課題

本研究と関連して、われわれは脂肪負荷肥満ラットにおいても脳内酸化ストレス亢進に基づく交感神経活性の増強が高血圧を生じる可能性を示唆する所見を得ている(Nagae A, Fujita T, et al. The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension [Fukuoka, Japan]

PO1-213. 2006 [abstract]). 実際、代謝異常と高血圧を伴う病態であるメタボリックシンドロームにおいては交感神経亢進や ROS 産生増強を認めることはよく知られている。さらに、われわれを含めたいくつかの施設から、食塩感受性高血圧がインスリン抵抗性を呈するという報告があり (*J Hypertens*. 2006; 24: 1627-1632, *J Hypertens* 1999; 17: 1229-1237, Ogihara T, Fujita T, et al. *Hypertension*. 2002; 40: 83-89)、脳内酸化ストレス亢進に基づく交感神経活性の増強がこれらに共通のメカニズムであるとしてもおかしくはない。今後は肥満モデルにおける検討を進める。さらに、肥満者やメタボリックシンドロームの患者は食塩感受性が亢進しているといわれているので、中枢におけるこれらの機序との関連を検討し、そのメカニズムについても検索していく予定である。

#### 業績

1. Ando K, Shimosawa T, Fujita T: Adrenomedullin in vascular diseases. *Cur Hypertens Rep* 2004; 6: 55-59.
2. Kawai J, Ando K, Tojo A, Shimosawa T, Takahashi K, Onozato ML, Yamasaki M, Ogita T, Nakaoka T, Fujita T: Endogenous adrenomedullin protects against vascular response to injury in mice. *Circulation* 2004; 109: 1147-1153.
3. Fujita T, Ando K: Salt, blood pressure, and kidney. In *Kidney and Blood Pressure Regulation*. ed by Suzuki H, Saruta T, Contrib Nephrol, Karger, Basel, 2004; 143: 16-31.
4. Matsui H, Shimosawa T, Itakura K, Guanqun X, Ando K, Fujita T: Adrenomedullin can protect against pulmonary vascular remodeling induced by hypoxia. *Circulation* 2004; 109: 2246-2251.
5. Xing G, Shimosawa T, Ogihara T, Matsui H, Itakura K, Xu Q, Asano T, Ando K, Fujita T: Angiotensin II-induced insulin resistance is enhanced in adrenomedullin deficient mice. *Endocrinology* 2004; 145: 3647-3651.
6. Ando K, Fujita T: Role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in the development of hypertensive organ damage. *Clin Exp Nephrol* 2004; 8: 178-182.
7. Shimosawa T, Takano K, Ando K, Fujita T: Magnesium inhibits norepinephrine overflow by blocking calcium channels at peripheral sympathetic nerve endings. *Hypertension* 2004; 44: 897-902.
8. Ando K, Takahashi K, Shibata S, Matui H, Fujita M, Shibagaki Y, Shimosawa T, Isshiki M, Fujita T: Two cases of renovascular hypertension and ischemic renal dysfunction: reliable choice of examinations and treatments. *Hypertens Res* 2004; 27: 985-992.
9. Maruyama N, Ishigami A, Kuramoto M, Handa S, Kubo S, Imasawa T, Seyama K, Shimosawa T, Kasahara Y, Fujita T: Senescence marker protein-30 knockout mouse as an aging model. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1019: 383-387.
10. Shimosawa T, Fujita T: Adrenomedullin and organ protection. *Jpn J Geriatr* 2004; 41: 141-149.
11. Isshiki, M., Mutoh, A., Fujita, T: Subcortical Ca<sup>2+</sup> waves sneaking under the plasma membrane in endothelial cells. *Circ Res* 2004; 95, e11-e21.
12. Fujita M, Kuwaki T, Ando K, Fujita T: Sympatho-inhibitory action of endogenous adrenomedullin through inhibition of oxidative stress in the brain. *Hypertension* 2005; 45: 1165-1172.
13. Ando K, Fujita T: Role of salt and potassium in hypertension and the associated organ damages. *Curr Hypertens Rev* 2005; 1: 183-187.
14. Shimosawa T, Ando K, Fujita T: Pleiotropic effect of adrenomedullin: Lessons from pure adrenomedullin knockout mice. In: *Adrenomedullin in Cardiovascular Disease*. Ed by Nishikimi T, New York, Springer 2005; 175-185.
15. Ono A, Fujita T: Predictors of controlled ambulatory blood pressure in treated hypertensive patients with uncontrolled office blood pressure. *Hypertens Res* 2005; 27: 805-811.
16. Ono A, Fujita T: Low-intensity anticoagulation for stroke prevention in elderly patients with atrial fibrillation: efficacy and safety in actual clinical practice. *Journal of Clinical Neuroscience* 2005; 12: 891-894.
17. Kido M, Ando K, Oba S, Fujita T: Renoprotective effect of pravastatin in salt-loaded Dahl salt-sensitive rats. *Hypertens Res* 2005; 28: 1009-1015.
18. Shimosawa T, Fujita T: Adrenomedullin and its related peptide. *Endocr J* 2005; 52: 1-10.

19. Shimosawa T, Fujita T: Adrenomedullin as a potent antioxidative and antiatherosclerotic substance. *Drug News Perspect* 2005; 18: 185-189.
20. Standridge JB, Sealey JE, Laragh JH, Houston MC, Gavras H, Johnson RJ, Blumenfeld JD, Brown M, Egan BM, Meltzer JI, Shimosawa T, Fujita T: A free-ranging roundtable discussion on hypertension. *J Hum Hypertens* 2005; 19: 259-266.
21. Kushiyama A, Shojima N, Ogihara T, Inukai K, Sakoda H, Fujishiro M, Fukushima Y, Anai M, Ono H, Horike N, Viana AY, Uchijima Y, Nishiyama K, Shimosawa T, Fujita T, Katagiri H, Oka Y, Kurihara H, Asano T: Resistin-like molecule beta activates MAPKs, suppresses insulin signaling in hepatocytes, and induces diabetes, hyperlipidemia, and fatty liver in transgenic mice on a high fat diet. *J Biol Chem.* 2005; 280: 42016-25.
22. Ando K, Fujita T: Control of morning blood pressure: The best preventive strategy against stroke. *Hypertens Res* 2006; 29: 555-556.
23. Matsui H, Shimosawa T, Uetake Y, Wang H, Ogura S, Kaneko T, Liu J, Ando K, Fujita T: Protective effect of potassium against the hypertensive cardiac dysfunction. *Hypertension.* 2006; 48: 225-231.
24. Ando K, Fujita T: Anti-diabetic effect of blockade of the renin-angiotensin system. *Diab Obes Metab* 2006; 8: 396-403.
25. Marumo T, Uchimura H, Hayashi M, Hishikawa K, Fujita T: Aldosterone impairs bone marrow-derived progenitor cell formation. *Hypertension* 2006; 48: 490-6.
26. Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N, Fukuda T, Sato T, Sekine K, Kato S, Isshiki M, Fujita T, Kobayashi M, Kawamura K, Masuda H, Kamiya A, Ando J: Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat Med* 2006; 12, 133-137.
27. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T: Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 2006; 444: 770-774.
28. Nagase M, Yoshida S, Shibata S, Nagase T, Gotoda T, Ando K, Fujita T: Enhanced aldosterone signaling in the early nephropathy of rats with metabolic syndrome: possible contribution of fat-derived factors. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 3438-3446.
29. Nagase M, Shibata S, Yoshida S, Nagase T, Gotoda T, Fujita T: Podocyte injury underlies the glomerulopathy of Dahl salt-hypertensive rats and is reversed by aldosterone blocker. *Hypertension* 2006; 47: 1084-93.
30. Shibata S, Nagase M, Fujita T: Fluvastatin ameliorates podocyte injury in proteinuric rats via modulation of excessive Rho signaling. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 754-764.
31. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawachi H, Fujita T: Podocyte as the target for aldosterone: roles of oxidative stress and Sgk1. *Hypertension* 2007; 49: 355-364.
34. Liu J, Shimosawa T, Matsui H, Meng F, Supowit SC, Dipette DJ, Ando K, Fujita T: Adrenomedullin inhibits angiotensin II-induced oxidative stress via Csk-mediated inhibition of Src activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292: H1714-H1721.



## Role of Oxidative Stress in Central Pressor Mechanism in Salt-Sensitive Hypertension

Toshiro Fujita, MD.

Department of Nephrology & Endocrinology, University of Tokyo, Graduate School of Medicine

### Summary

We have been proposed that the central sympathetic nervous system plays an important role of salt-sensitive hypertension. For example, the sympathetic nerve activity was enhanced in salt-sensitive hypertensive patients and rats, leading the suppressed renal sodium (Na) excretion, and resultant Na retention and hypertension. And then, we suggested that central sympathetic activation caused these abnormalities. Recently, several groups including us indicated that oxygen reactive species (ROS) generation was up-regulated in salt-sensitive hypertension, suggesting that ROS overproduction may contribute to its pathogenesis. Moreover, it has been reported that ROS may be related to blood pressure (BP) regulation through the sympathetic nervous system. We demonstrated that Intracerebroventricular hyperosmotic saline-induced increase in BP and sympathetic nerve activity were enhanced in salt-loaded adrenomedullin (AM) knockout mice, and these responses were inhibited with pretreatment of tempol, a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic. In addition, hypertonic saline increased ROS production, measured by the lucigenin chemiluminescence method, in the isolated hypothalamus and this response was greater in salt-loaded AM knockout mice than in salt-loaded wild-type ones. Because AM is considered to be an intrinsic antioxidant, endogenous AM in the brain may inhibit sympathetic activation through its antioxidant action. Thus, we examined the role of ROS in central sympathetic activation of salt-sensitive hypertensive animal models, Dahl salt-sensitive (S) rats. Intracerebroventricular injection of tempol decreased BP and renal sympathetic nerve activity in salt-loaded and non-salt-loaded Dahl S rats but this extent was greater in salt-loaded Dahl S rats. Intracerebroventricular injection of an NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium decreased BP and renal sympathetic nerve activity in salt-loaded Dahl S rats but did not in non-salt-loaded rats. Moreover, NADPH-induced ROS production from the isolated hypothalamus was increased in salt-loaded Dahl S rats. Moreover, the hypothalamic expression of NADPH oxidase subunits (p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup> and gp91<sup>phox</sup>) mRNA expression was enhanced in salt-loaded Dahl S rats. Therefore, central ROS overproduction may enhance sympathetic drive of BP regulation of salt-sensitive hypertension.

## 4. 食塩感受性における relaxin の関与の検討

池谷 直樹<sup>1</sup>, 高坂 哲也<sup>2</sup>, 鈴木 歩<sup>3</sup>, 小林 夏木<sup>3</sup>, 吉田 卓也<sup>3</sup>, 熊谷 裕通<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 静岡大学保健管理センター, <sup>2</sup> 静岡大学農学部応用生物化学科,

<sup>3</sup> 静岡県立大学食品栄養科学部臨床栄養科学科

**概要** 【目的】 Relaxin(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。これまでに我々は、RLXをDahl salt-sensitive(DS)ラットに投与することにより血圧低下を認めている。今回、食塩感受性におけるRLXの関与を明らかにするためにDSとDahl salt-resistant(DR)ラットの腎内RLXとその受容体の発現の比較と、RLXの高血圧性腎病変に対する影響、さらにDR群の内因性RLXを阻害した変化を検討した。

【方法】 Dahl salt-sensitive ラット(DS)、Dahl salt-resistant ラット(DR)に食塩負荷をしてDS群の一部にRLXを投与、DR群の一部に中和抗体を投与をして8週後に腎を摘出した。腎病変においてRLXのSingle stranded DNA(ss-DNA)、phosphorylated Smad2(pSmad2)の発現への影響を検討した。次にDS、DR群の腎においてRLXとRLX受容体(LGR7)のmRNAをRT-PCRで検討した。また、凍結標本にビオチン添加RLXの結合がみられるか検討した。

【結果】 RLX投与により、DS群の非投与群に比べて血圧低下、線維化の改善、apoptosisの減少、pSmad2の発現低下を認めた。DR群への中和抗体投与により、DRの非投与群に比べて血圧上昇傾向を認めた。RLXのmRNAはDS群で増加し、LGR7はDS群で軽度低下していた。また、凍結切片においてRLXの特異的な結合を認め、LGR7の分布と一致した。

【考察】 上記から、食塩感受性高血圧の発症に腎内RLX-RLX受容体が拮抗して関与していることが示唆された。

### 1. 研究の背景と目的

Relaxin (RLX)は、これまで妊娠、分娩、授乳に関する作用が知られてきたが、近年、多様な生理作用が報告されている<sup>1)</sup>。特に臓器の抗線維化ならびに血管拡張作用などが注目されている。食塩感受性高血圧は心拍出量と血管抵抗の両者の増大を伴う。一方、正常妊娠時には著明な心拍出量の増大にも関わらず、血管抵抗は減少し全身血圧は正常かむしろ低めとなる。その原因の一つとしてNovakらがRLXの関与を指摘している<sup>2)</sup>。我々は食塩感受性高血圧の発症やその治療にRLXが関与しうると仮定して、平成15年度当財団研究課題により、食塩感受性高血圧におけるRLXの関与を検討した。Dahl食塩感受性高血圧ラットに8%食塩負荷食を与え、RLXの投与を行い非投与群と比較した結果、有意な降圧効果を認めた。さらに非投与群で認めた尿管間質病変や動脈硬化性病変がRLX投与により有意な改善を認めた。今回の研究では食塩感受性高血圧におけるRLXの関与をさらに解明するために、①食塩感受性高血圧モデルにRLX投与を行い、組織の改善がみられた機序をapoptosisやTGF-β1活

性の観点から検討した。次に食塩負荷後の食塩感受性モデルと食塩抵抗性モデルにおけるRLXとRLX受容体の腎内mRNAの発現を比較した。さらにRLX受容体の蛋白発現部位の検討と結合実験を行った。②RLXの中和抗体を食塩抵抗性ラットに投与して内因性RLXの作用を阻害することにより血圧の変化や腎病変の変化の有無の検討を行った。

### 2. 研究方法

#### 2.1 RLX投与実験

##### 2.1.1 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、正常血圧対照として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。RLX を 0.5 mg/kg/day の濃度で持続投与するように注入し、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週間ごとに尻尾で測定を行った。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、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した。右腎臓は凍結して mRNA 解析や結合実験に用いた。

## 2. 1. 2 免疫組織学的検討

パラホルムアルデヒド固定した組織を薄切して免疫染色を行った。使用した抗体は、一次抗体として Apoptosis の検出の為に single stranded DNA (ss-DNA) 抗体 (Dako, Kyoto)、細胞外基質産生の強力な促進物質である TGF- $\beta$  の活性の指標である phosphorylated Smad2 (pSmad2) 抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、RLX の受容体である抗 LGR7 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 (Millipore, Billerica, MA) で、それぞれ適宜希釈して使用した。免疫組織学的染色は ABC 法によった。

陽性の場合に核が染色される ss-DNA、pSmad2 抗体は皮質、髄質に分けて陽性細胞数をカウントして RLX 投与群と非投与群を比較した。RLX の受容体である LGR7 は、定性的に局在を観察した。

更に Apoptosis の検出の為にパラホルム固定の標本に対して、Apoptag Peroxidase In Situ Detection Kit (Chemicon) を用いた。Apoptosis 陽性細胞を皮質、髄質に分けてカウントして比較した。

## 2. 1. 3 RLX と RLX 受容体発現の検討

### 2. 1. 3. 1 mRNA の検討

#### RT-PCR 方法

摘出した腎臓は髄質と皮質に分けて RNeasy RNA Stabilization Reagent (QIAGEN, Tokyo, Japan) に入れ、-20°C で保存した。Total RNA は RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。抽出した Total RNA から cDNA を合成した。PCR は LGR7 cDNA (PCR product: 731b.p.)、RLX-1 cDNA (PCR product: 349b.p.)、GAPDH cDNA (PCR product 190b.p.) の熱変性、アニーリング、伸長反応の温度及び時間はそれぞれ LGR7 (94°C, 30 秒、58°C, 30 秒、72°C, 30 秒)、RLX-1 (94°C, 30 秒、

56°C, 30 秒、72°C, 30 秒)、GAPDH (94°C, 15 秒、58°C, 30 秒、72°C, 30 秒) で行った。増幅サイクル数は LGR7 と RLX-1 は 35 サイクル、GAPDH は 25 サイクルで行った。増幅後、各 PCR 産物を電気泳動により DNA の分離を行った。電気泳動の後、ゲルは TAE buffer で 10,000 倍希釈した SYBR GreenI (Cambrex Bio Science Rockland Inc., ME, USA) に遮光下で 30 分間浸けて蛍光染色した。蛍光染色したゲルは Pharos FX (Bio-Rad) を用いてスキャンし、イメージ解析を行った。LGR7 と RLX-1 の結果は内部標準である GAPDH で補正した。陽性コントロールとして妊娠ラットの卵巣をそれぞれ用いた。

## 2. 1. 4 In situ binding study

RLX 受容体の免疫組織学的検討の他に、実際に腎臓に RLX が結合するかを確認するために、凍結切片上でのビオチン標識 RLX の結合実験を行った。方法は Kohsaka らの方法によった<sup>2)</sup>。凍結組織は厚さ 6 microm に切り、スライドに貼付し、アセトン固定後に、ビオチン標識 porcine relaxin を 1 microg/mL にて滴下し、室温で一晩インキュベーションした。洗浄後に、5 nm コロイド金を標識した anti-biotin IgG (コスモバイオ) をスライドに滴下し室温で 1 時間インキュベーションした。さらに洗浄後に、Silver Enhancer によりシグナル増幅を行った。

さらに、上記で見られた結合が特異的結合か明らかにするために、過剰量の RLX (250 microg/mL) を同時に添加して結合が影響されるかどうか検討した。

## 2. 2 中和抗体投与実験

### 2. 2. 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 DR 群と DR 群に RLX 中和抗体 (RLX-Ab) を投与した DR-RLX-Ab 群の 2 群に、高血圧対照群として DS 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% 食塩食開始後に DR ラットをランダムに DR 群と DR-RLX-Ab 群に分け、DR-RLX-Ab 群には RLX-Ab (Kohsaka et al.<sup>3)</sup>) を週 3 回静脈注射した。収縮期血圧は 0、3、8、30 日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、週一回、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。30 日には、ラットを麻酔下で開腹し、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. 2. 2 生化学的検討

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

### 2. 2. 3 組織学的検討

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  $\mu\text{m}$  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。糸球体、尿細管間質の組織病変をそれぞれ検討した。メチルカルノア溶液で固定した組織で thrombomodulin 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 nNOS の染色を行った。使用した抗体は、一次抗体として抗 thrombomodulin 抗体(a gift from M. Nakano, Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., Niigata, Japan)、抗 nNOS 抗体(Transduction, Lexington, KY)を用いて免疫組織学的染色は ABC 法によった<sup>4)</sup>。Thrombomodulin は、糸球体病変ではその陽性毛細血管数を 30 糸球体で、尿細管間質領域では顕微鏡 20 視野(400 倍, 1 視野 = 0.16  $\text{mm}^2$ )の陽性毛細血管数をカウントした。nNOS 陽性細胞は 30 糸球体あたりの陽性細胞数をカウントした。

### 2. 3 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。

## 3. 研究結果

### 3. 1 RLX 投与実験

#### 3. 1. 1 RLX 投与による apoptosis と TGF- $\beta$ 活性の変化

apoptosis に関して Tunel 法と single-stranded DNA 抗体を用いて検討した。結果を図 1 に示す。DS 群では apoptosis が広範囲に認められ、特に皮質の深部と髓質の尿細管細胞に多く認めた。一方、DR 群では皮質、髓質ともに陽性細胞は DR 群に比し減少していた。DS ラットに RLX 投与した群では、Tunel 法では減少傾向を示し、

apoptosis に対してより感度の高い検出法とされる ss-DNA 抗体染色では有意な減少が非投与群に比べて認められた。TGF- $\beta$ 活性をみるために pSmad2 抗体を検討したが、DS 群では DR 群に比べて有意に皮質、髓質共に陽性細胞が増加していた。陽性細胞は尿細管細胞で認められ、一部糸球体、間質にも認めた。DS ラットに RLX を投与した群では有意に陽性細胞の減少を認め、TGF- $\beta$ 活性の減少が明らかになった(図 2)。

#### 3. 1. 2 RLX, RLX 受容体発現の検討

RLX とその受容体の mRNA の発現の結果を腎を皮質、髓質に分けて図 3 と図 4 に示す。RLX の発現は皮質において DS 群が DR 群に比べて増加していた。髓質においては低い傾向を示したが有意な差ではなかった。一方、RLX 受容体の LGR7 は髓質において DR 群が DS 群に比べて増加していたが、軽度の変化であった。

#### 3. 1. 3 LGR7 免疫染色

LGR7 染色の写真を図 5 に示す。RLX の受容体である LGR7 は血管内皮細胞、糸球体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。各群間での差は明らかではなかった。

#### 3. 1. 4 In situ binding study

食塩感受性ラットの染色結果を図 6 に示す。RLX の結合部位は血管内皮、血管平滑筋、さらに遠位尿細管に認められた。また糸球体内にも弱く結合が認められた。ビオチン添加 RLX のみの結合に比べ、過剰量の RLX を添加すると結合が弱くなっており、RLX の特異的な結合であることが示された。

