

高血圧発症における「塩分メモリー」の検討とその分子機序の解明

篠村 裕之, 小口 英世, 石黒 喜美子, 伊藤 裕

慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科

概要 これまでに、当教室ではアンジオテンシン阻害薬(ACEI)とアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)の一過性投与が後の高血圧発症の持続抑制をもたらすことを報告してきた。これらの研究より、高血圧発症早期において RAS が重要な役割を果たす可能性が示唆されたが、塩分バランスの変動の影響は明らかにされていない。そこで今回、高血圧発症時期の一時的な塩分バランスの変化の影響が記憶される「塩分メモリー」が存在するか否かを検討することを本研究の目的とした。

【方法】 (実験1)雄 DS ラットを4群に分け、6週齢から14週齢まで低食塩食(0.12% NaCl)、高 NaCl 食(7% NaCl)、また高 NaCl 食と同等の Na 負荷となる高 Na/アミノ酸食(12.7% NaAA)を与えた後、正常食に戻し、その後約3か月間、血圧の変動を観察し、28週で組織学的・生化学的解析を行った。(実験2)雄 SHR を5群に分け、コントロールを除く群では同様に6週齢から14週齢まで低食塩食、高 NaCl 食、高 NaAA 食、また高 NaCl 食と同等の Cl 負荷となる高 Cl/アミノ酸食(11.6% AAC)を与えた後、正常食に戻し、その後約2か月間、血圧の変動を観察し、24週で組織学的・生化学的解析を行った。

【結果】 (実験1)高 NaCl 食投与群では、収縮期血圧 200 前後に上昇し、正常食に戻したあとも他群に比べ有意に血圧上昇を認めた。高 NaAA 群では投与中、投与後ともコントロール群に比して軽度血圧上昇を認めたが、高 NaCl 群に比して有意に低値であった。実験終了時には、血漿レニン活性ならびに血漿アルドステロンは高 NaCl 群のみ上昇していた。また、高 NaCl 群では腎臓の細動脈肥厚を認めた。(実験2)高 NaCl 群は、血圧が 300 mmHg 前まで上昇し、正常食に戻したあとも他群に比べ有意に血圧上昇を認めた。高 NaAA 群、AACI 群とも投与中、投与後ともコントロール群とほぼ同様な血圧上昇を示したが、高 NaCl 群に比して明らかに低値であった。24時間尿蛋白量は、高 NaCl 群では投与中・投与終了後ともに高値を示し、腎臓の細動脈肥厚も認めた。

【結論】 DS rat、SHR に一過性に高食塩食を投与し高血圧にすることで、正常食に戻した後も正常血圧に戻らない、すなわち「塩分メモリー」の存在が確認された。ナトリウム、クロールイオン単独でメモリー現象は確認されなかったことより、塩分メモリーが生じるためにはナトリウム、クロールの両イオンの存在が必要であることが示唆された。

1. 研究目的

高血圧症の患者数は全世界で9億7,200万人、すなわち成人人口の26.4%であることが推定されており、年々増加している^[1]。我が国においても、高血圧の有病率は30歳代で20%程度、60歳代で60%以上、と年齢とともに進行することが知られており、高齢化社会の進行に伴い高血圧患者数の増加傾向は続いている。

ヒトの高血圧症のモデル動物として、Dahl 食塩感受性

(DS)と高血圧自然発症ラット(SHR)が広く用いられている。前者は Sprague-Dawley 系ラットコロニーから高食塩食による高血圧発症を指標とした選抜・交配により確立された系統である。一方、SHR は、Wistar-Kyoto 系ラットコロニーから血圧高値のものから作製された系統であるが、このラットでは3週齢から10週齢の間に血圧が徐々に上昇し、10週齢を過ぎると高血圧の発症がほぼ完全に確立している。この時期はヒトにおいては高血圧前症(pre

-hypertension)に相当すると考えられ、後の高血圧の発症を決定する重要な時期(critical period)として、一つの治療標的として我々は注目している^[2]。

以前に、当教室でアンジオテンシン阻害薬(ACEI)とアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)の一過性投与が血圧に及ぼす影響を動物モデルを用いて検討した。まず、SHRの中でも特に臓器障害が生じ易い脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)の検討を行った。最初の実験ではSHRSPにACEIであるデラプリル、ARBであるカンデサルタン、血管拡張薬であるヒドララジンのいずれかを高血圧発症時期の‘critical period’に一致するよう、3週齢から10週齢の間に投与した^[3]。10週齢の時点で薬剤の投与を中止し、その後は30週齢までは薬剤を投与せず経過観察した。高血圧発症時期に一致して血管拡張薬を投与したラットでは投薬中は血圧が低下していたが、中止した後はコントロールのSHRSPと同程度まで血圧が上昇した。一方、ACEIまたはARBを投与したラットでは血圧低下が続き、血圧の最終値が無治療群に比して40 mmHg程低下していた。DSラットを用いた検討でも同様な“RASブロックメモリー”現象を確認した^[4]。

以上の結果から、‘critical period’におけるRAS活性が、後の高血圧の発症に大きく影響する可能性が示された。その可能性を検証するために、次の検討では‘critical period’にACEIやARBではなく、アゴニストであるアンジオテンシンII(AII)を正常血圧ラット(WKY)およびSHRに一時的に投与する実験を行った^[7]。WKY、SHRともにAII投与中のみならず、AII投与中止後も血圧の上昇が持続することが明らかとなった。また、ARBの一過性投与が腎の抵抗血管の血管肥大・内腔狭窄の抑制、更にはレニン合成の抑制をもたらすこと、一方ではAIIの一過性投与は逆に血管肥大・狭窄、それにレニン合成の促進を惹起することを見出した^[5]。上述した動物実験から、RASによる腎臓の細動脈肥厚が高血圧発症において重要な役割を果たす可能性が示唆された^[2]。最近、ARBの一過性投与がヒトの高血圧発症に与える影響を検討する臨床試験(TROPHY(Trial of Prevention of Hypertension)試験)が行われ、同様な結果が報告された^[6]。

