

## ナトリウム依存性腎アセチルコリン分泌機構への介入による 食塩感受性高血圧の病態制御の試み

清水 秀二<sup>1</sup>, 川田 徹<sup>1</sup>, 秋山 剛<sup>2</sup>, 福満雅史<sup>1</sup>, Michael James Turner<sup>1</sup>

国立循環器病研究センター<sup>1</sup> 循環動態制御部,<sup>2</sup> 心臓生理機能部

### 概要

**【目的】** 腎皮質でのアセチルコリン(ACh)分泌には、皮質細胞内の Na<sup>+</sup>濃度の上昇が関与しており、Dahl 食塩感受性高血圧ラットでは、この腎での食塩感受性 ACh 分泌が阻害されている可能性が我々の先行研究で示唆されている。そこで本研究では、ACh 分解酵素阻害薬などの薬剤が、Dahl 食塩感受性高血圧ラットの腎皮質での内因性 ACh 分泌に及ぼす影響を明らかにし、腎内因性 ACh 分泌への介入が食塩感受性高血圧の発症や進展を抑制できるかを検討することを目的とした。

**【方法】** 生後 6 週の雄 Dahl 食塩感受性高血圧ラットに 8%高食塩食を負荷し、高血圧を誘発する。高食塩食負荷と同時に、ACh 分解酵素阻害薬であるリバスチグミン(50 µg/ml)を経口投与し、8 週間後(生後 14 週)に αクロラロース・ウレタン麻酔下にて腎臓を摘出し、腎皮質組織を得る。腎皮質組織(約 100 mg)をホモジナイズし、上清を分離・濾過し、濾過液中の ACh 量を、高速液体クロマトグラフィを用いて定量することにより、腎皮質 ACh 含量の指標とする。また、腎皮質組織を 10%ホルマリン固定し、Periodic Acid-Schiff(PAS)染色することで、糸球体への病理組織学的影響を検討する。

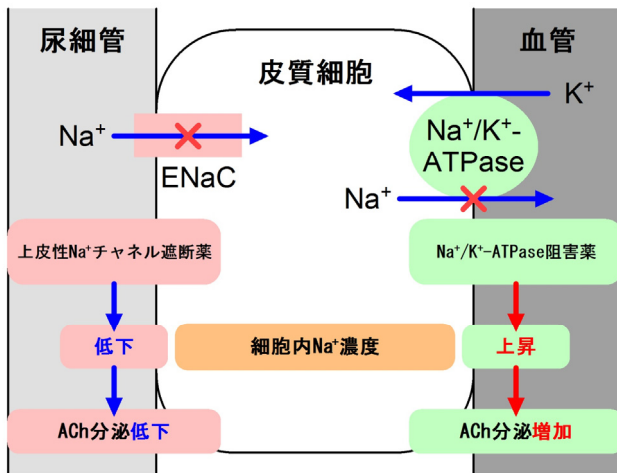
**【結果】** Dahl 食塩感受性高血圧ラットに正常食塩食(0.3%)を与えた場合の腎皮質 ACh 含量は、Wistar/ST ラットの ACh 含量と有意差を認めなかった(49.7 ± 1.0 vs. 41.5 ± 1.0 nmol/mg, not significant)。8%高食塩食を負荷した Dahl 食塩感受性高血圧ラットにリバスチグミンを経口投与した群では、対照群(リバスチグミン非投与群)と比べ、腎皮質 ACh 含量が有意に上昇した(74.3 ± 16.3 vs. 14.8 ± 0.4 nmol/mg, P<0.05)。また、PAS 染色による病理組織学的検討では、リバスチグミン非投与群の一部糸球体に硬化像(glomerular sclerosis)が認められた。

**【考察】** Dahl 食塩感受性高血圧ラットに高食塩食を負荷すると、腎皮質での ACh 量が低下するが、ACh 分解酵素阻害薬の投与により腎皮質 ACh 含量を増加させることが可能であった。ACh 分解酵素阻害薬による腎 ACh 分泌機構への介入は、食塩感受性高血圧による腎組織障害を低減できる可能性があると考えられた。