### 3. 2 RLX 中和抗体投与における検討

#### 3. 2. 1 体重、血圧等の変化

表 1 に 3 群のデータを示した。DS 群が体重は 30 日で有意に高値を示した。また DR 群と DR-RLX-Ab 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低値傾向であったが有意ではなかった。図 7 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。それぞれ上昇傾向を示したが、DS 群は有意に DR 群に比べて収縮期血圧の上昇を認めた。それに対して、DR-RLX-Ab 群では抗体投与直後から血圧の上昇傾向を示し、DS 群と有意の差を認めなくなっていた。

#### 3. 2. 2 生化学的検討

生化学的検査の結果は表 1 に示した。3 群の血中クレアチニン濃度ならびに尿中クレアチニン排泄量はそれぞれ

れ有意な差は認めなかった。DS 群の尿中総蛋白排泄量は DR 群に比して上昇していたが有意な差は認めなかった。

### 3. 2. 3 組織学的検討

#### 3. 2. 3. 1 組織染色

食塩負荷後 30 日では DS ラットでは糸球体、尿細管間質の変化ならびに動脈硬化病変は軽度であった。これに対し、DR ラット群と DR ラットに RLX 抗体を投与した群では通常の観察では組織変化は殆ど見られなかった。nNOS は糸球体近傍の macula densa に発現を認め、表 1 に示すように nNOS 陽性細胞は有意に DR ラットで DS ラットに比べて増加していた。DR ラットに RLX 抗体を投与した群では、有意に DR ラットに比べて減少を示した。Thrombomodulin 陽性血管は DS ラットにおいて DR ラットに比べて糸球体毛細血管と尿細管間質毛細血管において有意に減少していた。RLX 抗体を投与した DR ラットでは thrombomodulin 陽性血管は減少しており、糸球体毛細血管で有意な差をみせた。

## 4. 考 察

今回の研究で食塩感受性における RLX の関与を検討した結果、以下の新たな事実を認めた。第一には RLX が apoptosis の抑制と TGF- $\beta$ 1 の抑制を介して腎臓の線維化の抑制をしていることが示唆された。第二に RLX は腎臓内で産生され、その受容体も存在することから、病変の進展に腎内に RLX-RLX 受容体経路が存在し、臓器線維化の進展に拮抗しうることが示された。

今回、RLX の腎臓病変改善の機序として、apoptosis と TGF- $\beta$ 1 の活性化に関して焦点を当てた。近年、apoptosis は臓器の線維化として重要であることが注目されており、また RLX には apoptosis の抑制作用があることが心臓などの他の臓器の検討で報告されている<sup>5)</sup>。さらに食塩感受性高血圧の進展に apoptosis が関与していることが報告されている<sup>6)</sup>。食塩感受性高血圧による腎症において apoptosis は糸球体、尿細管において増加していたが、RLX 投与により、有意な抑制が認められた。また TGF- $\beta$ 1 は強力な線維化促進物質であり、pSmad2 は TGF- $\beta$ 1 シグナル伝達が活性化された際に認め、腎臓の線維化の際には pSmad2 が増加する。一方、RLX には *in vitro* において腎臓の線維芽細胞における pSmad2 の発現を抑制するという報告がある<sup>7)</sup>。食塩感受性高血圧において TGF- $\beta$ 1 が亢進しており<sup>8)</sup>、中和抗体を投与すると血圧の降下、間

質の線維化の抑制が報告されている<sup>9)</sup>。今回、食塩感受性高血圧による腎症において pSmad2 は有意に増加しており、これまでの結果と一致していた。さらに RLX 投与により有意な減少を認めた。RLX mRNA 発現の増加が DS 群で認められたことは、理由は不明であるが、病変の進行に拮抗して臓器内で増加したことも考えられる。病変のおこった腎では、RLX が相対的不足の状態でありさらに外的に投与することにより改善を認めたと推測される。上記の結果は、食塩感受性高血圧や他の腎症による線維化に対する今後の RLX 治療に対する理論的バックグラウンドとなりうる。

次に食塩抵抗性ラットに RLX 中和抗体を投与することにより、血圧は上昇傾向を示し、DR 群で DS 群に比べて有意に低値であったものが DS 群と比較して有意な差が認められなくなった。一方、血圧の上昇度は DR 群と比べては有意ではなかった。食塩感受性高血圧の原因は単一ではなく様々な因子が指摘されている。今回、RLX 中和抗体投与による血圧の上昇が軽度であったことは、食塩感受性高血圧の発症に種々の原因が関与していることを示していると考えられる。また今回の検討では雄性ラットを用いているが、より RLX が高い血中濃度を示す雌性ラットを用いれば顕著な差が出たのかもしれない。今回、通常の PAS 染色では DR ラットにおいて抗体の投与により大きな違いは認められなかった。しかし、より詳細に免疫学的染色で検討した結果、thrombomodulin の染色では DS ラットならびに DR ラットに RLX 中和抗体を投与した群の腎では DR ラットに比べて有意な減少を認めた。thrombomodulin は正常機能を有する内皮細胞に発現する蛋白質で血小板凝集阻害など凝固抑制に働く内皮細胞機能に関与している。昨年度の検討では RLX 投与により腎内 thrombomodulin の発現増加が見られたことから、RLX による thrombomodulin 発現の調節が示された。今回の結果は RLX による血管内皮細胞機能の調節が示唆され、より長期に観察していけば RLX 抗体投与群で血圧上昇や腎組織障害の進行を認める可能性を示している。nNOS はこれまでの報告のように DS ラットでは DR ラットに比べて発現の減少が認められた<sup>10)</sup>。これまでの結果では、RLX 投与により nNOS 発現は増加していた。nNOS 発現の上昇していた DR 群に RLX 中和抗体の投与により、予想通りに nNOS 発現の減少が示された。このことは RLX が nNOS 発現を調節していることを示し、RLX の血圧低下作用が nNOS を介した作用であることを示唆している。

以上の結果から、食塩感受性高血圧の進展に RLX が腎内で拮抗している可能性、RLX の投与が有効であること、食塩抵抗性の維持に RLX が関与していることが示された。今回の検討は、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。

## 5. 今後の課題

腎内で RLX が発現して作用していること、尿細管で受容体が発現していることから、RLX の全身動態を検討する必要がある。現在、血液中、尿中濃度、食塩負荷に対する RLX の反応などを現在検討中である。今後、動物実験で雌雄別での RLX 投与や RLX 阻害の検討を考えていきたい。また、RLX のヒトでの関与を明らかにするために、これまで女性の閉経後の高血圧有病率の上昇には estrogen などが指摘されてきたが、閉経前後での血圧の変化と RLX の濃度の変化を estrogen とともに検討することは意味があると思われる。

また、臓器線維化に至るメカニズムとして apoptosis や TGF- $\beta$  に注目をあてて検討して有意な所見が得られた。これらが活性化する原因が何であるか、RLX が改善させる機序が何かさらに明らかにする必要がある。現時点では低酸素が関与していることを想定している。低酸素と RLX の関わり等を中心に研究を続けていく予定である。

## 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。

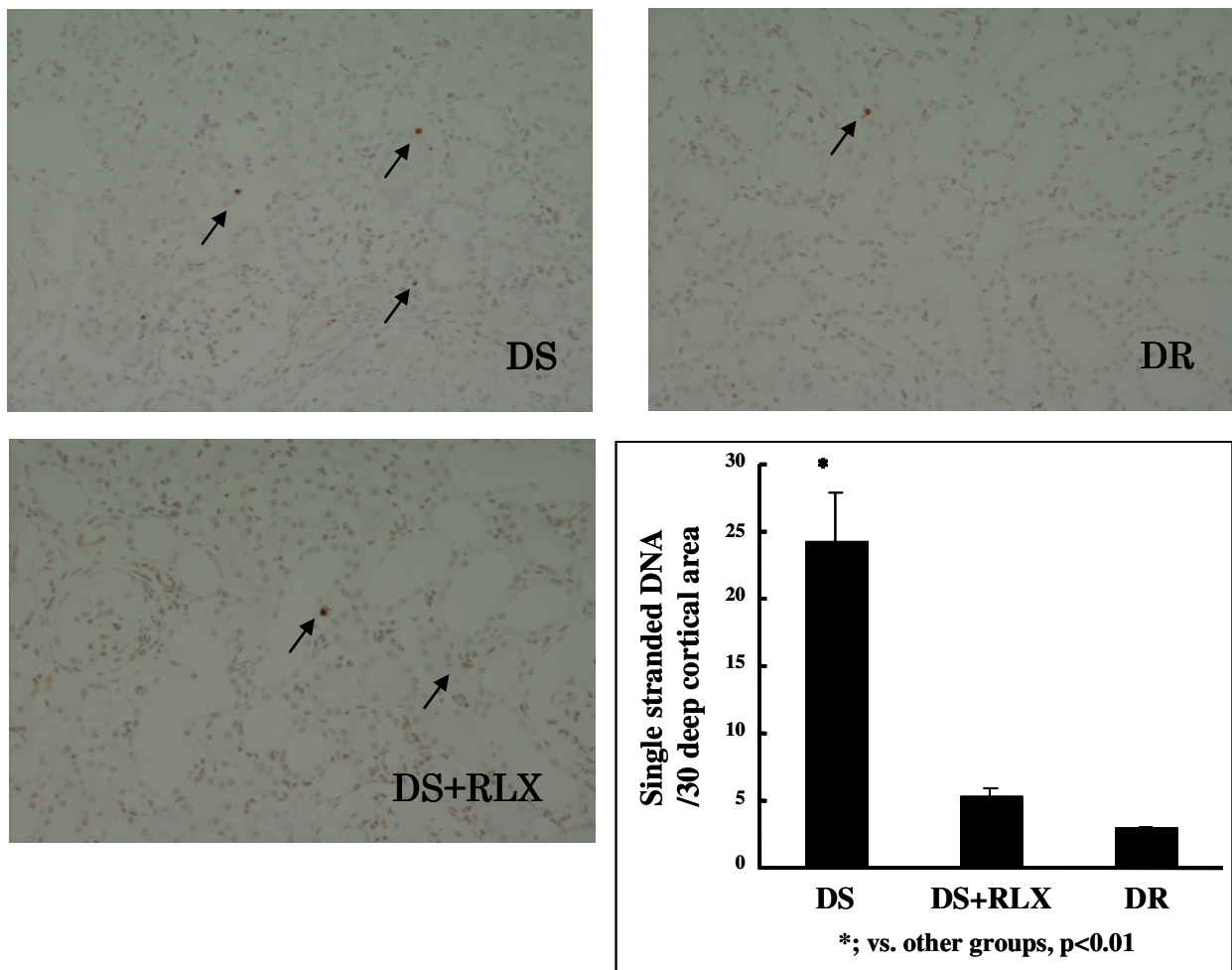
## 文 献

1. Sherwood OD. Relaxin's physiological roles and other diverse actions, *Endocr Rev.* 25: 205-34, 2004
2. 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.* 107: 1469-75, 2001
3. 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
4. Kumagai H, Katoh S, Hirokawa K, Kimura M, Hishida A, Ikegaya N. Renal tubulointerstitial injury in weanling rats with hyperhomocysteinemia. *Kidney Int.* 62: 1219-28, 2002
5. Bani D, Nistri S, Sacchi TB, Bigazzi M. Basic progress and future therapeutic perspectives of relaxin in ischemic heart disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1041: 423-30, 2005
6. Ying WZ, Wang PX, Sanders PW. Induction of apoptosis during development of hypertensive nephrosclerosis. *Kidney Int.* 58: 2007-17, 2000
7. Tamaki K, Okuda S, Nakayama M, Yanagida T, Fujishima M. Transforming growth factor-beta 1 in hypertensive renal injury in Dahl salt-sensitive rats. *J Am Soc Nephrol.* 7: 2578-89, 1996.
8. Dahly AJ, Hoagland KM, Flasch AK, Jha S, Ledbetter SR, Roman RJ. Antihypertensive effects of chronic anti-TGF-beta antibody therapy in Dahl S rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283: R757-67, 2002.
9. Heeg MH, Koziolok MJ, Vasko R, Schaefer L, Sharma K, Muller GA, Strutz F. The antifibrotic effects of relaxin in human renal fibroblasts are mediated in part by inhibition of the Smad2 pathway. *Kidney Int.* 68: 96-109, 2005.
10. Castrop H, Kurtz A. Differential nNOS gene expression in salt-sensitive and salt-resistant Dahl rats. *J Hypertens.* 19: 1223-31, 2001

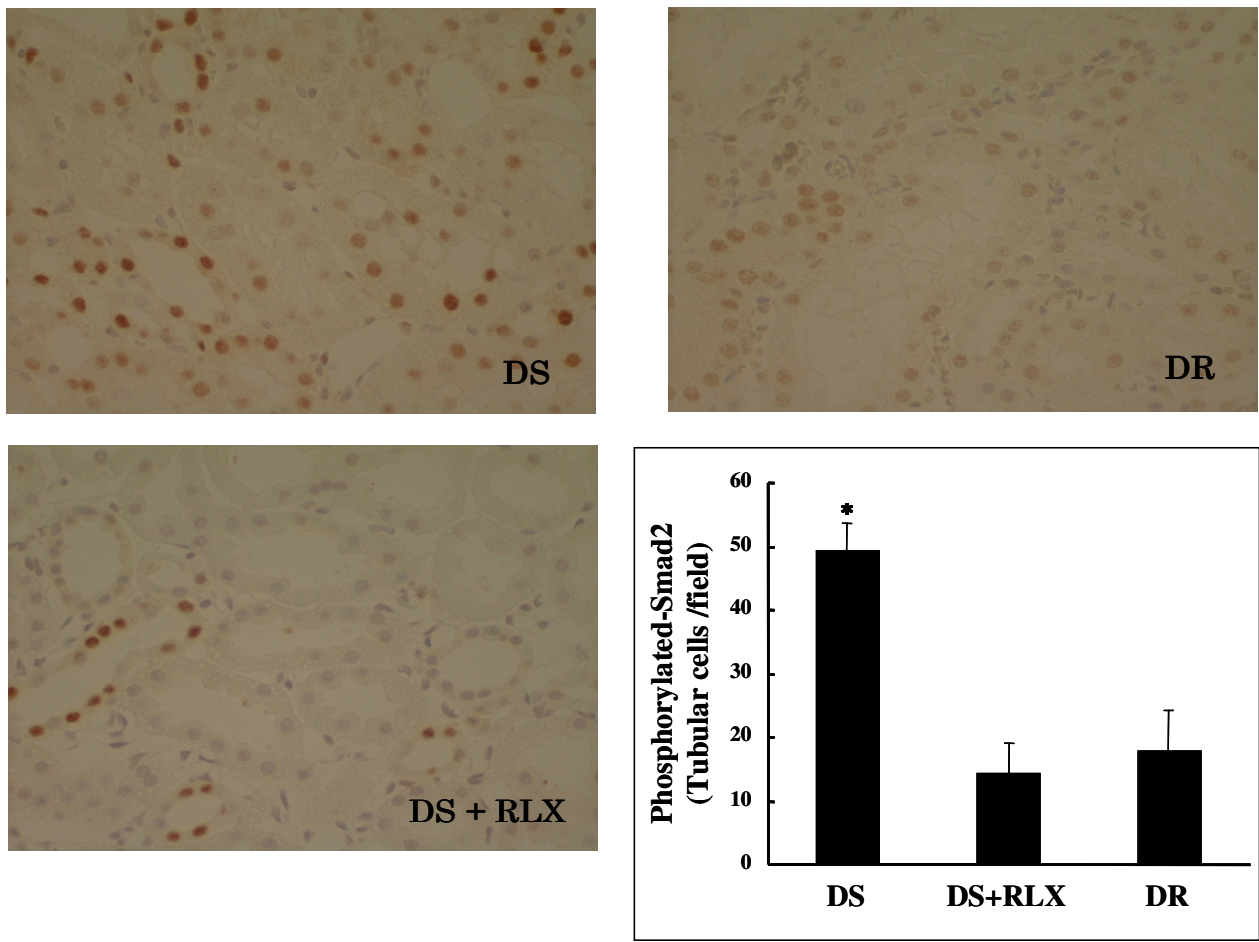
**Table 1. Results at 30 days**

Groups	DS	DR	DR+RLX-Ab
number	5	5	5
Body weight (g)	363.5 ± 17.0	311.0 ± 36.8 <sup>a</sup>	313.5 ± 8.2 <sup>a</sup>
Kidney weight (g)	1.39 ± 0.05	1.60 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.58 ± 0.18 <sup>a</sup>
Blood pressure (mmHg)	146.8 ± 16.2	125.6 ± 5.9 <sup>a</sup>	137.8 ± 6.3
Pulse (/min)	343 ± 11.4	345 ± 13.1	348 ± 11.3
Serum creatinine (mg/dl)	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.1
Urinary creatinine (mg/day)	12.4 ± 1.8	10.5 ± 2.1	11.0 ± 2.4
Urinary protein (mg/day)	68.6 ± 22.3	39.5 ± 21.7	38 ± 9.9
nNOS positive cells (/30 glomeruli)	8.0 ± 0.7	14.3 ± 1.6 <sup>a</sup>	10.3 ± 2.1 <sup>a,b</sup>
Tubulointerstitial thrombomodulin positive vessels (/20 fields)	195.0 ± 106.0	475 ± 84.3 <sup>a</sup>	377.3 ± 89.8 <sup>a</sup>
Glomerular thrombomodulin positive vessels (/30 glomeruli)	166 ± 33.0	326.0 ± 43.7 <sup>a</sup>	237.5 ± 53.8 <sup>a,b</sup>

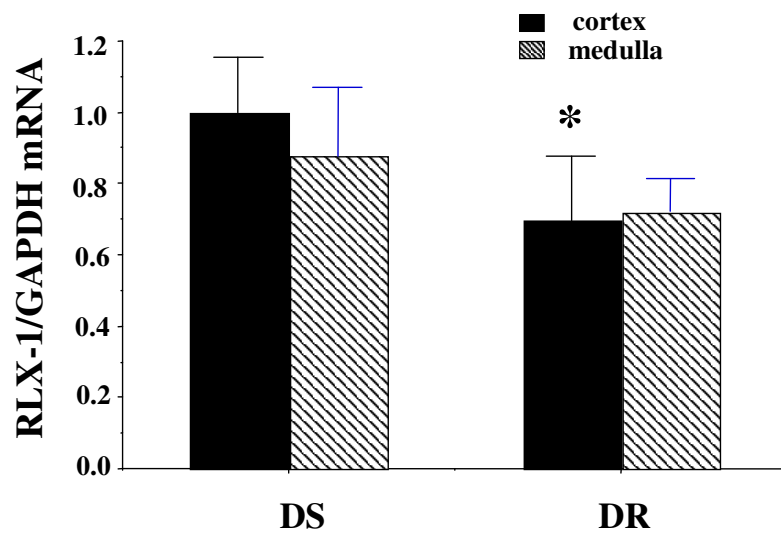
a; p < 0.05 vs. DS group, b; P < 0.05 vs. DR group.



**Figure 1. Expression of single stranded DNA.** Increased expression of single stranded DNA (ss-DNA) was found in DS rats compared to those of DR rats. RLX treatment significantly decreased expression of ss-DNA.

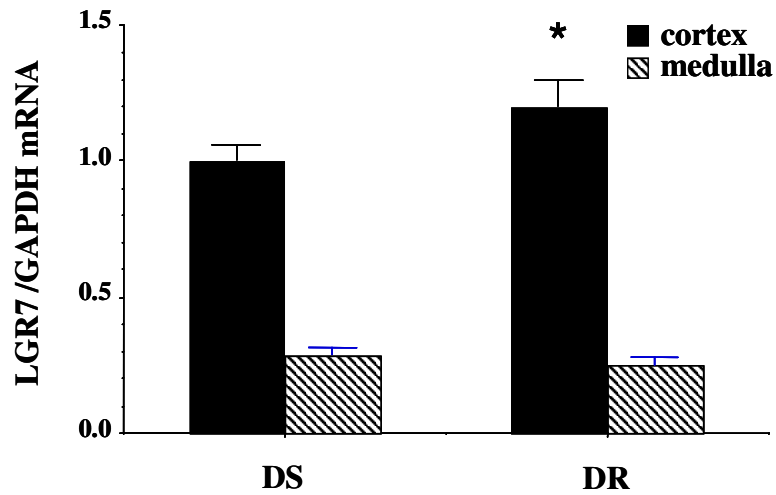


**Figure 2. Expression of Phosphorylated Smad2(pSmad2).** Increased expression of pSmad2 was observed in tubular cells in DS rats compared to those of DR rats. RLX administration significantly decreased pSmad2 expression in DS rats.

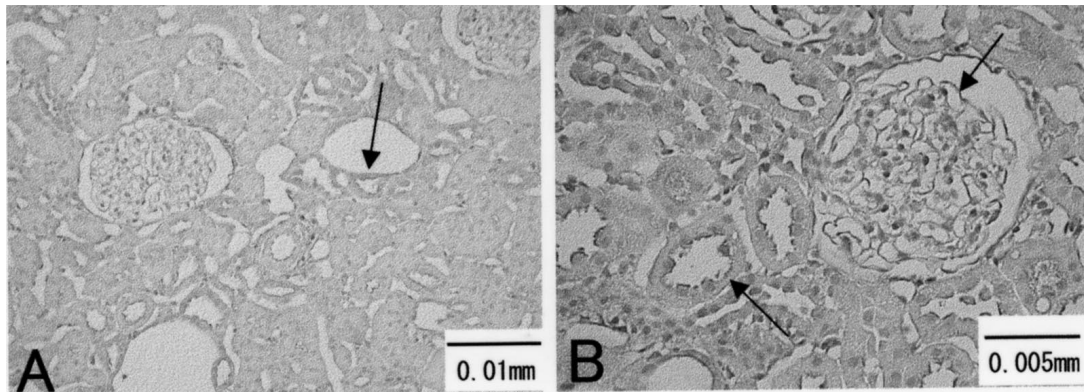


**Figure 3. Expression of RLX mRNA.** Increased expression of RLX mRNA was found in the cortex of DS rats compared to DR rats. \*,  $p < 0.05$  vs. DS rats.