以上より、高血圧発症早期においてRASが重要な役割を果たす可能性が示唆されたが、塩分バランスの変動の影響は明らかにされていない。そこで今回、高血圧発症

時期の一時的な塩分バランスの変化の影響が記憶される「塩分メモリー」が存在するか否かを検討することを本研究の目的とした。具体的には、DSラット、高血圧自然発症ラット(SHR)に一過性に高食塩食を投与して血圧上昇を起こした後に、通常食塩食に戻した場合の血圧の変化とその成因を検討することを目標とした。

2. 研究方法

2.1 DSラット、SHRへの一過性塩分投与の効果の検討

(実験1)雄DSラット(n=24)を4群に分け、コントロールを除く群では各々6週齢から14週齢まで低食塩食(0.12% NaCl)、高NaCl食(7% NaCl)、また高NaCl食と同等のNa負荷となる高Na/アミノ酸食(12.7% NaAA)を与えた後、正常食に戻し、その後約3か月間、定期的にtail-cuff法で血圧測定を行い、24時間蓄尿にて尿蛋白の変動、Na、Cl排泄量を測定した。28週で全群屠殺し、組織学的・生化学的解析を行った。

(実験2)雄SHR(n=30)を5群に分け、コントロールを除く群では同様に6週齢から14週齢まで低食塩食、高NaCl食、高NaAA食、また高NaCl食と同等のCl負荷となる高Cl/アミノ酸食(11.6% AACl)を与えた後、正常食に戻し、その後約2か月間、定期的にtail-cuff法で血圧測定を行い、24時間蓄尿にて尿蛋白の、Na、Cl排泄量を測定した。24週で全群屠殺し、組織学的・生化学的解析を行った。

2.2 検討項目

2.2.1 組織学的検討

腎・胸部大動脈・心臓のパラフィン固定標本を作製し、腎はPAS染色、大動脈はHE染色、心臓はMasson-trichrome染色を行なった。各切片は光学顕微鏡で観察し、腎臓の組織学的変化をスコア化した^[5]。

2.2.2 生化学的測定

血清BUN、Cr、血漿レニン活性、アルドステロン、また蓄尿中の尿蛋白、尿中Na・Cl排泄量を測定した。

2.2.3 Real-Time RT-PCRによる腎mRNA発現の検討

腎からmRNAを抽出し、レニン発現を、既報のreal-time RT-PCR法を用いて解析した^[5]。

3. 研究結果

3. 1 DS ラットへの一過性塩分投与の効果の検討

3. 1. 1 血圧の変化

高 NaCl 食群では、収縮期血圧 200 前後に上昇し、正常食に戻したあとも他群に比べ有意に血圧上昇を認めた。高 NaAA 群では投与中、投与後もコントロール群に比して血圧上昇傾向を認めたが、高 NaCl 群に比して有意に低値であった(コントロール群 140 ± 6 , 高 NaCl 群 $198 \pm$

8^{**} , 高 NaAA 162 ± 4 , 低食塩食群 144 ± 4 mmHg, $^{**}P < 0.01$) (図 1)。

3. 1. 2 尿蛋白

24 時間蓄尿蛋白量は高 NaCl 食群では投与中・投与終了後も有意に高値を認めた。高 NaAA 食群では投与中は軽度高値となるも、投与終了後は低下しコントロール群と同様であった(図 2)。

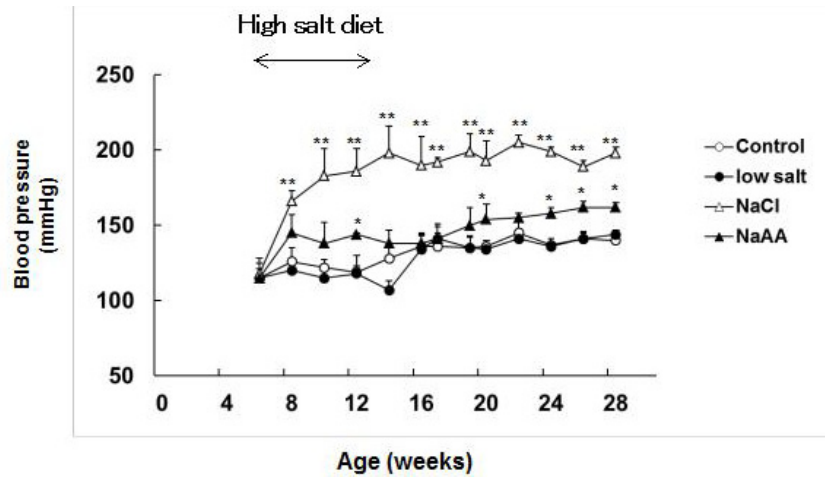


図 1. DS rat に一過性高食塩食を投与し、その後正常食に戻した後の血圧変化の推移 * , ** : $p < 0.05$, $p < 0.01$ vs control