### 1. 研究目的

我が国の高血圧患者数は、4,000 万人とも言われており、高血圧は 40 歳以上の 2 人に 1 人がかかる国民病である。食塩感受性高血圧は、本態性高血圧のひとつであると考えられており、高血圧治療ガイドライン 2014(JSH2014)においても減塩は、生活習慣修正項目の一つとして記載されている。その一方で、食塩感受性高血圧発症のメカニズムには、まだまだ不明な点が多い。我々は、マイクロダイアリス法を用いた先行研究にて、正常血圧ウサギにお

ける腎皮質細胞内の Na<sup>+</sup>濃度の上昇が、腎でのアセチルコリン(ACh)分泌を促すことを発見した(Fig. 1)。また、我々の別の先行研究では、Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおいて、この腎での食塩感受性 ACh 分泌が阻害されている可能性が示唆されている。したがって、食塩感受性高血圧の発症には、腎皮質における ACh 分泌の異常が関与している可能性がある。そこで、もし薬剤により腎皮質での ACh の分泌を促進させる、または分解を阻害することができれば、食塩感受性高血圧の発症や進展を抑制するこ



**Fig. 1.** Sodium-dependent acetylcholine (ACh) release in the renal cortex

とができる可能性がある。近年、ACh 分解酵素阻害薬であるドネペジルが、心臓での ACh の分解を抑制し、心不全への治療効果を発揮することが報告されており<sup>(1)</sup>、ACh 分解酵素阻害薬を投与することで、腎においても ACh の分解を抑制することができれば、食塩感受性高血圧の発症や進展を抑えることができると考えられる。そこで本研究においては、食塩感受性高血圧モデル動物(Dahl 食塩感受性高血圧ラット)における腎皮質での内因性 ACh の分泌異常を明らかにするとともに、ACh 分解酵素阻害薬などの薬剤が腎皮質での ACh 量に及ぼす影響を解明することで、これらの薬剤が高血圧の発症や進展を抑制できるかを検討する。

## 2. 研究方法

### 2.1 実験動物の取り扱い

実験動物の扱いは、すべて日本生理学会動物実験倫理規定に従い、実験は国立循環器病研究センター実験動物委員会の許可を得て行った。

### 2.2 プロトコール

#### 2.2.1 通常(Wistar/ST)ラットと Dahl 食塩感受性高血圧ラットの比較

Wistar/ST ラット(雄)と Dahl 食塩感受性高血圧ラット(雄)に通常食塩食(0.3%NaCl 食)を与え、生後 14 週を超えるまで飼育した。14 週齢を超えた個体において、 $\alpha$  クロラロース・ウレタン腹腔内投与にて麻酔を導入した後、気管切

開し、挿管・人工呼吸管理とした。外頸静脈にカテーテルを挿入し、 $\alpha$  クロラロース・ウレタンの持続静脈投与を行い、麻酔を維持した。右側臥位にて開腹、左腎を露出、腎門部にて腎動脈・静脈および尿管を遮断し、左腎を摘出した。37°C の生理食塩水にて洗浄した後、腎皮質の一部(約 100 mg)を採取した。採取した腎皮質に、0.1 M Perchloric Acid を 1.0 ml 添加し、ホモジナイザーにてホモジナイズした(5,000 rpm, 5 sec, 数回)。遠心分離機(20,000G, 15 min, 0°C)にて上清を分離した後、1 M  $\text{KHCO}_3$  を適量添加し、pH を 5(4~7)付近に調節した。Millipore Ultrafree MC フィルタ(カットオフ分子量 10,000)を用いて、遠心分離機(5,000G, 20 min, 20°C)にて濾過を行い、濾過液を得た。濾過液中の ACh 量を下記(2. 3)の高速液体クロマトグラフィ法にて測定した。なお、腎摘出後のラットには、ペントバルビタール過量投与により安楽死の処置を取った。