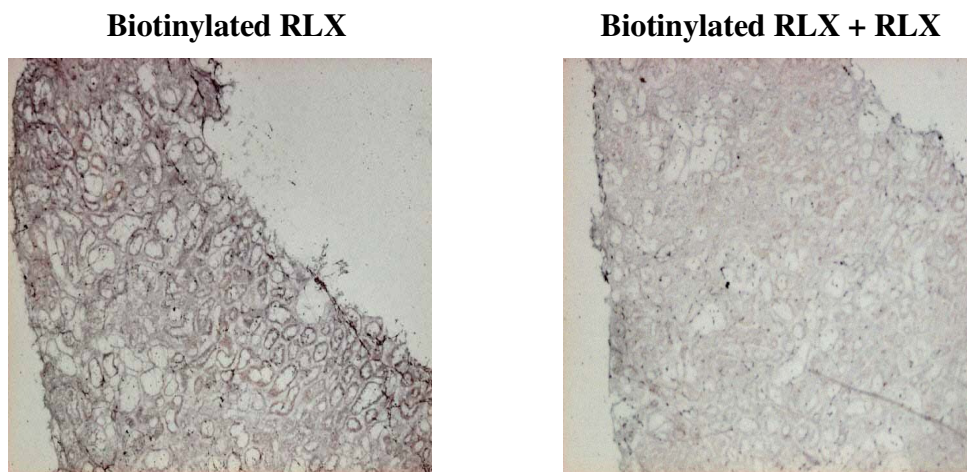




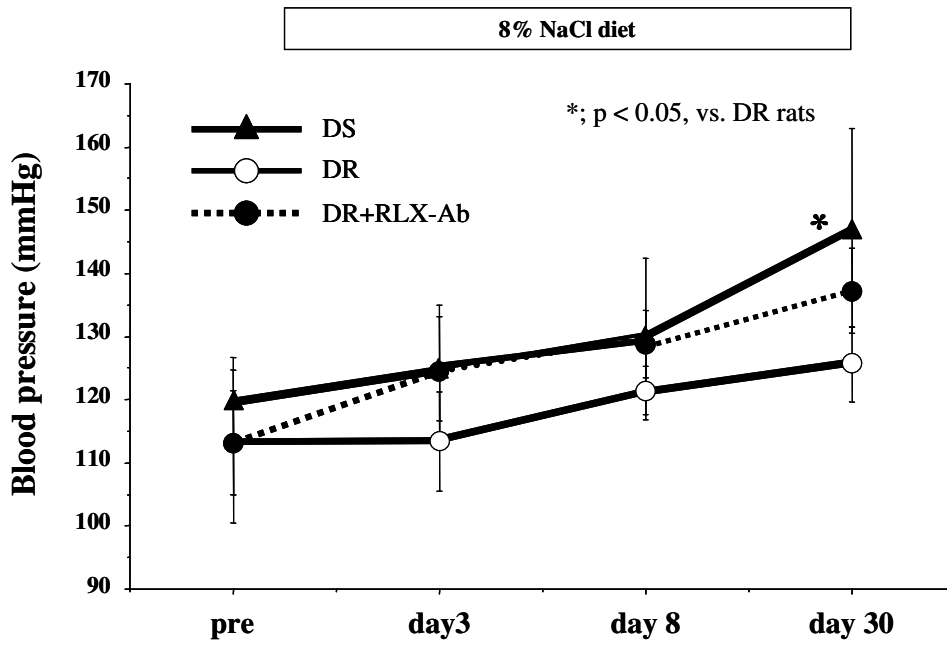
**Figure 4. Expression of LGR7 mRNA.** Slightly increased expression of LGR7 mRNA in the cortex was observed in DR rats compared to DS rats. \*;  $p < 0.05$  vs. DS rats.



**Figure 5. Expression of LGR7.** LGR7 expression was observed in vascular endothelial cells, luminal side of tubular cells, and glomeruli.



**Figure 6. In situ binding study.** The binding of biotinylated RLX was observed in kidney sections. Addition of larger amounts of non-labelled RLX made binding weaker compared to that of only biotinylated RLX.



**Figure 7. Changes in blood pressure.** DS rats showed significant elevation of systolic blood pressure compared to DR rats after salt loading. DR rats receiving RLX antibody showed no significant difference from DS rats unlike DR rats not receiving antibody.

## Involvement of Relaxin in Salt-Sensitive Hypertension

Naoki Ikegaya<sup>1</sup>, Tetsuya Kohsaka<sup>2</sup>,  
Hiromichi Kumagai<sup>3</sup>, Ayumi Suzuki<sup>3</sup>, Natsuki Kobayashi<sup>3</sup>, Takuya Yoshida<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Med. Care Center, Shizuoka Univ., <sup>2</sup>Dept. of Applied Biological Sciences, Shizuoka Univ.,  
<sup>3</sup>Dept. of Clin. Nutrition, Sch. of Nutritional Science, Univ. of Shizuoka, Shizuoka, Japan.

### Summary

Although potent anti-fibrotic and vasodilatory properties of relaxin(RLX) are recently reported, the involvement in salt-sensitive hypertension has not been elucidated. Since anti-fibrotic effects of RLX were observed in salt-sensitive hypertensive kidneys, we examined renal RLX-receptor in the kidney of Dahl salt-sensitive (DS) and Dahl salt-resistant (DR) rat. Specific binding of RLX in kidneys was observed and the binding sites of RLX were similar to LGR-7 (RLX receptor) immunostaining. Next, we examined RLX and RLX receptor (LGR7) mRNA in kidneys of Dahl salt-sensitive (DS) and Dahl salt-resistant (DR) rats by RT-PCR. DS rats showed an increased expression of RLX mRNA in the cortex compared to DR rats. LGR7 mRNA was slightly decreased in DS rats compared to DR rats. Then, we examined effects of RLX treatment on apoptosis and TGF- $\beta$  activation in DS and DR rats placed on an 8% NaCl diet. The administration of RLX (4 microg/h) to male DS rats for 8 weeks significantly reduced systolic blood pressure. Histologic studies revealed the amelioration of tubulointerstitial fibrosis (-21.8%), in rats received RLX. RLX-treated kidneys showed significantly decreased apoptosis (-40.8%), and phosphorylated Smad2 (-71.0%) expression in tubules compared to saline control. Finally, Since RLX is expressed in the kidney, we hypothesized that chronic inhibition of endogenous RLX turns salt-resistant into salt-sensitive in Dahl salt-resistant (DR) rats. DR rats with and without RLX neutralizing antibody and DS rats were placed on an 8% NaCl diet for 30 days. DR rats showed significantly lower blood pressure (125 mmHg) than DS rats (147 mmHg) on day 30. However, DR rats receiving RLX antibody showed an elevation of blood pressure (138 mmHg), which was not significantly different from the pressure of DS rats.

These results suggest the counterbalance of intrarenal RLX-RLX receptor axis in the progression of salt-sensitive hypertension and kidney fibrosis.

## 5. 食塩感受性を規定する遺伝的素因の解明

岩井 直温

国立循環器病センター研究所疫学部

**概要** 1) ダール食塩感受性ラットの素因遺伝子の探求: ダール及びルイスラットを掛け合わせ作成した F2 ラットにテレメトリーを埋め込み、400 余りのマーカーを用いて、QTL 解析を行った。染色体 1 番、10 番に食塩感受性収縮期血圧に影響を与える座位を同定した。マイクロアレーを用いた網羅的発現解析を併用することで、染色体 1 番の候補遺伝子は *Klk1*、染色体 10 番の候補遺伝子は *Ccl2* であることを確定した。染色体 1 番の QTL は幅広く、複数の素因遺伝子が存在すると考えられ、現在追求中である。

2) ゲノム疫学的方法による食塩感受性素因遺伝子の同定: 都市部の一般住民を対象とした吹田コホートを対象として、候補遺伝子法により、食塩感受性高血圧素因遺伝子の探求を行った。*SLC12A3* 遺伝子の機能喪失変異をホモに持つと、低カリウム性アルカローシス、低カルシウム尿、低マグネシウム血症、マイルドな細胞外液喪失症状を呈し、あたかもサイアザイド系利尿剤を服用しているかのような病態を示す。ジテルマン症候群と呼ばれている。ヘテロに持つ場合は、摂取食塩量を、無意識に増加させて代償していると報告されている。詳細なシーケンス解析により、吹田コホートに於いて、7 種類のジテルマン変異が存在することを確認し、これらを合わせたアレル頻度は 2%にもなることが明らかとなった。ヘテロ保持者は、25 人に一人の割合で存在する。これらヘテロ保因者は食塩非感受性者と考えられ、不用意な減塩や利尿剤使用で、脱水に陥りやすいと考えられた。*CYP11B2* はアルドステロン合成酵素であるが、このプロモーター領域の T(-344)C 変異がアンジオテンシン II への反応性を規定していることを明らかとした。T 型は、アンジオテンシン II への反応性が乏しく、高食塩摂取下の低アンジオテンシン II 下でも、アルドステロン整合性が十分に下がりきらず、食塩感受性高血圧を呈すると考えられた。実際、TT 型では、食塩摂取量 10 グラムの増加で収縮期血圧が 5 mmHg 上昇すると計算された。TT 型の出現頻度が約 50%であることを考えれば臨床的意義は大きいと思われる。ラットで食塩感受性素因遺伝子と思われた *KLK1* と *CCL2* は共に、ヒト高血圧との関連は認められなかった。以上、*SLC12A3* は、日本人ではジテルマン症候群変異の頻度が高く、食塩非感受性の素因となっていること、*CYP11B2* のプロモーター領域 T(-344)C 変異の TT 型が食塩感受性の素因となっていることを明らかとした。

### 1. 研究の背景と目的

高血圧は、高齢・糖尿病・高脂血症・喫煙・肥満などと並び、循環器疾患の大きな危険因子の一つである。種々の降圧薬の組み合わせにより、ある程度の降圧は容易となり、ある程度の合併症の予防も可能となっている。しかしながら、各個人の病態に合った理想的な降圧というよりは、降圧剤を用いて何とか血圧を下げて対症療法を行っているというのが現実であり、病態に合った治療ができていないという意味では、降圧は不十分であることが多く、副作用も多い可能性があり、合併症の予防は不十分であると考えられる。

高血圧の原因・素因として広く認められている要因は、食塩摂取過多・アルコール摂取過多・肥満・ストレス(睡眠

障害を含む)である。食塩やアルコール摂取過多で血圧が上がりやすい人、比較的上がりにくい人、体重増加で血圧が上がりやすい人、太っていても血圧は高くない人、ストレスで血圧が上がりやすい人、など、これら要因に対する感受性は、個々人によって異なると考えられる。しかしながら、臨床的に、従来から問題となっているのは食塩感受性である。

原発性あるいは過形成によるアルドステロン症の頻度は、従来想定されていたよりも高く、高齢化の中で、動脈硬化性の腎血管性高血圧、腎梗塞などの腎実質障害などの頻度も高まり、これらが食塩感受性高血圧の存在を際立たせている側面もあるが、従来から指摘されているように遺伝的素因の関与もあると思われる。

今回のプロジェクトでは、食塩感受性を遺伝的素因の観点より追及した。動物モデルを用いた解析とゲノム疫学的手法を用いた解析を行った。

## 2. 研究方法

### 2.1 食塩感受性高血圧モデル動物を用いた検討

ダール食塩感受性ラットは、8%食塩食を8週間負荷することで、著明な高血圧及び心不全を呈するモデルである。このモデルの素因遺伝子を同定するために、食塩非感受性ラットであるルイスラットとの掛け合わせを行い、雄F2ラット107匹を作成した。すべてにテレメトリーを埋め込み、8%食塩食負荷を行い、血圧測定(夜間・昼間の収縮期血圧、拡張期血圧、脈圧、心拍動数)を行った。肝臓よりDNAを抽出し、全ゲノムに亘り、約400のマーカーを用いてQTL解析を行った。

### 2.2 ゲノム疫学的検討

対象集団は、吹田スタディーで追跡調査されている者を用いた。吹田スタディーは、1989年よりファローされているコホート調査である。吹田市民30万人より、年齢・性を顧みず無作為に14,400人を抽出し、手紙を出して2年毎に検診を受けてもらうシステムである。現在までに、約7,000人が受診しており、年間約2,000人が継続的に受診している(2年で4,000人)。生活習慣病の遺伝解析を行う目的で、2002年から2005年までDNAを収集した。全例ではないが、尿中電解質(スポット尿)、レニン活性、アルドステロン濃度の測定も行った。

従来から、食塩代謝に関与するとされる遺伝子を候補として選択し、100名あまりでシーケンスを行い、日本人に存在するありふれた変異を収集した。これら変異の連鎖の程度よりタグSNPを選択し、タックマン法を用いて、吹田サンプルでタイピングを行った。高血圧や食塩感受性との関連を統計学的に調査した。

## 3. 研究結果

### 3.1 ダールラットのF2解析

染色体1番(多分二つのピーク)、染色体10番、染色体11番に、血圧レベルに影響を及ぼすQTLを見出した。各染色体ごとに記載する。

#### 染色体1番

Klk1からPex11aあたりまでの極めて広いピークが検出された。多分二つ以上のQTLが重なっているのだろうと想像される。microarrayを併用し、この領域に存在する遺伝

子で、腎臓での発現がダールとルイスラットで異なるものを同定した。機能的に食塩代謝と関連する可能性のあるものとしてKlk1(カリクレイン1)遺伝子を同定した(図1, Hypertension 2005)。現在、もうひとつのピークに存在する候補遺伝子を検索中である。ちなみに、Klk1遺伝子と血圧の関連を、吹田スタディーで調査したが、関連は認められなかった(未発表)。

#### 染色体10番

Ccl2(Mcp1)近傍をピークとする。MicroarrayでもCcl2の発現レベルが異なり、候補遺伝子と考えられた。食塩負荷により尿細管障害が生じ、この局所炎症を増悪させることにCcl2遺伝子が関与していると思われる(Hypertens Res 2007)。ちなみに、CCL2遺伝子と高血圧の関連を吹田スタディーで調査したが、関連は認められなかった(Circulation J 2006)。

#### 染色体11番

Comt遺伝子近傍をピークとする。Comtの発現は、ダールとルイスではダールで著明に低い。Comtの3'UTRに存在する約200ベースの挿入配列のためにmRNAのstability低下によりダールでは発現レベルが下がっていると思われた(Hypertens Res 2007)。しかしながら、薬理実験の結果より、Comtの発現低下が血圧レベルに影響を与えるとは結論しにくく、近傍の別の遺伝子の関与が考えられるが、未同定である。ちなみにCOMT遺伝子と血圧レベルを吹田スタディーで調査したが、はっきりとした関連は認められなかった(未発表)。

蛋白をコードしている遺伝子だけではダールラットの食塩感受性を説明できない可能性も考え、microRNAの発現レベルを評価したが、病態との関連は考えにくいとの結論に至った(Hypertens Res 2005)。

### 3.2 ゲノム疫学的検討

食塩代謝に関与すると思われる候補遺伝子を選び、100人程度でシーケンスを行い、日本人に存在する変異を収集した。頻度の高い変異に関してはタグSNPを選択し吹田サンプル2,000人から4,000人で遺伝型を決定した。アミノ酸変異など機能的に意味があると思われるものは、頻度の低いものも遺伝型を決め、高血圧、食塩感受性との関連を調査した。

#### SLC12A3

SLC12A3の機能喪失はジテルマン症候群として知られている。低カリウム性アルカローシス、低カルシウム尿、低マグネシウム血症、マイルドな細胞外液喪失症状を呈し、

あたかもサイアザイド系利尿剤を服用しているかのような病態を示す。ジテルマン症候群変異は極めて多数報告されているが、日本人で頻度の高いものとして 4 種類存在することを明らかとした (Hypertens Res 2004, Hypertens Res 2005)。M279V (アレル頻度 0.14%)、V578M (0.55%)、R642C (0.03%)、L849C (1.14%) の四つの機能喪失変異、更に稀な 3 種類の機能変異のアレル頻度を合わせると、2.0%となり、ヘテロ保持者は 25 人に一人、ジテルマン症候群患者は、10 万人に 40 人と計算される。ヘテロ保持者は、食塩摂取量を無意識の内に増やすことで、細胞外液喪失症状を代償していると報告されている。日本人の 25 人にひとりの食塩非感受性を、この遺伝子ひとつで説明できる可能性がある。これらヘテロ保持者は、不用意な利尿剤投与あるいは減塩により細胞外液喪失症状を呈する可能性がある (図 2)。

*SLC9A2, SLC9A3, UMOD, SCNN1B, CLCNKB, KCNJ1, SLC12A1* などの遺伝子に関しては、ありふれた変異と血圧レベル、レニン・アルドステロン・プロファイルとの相関は認められなかった (Hypertension 2006)。

#### CYP11B2

アルドステロン合成酵素プロモーター領域の T(-344)C 変異とアルドステロンレベルに相関が観察された。リポーター・アッセイによると、この T(-344)C 変異は、アンジオテンシン II に対する反応性を規定していた。T 型は、アンジオテンシン II に対する反応性が弱く (図 3)、高食塩摂取下でもプロモーター活性の低下が認められず、アルドステロンが過剰となり、食塩感受性を示すことが観察された。実際、尿中ナトリウム排泄量と収縮期血圧の関係は、T 型では正相関を認めるのに対して (食塩感受性)、C 型では相関は認められなかった (食塩非感受性)。TT 型では、尿中食塩排泄量が 10 グラム増加するごとに、収縮期血圧が 5 mmHg 増加すると計算された (図 4)。TT 型は、日本人では 48%をも占めることを考えると、この遺伝型の臨床的意義は大きく、TT 型の高血圧患者では、減塩指導を推進すべきと考える (Hypertension 2007)。

#### 4. 考 察

ラットモデルから得られた候補遺伝子は、ヒトの食塩感受性高血圧の素因とは、少なくとも日本人では、考えにくいとの結果であった。ヒトを用いた臨床研究こそが本道であろうと実感された。SLC12A3 の機能喪失変異の頻度が、ヘテロ保因者が 30 人に一人と、予想以上に高く、食塩非

感受性の素因と考えられた。これら変異を持つ場合は、脱水に対して弱いと考えられるため、不用意な利尿剤投与や、強力な減塩は控えるべきと思われる。一方、CYP11B2 のプロモーター領域の変異 T(-344)C は、アルドステロンのアンジオテンシン II への反応性を規定しており、TT 型で、高食塩摂取下で、アルドステロンが必要以上に高くなり、食塩感受性を示すことが示された。TT 型高血圧では、減塩が理にかなった治療・予防対策となる。勿論、血圧レベルは、これら二つの遺伝子だけで決定されているわけではなく、多面的な対策を要するが、高血圧の一部の病態は説明するものと考ええる。

#### 5. 今後の課題

最近、イルミナ 550K を用いて、約 1,000 名を対象として、収縮期血圧、レニン活性、アルドステロン濃度、BMI などに影響を及ぼす遺伝型の、ゲノムワイド・スクリーニングを経験した。レニン活性は、一般的に食塩摂取量を反映すると考えられるので、レニン活性と遺伝型の交絡が、収縮期血圧に与える影響も、同時に観察した。多重比較による補正を行っても有意差を持つ遺伝型は、残念ながら検出されなかった。このことは、食塩感受性を規定する、圧倒的なマスター遺伝子が、日本人では存在しないことを、強く示唆する。上記に示した如く、多数の遺伝子が、少しずつの寄与を持って、食塩感受性に関与する可能性が高い。あるいは、極めて頻度は低いが、影響力の大きな遺伝型が存在する可能性もあるかもしれない。いずれにせよ、一挙に解決は困難である。個々人の全シーケンスと個々人の表現型を対比できるようになって、しかも数万、数十万規模のデータベースが必要であり、更にインフォーマティクスの進歩があつてこそ、解決の糸口が見えてくると思われる。

#### 参考文献

1. Ono K, Kokubo Y, Mannami T, Inamoto N, Shioji K, Iwai N. Heterozygous disruption of *CMA1* does not affect blood pressure. *J. Hypertens.* 2004; 22:103-109.
2. Ono K, Goto Y, Takagi S, Baba S, Tago N, Nonogi H, Iwai N. A promoter variant of the heme oxygenase-1 gene may reduce the incidence of ischemic heart disease in Japanese. *Atherosclerosis.* 2004; 173: 315-319.
3. Tago N, Kokubo Y, Inamoto N, Naraba H, Tomoike H, Iwai N. A high prevalence of Gitelman's syndrome