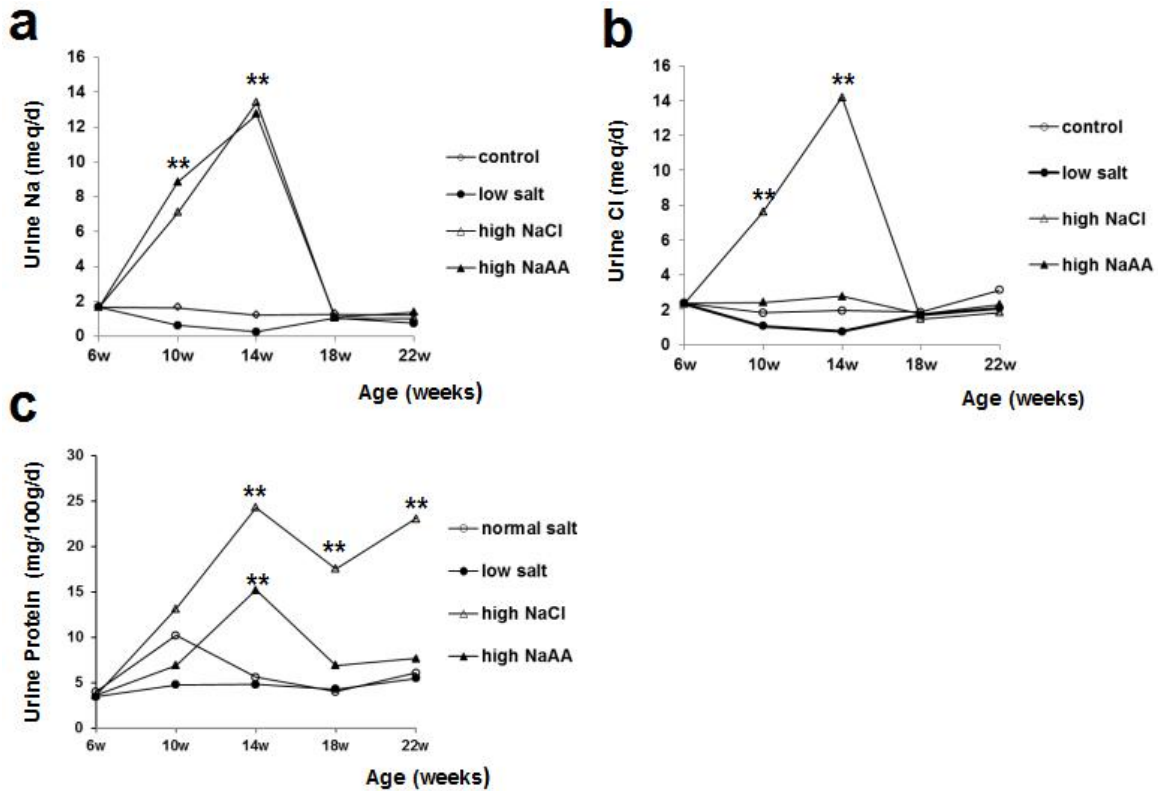


図 2. 蓄尿 Na、Cl、蛋白の推移(DS rat) ** : $p < 0.01$ vs Control

3. 1. 2 尿中 Na・Cl 排泄量

24時間蓄尿 Na 排泄量は高 NaCl または NaAA 食投与中はコントロール群に比して有意な上昇を認めた。同様に、蓄尿 Cl 排泄量は高 NaCl または AACL 食投与中はコントロール群に比して有意に上昇を認めた。

3. 1. 3 血液生化学

実験終了時に測定したクレアチンクリアランス、BUN・Cr 値に関しては、群間で有意差を認めなかった(図 3)。

3. 1. 4 腎臓の組織学的変化

実験終了時の糸球体所見は、高 NaCl 食群でメサンギウム基質の拡大がコントロール群に比して有意に上昇していた(図 4)。また、腎臓細動脈における中膜内腔比も有意に高値を認めた。

3. 1. 5 血漿レニン活性とアルドステロン

実験終了時には、血漿レニン活性ならびにアルドステロン濃度は高 NaCl 群でのみ上昇もしくは上昇傾向を認めた(血漿レニン活性:コントロール 2.3 ± 0.6 , 高 NaCl 群 $4.2 \pm 0.7^*$, 高 NaAA 群 1.4 ± 0.2 , 低食塩食群 2.4 ± 0.5 ng/ml/h, $*P < 0.05$) (図 5)。

3. 1. 6 腎臓のレニン mRNA の発現

腎におけるレニン mRNA の発現量は、高 NaCl 群で高

い傾向を示した。

3. 2 SHR への一過性塩分投与の効果の検討

3. 2. 1 血圧の変化

高 NaCl 群は、血圧が 300 mmHg 前まで上昇し、正常食に戻したあとも他群に比べ有意に血圧上昇を認めた。高 NaAA 群、AACL 群とも投与中、投与後もコントロール群とほぼ同様な血圧上昇を示したが、高 NaCl 群に比して明らかに低値であった(コントロール群 245 ± 3 , 高 NaCl 群 $285 \pm 2^{**}$, 高 NaAA 群 245 ± 3 , 高 AACL 群 247 ± 5 , 低食塩食群 243 ± 3 mmHg, $**P < 0.01$) (図 6)。

3. 2. 2 尿蛋白

24時間尿蛋白量は高 NaCl 食群では投与中・投与終了後ともにコントロールに比し有意に高値を認めた。高 NaAA 群では投与中は高値となるも、投与終了後は低下しコントロール群と同様であった(図 7)。

3. 2. 3 尿中 Na・Cl 排泄量

24時間蓄尿 Na 排泄量は高 NaCl または高 NaAA 食投与中コントロールに比して有意に上昇を認めた。また、蓄尿 Cl 排泄量は高 NaCl または高 AACL 食投与中コントロールに比して有意に上昇を認めた。