#### 2.2.2 高食塩食負荷による Dahl 食塩感受性高血圧ラットでの腎皮質 ACh 含量と ACh 分解酵素阻害薬の効果

6 週齢の雄の Dahl 食塩感受性高血圧ラットに高食塩食(8% NaCl 食)を与え、8 週間(生後 14 週まで)飼育した。ACh 分解酵素阻害薬が腎皮質の ACh(含)量に及ぼす影響を明らかにするため、一部のラットにおいて ACh 分解酵素阻害薬であるリバスタチグミンの経口投与を行った。リバスタチグミン投与群では、水 1.0 L に対して 50 mg のリバスタチグミンを溶かした薬液(50  $\mu\text{g/ml}$ )を、高食塩食開始と同時に自由飲水にて摂取させた。

8 週経過後、 $\alpha$  クロラロース・ウレタン腹腔内投与にて麻酔を導入した後、気管切開し、挿管・人工呼吸管理とした。外頸静脈にカテーテルを挿入し、 $\alpha$  クロラロース・ウレタンの持続静脈投与を行い、麻酔を維持した。右側臥位にて開腹、左腎を露出、腎門部にて腎動脈・静脈および尿管を遮断し、左腎を摘出した。37°C の生理食塩水にて洗浄した後、腎皮質の一部(約 100 mg)を採取した。採取した腎皮質は、上記方法にてホモジナイズし、上清を分離・濾過し、濾過液を得た。濾過液中の ACh 量を下記(2. 3)の高速液体クロマトグラフィにて測定した。摘出した腎皮質組織の一部を 10%ホルマリンで固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色および PAS(Periodic Acid-Schiff)染色を行い、病理組織学的検討を行った。なお、腎摘出後は、上記方

法にて安楽死の処置を取った。

### 2. 3 高速液体クロマトグラフィ法による ACh 含量の分析

高速液体クロマトグラフィのシステムは、パルスダンパー (EP-300, Eicom, Kyoto, Japan), 保護カラム (CH-GEL, Eicom), 分離カラム (AC-GEL, Eicom), 酵素カラム (AC-ENZ II, Eicom), 電気化学検出器 (ECD-300, Eicom), 脱ガス装置 (DG-300, Eicom) から成る。分離カラムと酵素カラムの温度は、カラムオープン (ATC-300, Eicom) によって 33°C に保たれており、電気化学検出器は、+0.30V の白金作用電極 (WE-PT, Eicom) と銀・塩化銀基準電極により動作する。測定サンプルは、自動注入装置 (M-514, Eicom) により直接、液体クロマトグラフィに注入され、測定結果は、AD コンバータ (PowerChrom EPC-500, Eicom) を介してコンピュータに記録される。本システムでの ACh 測定感度は、1 サンプル当たり 10 fmol (SN 比=3) である。

### 2. 4 統計検定

データは、mean ± standard error で表示し、unpaired T-test にて検定を行った。P<0.05 をもって統計的有意と判定した。

## 3. 研究結果

### 3. 1 通常 (Wistar/ST) ラットと Dahl 食塩感受性高血圧ラットの比較

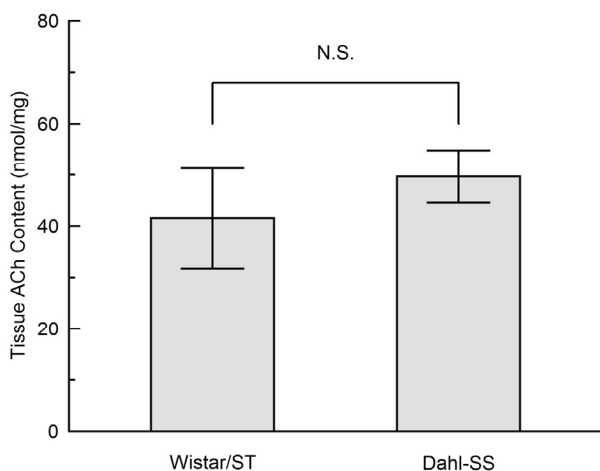


Fig. 2. Renal cortical acetylcholine (ACh) contents in Wistar/ST and Dahl salt-sensitive (Dahl-SS) rats

Wistar/ST ラットに通常食塩食を与えて飼育した場合の腎皮質での ACh 含量は、41.5 ± 9.8 nmol/mg であった。一方で、Dahl 食塩感受性高血圧ラットに通常食塩食を与えて飼育した場合の腎皮質での ACh 含量は、49.7 ± 5.1 nmol/mg であり、両群間に有意差は認めなかった (Fig. 2)。