- mutations in Japanese. *Hypertens. Res.* 2004; 27: 327-331.
4. Iwai N, Tago N, Yasui N, Kokubo Y, Inamoto N, Tomoike H, Shioji K. Genetic analysis of 22 candidate genes for hypertension in the Japanese population. *J. Hypertens.* 2004; 22: 1119-1126.
  5. Iwai N, Mino Y, Hosoyamada M, Tago N, Kokubo Y, Endou H. A high prevalence of renal hypouricemia caused by inactive *SLC22A12* in Japanese. *Kidney. Int.* 2004; 66: 935-944.
  6. Kokubo Y, Iwai N, Tago N, Inamoto N, Okayama A, Yamawaki H, Naraba H, Tomoike H. Association analysis between hypertension and *CYBA*, *CLCNKB*, and *KCNMB1* functional polymorphisms in the Japanese population-The Suita Study- *Circ. J.* 2005; 69: 138-142.
  7. Mino Y, Kuwahara T, Mannami T, Shioji K, Ono K, Iwai N. Identification of a novel insertion mutation in *GATA3* with HDR syndrome. *Clin. Exp. Nephrol.* 2005; 9: 58-61.
  8. Iwai N, Yasui N, Naraba H, Tago N, Yamawaki H, Sumiya H. *Klk1* as one of the genes contributing to hypertension in Dahl salt sensitive rat. *Hypertension.* 2005; 45: 947-953.
  9. Iwai N, Naraba H. Polymorphisms in pre-microRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 331: 1439-1444.
  10. Kajimoto K, Shioji K, Ishida C, Iwanaga Y, Kokubo Y, Tomoike H, Miyazaki S, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Validation of the association between the gene encoding 5-lipoxygenase-activating protein and myocardial infarction in a Japanese population. *Circ. J.* 2005; 69: 1029-1034
  11. Kajimoto K, Shioji K, Tago N, Tomoike H, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of *MEF2A* mutations in myocardial infarction in Japanese patients. *Circ. J.* 2005; 69: 1192-1195
  12. Naraba H, Kokubo Y, Tomoike H, Iwai N. Functional Confirmation of Gitelman's Syndrome Mutations in Japanese. *Hypertens. Res.* 2005; 28: 805-809.
  13. Naraba H, Iwai N. Assessment of the MicroRNA System in Salt-Sensitive Hypertension. *Hypertens. Res.* 2005; 28: 819-826.
  14. Iwai N, Kajimoto K, Kokubo Y, Okayama A, Miyazaki S, Nonogi H, Goto Y, Tomoike H. Assessment of genetic effects of polymorphisms in the *MCP-1* gene on serum *MCP-1* levels and myocardial infarction in Japanese. *Circ. J.* 2006; 70: 805-809
  15. Iwai N, Kajimoto K, Kokubo Y, Tomoike H. Extensive Genetic Analysis of 10 Candidate Genes for Hypertension in Japanese. *Hypertension* 2006; 48: 901-907.
  16. Yasui N, Kajimoto K, Sumiya T, Okuda T, Iwai N. The Monocyte Chemotactic Protein-1 Gene May Contribute to Hypertension in Dahl Salt-Sensitive Rats. *Hypertens. Res.* 2007; 30: 185-193
  17. Iwai N, Kajimoto K, Tomoike H, Takashima N. Polymorphism of *CYP11B2* determines salt sensitivity in Japanese. *Hypertension.* 2007; 49: 825-831

図 1 ダールとレイスラットの掛け合わせによるF2解析により、染色体1番に血圧レベルに影響を与えるQTLを同定した。図に示す如く、このピークは幅広く、複数の原因遺伝子を含むと思われる。Ngfg 近傍に存在するKik1 の発現レベルに差が認められ、候補遺伝子を考えられた。

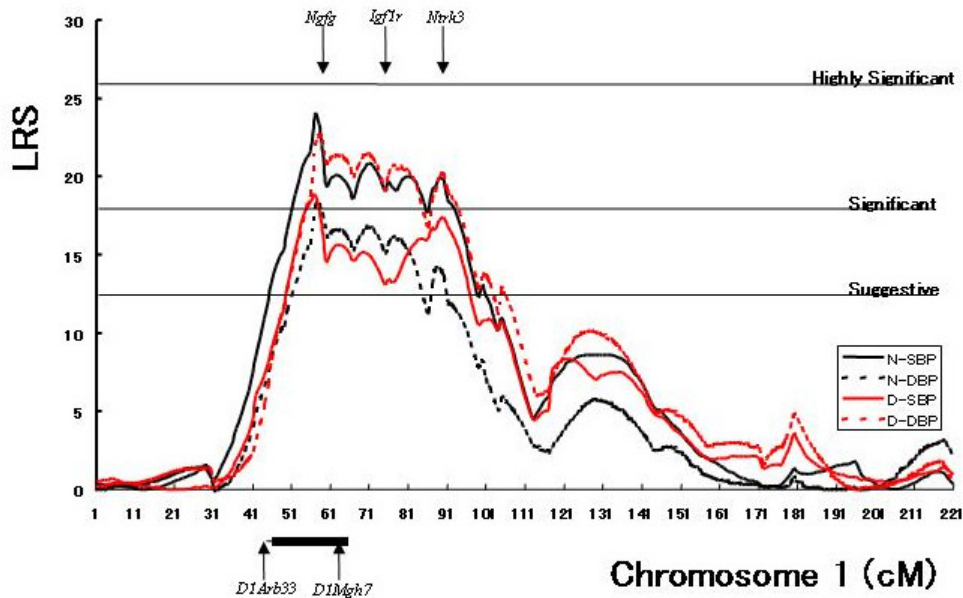


図 2 Gitelman 症候群は極めて稀なものではない

GS 変異の検出を吹田スタディーの約 3,600 人を対象に行った。  
機能が喪失している事が確認できた変異 7 種類を検出した。  
それらを足し合わせたアレル頻度は 2.0%であった。  
血圧が上がりにくい素因と考えられる。

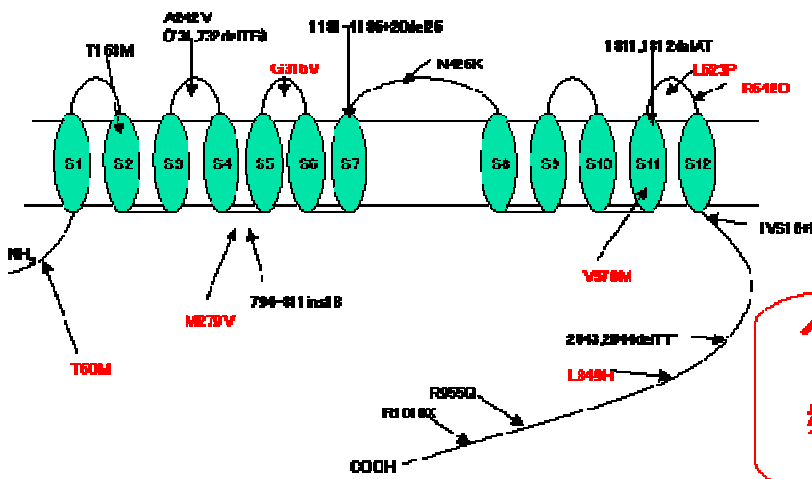




図 3 T(-344)C 遺伝型の意義をリポーターアッセイで確認した。用いた細胞は H295R (副腎皮質由来・アルドステロン産生細胞) である。C 型はアンジオテンシン II に対して反応性を示したが、T 型は反応性が低かった。高食塩食下では、C 型はアンジオテンシン II 低下から、アルドステロン・レベルも十分に低下するが、T 型では余り低下しない。

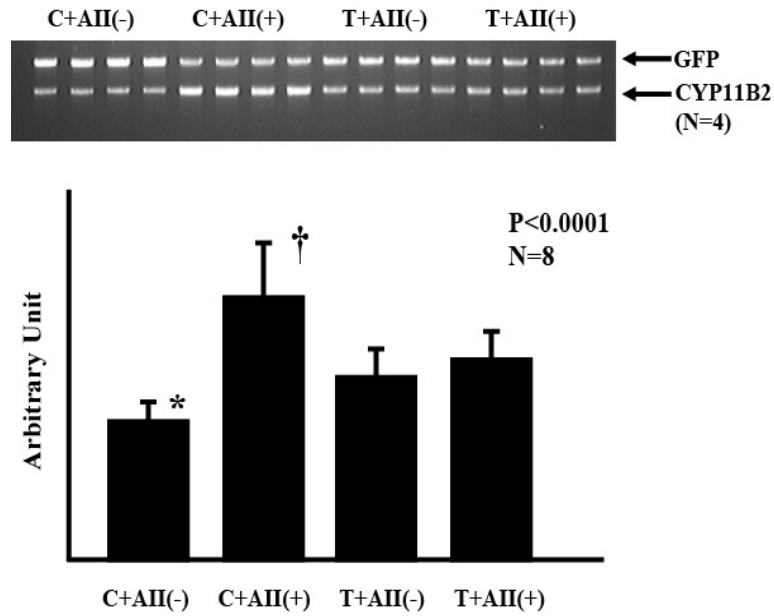
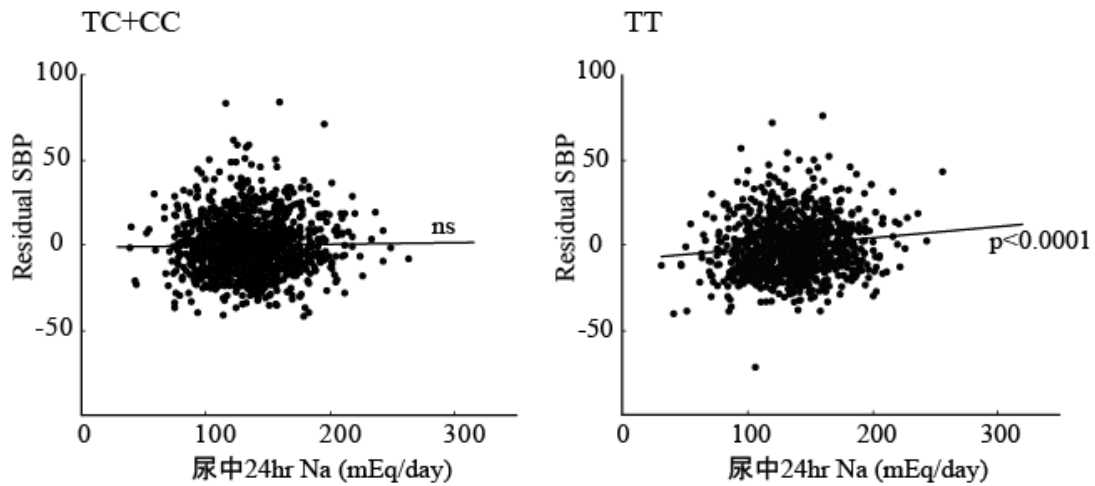


図 4 TT 型では、高食塩摂取下で、収縮期血圧の上昇が観察される。



## Identification of Genes Contributing to Salt Sensitivity in Japanese

Naoharu Iwai, MD

Research Institute, National Cardiovascular Center

### Summary

The purpose of the present study was to identify genes contributing to salt sensitivity. We at first attempted to identify genes contributing to salt-sensitive hypertension in Dahl-salt sensitive rats. We performed QTL analysis for blood pressure by using 107 male F2 rats produced from Dahl salt sensitive and Lewis rats, and identified *Klk1* gene in chromosome 1 and *Ccl2* gene in chromosome 10 as candidate genes for salt sensitivity. However, association studies in the Suita cohort did not support that these genes contributed to salt sensitivity in Japanese.

We performed association studies between candidate genes for salt sensitivity and hypertension using the Suita cohort. The Suita cohort sample consisted of 14,200 men and women recruited randomly from the Suita city municipal population registry. They were then invited by letter to attend regular cycles of follow-up examination (every 2 years). We analyzed 2,000 - 4,000 samples in the present study. Among the many genes analyzed, *SLC12A3* and *CYP11B2* appeared to be intriguing.

*SLC12A3* is known to be responsible for Gitelman's syndrome, characterized by NaCl loss from the urine. We identified 7 loss-of-function mutations in this gene in Japanese, and the combined allele frequency of these 7 mutations was as high as 2%. This indicates that one in 25 Japanese is heterozygous for Gitelman's syndrome mutations. These heterozygotes appear to be salt-resistant and vulnerable to dehydration.

*CYP11B2* is known to be aldosterone synthetase. The promoter polymorphism T(-344)C appears to determine sensitivity to angiotensin II. The C type is sensitive to angiotensin II, while the T type is insensitive to angiotensin II. Thus, even under low angiotensin II concentration, such as in high salt intake situations, the promoter activity of the subjects with the TT genotype appeared to produce excess amounts of aldosterone. In fact, systolic blood pressure in subjects with the TT genotype was positively correlated with salt excretion in the urine, which was not observed in subjects with the CC genotype. The genotype frequency of the TT genotype was around 0.5, and therefore, this genotype appears to have great clinical implications.



## 6. 食塩感受性高血圧の遺伝子指標としての G 蛋白質共役型受容体キナーゼ4 (GRK4) 遺伝子多型の意義

眞田 寛啓, 谷田部 淳一, 米田 実, 緑川 早苗, 橋本 重厚, 渡辺 毅

福島県立医科大学医学部内科学第三講座

**概要** 【目的】 G 蛋白質共役型受容体キナーゼ 4 型 (GRK4) は、本態性高血圧症の培養近位尿細管細胞においてその活性が高く、その結果ドパミン-1 受容体のリン酸化の亢進により受容体以降の情報伝達系が障害され、ナトリウムの再吸収が亢進することで高血圧症の発症、維持に深く関与することを報告し、(Proc Natl Acad Sci 2002; 99: 3872)さらに GRK4 の遺伝子多型と食塩感受性高血圧との関連について報告した (Clin Chem 52(3): 352-360, 2006)。そこで GRK4 の遺伝子多型から食塩感受性を推定後、サイアザイド系利尿剤の効果について明らかにする。

【方法】 高血圧外来に通院中の患者のうち、未治療あるいは利尿剤以外の単独投与にて血圧コントロール不良であり、インフォームドコンセントが得られた 40 名を対象とした。患者より得られた DNA を用いて GRK4 (R65L, A142V, A486V)、および高血圧関連遺伝子である angiotensinogen [AGT] (M235T)、angiotensin II type I receptor [AT1] (A1166C)、plasminogen activator inhibitor-1 [PAI1] (4/5G)、angiotensin-converting enzyme [ACE] (I/D)、AGT (A-6G) などの単一塩基遺伝子多型 (SNPs) を決定した。GRK4 遺伝子多型から個々の食塩感受性を推定し、減塩指導、利尿剤単独あるいは追加投与しその降圧効果を検討した。

【成績】 現在までに 40 例登録し、遺伝子解析が終わった 22 例において、14 例が食塩感受性 (SS)、8 例が食塩非感受性 (NSS) であった。減塩 (6 g/day) により SS 群、NSS 群ともに低下傾向を示したが家庭血圧の平均では有意差は無かった。しかし両群に低用量のサイアザイド系利尿剤を投与すると 3 ヶ月で、ESS 群で家庭血圧が  $8.3 \pm 0.89$  mmHg ENSS 群で  $2.3 \pm 0.57$  mmHg 低下した。

【結論】 日本人において、食塩感受性高血圧をもっともよくあらわす遺伝子モデルは、GRK4 の 3 種類の変異 (R65L, A142V, A486V) すべてをあわせたものであり、SS 群において低用量のサイアザイド系利尿剤の有用性が示され、さらに今回の検討において遺伝子解析によって SS および NSS の症例を抽出することによってサイアザイド系利尿剤が有効である症例の選択が可能であることが示唆された。GRK4 の遺伝子多型は食塩感受性高血圧の成因に深く関与しており、高血圧症の病型診断のために有用であることが示唆された。

### 1. 研究の背景と目的

高血圧など生活習慣病は多因子疾患と位置づけられ、その成因は均一でなく、発症には遺伝要因と環境要因との複雑な相互作用のもとに発症すると考えられている。高血圧症、特に日本人に多いとされる食塩感受性高血圧のような慢性疾患のハイリスク患者のリスクの層別化と、患者識別の方法は健康なライフスタイルの導入を促す手段として作成が期待されている。

高血圧症患者の 90% 以上を占める本態性高血圧症は、現在の診断法では単一の原因を特定できない高血圧症と定義され、日本人では推定で 3,500 万人とされている。本態性高血圧症の中でも特に食塩感受性高血圧は、高

率に微量アルブミン尿、インスリン抵抗性の亢進を合併しさらに、24 時間血圧測定では夜間降圧を認めない non-dipper 型が多く、心血管危険因子を伴いやすい高血圧であることが明らかとなっている、つまりこの食塩感受性高血圧を的確に診断し治療することが重要であると考えられている。しかし、食塩感受性の簡便な早期診断方法はないのが現状である。したがって、食塩感受性の遺伝子マーカーを確定し、早期に生活習慣に介入することは高血圧の発症予防・治療の点から重要である。さらに、食塩感受性規定因子に対する治療介入は、高血圧治療の目的達成に必要とされる。

ドパミン (DA) は、アドレナリンやノルアドレナリンとともに

生体内カテコールアミンの一つである。DA を静脈内に投与するとナトリウム排泄量の増加や血圧降下作用を認め、さらに食塩負荷により尿中 DA 排泄量が増加することから、DA は血圧調節、ナトリウム代謝に重要な働きを演じていると考えられている。DA 受容体は、G 蛋白質のGsと共役しアデニル酸シクラーゼ(AC)を活性化する D<sub>1</sub>-like 受容体(D<sub>1</sub>, D<sub>5</sub>)と Gi/Go と共役し AC 活性を抑制する D<sub>2</sub>-like 受容体(D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>)に大別される。特に DA のナトリウム利尿作用において重要である D<sub>1</sub> 受容体は主に腎近位尿細管細胞に発現している<sup>1)</sup>。

降圧因子であるドパミンは、腎近位尿細管細胞において産生され、同細胞に存在するドパミン 1(D<sub>1</sub>) 受容体を介してナトリウムの再吸収を抑制し、結果としてナトリウムの排泄に深く関与している。腎近位尿細管細胞は糸球体で濾過されたナトリウム、重炭酸の大部分を再吸収し、この過程で Na<sup>+</sup>が基底膜側にある Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Na<sup>+</sup>ポンプ)によって細胞外へ運びだされ細胞内外の濃度勾配を形成し、さらに刷子縁膜上の Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体(NHE3) および基底膜上の Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 共輸送体(NBC-1)によって管腔から細胞内へ再吸収される。これらの輸送体の制御に DA が関与している。

本態性高血圧患者において、ドパミンによるナトリウム利尿反応が正常者に比べ低下しており、本態性高血圧症のモデルラットにおいても、同様にドパミン作用低下が認められることをすでに報告した。この原因は主に腎近位尿細管におけるドパミン刺激による情報伝達異常であるとの仮説に基づき研究を行い、SHR の近位尿細管細胞、ならびにヒト高血圧患者の腎組織より初代培養した近位尿細管細胞を用いた実験系において、WKY および正常血圧患者の近位尿細管細胞と比較し、ドパミン刺激に対する cAMP 産生能の低下を認め、さらにこの原因が D<sub>1</sub>受容体のリン酸化であることが推察された<sup>2)</sup>。また、高血圧患者からの近位尿細管細胞においても、D<sub>1</sub>受容体の高リン酸化状態にあることが判明し、さらに G 蛋白共役型レセプターキナーゼ 4(GRK4)が、D<sub>1</sub>受容体をリン酸化に関与することを確認した。この GRK4 の活性上昇によって、ドパミン受容体が高リン酸化状態となり、DA によって引き起こされる受容体と G 蛋白質の共役障害が、情報伝達異常の原因となり DA のナトリウム利尿が障害されていると考えられる<sup>3)</sup>。そこで本研究は、GRK4 の SNPs の機能解析および本態性高血圧症、特に日本人に多いとされる食塩感受性高血圧を中心にして候補遺伝子を解析し、高血圧患者の食塩感受

性に関わる遺伝子を同定する。

## 2. 研究方法

### 2.1 各種 GRK4 の SNPs を導入した細胞での機能解析

D<sub>1</sub> 受容体を安定発現(Tet-off Gene Expression System, CLONETECH)させた Chinese hamster ovary(CHO)細胞に、各種 GRK4(Wild, R65L, 142V, A486V)の cDNA を遺伝子導入し(T-Rex Expression System, Invitrogen)さらに GRK4 の発現を調節するために Tet-off<sup>TM</sup> Gene Expression System (CLONETECH)を導入した3重安定細胞を作成。

① 3重安定細胞におけるGRK4の各種SNPsによるD<sub>1</sub>受容体のリン酸化の状態を検討するため培養細胞から蛋白を抽出し、免疫沈降法は 3<sup>rd</sup> internal loopに対する抗ラットドパミンレセプター抗体を用いて行った。この抗体にて、ウエスタンブロッティング法による検討を行った。腎より抽出した蛋白を 8% SDSアクリルアミドゲルにて電気泳動し、ニトロセルロース膜へ転写した後、ブロッキング液(5% Tris-HCl, 5% nonfat dry milk, 0.1% Tween 20)中で一晩処理したのち、抗ホスホセリン抗ラットDIR抗体にて抗原抗体反応を行い、ペルオキシダーゼ標識ヒツジ由来抗ウサギ抗体またはウマ由来抗マウス抗体を二次抗体として標識をおこなった。撮影の後、スキヤニングデンシトメトリー法にて定量解析を行った。

② 3重安定細胞におけるFenoldopam刺激によるcAMPの反応性を検討するため細胞中のcAMPを測定した(Bridge-It camp all in one assay system, Mediomics)。