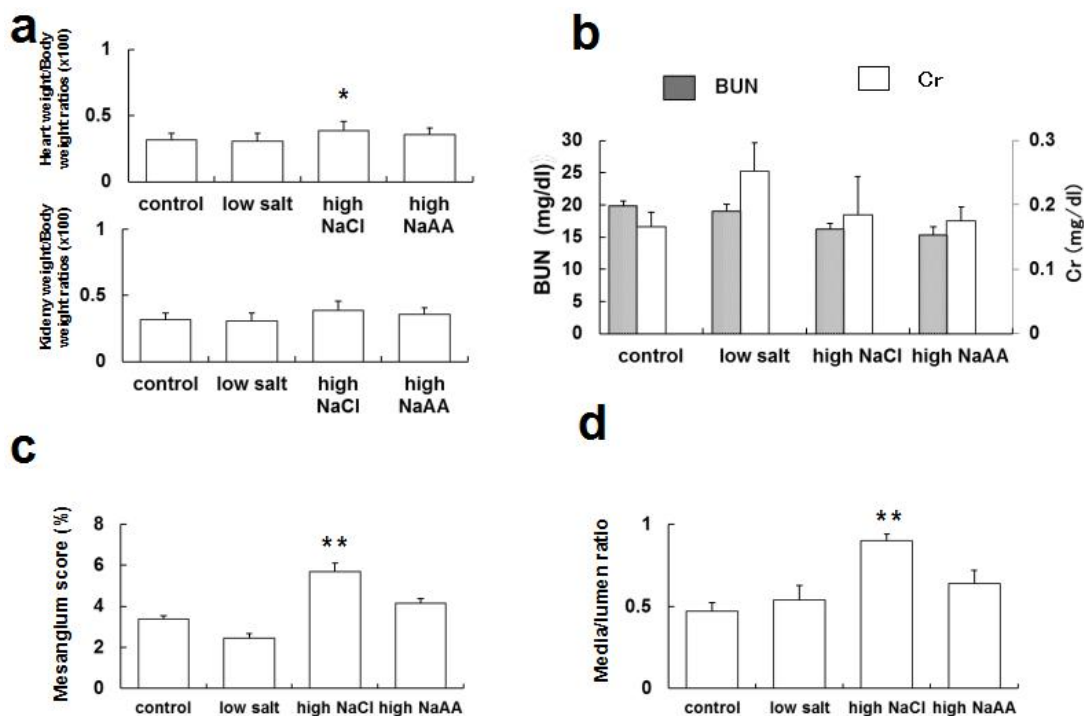


図 3. 実験終了時(28 週)における心、腎重量、生化学、組織所見(DS rat)。a. 心、腎重量(体重 100 g あたり)、b. BUN、Cr、*: $p < 0.05$ vs Control。c, d. 糸球体、血管、間質スコア、**: $p < 0.01$ vs Control。

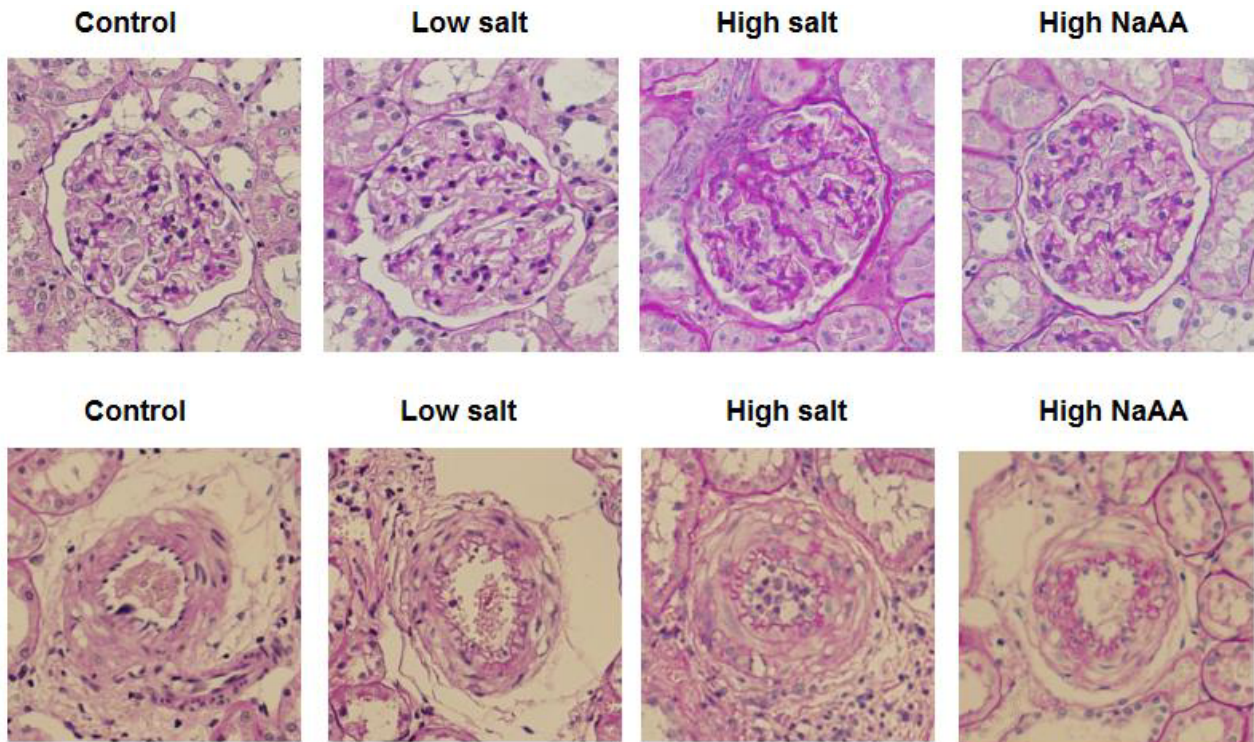


図 4. 28 週における各食投与による、糸球体、腎細動脈の組織学的変化(DS rat)