### 3. 2 高食塩食負荷による Dahl 食塩感受性高血圧ラットでの腎皮質 ACh 含量と ACh 分解酵素阻害薬の効果

Dahl 食塩感受性高血圧ラットに高食塩食を与えて、8 週間飼育した場合の腎皮質での ACh 含量は 14.8 ± 3.8 nmol/mg であったが、ACh 分解酵素阻害薬であるリバスチグミンを同時に投与した群では、腎皮質 ACh 含量が 74.4 ± 16.3 nmol/mg とリバスチグミン非投与群と比べて有意に上昇していた (Fig. 3)。

高食塩食を負荷した Dahl 食塩感受性高血圧ラットの腎皮質のヘマトキシリン・エオジン染色と PAS 染色をそれぞれ Fig. 4a および 4c に示す。高食塩食を負荷したラットの糸球体の一部には硬化像を認め、尿細管の拡張も認められた。高食塩食負荷と同時にリバスチグミンを投与したラットの腎皮質のヘマトキシリン・エオジン染色と PAS 染色をそれぞれ Fig. 4b および 4d に示す。リバスチグミン投与群においては、非投与群と比べて糸球体の変化や尿細管の拡張は少なかった。

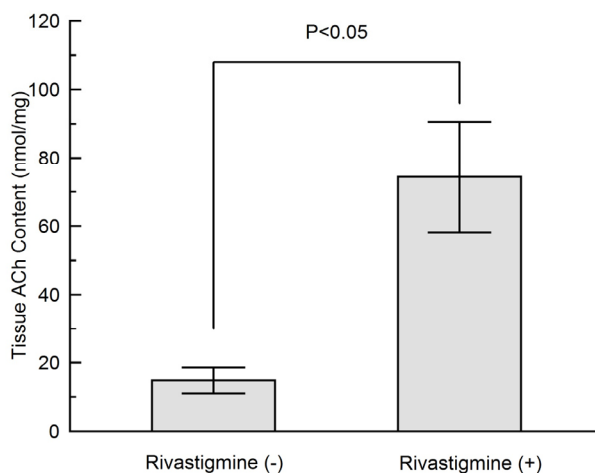
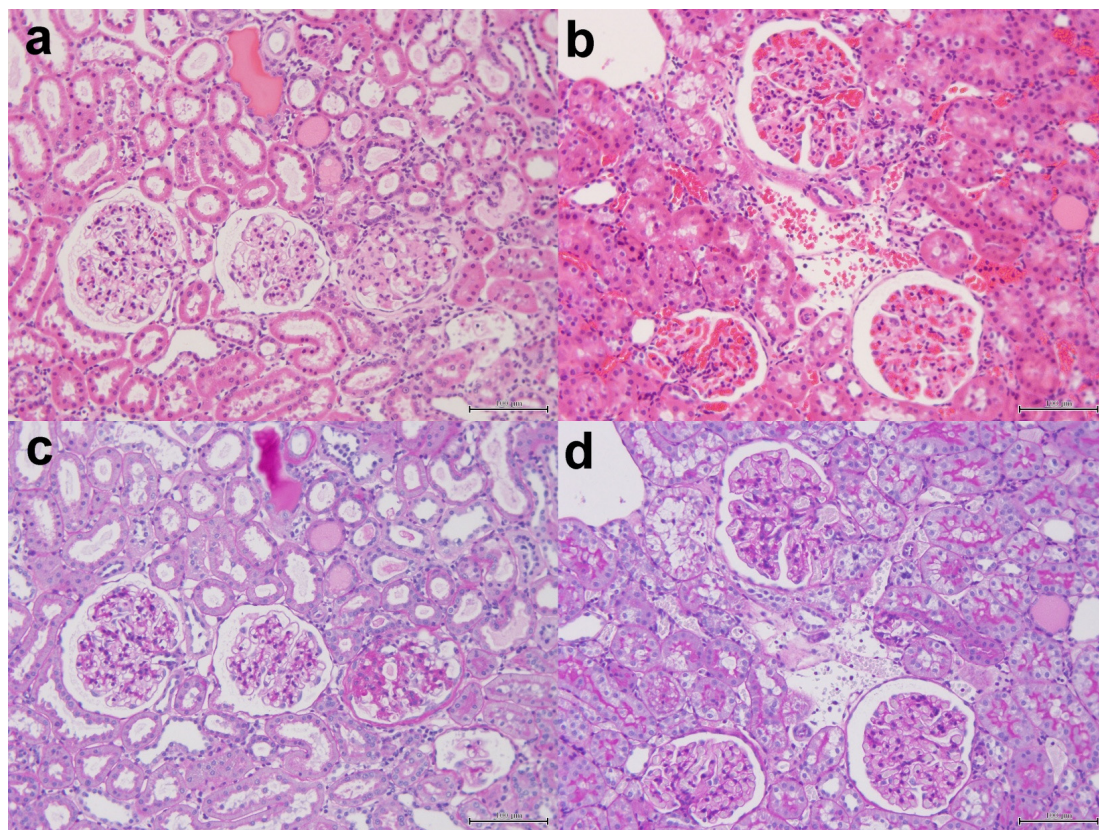