③ 自然発症高血圧ラット(SHR)におけるGRK4の評価  
麻醉下(pentobarbital 50 mg/kg, 経腹膜注射)にて右腎を摘出した後、浸透圧ポンプの埋込み手術を行った。浸透圧ポンプには約 4 cm長のポリエチレンチューブ(PE60 Becton Dickinson Sparks USA)を接続し、先端には腎皮質へ挿入するため小外径のチューブ(SP10 夏目)を接着剤(Bipax epoxy resin glue, Tra-Con)にて接合した。実験開始第 0日、右腎摘出部位に浸透圧ポンプを留置し、チューブを左腎近傍に配置後、先端を挿入するため26ゲージ注射針を用いて挿入口を作成し、固定用のメッシュ(LARS Mesh, Boston Scientific)を通してチューブ先端を挿入した後、メッシュ上に脂肪断片を配置して組織接着剤(Aron Alpha, 三共)にて固定した。Ringer液を満たした浸透圧ポンプ(model 2001, 1 μl/hr, Alzet DURECT Corporation, Cupertino CA USA)で1週間の経過観察後、

第7日目に麻酔下で再手術を行い、それぞれGRK4のAs-Odn、Sc-Odn、ならびにRinger液を含む浸透圧ポンプ(model 2004, 0.2  $\mu$ l/hr, Alzet DURECT Corporation, Cupertino CA USA)に交換した。その後high salt diet (4%) 添加飼料を4週間給餌した。また、Tail-cuff plethysmography (BP-98A Softron Co.)にて経時的に血圧を測定した。

## 2. 2 食塩感受性高血圧と GRK4 遺伝子多型および高血圧関連遺伝子との検討

対象は、83例のランダムに選択された未治療本態性高血圧であり全症例において遺伝子解析に対するインフォームドコンセントが取得されている。収縮期血圧が140 mmHg以上または拡張期血圧が90 mmHgの患者で糖尿病、腎機能障害(血清クレアチニン $>1.0$  mg/dl、クレアチニンクリアランス $<70$  ml/min、微量アルブミン $<14.7$  mg/g creatinine)、あるいは二次性高血圧を有する患者は研究から除外した。

83例(54.8 $\pm$ 0.8歳、BMI 23.1 $\pm$ 0.2、女性47名、男性36名)を研究対象とし、食塩感受性試験を施行した。各症例は入院後2週間の正食塩食(153 mmol/dayと50 mmolカリウム/day)後、低食塩食(51 mmol/day)7日間、その後高食塩食(340 mmol/day)を7日間摂取した。各期間の最終日に24時間自由行動下血圧を測定した。(日本コーリン ABPM-630 東京、日本)。食塩感受性の判定は、低食塩食から高食塩食に変更後24時間平均血圧が10%増加によって食塩感受性と、10%未満であれば食塩非感受性と判断した<sup>4,6)</sup>。

患者全血よりDNAを抽出 BDtract Genomic DNA Isolation kit, Maxim Biotech)し、GRK4(R65L, A142V, A486V)<sup>7,8)</sup>、angiotensinogen [AGT] (A-6G・M235T)<sup>9)</sup>、angiotensin II type I receptor [AT1] (A1166C)<sup>10)</sup>、plasminogen activator inhibitor-1 [PAI1] (4/5G)<sup>11)</sup>およびCYP11B2(aldosterone synthase C344T)<sup>12)</sup>の単一塩基遺伝子多型(SNPs)をLightCycler<sup>TM</sup> Master Hybridization Probe Kit (Roche)を用いてGRK4の遺伝子型を決定した。また、angiotensin-converting enzyme [ACE]の挿入/欠失多型(I/D)<sup>13)</sup>をPCR法で決定し、 $\alpha$  アデュシン(ADD G460W)<sup>14,15)</sup>はPCR-RFLP法にて決定した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 3重安定細胞におけるGRK4の各種SNPsによるD1受容体のリン酸化の状態

高血圧の近位尿細管細胞で認められるアゴニスト刺激前からのD<sub>1</sub>受容体のリン酸化の亢進の状態は、GRK4のSNPsの導入によりD<sub>1</sub>受容体のリン酸化亢進が再現された。GRK4の活性亢進の詳細な機序は不明であるが、GRK4の活性は、A142V $>$ R65L+A486V $>$ A486=R65L $>$ Wildであった(Figure 1)。

また、これらの細胞においてD<sub>1</sub>受容体の選択的アゴニストであるFenoldopamを添加によりD<sub>1</sub>受容体のみでGRK4を導入していない細胞では濃度依存性にcAMPが増加したが、GRK4(Wild)の導入によりcAMPの産生は軽度抑制され、さらにGRK4のSNPsの挿入によりさらにcAMPの産生は抑制された。テトラサイクリンによってGRK4の発現を抑制するとFenoldopamに対するcAMPの反応性がほぼ正常まで回復することが確認された(Figure 2)。

実験開始時、SHR群ではWKY群に対し血圧は有意に高値であった。WKY群では、As-Odn、Scr-Odn、Vehicleの投与によっても加齢により血圧上昇は見られなかった。SHR群では、各投与群で血圧が加齢とともに上昇した。しかしながら、As-Odnを投与した群では、その他の群に比して投与2週目より血圧の上昇が有意に抑制された(Figure 3)。

### 3. 2 食塩感受性高血圧および非感受性高血圧の特徴

食塩感受性試験の結果、年齢(SS = 59.3 $\pm$ 2.1, SR = 57.1 = 1.7歳)、性別、体重、身長、BMI(SS = 22.7 $\pm$ 0.4, SR = 22.6 $\pm$ 0.4)は食塩感受性群と非感受性群で差はなかった(Table 1)。正塩食下での24時間平均血圧は、食塩感受性群(107 $\pm$ 0.5 mmHg)・食塩非感受性群(109 $\pm$ 0.8 mmHg)で有意差はなかった。低塩食から高塩食によって食塩感受性群では24時間平均血圧が10%以上の増加した(低塩:104 $\pm$ 0.5 高塩 116 $\pm$ 0.7 mmHg)が、食塩非感受性群では増加しなかった(低塩:108 $\pm$ 0.8 高塩 109 $\pm$ 0.8 mmHg)。また、体重は両グループで、高塩食で増加したが、食塩感受性群(1.66 $\pm$ 0.14 kg, 3.02 $\pm$ 0.26%)で非感受性群(0.24 $\pm$ 0.09 kg, 0.38 $\pm$ 0.16%)よりも増加の程度は大きかった。高塩食は両群でヘマトクリット値を減少させたが、食塩感受性群(2.04 $\pm$ 0.36, 5.58 $\pm$ 0.96%)で非食塩感受性群(0.55 $\pm$ 0.18, 1.55 $\pm$ 0.52%)よりも減少の程度は大きかった。高塩食摂取により、PRA、PACは両群同じ程度低下した。食塩感受性群で有意に低かった(Bonferroni correction 検定)。尿エピネフリンや、ノルエピネフリンは両群でナトリウ

ム摂取によって影響を受けなかった(Bonferroni correction 検定)。一方、尿ドパミンはナトリウム摂取により、食塩非感受性群と感受性群両方で増加した(Table 2)。

### 3. 3 食塩感受性高血圧と食塩非感受性高血圧における GRK4 遺伝子多型および高血圧関連遺伝子多型の頻度

食塩非感受性群よりも、感受性群において GRK4 SNPs (R65L, A142V, A486V) の有意にアリル頻度は高かったが、高血圧関連遺伝子である AGT (A-6G・M235T)、AT1 (A1166C)、PAII (4/5G)、CYP11B2(C344T)、ACE の挿入/欠失多型 (I/D) および  $\alpha$  アデュシン (ADD G460W) のアリル頻度に差は認められなかった(Table 3)。

MDR (multifactor dimensionality reduction) 解析を用いて食塩感受性を予測する遺伝子モデルを推定した。GRK4 R65L, A142V, A486V 変異のみで、食塩感受性を 94.4% 正確に予測できていた ( $p < 0.001$ )。食塩感受性高血圧の日本人で三つの GRK4 変異を用いたモデルは 83% の感度で、100% の特異度だった (Figure 4)。

一方、3 あるいはそれ以上の変異の存在は、常に食塩感受性進行のハイリスクと関連していた。3 種の GRK4 変異モデルは、いずれの GRK4 変異一つだけより有用である。この GRK4 の 3 種の変異の存在モデルは、ナトリウム摂取の増加に伴い血圧も実際に上昇する食塩感受性の所見と一致している。GRK4 アリルの数はナトリウム摂取の増加に続くナトリウム排泄の増加に反比例していた。( $r^2 = 0.99, p < 0.001$ ) (Figure 5)。

## 4. 考 察

腎ドパミン受容体は中等度のナトリウム過剰状態のときには、その 50% 以上のナトリウム排泄を担っていることが知られている。しかしながら、D<sub>1</sub> 受容体機能低下のため遺伝的な高血圧ラットや本態性高血圧症では、ナトリウム輸送のドパミンによる腎機能のパラクライン調節が障害されている。これは D<sub>1</sub> 受容体自体の障害ではなく、D<sub>1</sub> 受容体の脱感作に関わる遺伝子である G 蛋白共役キナーゼ 4 受容体型 (GRK4) の活性変化によって引き起こされるセカンドメッセンジャーからの脱共役の障害である。この脱共役に関与する GRK4 に三つの変異 (R65L, A142V, A486V) が存在することが報告されている。さらにこの三つの変異によって腎での cAMP 産生に関わる D-1 受容体以降のシグナルを障害する。腎での GRK4 発現を強制的に抑制すると高血圧患者由来の腎近位尿管細胞での D<sub>1</sub> 受容体

機能は正常化し、自然高血圧発症ラット (SHR) では高血圧が改善する。さらに、マウスにおいて野生型 GRK4 でないヒト GRK4 A142V を過剰発現させると、D<sub>1</sub> 受容体刺激に対するナトリウム利尿反応は障害され、高血圧を生じる。3 年間の研究においていくつかの新しい成果がある。第一に、日本人高血圧患者において、GRK4 の三つの変異 (R65L, A142V, A486V) は食塩非感受性群に比べ食塩感受性群で頻度が高かった。第二に、以前に etiology で食塩感受性に重要と考えられていたその他の遺伝子のアリル頻度には日本人高血圧患者の食塩感受性群・非感受性群において差がなかった。第三に、高血圧日本人患者の食塩感受性群と非感受性群において GRK4 遺伝子座で考えられる遺伝子分布 (変異アリルが 0 から 6) は同じではなかった。3 種未満のアリル変異でも食塩感受性の患者はいるが、3 種類ないしそれ以上の GRK4 遺伝子の変異アリル (R65L, A142V, A486V のいずれか) を持つものは、食塩感受性群であった。

日本人において、食塩感受性高血圧をもっともよくあらわす遺伝子モデルは、GRK4 の 3 種類の変異 (R65L, A142V, A486V) の組み合わせであり、食塩感受性と非感受性群を 94.4% 予見した。これらの所見は、単一遺伝子がフェノタイプの発生において重要であっても、患者リスクの検出能力をあげるために遺伝子多型を考慮することが重要であるという考えを支持するものである。GRK4 の SNPs (R65L, A142V, A486V) により D<sub>1</sub> 受容体のリン酸化が亢進し、ドパミンによる cAMP の増加が障害されるため NHE3、NBC-1 および Na<sup>+</sup>ポンプの活性の抑制が不十分となり、ナトリウム利尿が起こりにくくなり食塩感受性高血圧が発症しやすくなると考えられる。GRK4 変異はその報告について研究されていない。我々の研究では、GRK4 変異は高血圧日本人患者で食塩非感受性群よりも感受性群において頻度が高かったということだけでなく、GRK4 R65L と A142V のホモ接合体は食塩感受性日本人高血圧患者においてのみみられることもわかった。我々の調べた高血圧患者の中で、食塩感受性高血圧患者だけが、少なくとも三つの GRK4 変異アリル (65L, 142V, 486V) を持っていた。この食塩感受性群の特徴は、食塩感受性高血圧患者が D<sub>1</sub> 受容体を介する腎ナトリウム輸送とナトリウム再吸収が障害されていることと関連している<sup>17)</sup>。

遺伝性的高血圧において、GRK4 遺伝子変異 (R65L, A142V, A486V) は腎 D<sub>1</sub> 受容体を障害するため、食塩負荷に対する反応であるナトリウム排泄が障害される<sup>16)</sup>。ヒト

GRK4 $\gamma$ A142V を過剰発現させたマウスは D<sub>1</sub> 受容体アゴニスト刺激に対する利尿とナトリウム利尿に障害がある<sup>17)</sup>。GRK4 遺伝子変異のみが食塩感受性高血圧と関連があり、これらの変異は日本人における食塩感受性を高い割合で予見した。さらに、日本人で GRK4 変異を 3 以上もつものは、つねに食塩感受性があり、慢性的なナトリウムの過剰負荷に対する反応が障害されていた。GRK4 遺伝子変異の数と、過剰なナトリウム負荷に対する反応の障害の高い相関が、ドパミン機能の喪失と以前に述べた高血圧との関連との根底にある可能性がある<sup>17,18)</sup>。

我々の調べた高血圧患者の中で、食塩感受性高血圧患者だけが、少なくとも三つの GRK4 変異アレル (65L, 142V, 486V) を持っていた。この食塩感受性群の特徴は、食塩感受性高血圧患者が D<sub>1</sub> 受容体を介する腎ナトリウム輸送とナトリウム再吸収が障害されていることとの関連<sup>18,19)</sup>が予想される。また今回研究の途中であるが我々の遺伝子モデルにより食塩感受性・非感受性に分類した場合、サイアザイド系利尿剤の効用に大きな差があったことからこの遺伝子モデルを食塩感受性のマーカーとして利用することができると思われる。

## 5. 今後の課題

降圧薬に進展にもかかわらず、血圧コントロールは頭打ちとなり、さらに生活習慣の欧米化とともに心血管合併症、糖尿病が増加している。また、食塩感受性高血圧においては、高率に微量アルブミン尿、インスリン抵抗性の亢進を併し心血管危険因子を伴いやすい高血圧である。高血圧とナトリウム代謝については関連が深い、どのような機序にて高血圧が発症するのかはいまだ不明である。ドパミンは腎からのナトリウム排泄に関与する有力な液性調節因子であり、高血圧の成因に密接な関係を有する可能性がある。本研究の基礎実験および臨床研究から GRK4 の SNPs (R65L, A142V, A486V) により D<sub>1</sub> 受容体のリン酸化が亢進し、ドパミンによる cAMP の増加が障害されることによりナトリウムの排泄が低下し、ナトリウムが貯留し血圧が上昇し食塩感受性高血圧が発症しやすくなると考えられた。今後は GRK4 の既知の SNPs のみでなく V274I, A235T, G562D についてもその役割について検討する予定である。また、今回の検討により GRK4 の遺伝子多型が食塩感受性高血圧と深く関与しており、高血圧症の病型診断のために GRK4 の遺伝子多型が有用である可能性が示唆された。また、他の遺伝子多型と食塩感

受性高血圧との関連を排除するには十分な症例数ではないため、遺伝子解析の数を増やす必要がある。さらに、これらの結果を一般化するためには他の日本人コホートにおける結果で再現性をみる必要がある。GRK4 変異の役割を他の母集団 (海外のサンプルを含めて) 検討する必要がある。最近、Speirs ら<sup>20)</sup> および Gu ら<sup>21)</sup> は、GRK4 遺伝子多型と高血圧 Caucasians および Chinese のコホートにおいて同様の結果を用いて高血圧における役割を研究している。現在進行中であるが、未治療の高血圧患者において、GRK4 の遺伝子多型から食塩感受性を推定し積極的に減塩指導を行いサイアザイド系利尿薬の効果を検討中である。

## 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。

## 文 献

1. Jose PA, Eisner GM, Felder RA : Renal dopamine and sodium homeostasis. *Curr Hypertens Rep* 2: 174-183, 2000.
2. Sanada H., Jose PA., Hazen-Martin D., Tu PY., Xu J., Bruns DE., Phipps J., Carey RM., Felder RA.: Dopamine-1 receptor coupling defect in renal proximal tubule cells in hypertension. *Hypertension*, 33(4): 319-322, 1999.
3. Robin A. Felder, Hironobu Sanada, Jing Xu, Pei-Ying Yu, Zheng Wang, Hidetsuna Watanabe, Laureano D. Asico, Wei Wang, Shaopeng Zheng, Ikuyo Yamaguchi, Scott M. Williams, James Gainer, Nancy J. Brown, Debra Hazen-Martin, Lee-Jun C. Wong, Jean E. Robillard, Robert M. Carey, Gilbert M. Eisner, and Pedro A. Jose: G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants in human essential hypertension. *PNAS* 99: 3872-3877, 2002.
4. Weinberger, M.H., Stegner, J.E., Fineberg, N.S. A comparison of two tests for the assessment of blood pressure responses to sodium. *Am J Hypertens* 1993; 6: 179-84.
5. Miller, J.Z., Luft, F.C., Grim, C.E., Fineberg, N.S. Definitions and characteristics of sodium sensitivity and



- blood pressure resistance Hypertension. 1986; 8(Pt 2): II 127-34.
6. Sullivan, J.M. Salt sensitivity. Definition, conception, methodology, and long-term issues. Hypertension 1991; 17 [suppl I]: I-61-I-68.
  7. Bengra C, Mifflin TE, Khripin Y, Manunta P, Williams SM, Jose PA, et al. Genotyping essential hypertension single-nucleotide polymorphisms by a homogenous PCR method with universal energy transfer primers. Clin Chem 2002; 48(12): 2131-2140.
  8. Williams SM, Addy JA, Phillips JAIII, Dai M, Kpodonu J, Afful J, et al. Combinations of variations in multiple genes are associated with hypertension. Hypertension 2000; 36(1): 2-6.
  9. Hata A, Namikawa C, Sasaki M, Sato K, Nakamura T, Tamura K, et al. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. J Clin Invest 1994; 93(3): 1285-7.
  10. Baudin B. Angiotensin II receptor polymorphisms in hypertension. Pharmacogenomic considerations. Pharmacogenomics 2002; 3: 65-73.
  11. Srikumar N, Brown NJ, Hopkins PN, Jeunemaitre X, Hunt SC, Vaughan DE, et al. PAI-1 in human hypertension: relation to hypertensive groups. Am J Hypertens 2002; 15(8): 683-90.
  12. Poch E, Gonzalez D, Giner V, Bragulat E, Coca A, de la Sierra A. Molecular basis of salt sensitivity in human hypertension. Evaluation of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms. Hypertension 2001; 38(5): 1204-9.
  13. Tiet L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, et al. Evidence from combined segregation and linkage analysis that a variant of the angiotensin 1-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. Am J Hum Genet 51: 197-205, 1992.
  14. Sugimoto K, Hozawa A, Katsuya T, Matsubara M, Ohkubo T, Tsuji I, et al. Alpha-Adducin Gly460Trp polymorphism is associated with low renin hypertension in younger subjects in the Ohasama study. J Hypertens 2002; 20(9): 1779-84.
  15. Grant FD, Romero JR, Jeunemaitre X, Hunt SC, Hopkins PN, Hollenberg NH, et al. Low-renin hypertension, altered sodium homeostasis, and an alpha-adducin polymorphism. Hypertension 2002; 39(2): 191-6.
  16. Barlassina C, Schork NJ, Manunta P, Citterio L, Sciarrone M, Lanella G, et al. Synergistic effect of alpha-adducin and ACE genes causes blood pressure changes with body sodium and volume expansion. Kidney Int 2000; 57(3): 1083-90.
  17. Ritchie MD, Hahn LW, Roodi N, Bailey LR, Dupont WD, Parl FF, et al. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer. Am J Hum Genet 2001; 69(1): 138-47.
  18. Jose PA, Eisner GM, Felder RA. Role of dopamine receptors in the kidney in the regulation of blood pressure. Curr Opin Nephrol Hypertens 2002; 11: 87-92.
  19. O'Connell DP, Ragsdale NV, Boyd DG, Felder RA, Carey RM. Differential human renal tubular responses to dopamine type 1 receptor stimulation are determined by blood pressure status. Hypertens. 1997; 29: 115-22.
  20. Speirs HJ, Katyk K, Kumar NN, Benjafield AV, Wang WY, Morris BJ. Association of G-protein-coupled receptor kinase 4 haplotypes, but not HSD3B1 or PTP1B polymorphisms, with essential hypertension. J Hypertens 2004; 22(5): 931-936.
  21. Dongfeng Gu, Shaoyong Su, Dongliang Ge, Shufeng Chen, Jianfeng Huang, Biao Li, Runsheng Chen, Boqin Qiang. Association study with 33 single-nucleotide polymorphisms in 11 candidate genes for hypertension in Chinese. Hypertens. 2006; 47: 1147-1154.