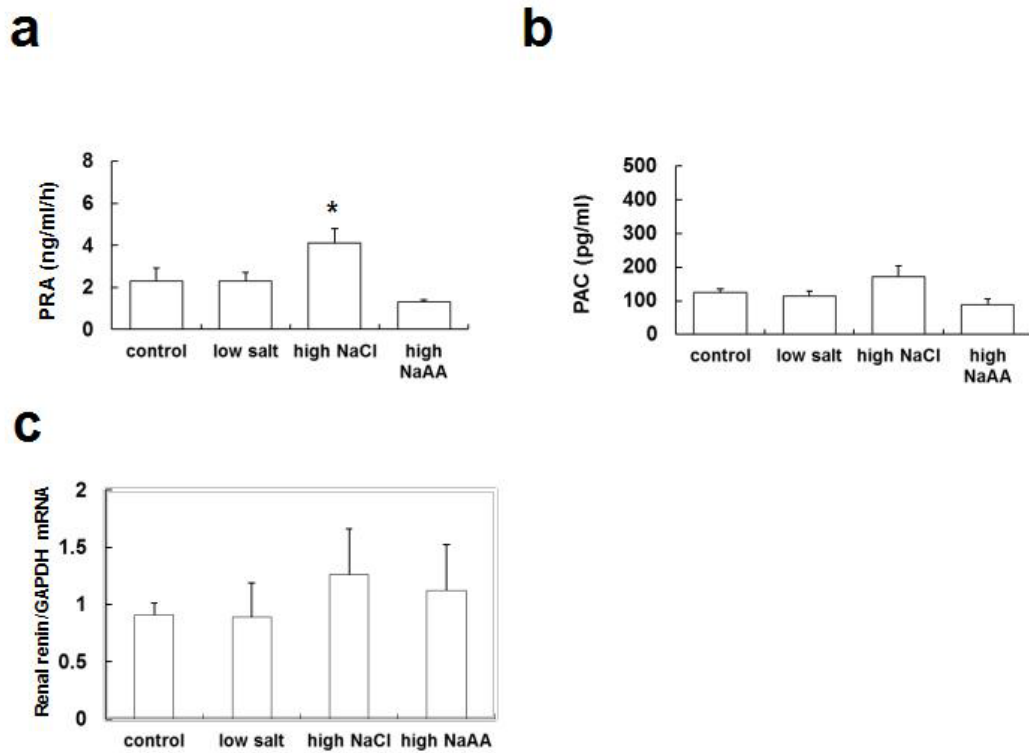


図 5. 28 週における血漿レニン活性、アルドステロン濃度及び RT-PCR 法による腎組織でのレニン mRNA 発現量 (DS rat)。*: $p < 0.05$ vs Control