Fig. 3. Effect of rivastigmine on renal cortical acetylcholine contents of Dahl salt-sensitive rats under high-salt diet



**Fig. 4.** Hematoxylin and eosin (HE) and Periodic Acid–Schiff (PAS) stains of renal cortex under high-salt diet (a, c) or high-salt diet with rivastigmine (b, d)

#### 4. 考察

本研究において、Dahl 食塩感受性高血圧ラットでは高食塩食負荷時に腎皮質 ACh 含量が低下するが、ACh 分解酵素阻害薬であるリバスチグミンを投与すると、腎皮質 ACh 含量が増加し、糸球体への障害を低減させることが明らかとなった。

##### 4. 1 Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける腎皮質での ACh 分泌異常

本研究では、Wistar/ST ラットと Dahl 食塩感受性(高血圧)ラットに通常食塩食(0.3% NaCl 食)を与えて14週を超えるまで飼育したが、腎皮質の ACh 含量は両群間で有意差を認めなかった。このことから、Dahl 食塩感受性ラットにおいても高食塩食を負荷しない状態では、腎皮質での ACh 分泌は維持されていることが分かる。

一方で高食塩食(8% NaCl 食)を負荷して8週間飼育した Dahl 食塩感受性高血圧ラットでは、腎皮質での ACh 含量の低下が認められた。Ozawa らは、Dahl 食塩感受性高血圧ラットでは、ACh 投与による輸入細動脈の拡張が阻

害されていることを報告している<sup>(2)</sup>が、本研究の結果から ACh に対する応答だけでなく、ACh の分泌自体も低下している可能性が示唆された。

Takeda らは、ACh がウサギ腎皮質集合管のアミロイド感受性上皮性 Na<sup>+</sup>チャネル(ENaC)の内向き電流を抑制することを報告しており<sup>(3)</sup>、Schlüter らは、アミロイドが腎での Na<sup>+</sup>の排出を増加させ、血圧を低下させると報告している<sup>(4)</sup>。このように ACh には腎皮質での Na<sup>+</sup>の再吸収を抑える働きがあると考えられ、腎皮質での ACh 量の低下は、ENaC を介した細胞内への Na<sup>+</sup>の取り込みを促進させ、Na<sup>+</sup>の再吸収を増加させている可能性がある。我々の正常血圧ウサギを用いた先行研究では、ENaC 遮断薬であるベンザミルを用いて細胞内への Na<sup>+</sup>の取り込みを抑制すると、ACh 分泌が低下したことから(Fig. 1 参照)、腎皮質での ACh 分泌は細胞内 Na<sup>+</sup>濃度を一定に保つように調節されていると考えられる。

さらに、Krivoi らは、ニコチン性 ACh レセプタと

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの間には相互作用があることを報告しており<sup>(5)</sup>, AChがNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseを介した細胞外へのNa<sup>+</sup>の排出を調節している可能性がある。我々のウサギを用いた先行研究では, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 阻害薬であるウアバインを用いて細胞外へのNa<sup>+</sup>の排出を抑制すると腎皮質でのACh分泌が増加したことから (Fig. 1 参照), ACh にはNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の活性を亢進させる作用があると考えられる。