Table 1 Characteristics of hypertensive subjects

Variables	Salt-Resistant (n = 48)	Salt-Sensitive (n = 35)
Age	57.1 ± 1.7	59.3 ± 2.1
Gender: M/F	22/26	14/21
Weight (kg)	57.6 ± 1.2	56.4 ± 1.0
Height (m)	1.59 ± 0.012	1.58 ± 0.014
BMI	22.6 ± 0.4	22.7 ± 0.4

Table 2 Effect of sodium intake on blood pressure and selective hormonal/humoral agents in SS and SR hypertensive subjects

Variables	SR (n = 48)				SS (n = 35)				Comp <sup>2</sup>
	Dietary Sodium Intake (mmol/day)			Effect <sup>1</sup> p	Dietary Sodium Intake (mmol/day)			Effect <sup>1</sup> p	
	Na 51	Na 153	Na 340		Na 51	Na 153	Na 340		
SBP (mmHg)	146 ± 1	148 ± 1	147 ± 1	0.508	142 ± 0.9	146 ± 1.0	159 ± 1.6	<0.001	<0.001
DBP (mmHg)	89 ± 0.7	90 ± 0.7	90 ± 0.7	<b>0.016</b>	86 ± 0.4	88 ± 0.6	95 ± 0.6	<0.001	<0.001
MBP (mmHg)	108 ± 0.8	109 ± 0.8	109 ± 0.8	0.058	104 ± 0.5	107 ± 0.5	116 ± 0.7	<0.001	<0.001
Weight (kg)	57.4 ± 1.1	57.6 ± 1.2	57.7 ± 1.2	<b>0.013</b>	55.9 ± 0.9	56.4 ± 1.0	57.6 ± 0.9	<0.001	<0.001
Hct (vol%)	39.4 ± 0.6	39.2 ± 0.6	38.8 ± 0.6	<b>0.004</b>	39.0 ± 0.6	38.4 ± 0.5	36.9 ± 0.5	<0.001	<0.001
RPA (ng Al/ml/hr)	2.1 ± 0.2	1.5 ± 0.2	0.6 ± 0.07	<b>0.001</b>	1.4 ± 0.2	0.6 ± 0.07	0.4 ± 0.07	<b>0.008</b>	0.395
PAC (pg/ml)	173 ± 13	115 ± 8	68 ± 5	< <b>0.001</b>	103 ± 9	67 ± 5	49 ± 4	<b>0.008</b>	0.096
U-NE (µg/day)	76 ± 8	57 ± 4	54 ± 4	<b>0.034</b>	53 ± 4	51 ± 6	45 ± 2	0.229	0.300
U-Dopamine (mg/day)	558 ± 23	810 ± 13	926 ± 69	<b>0.001</b>	421 ± 14	590 ± 36	846 ± 58	<b>0.001</b>	0.688

Data are M ± SE.

1. "Effect" p-values indicate whether the slope of the line is significantly different from zero.

2. "Comp (comparison)" p-values indicate whether or not the two groups (SS and SR groups) show significantly different responses to dietary sodium intake.

3. Plasma renin activity was measured in 43 of 48 SR and 32 of 35 SS subjects.

Although the sodium diets were taken in the order of normal (153), low (51), and high (340), the data are presented in increasing sodium intake, see methods. \*not significant using Bonferroni correction for 36 comparisons (see statistical analysis and results).

Table 3 Allele Frequency in Salt Sensitive and Salt Resistant Hypertensive Japanese

Genes	Salt-Resistant (n = 48)	Salt-Sensitive (n = 35)
<b>GRK4 R65L (% L)*</b>	<b>0</b>	<b>47**</b>
<b>GRK4 A142V (% V)</b>	<b>5</b>	<b>51**</b>
<b>GRK4 A486V (% V)</b>	<b>24</b>	<b>67**</b>
ACE I/D (% I)	69	68
AGT A6-G (%-6G)	85	90
AGT M235T (% M)	81	84
AT <sub>1</sub> R A1166C (% A)	90	91
PAI-1 4/5G (% 4G)	66	66
CYP11B2 (% C)	63	68
ADD G460W (% W)	50	53

\*Wild type \*\*P < 0.000005, vs. Salt-Resistant, Chi-square

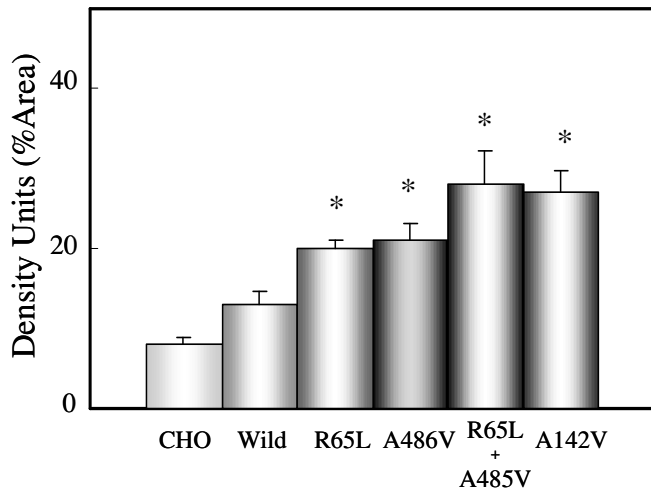


Figure 1

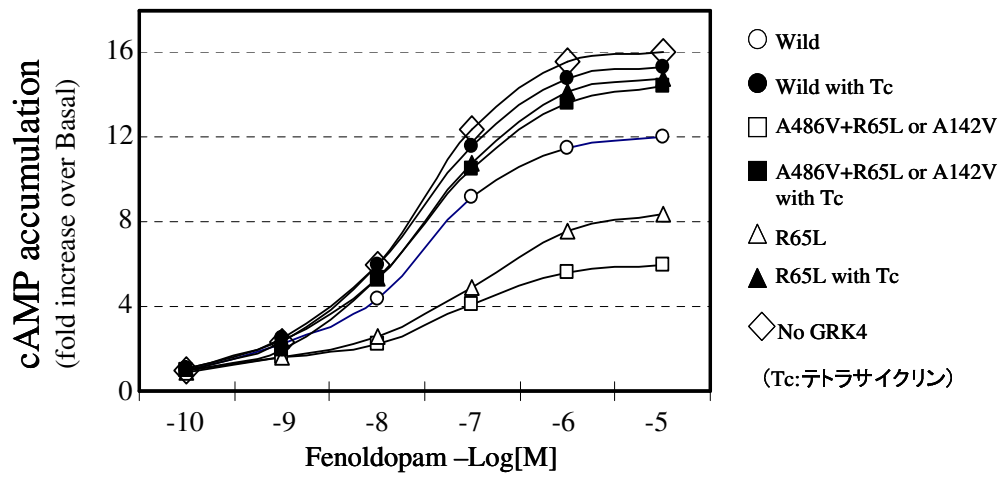


Figure 2

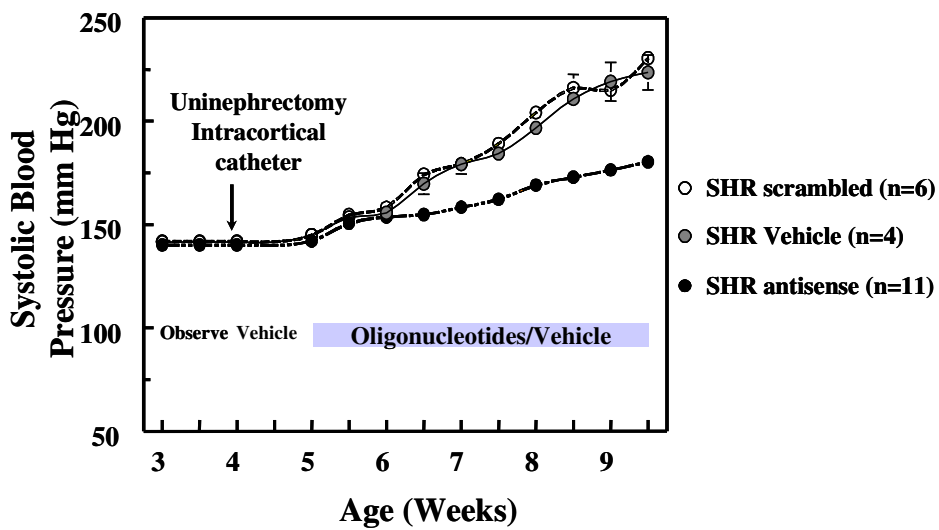


Figure 3

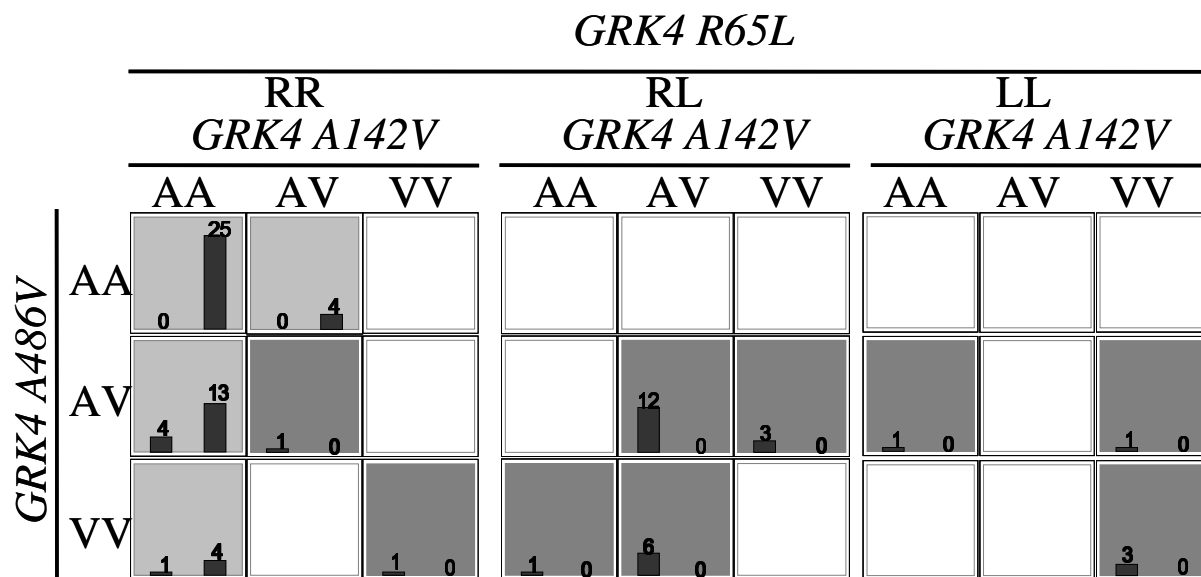


Figure 4

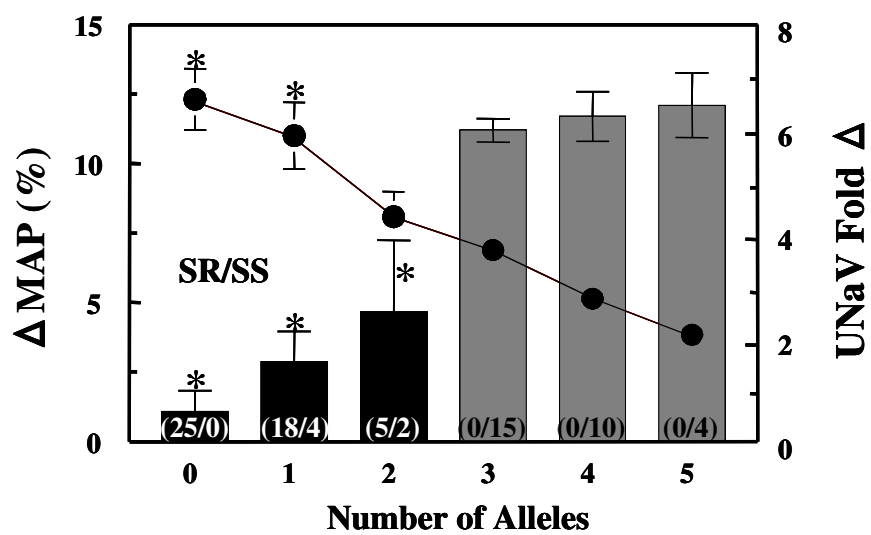


Figure 5

## The Molecular Diagnosis of Salt Sensitive Hypertension Using G-Protein-Coupled Receptor Kinase Type 4 (GRK4) Polymorphisms

Hironobu Sanada, Jyunichi Yatabe, Sanae Midorikawa, Minoru Yoneda,  
Shigeatsu Hashimoto, Tsuyoshi Watanabe

Third Department of Internal Medicine, Fukushima Medical University School of Medicine

### Summary

G protein-coupled receptor kinase type 4 (GRK4) is important in the pathogenesis of essential hypertension (Proc Natl Acad Sci 2002; 99: 3872). Because activating variants of GRK4 impair the transduction of the renal D1 dopamine receptor and sodium handling, we evaluated the association of GRK4 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in salt sensitive (SS) and salt resistant (SR) subjects whose 24-hour ambulatory mean blood pressures (MBP) were measured. The subjects were observed for 7 days on normal sodium (153 mmol/day) diet which was changed to low (51 mmol), high (340 mmol), and normal sodium (153 mmol) that lasted 5 days for each level of sodium intake. Thirty-five SS (MBP from  $104 \pm 1$  to  $116 \pm 1$  mmHg) and 48 SR (MBP from  $108 \pm 2$  to  $110 \pm 1$  mmHg) subjects were studied; sodium excretion in response to the high sodium intake was greater in SR than in SS subjects, resulting in a greater cumulative sodium retention (121 mmol) and weight gain (1.28 kg) in SS than in SR subjects. High sodium intake decreased plasma renin and aldosterone levels and increased urinary dopamine similarly in SS and SR subjects. A genetic model based on GRK4-R65L, GRK4-A142V, and GRK4-A486V was 94.4% predictive of SS hypertension. We did not detect any differences in allele frequencies of variants of ACE, AGT, AT<sub>1</sub>R, PAI-I, CYP11 $\beta$ 2, D<sub>1</sub>R, GN $\beta$ 3, and ADD genes between SS and SR subjects. Thus, SNPs of GRK4 are important in the pathogenesis of salt-sensitive hypertension and may be useful in the diagnosis of this subset of hypertension.

## 7. 疾患モデル動物を用いた食塩負荷に伴う心肥大・心不全発症関連遺伝子の同定

間野 博行, 島田 和幸

自治医科大学医学部

**概要** 本態性高血圧症は遺伝的素因の関与が示唆される代表的な生活習慣病であるが、本疾患が具体的にどの様な遺伝子異常を背景としているかは今なお殆ど不明なままである。また本態性高血圧などによる長期にわたる圧負荷はやがて心筋の収縮力低下および細胞死を導き、うっ血性心不全に至る。我々は本研究計画において本態性高血圧症および心不全の発症・進展機構を明らかにする目的で、疾患モデル動物あるいは患者心筋サンプルを用いた網羅的遺伝子発現解析によりうっ血性心不全の病態解明を目指した。Dahl ラットは遺伝性食塩感受性ラットであり、高食塩負荷摂取により全身性高血圧・心肥大を発症する。高食塩負荷の持続により比較的短期間のうちに重症心不全へと移行するため、ヒトの心不全発症機構の良いモデル動物といえる。そこで各病期の Dahl rat 心筋を用いて DNA マイクロアレイ解析(約 8,800 種類の遺伝子)を行い、病期特異的に発現変化する遺伝子の同定を試みた。その結果「心肥大発症に伴って発現亢進する遺伝子群」、「健常期および心肥大期では発現が高いが心不全への移行に伴って発現が低下する遺伝子群」など様々な疾患関連遺伝子を同定することに成功した。

### 1. 研究目的

食塩の長期に渡る摂取量増加は、ヒトの体において末梢血管抵抗の上昇や電解質インバランスなど様々な心血管系への圧・容量負荷を生じることが知られる。これらの慢性負荷に対抗して心筋細胞は代償的に肥大し「心肥大」と呼ばれる病態が発生するが、心血管系への負荷があまりに長期に渡るとやがて心筋細胞の収縮力低下及び細胞死(アポトーシス)が誘導され、最終的に心拍出量が低下する「うっ血性心不全」と呼ばれる病態に至る<sup>1)</sup>。いったん低下した心機能を回復することは現在でも極めて困難であり心不全は本邦成人死因の第二位を占めるに至る<sup>2)</sup>。したがって心不全発症メカニズムの解明とその情報を基にした新規分子標的療法の開発は今日の医療の場における最も重要な要請の一つといえる。しかし「長期に渡る圧・容量負荷」をシミュレーションできる培養細胞実験系が存在しないため心不全の発症機構は未だなおほとんど不明のままである。本メカニズムを解明するために優れた疾患モデル動物を用いた解析が必須であろう。本研究計画において我々は、「長期に渡る食塩負荷による心肥大・心不全発症」を正確に再現可能なモデル動物であるダール食塩感受性ラット(Dahl salt-sensitive rat)<sup>3)</sup>を用い、心筋細胞における遺伝子発現様式の変化を DNA チップを主体としたゲノミクス技術を用いて網羅的に解明するという

独創的なアプローチを試みる。本解析によって心肥大・心不全発症の分子機構に新しい情報が本邦よりもたらされると期待される。

### 2. 研究方法

**2.1** Dahlラットは遺伝的食塩感受性動物であり、高食塩摂取により数週間で心肥大・全身性高血圧を発症し、高食塩負荷を続けると数ヶ月のうちに心肥大へと移行しやがて死へ至る<sup>3)</sup>。したがって、高食塩負荷における Dahl ラットの病態の変化は、以前より本邦に多い食塩負荷型の高血圧・心不全の経過を短期間のうちに正確にシミュレートしていると言えよう。我々は既に Dahl ラットを用いた小動物血圧計、心臓超音波検査による基礎実験を終了し、6週令の Dahl ラットに 8%食塩含有食を摂取させると、2週後に全身性高血圧が発症し 5週後に心筋細胞の肥大がピークとなるが、食塩負荷を持続すると約 7週後より急速に心機能が退化し、9-11週でほぼ全例死亡することを確認した。そこで本研究計画においてはこれら各週令のラットより心室筋を採取し、DNA チップ<sup>4)</sup>およびエピジェネティック技術<sup>5)</sup>を用いて心筋細胞の経時的変性を明らかにする。

**2.2** Dahl ラットに食塩負荷をかけた群と、低食塩食を摂取させたコントロール群より各週令毎に心筋組織を採取し、

メッセンジャーRNA を抽出して DNA チップ解析 (Affymetrix 社 GeneChip RGU34A) を行う。本チップ解析によって約 9000 種類のラット遺伝子の心筋における発現変化が網羅的に解析できる。我々は既に殆どの心筋サンプルにおける DNA チップデータ取得を終了しており<sup>6,7)</sup>、例えば心肥大期と心不全期とのデータを直接比較することにより後者で発現が減弱する遺伝子 DBP (D-binding protein) の同定に成功した。DBP は細胞をアポトーシス (細胞死) から守る機能を有する転写因子であり、心不全への移行に伴って同遺伝子の発現が特異的に減少する事実は興味深い。DBP が直接的に心機能に関与することを解析する目的で、同遺伝子産物の優性抑制変異体を作成し、培養ラット心筋細胞に導入したところ細胞内カルシウム濃度の調節が重度に傷害されることが示された。すなわち DNA チップによって検出された「DBP 遺伝子の発現低下」が直接心不全の発症に関与することが示唆された。

2. 3 また得られたデータベースより幾つかのクライテリアの基で心肥大・心不全関連遺伝子をさらにスクリーニングする。同定された疾患関連候補遺伝子の検証は、DBP の例と同様にラット培養心筋細胞への導入実験によって確認する。

2. 4 DNA チップ解析のみでは得られる情報が既知の遺伝子に偏重するため、Dahl ラットにおける全ての遺伝子を比較するためには、未知の遺伝子も完全にスクリーニングする必要がある。本目的のためには、「発現量が異なる cDNA 断片」を網羅的に単離する cDNA サブトラクションクローニング法が有効である。そこで例えば「心不全期」対「同一週令のコントロールラット」の様に病態の理解に役立つ幾つかのサンプルペア間でサブトラクションクローニングを行い、例えば「コントロールに対して心不全心筋で極端に発現が亢進(あるいは低下)する遺伝子断片」等を網羅的に同定する。

2. 5 DNA チップおよび cDNA サブトラクションクローニングによって同定された疾患関連遺伝子の機能をトランスジェニックマウスなどの発生工学的手法を用いて、個体において検証する。また疾患関連遺伝子の発現変化自体のメカニズムを明らかにするために、これら遺伝子群のメチル化の変化や、遺伝子周囲の染色体アセチル化の変化などを最新のエピジェネティクス技術を用いて解明する。