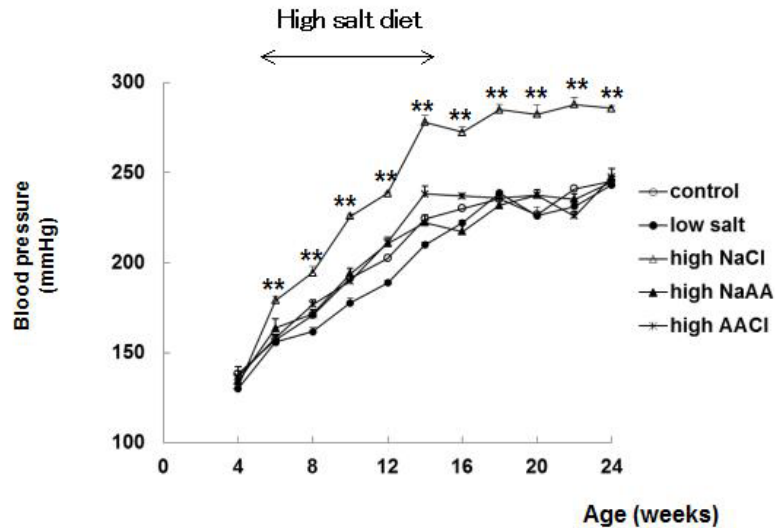


図 6. SHR に一過性高食塩食を投与し、その後正常食に戻した後の血圧変化の推移 **：p<0.01 vs control

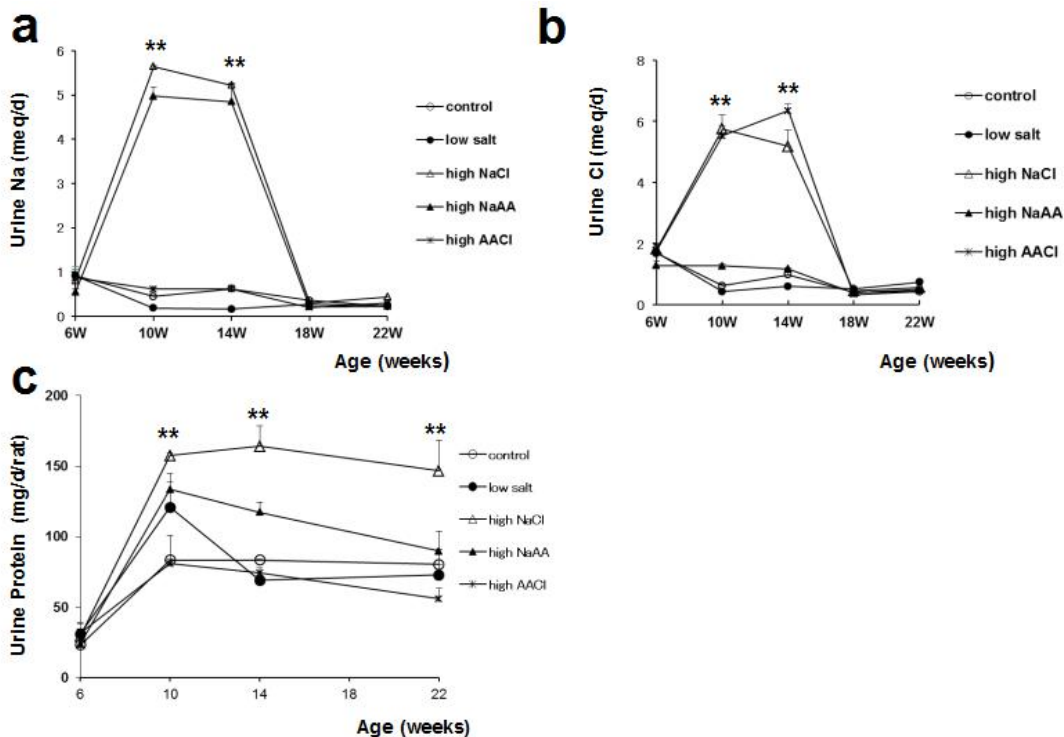


図 7. 蓄尿 Na、Cl 蛋白の推移 (SHR) **：p<0.01 vs Control

3. 2. 4 血液生化学

実験終了時に測定したクレアチニンクリアランス、BUN・Cr 値ともに各群間で有意差を認めなかった (図 8)。

3. 2. 5 腎臓の組織学的変化

実験終了時の糸球体所見は、高 NaCl 食群でメサンギウム基質の拡大がコントロール群に比して有意に上昇していた。また、高 NaCl 食群で腎臓細動脈における中膜内腔

比も同様に有意に高値を認めた (図 9)。

3. 2. 6 血漿レニン活性とアルドステロン

実験終了時には血漿レニン活性、アルドステロン濃度ともに高 NaCl 群が高値の傾向を示したが有意差には至らなかった (コントロール 4.1 ± 0.7 , 高 NaCl 群 5.1 ± 1.1 , 高 NaAA 群 3.4 ± 0.3 , 高 AAcI 群 3.5 ± 0.6 , 低食塩食群 3.2 ± 0.5 ng/ml/h) (図 10)。

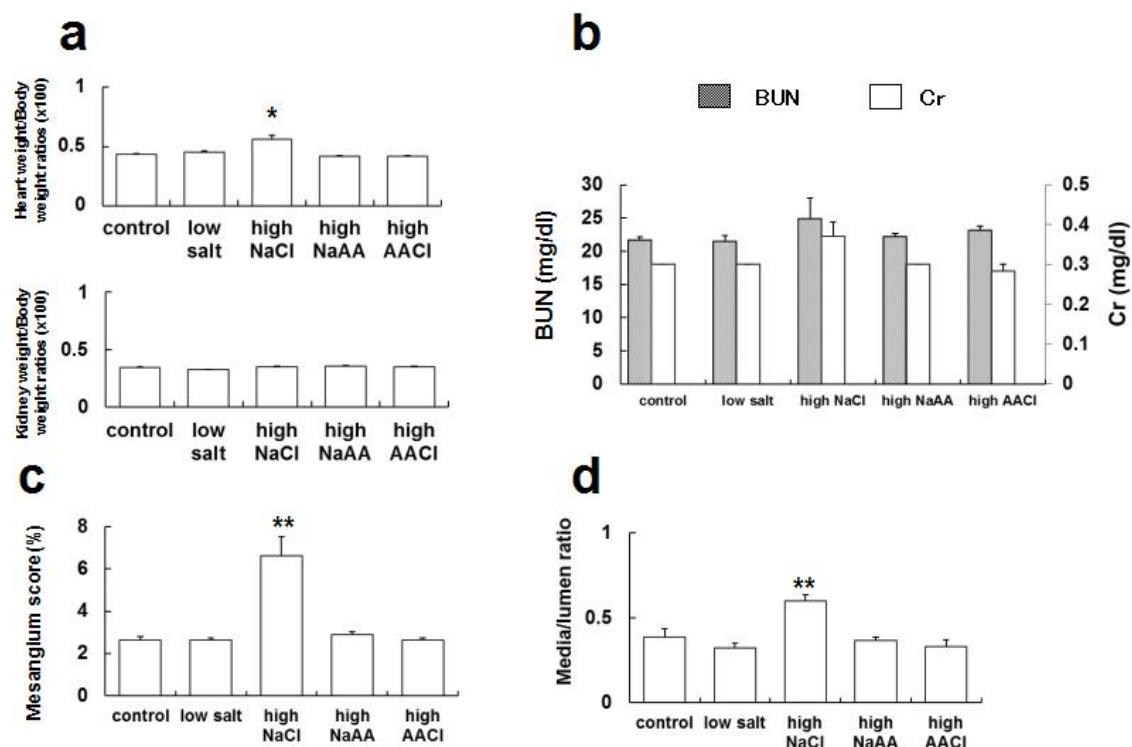


図 8. 実験終了時(28 週)における心、腎重量、生化学、組織所見(SHR)。a. 心、腎重量(体重 100g あたり)、b. BUN, Cr *: $p < 0.05$ vs Control。c, d. 糸球体、血管、間質スコア **: $p < 0.01$ vs Control。