これらのことから, 高食塩食を負荷した Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける腎皮質での ACh 分泌の低下は, ENaC を介した細胞内への Na<sup>+</sup>の取り込みを促進させ, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase による細胞外へのNa<sup>+</sup>の排出を低下させることにより, 細胞内 Na<sup>+</sup>濃度を上昇させ, 細胞障害を引き起こすと考えられた。

#### 4. 2 腎皮質における ACh 分解酵素阻害薬の効果

高食塩食を負荷した Dahl 食塩感受性高血圧ラットに, ACh分解酵素阻害薬であるリバスチグミンを経口投与した場合は, 腎皮質での ACh 含量は維持されており, 糸球体の障害も少ない傾向にあった。Ismail らは, リバスチグミンが Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 活性を増強することを報告しており<sup>(6)</sup>, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase による細胞外へのNa<sup>+</sup>の排出を促進することにより, 細胞障害を低減している可能性が考えられた。

一方で, 高食塩食負荷時の Dahl 食塩感受性高血圧ラットでは, ENaC mRNA の過剰発現<sup>(7)</sup>や Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の活性亢進・Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mRNA の過剰発現<sup>(8)</sup>も報告されていることから, ACh 分解酵素阻害薬投与による腎皮質での ACh 含量の増加が, ENaC や Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の活性にどのような影響を与えるかについては, 更なる検討が必要である。

#### 4. 3 まとめ

Dahl 食塩感受性高血圧ラットでは, 高食塩食負荷時の腎皮質 ACh 分泌に異常があり, 腎皮質での ACh 含量が低下している。ACh 量の低下は, ENaC を介した細胞内への Na<sup>+</sup>の取り込みを促進し, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase を介した細胞外へのNa<sup>+</sup>の排出を抑制し, 細胞障害を引き起こすと考えられる。ACh分解酵素阻害薬は, Dahl 食塩感受性高血圧ラットの高食塩負荷時の腎皮質 ACh 含量を増加させ, 糸球体などへの細胞障害を低減することから, 食塩感受性高血圧における腎障害の抑制効果が期待できると考えられた。

## 5. 今後の課題

本研究では Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける腎皮質での ACh 分泌に関して検討を加えたが, 他のモデル動物に関しては十分な検討が行われていない。対照群として用いた Wistar/ST ラットや Dahl 食塩抵抗性ラットの高食塩食負荷時の腎皮質での ACh 分泌については, 未だ明らかになっておらず, 今後さらなる検討が必要であると考えられる。

また, 本研究においては ACh 分解酵素阻害薬の腎組織障害に対する影響を病理学的に検討したが, ACh 分解酵素阻害薬が Dahl 食塩感受性高血圧ラットの血圧に対してどのように影響を与えるかは分かっていない。したがって今後, テレメトリ装置等を用いて血圧の推移を観察する必要があると考えられる。

さらに, ACh 分解酵素阻害薬以外の薬剤(アンジオテンシン変換酵素阻害薬や α<sub>2</sub> アドレナリン受容体作動薬)が, 腎皮質での ACh 含量にどのような影響を与えるかについては, 未だ十分な検討がなされておらず, 引き続き検討を重ねて行きたいと考えている。

## 6. 文献

- 1) Kubo T, Sato T, Noguchi T, Kitaoka H, Yamasaki F, Kamimura N, Shimodera S, Iiyama T, Kumagai N, Kakinuma Y, Diedrich A, Jordan J, Robertson D, Doi YL. Influences of donepezil on cardiovascular system--possible therapeutic benefits for heart failure--donepezil cardiac test registry (DOCTER) study. *J Cardiovasc Pharmacol.* 60:310-314, 2012.
- 2) Ozawa Y, Hayashi K, Kanda T, Homma K, Takamatsu I, Tatematsu S, Yoshioka K, Kumagai H, Wakino S, Saruta T. Impaired nitric oxide- and endothelium-derived hyperpolarizing factor-dependent dilation of renal afferent arteriole in Dahl salt-sensitive rats. *Nephrology (Carlton).* 9:272-277, 2004.
- 3) Takeda M, Yoshitomi K, Taniguchi J, Imai M. Inhibition of amiloride-sensitive apical Na<sup>+</sup> conductance by acetylcholine in rabbit cortical collecting duct perfused in vitro. *J Clin Invest.*