2. 6 任意の 2 サンプル間でエピジェネティック修飾が異なる遺伝子をゲノムワイドに網羅的に同定する目的で

Differential Chromatin Scanning (DSC)法を開発した<sup>8,9)</sup>。実際にはアセチル化ヒストンに対するモノクローナル抗体 (Upstate Biotechnology, CA)を用いて、アセチル化レベルが異なる遺伝子をスクリーニングする手法として開発した。まずテスター及びドライバー細胞はホルマリン固定を行ったあと、同抗体によるクロマチン免疫沈降を行った。純化されたゲノム DNA を RsaI 制限酵素で消化後、TAG アダプター (5'-CCACCGCCATCCGAGCCTTTCTGCCC GGG-3'/3'-GAAAGACGGGCC-5') と結合した。さらに TAG プライマー (5'-CCACCGCCATCCGAGCCTTT C TGC-3') による PCR 反応を行うことで、免疫沈降 DNA 断片を増幅した。さらにテスターサンプルは制限酵素 XmaI、ドライバーサンプルは制限酵素 SmaI でそれぞれ消化し、前者はさらにサブトラクションアダプター (5'-GTGAGG GTCGGATCTGGCTGGCTC-3'/3'-CGACCGAGGGCC-5') と結合させた。これを熱変性した後、そのうち 0.5 µg をやはり熱変性させたドライバーサンプル (40 µg) とアニールさせた (67°C, 20-24 時間)。その後サブトラクションプライマー (5'-GTGAGGGTCGGATCTGG CTGGCTC-3') により PCR を行うことで、テスターサンプル特異的な DNA 断片を増幅した。Mung bean nuclease にて残存一本鎖 DNA を消化した後、PCR プロダクトを XmaI で制限酵素消化した。さらにセカンドサブトラクションアダプター (5'-GTT AGCGGACACAGGGCGGGTTCAC-3'/3'-GCCCAGTGG GCC-5') と結合させ、再びドライバー DNA とアニールさせた後、セカンドサブトラクションプライマー (5'-GTT AGCGGACACAGGGCGGGTTCAC-3') により PCR を行った。得られた産物を pBlueScript ベクターに挿入し、インサートの塩基配列を決定した。得られたデータはヒトゲノム塩基配列データベース (Genome Bioinformatics Group of the University of California at Santa Cruz の June, 2003 アッセンブル、<http://genome.ucsc.edu/>) に対して BLAST サーチし、アノテーション処理を行った。Dahl ラットに高食塩を付加し約 7 週間経過する事で、全例に心不全を誘導することが出来た。一方低食塩摂取 Dahl ラットは全例健常であった。両グループのラットより左室心筋細胞を外科的に切除し、DCS 法による解析を行った。またラット心筋細胞株である H9C2 は 10% 仔牛胎児血清を含む DMEM/F12 メディウム (GIBCO-BRL) 中にて 37 度 5% CO<sub>2</sub> 培養条件下にて継代培養を行った。H9C2 細胞は American Type Culture Collection (Rockville, MD) より入手した。またヒストン脱アセチル化酵素の阻害には、300

nM の tricostatin A (TSA, SIGMA) を H9C2 細胞に添加する事で行った。新生仔ラットの新鮮心筋細胞は Yamamoto らの方法<sup>10)</sup>により調整し、10%仔牛胎児血清含有 DMEM/F12 メディウムにて培養した。

## 2.7 定量的 real-time PCR

ゲノム DNA は QIAprep Spin Miniprep Kit にて、また total RNA は RNeasy Mini Kit (両者とも QIAGEN, Clifton Hill, VA) にて調整した。cDNA の合成には、PowerScript 逆転転写酵素 (Clontech, CA) および oligo dT プライマーを用いて total RNA より作製した。得られたゲノム DNA あるいは cDNA を基質として、各ゲノム断片中に配置されたオリゴヌクレオチドをプライマーとした PCR を行った。試薬は QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) 社のものを用いた。PCR 産物量は ABI PRISM 7700 sequence detection system (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) にてリアルタイムに計測し  $C_t$  値を測定した。

## 2.8 ChIP-to-seq 法

クロマチン免疫沈降により得られたゲノム断片の分布を網羅的に解析する目的で、Roche 社の 454 ゲノムシーケンサーによる大規模解析を行った。これはパイロシーケンス法<sup>11)</sup>により一度に 20 万種類以上のクローンについて配列情報を得る手法で、得られた配列情報をヒトゲノム配列に照合することで、ゲノム上のどの領域がエピジェネティック修飾を受けているか明らかにすることが出来る。具体的にはクロマチン免疫沈降で得られたゲノム断片の両端にアダプターを付加し PCR 反応により増幅した。さらに 454 ゲノムシーケンサー用ビーズとアニールさせ、オイル中でのエマルジョン PCR を行った。このビーズを、マイ

クロタイタープレートにランダムに播き、それぞれの場所で in situ にシーケンス反応を行った。

## 3. 研究結果

3.1 6 週齢の Dahl ラットに対して 0.3% あるいは 6% の食塩含有食を接種させて飼育したところ、図 1 のように高食塩負荷群 (黒丸) においてのみ低食塩負荷群には認められない全身性高血圧が投与後 2 週間で生じた<sup>6)</sup>。継続的な高食塩負荷接種は投与後 4-6 週時をピークにして高血圧を誘導した。さらに同じマウスを超音波検査装置にて解析したところ、右図の通り左室駆出率 (EF: ejection fraction) が高食塩負荷群においてのみ、13 週齢から急速な低下を見た。以上より Dahl ラットは高食塩負荷によって速やかに高血圧を生じると共に、心不全を発症することが確認された。

3.2 これら各病期のラット各 2 例の左室心筋を調整し、mRNA を純化し、cDNA を合成した。さらに ENZO Diagnostics 社の ENZO BioArray RNA labeling kit を用いてビオチン標識した cRNA を作成し、Affymetrix 社の RGU34A マイクロアレイとハイブリダイズした。その結果約 8800 プローブセットの発現量を各病期において測定することが出来た<sup>6)</sup>。

得られた遺伝子発現量データを元に階層的クラスタリング解析<sup>12)</sup>を行ったところ図 2 にあるような遺伝子系統樹を作成することが出来た。高食塩負荷群 (H) において低食塩負荷群 (L) とは異なる遺伝子発現プロファイルが存在することが判る。

図1 Dahl ラットの心不全誘導

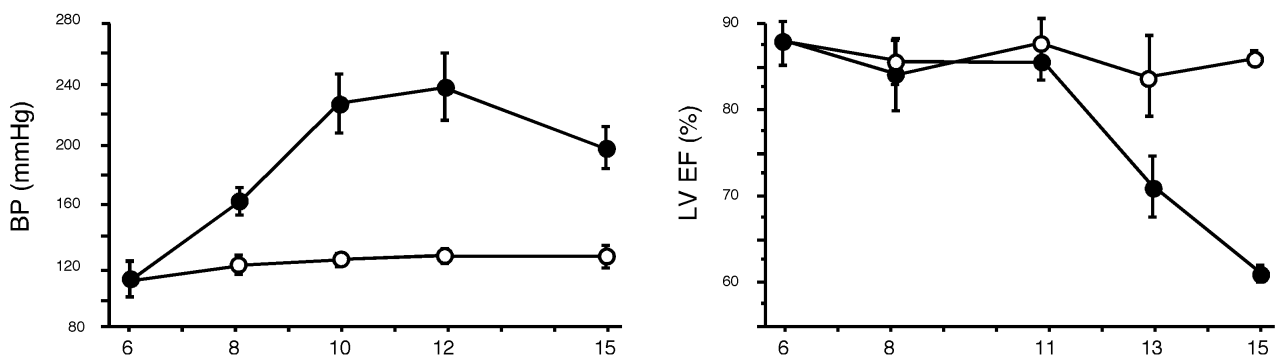
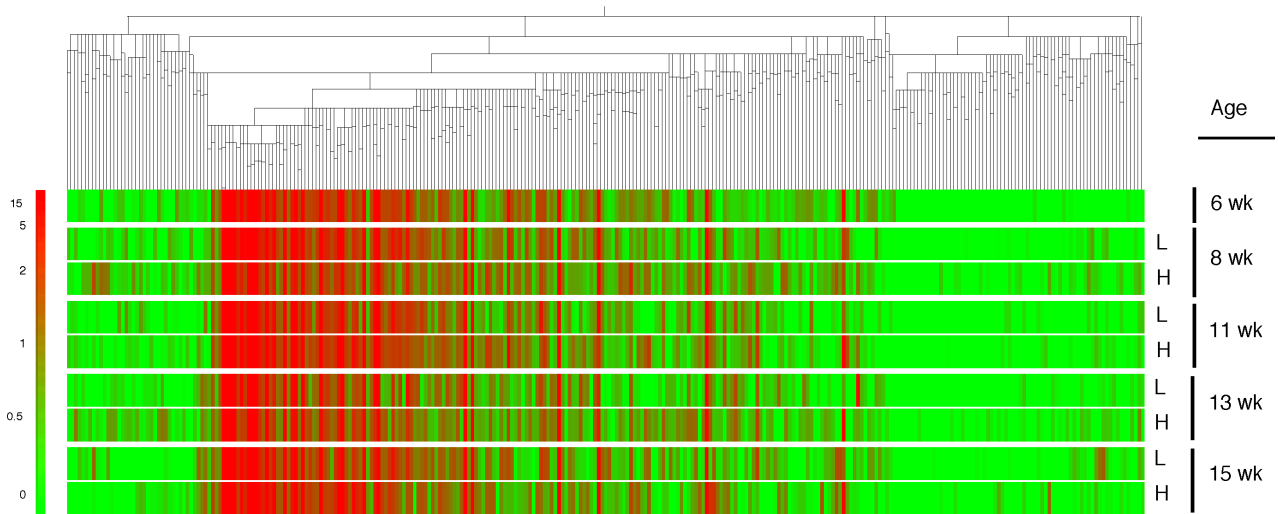




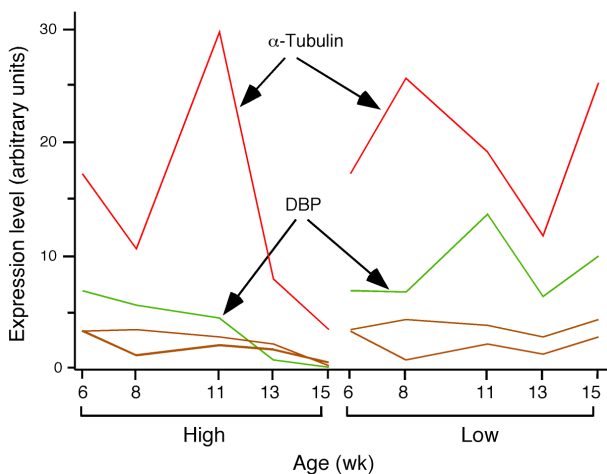
図2 DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイル



これら遺伝子発現データより「EF が低下する心不全期」特異的に発現量が低下する遺伝子を抽出したところ下図のように 4 種類の遺伝子が同定された。なかでも DBP (D-binding protein) は細胞死(アポトーシス)制御に重要な役割を果たす HGF/E4BP4 ファミリーの転写因子であり、その構造上抗アポトーシス作用に働くと予想される<sup>13)</sup>。DBP が心不全期特異的に発現が低下することは、心不全期の心筋において細胞死が誘導されることの原因となっている可能性もある。

遺伝子発現量の変化を表している。ANP が高食塩負荷群において系時的に発現上昇している一方、DBP 遺伝子はし不全期への移行に伴い発現量が低下していることが判る。さらに我々は DBP の dominant negative 変異体を発現する組換えアデノウィルスを作成し培養ラット心筋に導入したところ、アンギオテンシン II 添加による細胞内カルシウム濃度の上昇がブロックされることが示された。

図3 心不全発症に伴い発現が減少する遺伝子



得られた遺伝子発現データの検証をする目的で定量的 PCR 法である real-time PCR により mRNA 量を測定した。図 4 上に心房性ナトリウム利尿蛋白 (ANP) 遺伝子<sup>14)</sup> の発現量を、図 4 下に DBP 遺伝子の発現量をそれぞれ測定した結果を示す。いずれもラットの週齢を横軸にして

図4 病期依存性遺伝子の発現検証

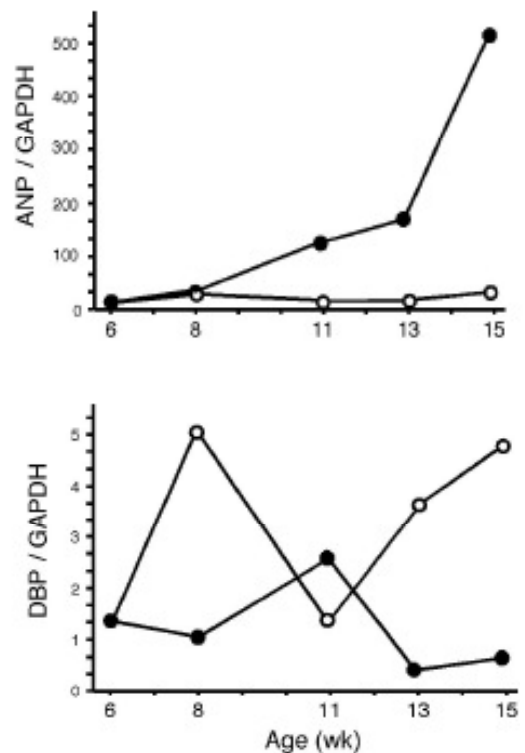
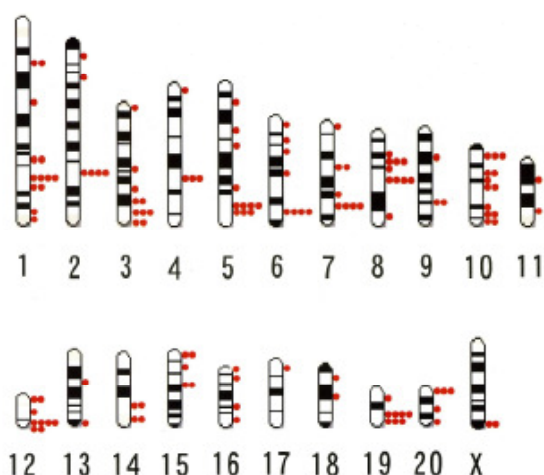


図5 ヒストン脱アセチル化酵素の標的領域



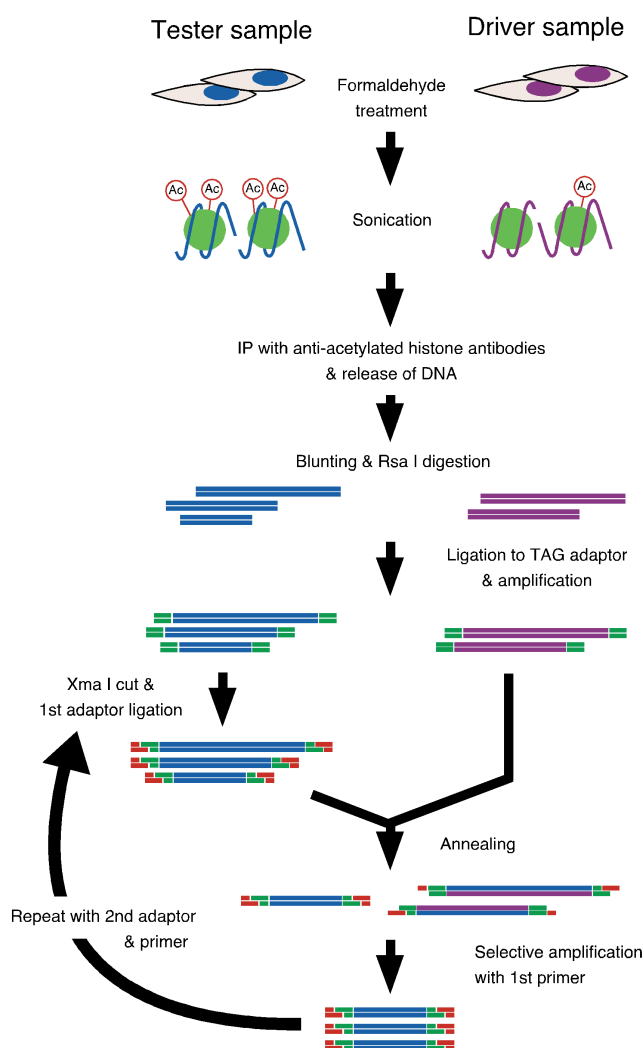
### 3. 3 DCS 法の開発

心不全において多くの心筋がほぼ同期して変性していくことより、その実態は点突然変異のような遺伝子変化ではなく、計時的なエピジェネティック変化が疾患発症原因となっている可能性が高い。実際これまでヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の活性異常が心肥大、心不全の発症に関与するとの報告が複数存在する。従って Dahl ラットうっ血性心不全の心筋細胞において、具体的にどのような遺伝子のヒストン蛋白アセチル化異常が生じているのかは、うっ血性心不全発症機構の解明において極めて重要である。しかし残念ながらこれまでゲノムワイドにヒストン変化をスクリーニングする手法は殆ど存在しなかった。そこで我々は任意のサンプル間でエピジェネティック修飾が変化するゲノム領域を同定するスクリーニング法である DCS 法を新たに開発した<sup>8,9)</sup>。

本法の概略を図6に示す。DCS法はすべてのエピジェネティック修飾に応用可能であるが、ここではヒストンアセチル化レベルの解析の場合を示す。今 Tester サンプルと Driver サンプルを比較し、前者においてのみヒストンがアセチル化されているゲノム断片を同定したいとする。まず比較したい2種類の組織・細胞を可溶化し、着目するヒストン修飾に対する抗体(ここではH3ヒストンのアセチル化修飾に対する抗体を示す)にてクロマチン免疫沈降を行う。得られた沈降物よりゲノムDNA断片を回収し、両端にTAGプライマーを結合させ、TAGプライマーによるPCRを行う。得られた産物のうちTesterから得られたゲノム断片のみTAGプライマー配列の一部を制限酵素により切断し、一次アダプターを結合させる。TesterとDriverそれぞれから増幅されたフラグメントを熱によりいったん一本鎖とした

後、両者を(Driver 過剰な状態で)混和する。その結果得られた二本鎖DNAのうち、両端に一次アダプター配列が再構築されるのはTesterにしか存在しないDNA断片のみになる。これを一次アダプターの配列を用いてPCRする事でTester特異的フラグメントのみを増幅する。さらにアダプター配列を制限酵素にて消化切断し、二次アダプターを結合させる。一次アダプターのととき同様なPCRを行う事でTester特異的フラグメントを増幅する。この2ステップのPCRを行う事で、効率よくTester特異的断片のみを純化することが出来る。

図6 DCS法の原理



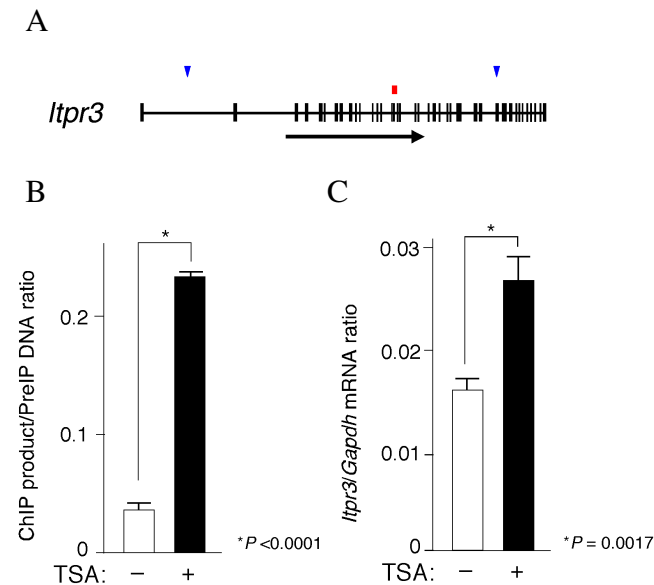
我々はこの方法の有用性を検討する目的で、心筋由来細胞株H9C2にHDAC阻害剤であるtrichostatin A(TSA)を添加した際にヒストンアセチル化レベルが変化する遺伝子の同定を試みた<sup>9)</sup>。DCS法で得られた288クローンの塩基配列を決定したところ、そのうち178クローンはゲノム

上で遺伝子の 5'領域にマップされることが判った。ランダムに選んだ 38 クローンについて TSA 刺激におけるアセチル化の変化を測定したところ 37 クローン(97%)において TSA 依存性のアセチル化上昇が確認された。以上より DCS 法によって極めて効率良く HDAC 標的遺伝子を同定可能なことが明らかになった。

### 3.4 DCS 法で同定されたゲノムフラグメントの検証

DCS 法が実際に心筋細胞において重要なフラグメントを同定した事を示すために、上記で得られた遺伝子群の心筋における検証を行った。例えば図 7 A にあるように、得られた断片の一部は inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 gene (*Itp3*) 遺伝子のエクソンからイントロンにまたがる領域に位置していた。本断片領域に結合するヒストン蛋白のアセチル化レベルが実際に Tester 細胞と Driver 細胞とで大きく異なることを確認するために H9C2 細胞に TSA を添加した場合と添加しない場合でそれぞれクロマチン免疫沈降したものを基質として *Itp3* ゲノム断片の量を定量的 real-time PCR 法により測定した。

図 7 DCS 法の検証



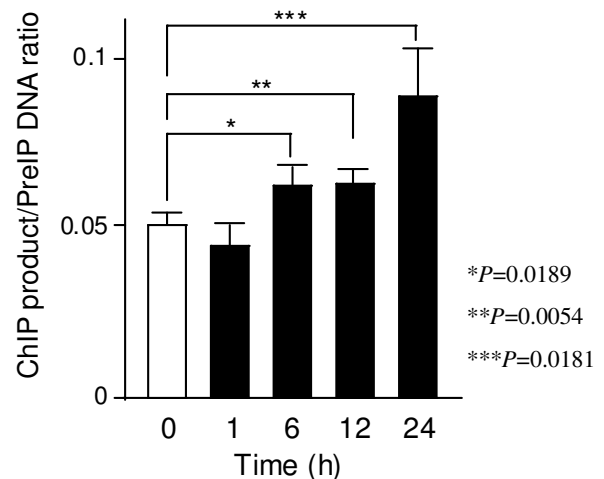
その結果図 7 B にあるように、TSA 添加により本ゲノム断片が著明に増加することが判った。すなわち TSA 添加により本ゲノム断片周囲のヒストン蛋白はアセチル化が誘導されていると考えられた。ちなみに本アセチル化の変化が遺伝子の発現誘導にリンクしているか否かを検証するために、H9C2 細胞より cDNA を調整し、*Itp3* 遺伝子 mRNA の量を定量的 real-time RT-PCR 法により測定した。その結果図 7 C にあるように、*Itp3* 遺伝子発現量はアセ