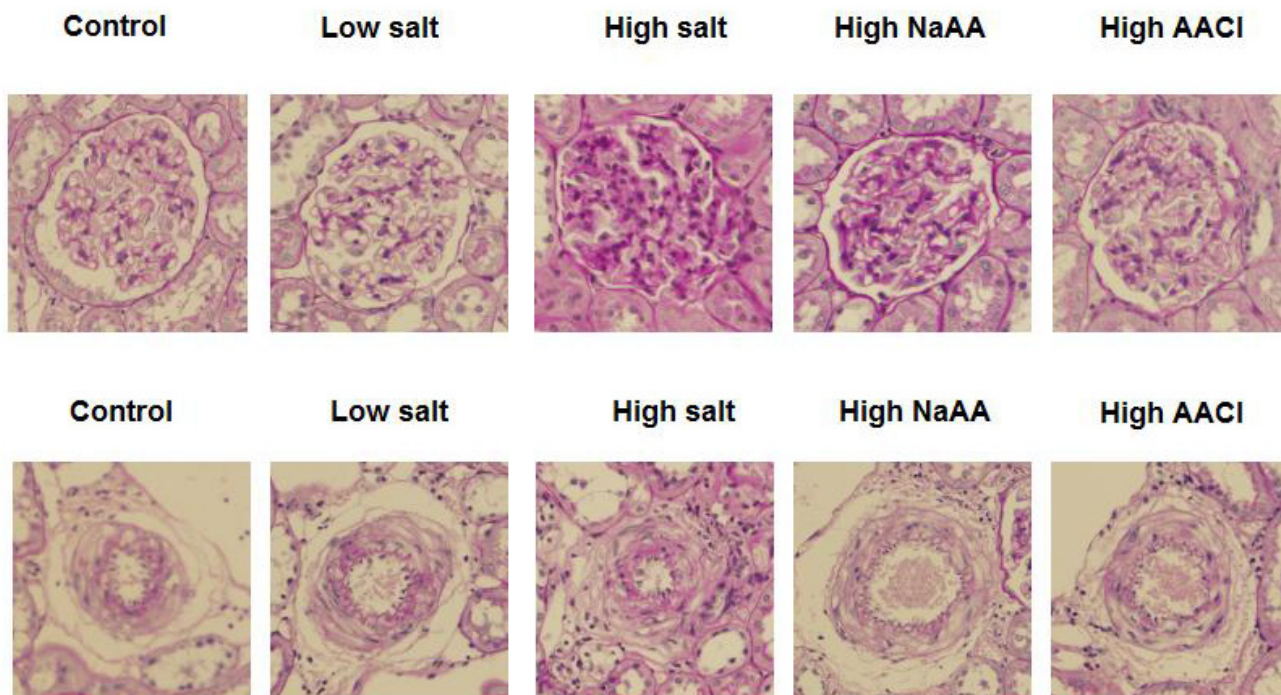


図 9. 28 週における各食投与群投与による、糸球体、腎細動脈の組織学的変化(SHR)

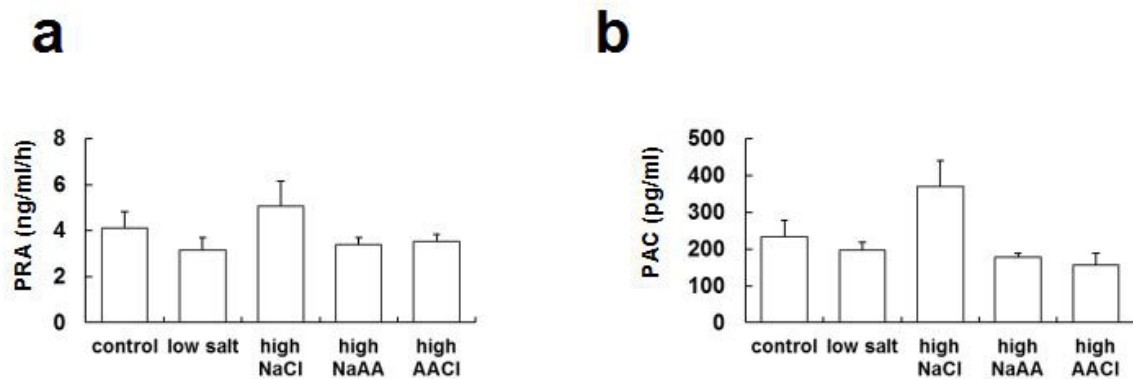


図 10. 28 週の血漿レニン活性、アルドステロン濃度 (SHR)

4. 考察ならびに今後の課題

高血圧の発症には遺伝素因と環境因子が関与していることが示されている。環境因子の中でも特に塩分摂取と高血圧発症の関連が古くから注目されている^[7]。塩分摂取量が多い地域ほど高血圧の有病率が高いことが INTERSALT 研究により示されている。また、DASH-Sodium をはじめとする複数の大規模介入試験では、減塩により高血圧の改善がもたらされることも示されている。一方、最近の臨床検討やメタ解析結果から、減塩は必ずしも死亡率の低下をもたらさないという指摘もあり^{[8] [9]}、塩分と高血圧、高血圧性臓器障害発症との関連についてはいまだ不明な点が多い。特に、高血圧発症早期における塩分摂取の影響は明らかではない。

従来は遺伝素因と環境因子は独立しており、また環境因子の影響も一過性であり、可逆性と認識されていた。ところが、同じく生活習慣病である糖尿病においては、食事療法の改善を含む血糖の管理を厳格に行うと、その効果が、厳格な血糖管理を中止した後も持続することが示されている。これが糖尿病による「メモリー効果」もしくは「レガシー効果」と呼ばれている現象である。

この「メタボリックメモリー」という概念が最初に提唱されたのは、DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) の長期成績が発表された時である。この臨床試験では、1 型糖尿病患者を無作為に血糖厳格管理群または通常治療群に割り付けた結果、試験終了の時点で微小血管障害が血糖厳格管理群で有意に低下していることが発表された。試験終了数年後に、試験参加者の試験終了後の経過が EDIC (Epidemiology of Diabetes Interventions and

Complications Study) で追跡された。その結果、DCCT 試験終了後は両群の HbA1c が同等の値に推移していたにもかかわらず、元の割り付けが血糖厳格管理群であった患者の心血管イベント発生率が有意に低く、また腎症を含む微小血管障害の発症も有意に低いことが発表された^[10]。同様に、2 型糖尿病を対象とした、UKPDS の長期追跡調査では、厳格な血糖管理を行った患者は、血糖厳格管理を中止したあとも微小血管障害、心筋梗塞、総死亡のリスクが減少することが示され、この現象が「レガシー効果」と命名された^[11]。