- 93:2649-2657, 1994.
- 4) Schlüter T, Rohsius R, Wanka H, Schmid C, Siepelmeyer A, Rettig R, Peters J, Grisk O. Amiloride lowers arterial pressure in cypla1ren-2 transgenic rats without affecting renal vascular function. *J Hypertens.* 28:2267-2277, 2010.
  - 5) Krivoi II, Drabkina TM, Kravtsova VV, Vasiliev AN, Eaton MJ, Skatchkov SN, Mandel F. On the functional interaction between nicotinic acetylcholine receptor and Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase. *Pflugers Arch.* 452:756-765, 2006.
  - 6) Ismail MF, Elmeshad AN, Salem NA. Potential therapeutic effect of nanobased formulation of rivastigmine on rat model of Alzheimer's disease. *Int J Nanomedicine.* 8:393-406, 2013.
  - 7) Aoi W, Niisato N, Sawabe Y, Miyazaki H, Tokuda S, Nishio K, Yoshikawa T, Marunaka Y. Abnormal expression of ENaC and SGK1 mRNA induced by dietary sodium in Dahl salt-sensitively hypertensive rats. *Cell Biol Int.* 31:1288-1291, 2007.
  - 8) Nishi A, Celsi G, Aperia A. High-salt diet upregulates activity and mRNA of renal Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup>-ATPase in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol.* 264:F448-F452, 1993.

## Pathophysiological Control of Salt-Sensitive Hypertension through the Modulation of Sodium-Dependent Renal Acetylcholine Release

Shuji Shimizu, Toru Kawada, Tsuyoshi Akiyama, Masafumi Fukumitsu, Michael James Turner

National Cerebral and Cardiovascular Center

### Summary

**Background:** We have already demonstrated that endogenous acetylcholine (ACh) release in the renal cortex is dependent on intracellular sodium concentration of cortical cells. This sodium-dependent ACh release may be impaired in Dahl salt-sensitive rats. Several pharmacological agents, such as ACh esterase inhibitors, may increase interstitial ACh concentrations in the renal cortex and suppress the progression of salt-sensitive hypertension.

**Purpose:** To investigate the effects of pharmacological agents on renal cortical ACh content of Dahl salt-sensitive rats.

**Methods:** Male Dahl salt-sensitive rats at 6 weeks of age were fed 8% high salt diet for 8 weeks. An ACh esterase inhibitor, rivastigmine, was orally applied to the rats at a concentration of 50 µg/ml in drinking water. Eight weeks later, these rats were anesthetized with  $\alpha$ -chloralose and urethane and the left kidney was extracted. A part of the renal cortex (100 mg) was homogenized into 0.1 M perchloric acid and the supernatant was filtrated. Filtrate ACh content was measured using high-performance liquid chromatography. As a comparison, Dahl salt-sensitive rats and Wistar/ST rats fed normal salt diet were examined.

**Results:** There were no significant differences in cortical ACh contents between Wistar/ST rats and Dahl salt-sensitive rats under normal salt diet ( $41.5 \pm 1.0$  vs.  $49.7 \pm 1.0$  nmol/mg, not significant). In rivastigmine-treated Dahl salt-sensitive rats, ACh content was significantly higher than that in untreated rats ( $74.3 \pm 16.3$  vs.  $14.8 \pm 0.4$  nmol/mg,  $P < 0.05$ ). Pathological examination demonstrated severer glomerular sclerosis in untreated rats compared with rivastigmine-treated rats.

**Conclusions:** An ACh esterase inhibitor, rivastigmine, significantly increased cortical ACh contents in Dahl salt-sensitive rats under high salt diet. Pharmacological intervention into cortical ACh release may suppress glomerular damage in the salt-sensitive hypertension.