チル化の変化に伴い著明に誘導される事が示された。以上より我々が DCS 法で同定したゲノム断片周囲のアセチル化が実際に変化しているのみならず、その遺伝子の発現量も変化する事が確認された。

### 3.5 DCS 法で同定されたゲノム断片の生理的意義

我々が DCS 法で同定したゲノム断片が生理的な心筋肥大の過程で実際にヒストンアセチル化レベルが変化している事を確認するために、以下の実験を行った。DCS 法で同定されたゲノム断片の一種は *Jagged 2* 遺伝子の最終エクソン上にマップされた。本ゲノムフラグメントのヒストンアセチル化レベルは図 7 と同様に H9C2 細胞で確認されたが、我々はさらに新生仔ラット心筋細胞における同断片のアセチル化レベルを解析した。フレッシュに調整された新生仔ラット心筋細胞はカルジオトロピン-1 (CT-1) 刺激によって新肥大反応が惹起される<sup>15)</sup>。そこで我々が同定したフラグメントに結合するヒストンのアセチル化レベルが、この CT-1 刺激によって変化するか否かを検証した。その結果 図 8 にあるように CT-1 の添加により時間依存性にエピジェネティック修飾が誘導される事が確認された。すなわち生理的な心筋肥大刺激によって我々の同定した遺伝子セットのヒストンアセチル化が変化する事が明らかになった。

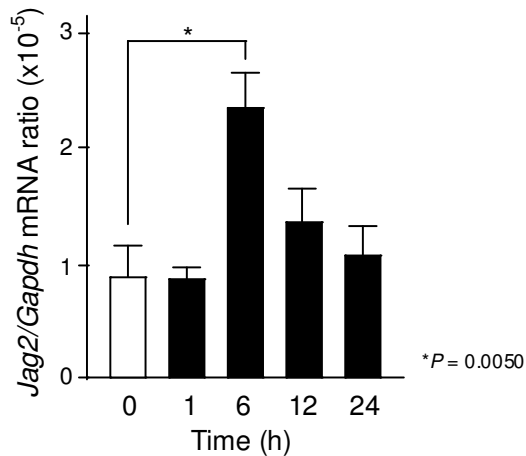
図 8 新鮮心筋細胞における検証



しかも図 8 に示されたヒストンアセチル化の変化は同断片がマップされた *Jag2* 遺伝子の mRNA 量に反映された。*Jag2* 遺伝子の発現量を定量的 real-time RT-PCR 法により新生仔ラット心筋細胞にて測定したところ、図 9 にあるように、TSA 刺激後約 6 時間をピークとした *Jag2* 遺伝子の転写活性化が確認された。したがって DCS 法により同定した心筋細胞内のヒストン脱アセチル化酵素標的分子生理的

刺激によって調節されている事が証明された。

図9 ヒストン修飾による *Jag2* 遺伝子の活性化

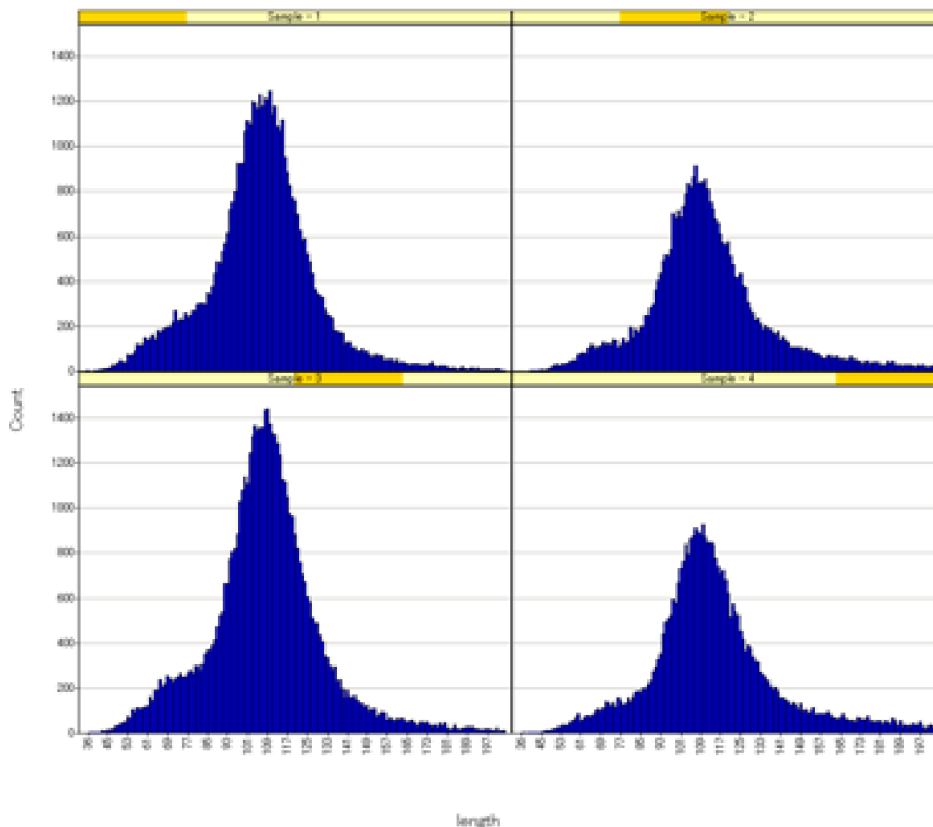


### 3.6 ChIP-to-seq 法

我々はさらにゲノムワイドでエピジェネティック変化が生じる遺伝子を明らかにする目的で、クロマチン免疫沈降法と超高速シーケンスシステムを組み合わせた ChIP-to-seq プロトコールを完成させた。これまで同様の目的には ChIP-on-chip 法<sup>16)</sup>が主に用いられてきたが、これらはマイ

クロアレイへの非特異的結合が否定できず、得られたデータの信頼性に問題があった。一般のキャピラリーシーケンス技術であれば一度に数百種類のクローンに関する配列情報しか得られないが、近年開発されてきた pyrosequencing 技術などでは、一度に数十万～数百万クロンの塩基配列解析が期待できる。そこで、クロマチン免疫沈降によって純化されたゲノム断片を超高速シーケンサーにて解析し、得られた配列情報をゲノムにマップすれば、そこでの頻度分布がそのままゲノム上のエピジェネティック修飾の強度を反映すると考えられた。そこで実際にヒトの心不全心筋検体に対してヒストン修飾抗体によるクロマチン免疫沈降を行い、Roche 社のパイロシーケンス機械による解析を行った。計 4 種類の免疫沈降産物に対してシーケンスを行い、各サンプルについて約 5 万種類ほどのクローン配列を得た。これら配列の長さ分布を図 10 に示すが、何れのサンプルでも安定して約 100 塩基前後をピークとした分布を描くことが判った。そこで 70 塩基長以上の配列についてヒトゲノムにマップしたところ、ヒトの心不全は特異的なエピジェネティックプロファイルを持つことが明らかになった。

図 10 ChIP-to-seq で得られたクローン配列長の分布



#### 4. 考 察

4. 1 高血圧・心不全各病期の Dahl ラットの左室心筋のマイクロアレイ解析を行うことにより、各病期に固有の発現を示す遺伝子群を同定することに成功した。さらに心不全への移行に伴って発現が低下する遺伝子群の抽出にも成功し、これには DBP 遺伝子が含まれていた。これらマイクロアレイ解析により、ヒトの臨床検体では解析困難である左室心筋の貴重な遺伝子発現データベースを構築することに成功した。これらは今後高血圧・心不全の研究解析に広く利用されるであろう。

4. 2 細胞分裂を伴わない心室筋が変性していくメカニズムには、エピジェネティックな変化、中でもヒストンのアセチル化の変化が重要な役割を果たしていることが予想される<sup>17)</sup>。しかしこれまでゲノムワイドにヒストンアセチル化のレベルを把握することは困難であった。我々はアセチル化ヒストンに対する抗体による免疫沈降物にサブトラクション PCR を組み合わせる事により新しく DCS 法を開発した。本法を利用することで初めて心不全におけるエピジェネティックな変化がゲノムワイドに明らかになると期待される。

4. 3 心筋内に生じているエピジェネティック変化を網羅的に解析する目的で新たに DCS 法を開発した。本法を H9C2 心筋細胞株に応用する事で、心筋内でのヒストン脱アセチル化酵素の標的分子をスクリーニングすることが出来た。

4. 4 DCS 法で同定されたヒストン脱アセチル化酵素の標的遺伝子は新鮮ラット心筋における生理的肥大誘導刺激によってもそのヒストンアセチル化レベルが制御されている事が明らかになった。

4. 5 ヒト心不全発症時におけるエピジェネティック変化を、ChIP-to-seq 法を用いることで、ゲノムワイドに示すことが出来た。またエピジェネティック変化は必ずしも mRNA の発現変化と平行ではないことも明らかになり、エピジェネティック異常自体の持つ疾患発症への関わりが明らかになった。

#### 5. 今後の課題

5. 1 我々の解析の結果、食塩高負荷時に心筋内でどのような遺伝子発現が生じるか、またその際にどのようなエピジェネティック変化が生じるかを明らかにすることが出来た。これらは実際の心不全発症機構に深く関与すると考えられ、個別の遺伝子の同定を今後行っていきたい。

5. 2 Dahl ラットの DNA マイクロアレイ解析で同定された DBP 遺伝子が、実際の生体内における心不全発症へ関

与することを *in vivo* で検証する目的で、発生工学的手法を用いて解析する。まず心筋特異的発現を示す alpha myosin heavy chain 遺伝子のエンハンサー・プロモーターによって正常 DBP 遺伝子を発現する遺伝子導入ユニットを作成し、これを Dahl ラットに導入したトランスジェニックラットを作成する。本ラットは高食塩負荷の有無に拘わらず DBP 遺伝子の発現が変化しないはずであり、心不全の発症が遅延すると期待される。一方同じ alpha myosin heavy chain 遺伝子エンハンサー・プロモーターによって dominant negative DBP を発現するユニットを正常ラット (Dahl ラットの親系である SD ラット) に導入したトランスジェニックラットを作成し、本ラットが遺伝性に心不全となるかを検証する。

5. 3 DCS 法を用いて Dahl ラットの高血圧期、心不全期など各病期の左室心筋検体を比較し、病期依存性にヒストンアセチル化レベルが変化する遺伝子群を解明する。これをさらに発展させ、ヒト臨床検体における解析も行う予定である。

今回我々が開発した DCS 法を直接 Dahl ラット心筋に応用する事で、心肥大時及び心不全発症時に大きく変化するエピジェネティック変化を網羅的に明らかにする事が可能になる。次年度は Dahl ラット心筋において、どのようなエピジェネティック修飾が、どのような遺伝子に対して心不全時に制御されているかを明らかにしたい。

#### 文 献

- 1) James, M.A., Saadeh, A.M. & Jones, J.V.: Wall stress and hypertension. *J. Cardiovasc. Risk* **7**: 187-190, 2000.
- 2) Braunwald, E.: Shattuck lecture-cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *New. Engl. J. Med.* **337**: 1360-1369, 1997.
- 3) Rapp, J.P., Wang, S.M. & Dene, H.: A genetic polymorphism in the renin gene of Dahl rats cosegregates with blood pressure. *Science* **243**: 542-544, 1989.
- 4) Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. & Trent, J.M.: Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* **21**: 10-14, 1999.
- 5) Bannister, A.J. & Kouzarides, T.: Reversing histone methylation. *Nature* **436**: 1103-1106, 2005.
- 6) Ueno, S., Ohki, R., Hashimoto, T., Takizawa, T., Takeuchi, K., Yamashita, Y., Ota, J., Choi, Y.L., Wada, T., Koinuma, K., Yamamoto, K., Ikeda, U., Shimada, K. &

- Mano, H.: DNA microarray analysis of in vivo progression mechanism of heart failure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**: 771-777, 2003.
- 7) Ohki, R., Yamamoto, K., Ueno, S., Mano, H., Misawa, Y., Fuse, K., Ikeda, U. & Shimada, K.: Transcriptional profile of genes induced in human atrial myocardium with pressure overload. *Int. J. Cardiol.* **96**: 381-387, 2004.
- 8) Kaneda, R., Toyota, M., Yamashita, Y., Koinuma, K., Choi, Y.L., Ota, J., Kisanuki, H., Ishikawa, M., Takada, S., Shimada, K. & Mano, H.: High-throughput screening of genome fragments bound to differentially acetylated histones. *Genes Cells* **9**: 1167-1174, 2004.
- 9) Kaneda, R., Ueno, S., Yamashita, Y., Choi, Y.L., Koinuma, K., Takada, S., Wada, T., Shimada, K. & Mano, H.: Genome-wide screening for target regions of histone deacetylases in cardiomyocytes. *Circ. Res.* **97**: 210-218, 2005.
- 10) Yamamoto, K., Dang, Q.N., Kelly, R.A. & Lee, R.T.: Mechanical strain suppresses inducible nitric-oxide synthase in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* **273**: 11862-11866, 1998.
- 11) Ronaghi, M.: Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* **11**: 3-11, 2001.
- 12) Alon, U., Barkai, N., Notterman, D.A., Gish, K., Ybarra, S., Mack, D. & Levine, A.J.: Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6745-6750, 1999.
- 13) Mueller, C.R., Maire, P. & Schibler, U.: DBP, a liver-enriched transcriptional activator, is expressed late in ontogeny and its tissue specificity is determined *posttranscriptionally*. *Cell* **61**: 279-291, 1990.
- 14) Rosenzweig, A. & Seidman, C.E.: Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu. Rev. Biochem.* **60**: 229-255, 1991.
- 15) Wollert, K.C. & Chien, K.R.: Cardiotrophin-1 and the role of gp130-dependent signaling pathways in cardiac growth and development. *J. Mol. Med.* **75**: 492-501, 1997.
- 16) Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L. & Lander, E.S.: Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**: 169-181, 2005.
- 17) McKinsey, T.A. & Olson, E.N.: Cardiac histone acetylation-therapeutic opportunities abound. *Trends Genet.* **20**: 206-213, 2004.

## Disease-Model Animals-Based Screening for Genes Involved in Molecular Pathogenesis of Cardiac Hypertrophy and Heart Failure

Hiroyuki Mano, Kazuyuki Shimada

Faculty of Medicine, Jichi Medical School

### Summary

Sustained pressure overload onto heart leads to hypertrophy of cardiac muscle, which is eventually followed by heart failure. Although pumping failure of heart is still one of the leading causes of human death, little is still understood for the underlying mechanism how ability of cardiac muscle becomes impaired. Studies on this issue have been seriously hampered by the difficulty in sampling human ventricle specimens at various stages in the development of hypertrophy-to-heart failure course. Dahl salt-sensitive rats are genetically hypersensitive to sodium intake. When fed a high sodium diet, they develop systemic hypertension, followed by cardiac hypertrophy and finally heart failure within a few months. Therefore, Dahl rats represent a good model with which to study how heart failure is developed *in vivo*. With the use of "GeneChip" DNA microarray technology, we have obtained gene expression profiling in cardiac myocytes during the course of heart failure in Dahl rats. In addition, we have developed a novel epigenetics technology, "ChIP-to-seq" method, by coupling chromatin immunoprecipitation (ChIP) to a high-throughput sequencing system. Our ChIP-to-seq enables to annotate ~200,000 ChIP products simultaneously, and clarifies the changes in epigenetic profile among failed hearts at a very high resolution and fidelity. Application of the ChIP-to-seq method to the Dahl rat as well as human clinical specimens has, for the first time, revealed a disease-dependent epigenetic profile in heart.

## 8. まとめ

プロジェクト研究リーダー 菱田 明 (浜松医科大学)

この研究を通じて、6 人のプロジェクトメンバー (分担研究者) は、それぞれの立場から、食塩感受性を規定する因子の解明と臨床指標の開発を目標に研究を行ってきた。

食塩感受性はその人の DNA で規定される固有の性質として理解し、その遺伝子を求めることにより食塩感受性もしくは非感受性集団を抽出することを目標に眞田、岩井の両分担研究者は食塩感受性遺伝子の検討を行った。眞田は、尿細管での Na 再吸収に重要な働きをするドパミンの作用を規定する因子として、ドパミン受容体のリン酸化に影響する G 蛋白共役型レセプターキナーゼ 4 の遺伝子多型が、食塩感受性と非感受性を区別する指標となりうるとの結論を得ることができた。今後より広い対象集団で検証することが必要である。一方、大規模な疫学的手法を用いて食塩感受性を規定する因子の存在の可能性を解析した岩井は Gitelman 症候群の原因遺伝子とされる SLC12A3 変異や、アルドステロン合成酵素である CYP11B2 の遺伝子多型が一部の特殊な集団の食塩感受性や非感受性を説明できることはあっても、食塩感受性高血圧を一つの遺伝子の変異で説明することは困難であるとの結論を出している。これらの結果は、食塩感受性を規定する因子が単一ではなく、多くの因子の組み合わせであることの反映であることを示している可能性があり、その場合には、単一遺伝子を探し当てることによって食塩感受性と非感受性を区別しようとするのが困難であることを示している。一方、食塩感受性 (もしくは非感受性) の一部を抽出する試みとしてはありうることを否定するものではなく、遺伝子多型などによって識別しようとする場合には、いくつかの候補遺伝子の

組み合わせによって食塩感受性集団を抽出することが必要であることを示した点で意義のある結果であった。

食塩感受性、非感受性を識別する方法は遺伝子レベルでの検索のみならず、食塩負荷に対する生体の反応の差や、食塩排泄に影響する因子を解明することでも可能になる可能性がある。そもそも食塩感受性を、「同じ程度の食塩排泄増加に要する血圧上昇の程度の差」によって識別するものとし、腎臓での食塩排泄調節にかかわる因子を検討することから食塩感受性の識別マーカーを明らかにしようとする研究が、西山、藤田、池谷の 3 分担研究者によってなされた、

西山は、尿中食塩排泄に重要な役割を果たす尿細管糸球体フィードバック機構について両者の差を検討し、食塩感受性高血圧ラットでは尿細管糸球体フィードバックが亢進していることによって食塩が排泄されにくい状況にあること、このフィードバックに ATP が強くかかわることが示された。また藤田は、交感神経系の反応性の異常による食塩排泄調節の異常に焦点をあて、中枢神経の酸化ストレス亢進が交感神経系を介して尿細管での食塩再吸収を亢進させていることが食塩感受性高血圧に関与していることを明らかにした。また池谷は、妊婦において循環血漿量が増加しているにもかかわらず、低血圧に傾くことから、妊娠中に増加するリラキシンの役割に注目し、食塩高血圧はリラキシンなど降圧系の機能異常に基づく可能性があることを報告した。これら 3 分担研究者の研究は、食塩感受性・非感受性に関与する因子を多面的に理解する上で大きな貢献をしたが、今後、こうした生理学的、病態生理学的アプローチの中から、食塩感受性



に大きく影響するマーカーを血中や尿中に発見する道につながる可能性がある」と期待される。

食塩感受性は高血圧との関係で論議されているが、高血圧を介さない機序での臓器障害があることが臨床医学の分野では問題とされている。しかし、臓器障害における食塩感受性のメカニズムや、感受性を規定する因子についてはほとんど検討がされていない。食塩過剰による臓器障害の代表としての心不全の発症にどのような分子異常が関与しているかについて、エピジェネティックな変化、microRNA の観点から検討した間野の研究はその端緒となるものである。この心肥大から心不全に移行していく過程で起きる多くのエピジェネティックな変化や microRNA の発現の変化を網羅的に解析する手法を開発した間野の研究は他分野での利用も期待できるものである。

今回の検討の中では、遺伝子的に食塩感受性であるとされる動物を用いた研究に代表されるように、「食塩感受性はその人の DNA で規定される固有の性質である」とする面からのアプローチが多かった。しかし、プロジェクトの議論の中で、

食塩感受性となることの多い腎機能障害、加齢、メタボリックシンドロームなど後天性因子も食塩感受性を強く規定することから、国民全体の中での食塩感受性高血圧の患者は先天性の因子以外に後天性の因子からの取り組みが必要であることが指摘された。高齢化やメタボリックシンドロームが問題となる日本社会に置いて、これら食塩感受性に関与する因子の解析が今後必要になると考えられる。

今回の 3 年間の研究では、食塩感受性か非感受性かを識別する臨床的手段の開発に直結する結果は得られなかったが、食塩感受性を規定する因子について多くの成果を挙げたプロジェクト研究ではあった。今後、さらにこの分野の研究が進むことを期待したい。

最後に、医学プロジェクトとして食塩感受性を取り上げていただき、財政面を始め、プロジェクトメンバー相互の研究協力、議論の場の提供など全面的支援をいただいたソルト・サイエンス研究財団に対し、プロジェクトメンバー一同を代表して感謝申し上げたい。

プロジェクト助成研究報告書 (医学)

Project Research Report

---

---

平成20年3月

March, 2008

財団法人ソルト・サイエンス研究財団  
The Salt Science Research Foundation

〒106-0032 東京都港区六本木7-15-14 塩業ビル  
Engyo Bldg. 7-15-14 Roppongi, Minatoku, Tokyo 106-0032, Japan

Tel. 03-3497-5711 Fax. 03-3497-5712

URL <http://www.saltscience.or.jp>

---

---

I S B N 9 7 8 - 4 - 9 0 2 1 9 2 - 1 6 - 2