今回の研究では、まず DS ラットの検討で、一過性に食塩を投与すると、投与中止後も血圧の持続上昇が持続する成績が得られた。これは塩分過剰摂取の影響が少なくとも一部が記憶される、すなわち「塩分メモリー」が存在する可能性を示す成績である。また、SHR の検討でも同様な「塩分メモリー」を認め、メモリーが発生するためには、Na、Cl の両イオンの存在が必要と考えられた。また本例では塩分一過性投与により、実験終了時には血漿レニン、アルドステロン値の上昇傾向、腎臓の細動脈肥厚の有意な上昇が認められた。塩分メモリーの機序の一つとして、一過性塩分投与により引き起こされた血圧上昇が、血管壁肥厚、末梢血管の代償性肥大が進行し、さらに腎細動脈肥厚により、レニン・アルドステロン系が亢進し、血圧上昇を招くという悪循環が形成されている可能性が示された。

今後、上記の仮説を検証するとともに、塩分メモリーの主座が腎臓にあることを証明するために、一過性高食塩食を投与したラットの腎臓を、無処置のラットに腎移植を行い、血圧の変動を観察することを試みる予定である。更

に、塩分そのものが、血圧上昇とは独立して、腎臓の遺伝子のエピジェネティック調節に関与している可能性も併せて検討する必要があると考えられる。

文 献

1. Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. **Lancet** 365: 217-223, 2005.
2. Sasamura H, Hayashi K, Ishiguro K, *et al.* Prevention and regression of hypertension: role of renal microvascular protection. **Hypertens Res** 32: 658-664, 2009.
3. Nakaya H, Sasamura H, Hayashi M, Saruta T. Temporary treatment of prepubescent rats with angiotensin inhibitors suppresses the development of hypertensive nephrosclerosis. **J Am Soc Nephrol** 12: 659-666, 2001.
4. Nakaya H, Sasamura H, Mifune M, *et al.* Prepubertal treatment with angiotensin receptor blocker causes partial attenuation of hypertension and renal damage in adult Dahl salt-sensitive rats. **Nephron** 91: 710-718, 2002.
5. Ishiguro K, Sasamura H, Sakamaki Y, *et al.* Developmental activity of the renin-angiotensin system during the "critical period" modulates later L-NAME-induced hypertension and renal injury. **Hypertens Res** 30: 63-75, 2007.
6. Julius S, Nesbitt S, Egan B, *et al.* Trial of preventing hypertension: design and 2-year progress report. **Hypertension** 44: 146-151, 2004.
7. Kawano Y, Ando K, Matsuura H, *et al.* Report of the Working Group for Dietary Salt Reduction of the Japanese Society of Hypertension: (1) Rationale for salt restriction and salt-restriction target level for the management of hypertension. **Hypertens Res** 30: 879-886, 2007.
8. Stolarz-Skrzypek K, Kuznetsova T, Thijs L, *et al.* Fatal and nonfatal outcomes, incidence of hypertension, and blood pressure changes in relation to urinary sodium excretion. **Jama** 305: 1777-1785, 2011.
9. Taylor RS, Ashton KE, Moxham T, *et al.* Reduced dietary salt for the prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized controlled trials (Cochrane review). **Am J Hypertens** 24: 843-853, 2011.
10. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, *et al.* Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. **N Engl J Med** 353: 2643-2653, 2005.
11. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, *et al.* 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. **N Engl J Med** 359: 1577-1589, 2008.

Examination of ‘Salt Memory’ in the Development of Hypertension and Its Molecular Mechanisms

Hiroyuki Sasamura, Hideyo Oguchi, Kimiko Ishiguro, Hiroshi Itoh

Department of Internal Medicine, School of Medicine, Keio University

Summary

Objectives: We and others have shown that treatment of spontaneously hypertensive rats (SHR) or Dahl salt-sensitive rats with an renin-angiotensin-aldosterone (RAA) system inhibitor at the time of hypertension development causes a sustained reduction of blood pressure. The aim of this study was to examine the effects of temporary exposure to a high-salt diet on blood pressure and markers of end-organ damage in hypertensive rat models.

Methods: (Experiment 1) Dahl salt-sensitive rats were divided into 4 groups, and fed from age 6 to 14 weeks with low-salt (0.12% NaCl), normal-salt (0.8% NaCl) high-salt (7% NaCl) or high-NaAA (12.7% NaAA) diet. After these treatments, all group were returned to a normal-salt diet. (Experiment 2) Male SHRs were divided into five groups, and fed from age 6 to 14 weeks with a low-salt (0.12% NaCl), normal-salt (0.8% NaCl) or high-salt (7% NaCl) diet. Other rats were given a high-sodium/normal-chloride (12.7% NaAA) or normal-sodium/high-chloride diet (11.6% AACL). After these treatments, all groups were returned to a normal-salt diet. The effects on systolic blood pressure and urine protein excretion were examined regularly until age 24-28 weeks.

Results: (Experiment 1) Transient treatment with a high-salt diet caused an elevation in blood pressure not only during the treatment period, but also after returning to the normal-salt diet. 3 months after treatment cessation, blood pressures were still elevated in the rats transiently exposed to a high-salt diet. Similarly, urine albumin excretion was elevated in the high-salt rats at the end of the study. No such effect was seen in the NaAA group. At age 28 weeks, the high-salt group rats demonstrated increases in plasma renin activity, aldosterone, with a similar trend for renal renin mRNA. (Experiment 2) Transient treatment with a high-salt diet caused an elevation in blood pressure not only during the treatment period, but also after returning to the normal-salt diet. An increase in proteinuria and renal arteriolar hypertrophy was recognized in the high salt group, together with a marginal elevation in renin-angiotensin-aldosterone (RAA) system activity.

Conclusion: These results suggest that transient high-salt diet treatment results in a sustained elevation of blood pressure and activation of RAA system in Dahl salt-sensitive rats and SHR.