

食塩感受性高血圧の成因と臓器合併症における マクロファージ鉍質コルチコイド受容体の役割の解明

長瀬 美樹

順天堂大学大学院医学研究科

概要 申請者はNa再吸収を調節するアルドステロンの受容体である鉍質コルチコイド受容体(MR)に着目して食塩感受性高血圧の研究を重ね、低分子量G蛋白Rac1によるリガンド非依存的MR活性化が食塩感受性高血圧やその臓器合併症の原因となることを報告してきた。最近、食塩と免疫系の関連がクローズアップされている。申請者は、MRがマクロファージにも発現し、サイトカイン産生を制御して腎障害の炎症機転に寄与することを見出したが、食塩との関係は不明である。今回、マクロファージ特異的MR KOマウスを用いて食塩負荷モデルを作製し、マクロファージMRが果たす役割を検証した。

Cre-loxPシステムを用いて、マクロファージ特異的MR KOマウス(M-MR KO; LysM^{cre/+} MR^{lox/lox})と対照マウス(M-MR Fc: LysM^{+/+} MR^{lox/lox})を得た。M-MR KOマウスは通常飼育条件下で明らかな腎臓の形態・機能異常を発症しなかった。これらマウスを用いて、片腎摘/食塩/アルドステロン持続投与マウスを作製した。

6週間後、tail-cuff法で測定した収縮期血圧、BUN、血清クレアチニン濃度、尿中アルブミン排泄、心/体重比、腎/体重比いずれも両群間で有意差を認めなかった。すなわち、マクロファージMRは本モデルの食塩感受性高血圧やアルブミン尿の病態に必須というわけではなかった。一方、腎線維化のマーカーであるCollagen I, Collagen III, FibronectinのmRNA発現はKO群で有意に上昇しており、マクロファージMRの欠損は線維化を改善するのではなく、逆に増悪させることが示された。TGFβ1は両群間で差がなく、PAI-1, CCN5はKO群で増加していたことから、線維化のメディエーターとして、PAI-1, CCN5の関与が示唆された。ポドサイト関連因子の遺伝子発現はFc, KO間で有意差を認めなかった。

マクロファージ特性に関しては、M1マクロファージマーカーであるTNFα, IL1βの遺伝子発現は両群間で有意差を認めず、IL6発現はKO群で高かった。M2マクロファージマーカー(IL10, Fizz1, Mannose receptor, Arg1)は、片腎摘/食塩/アルドステロン負荷モデルの腎臓で増加し、KO群でそれが増強しているものが多かったが、個体間でのばらつきのため有意差がつかないものもあった。マクロファージ浸潤を促進するMCP1発現はKO群で増大し、マクロファージマーカーであるF4/80発現もKO群で有意に増加していた。T細胞浸潤を促すRantes発現は両群間で差を認めなかったが、CD4はKO群で有意に増加していた。すなわち、KO群ではM2マクロファージやTリンパ球サブセットの浸潤が増加し、線維化増悪を来すことが示唆された。

1. 背景と研究目的

食塩感受性高血圧の成因はさまざまであるが、共通して腎Na排泄機能障害が認められる。申請者はNa再吸収を調節するアルドステロンの受容体である鉍質コルチコイド受容体(MR)に着目して食塩感受性高血圧の研究を重ね、低分子量G蛋白Rac1によるリガンド非依存的MR活

性が食塩感受性高血圧やその臓器合併症の原因となることを報告してきた。ラット・マウスにアルドステロンを持続投与しても、腎障害は生じないが、片腎摘プラス高食塩摂取により、血圧上昇、および腎臓におけるマクロファージ、T細胞など炎症細胞の浸潤、酸化ストレス惹起、炎症性サイトカインの発現、腎線維化が顕著に見られた。また、

多量の蛋白尿,糸球体硬化が出現し,このとき腎糸球体の蛋白濾過最終バリアをなす足細胞の傷害所見が早期より認められ,これらは MR 拮抗薬によりリバースした。Dahl 食塩感受性高血圧ラットや SHR 肥満ラットを高食塩食にて飼育した際にも,高血圧とともに同様の腎障害が出現した。この時,食塩負荷は血中アルドステロン濃度を上昇させずに,標的部位局所における Rac1 活性化を引き起こし,リガンド非依存性に MR 活性化を生じ,腎障害を引き起こした。

しかしながら,腎臓のどの細胞(尿細管セグメント,血管,糸球体,マクロファージや他の免疫細胞)における Rac1-MR 系活性化がどのようなシグナルを介して食塩誘発性高血圧・腎障害を引き起こすかに関してはまだ十分解明されていない。

最近,食塩と免疫系の関連がクローズアップされている。食塩感受性群では食塩負荷により腎臓や血管にマクロファージや T リンパ球などが浸潤し,産生されるサイトカインや活性酸素種が Na 排泄障害を惹起するという。食塩はまた, Sgk1 というキナーゼを介して T リンパ球の T_H17 サブセットへの分化を促進する。さらに,皮膚に Na リザーバーが存在し,マクロファージ-リンパ管系によるその制御異常が食塩感受性高血圧を来すという新たな概念も提唱されている。申請者は,MR が腎臓の遠位尿細管,集合管のみならずマクロファージにも発現し,サイトカイン産生を制御して腎障害の炎症機転に寄与することを見出したが,食塩との関係は不明である。そこで本研究では,マクロファージ特異的 MR KO マウスを用いて,片腎摘/食塩/アルドステロン負荷,食塩単独負荷モデルを作製し,マクロファージに発現する MR が果たす役割,特に M1/M2 マクロファージ浸潤,炎症,線維化,他の免疫細胞浸潤,アルブミン尿とポドサイト傷害に着眼して検証することを目的とした。

2. 方法

2.1 マクロファージ特異的 MR 欠損マウスの準備

LysM^{cre/+} MR^{fllox/fllox} ♂マウスと LysM^{+/+} MR^{fllox/fllox} ♀マウスを交配することにより, M-MR KO マウス(LysM^{cre/+} MR^{fllox/fllox})と同腹の対照マウス(Fc: LysM^{+/+} MR^{fllox/fllox})を準備した。

2.2 片腎摘/食塩/アルドステロン負荷モデル

M-MR Fc マウス, KO マウスにおいて,片腎摘+高食塩食(8%) +アルドステロン持続投与モデルを作製した。アルドステロン(8.4 µg/日)は皮下に挿入した浸透圧ミニポンプより投与した。

2.3 食塩負荷モデル

M-MR Fc マウス, KO マウスを,通常食+水道水ないし高食塩(8% NaCl 食)+0.9% NaCl 水で2週間飼育した。血圧は間接法(tail cuff)にて測定した。

腎障害は,光顕,電顕,アルブミン尿,障害マーカー解析にて評価した。

耳の皮膚を用いて,マクロファージ染色, M1/M2 極性マーカーの評価を行った。M-MR KO マウスでは TonEBP-VEGF-C/VEGFR3 経路が障害されて, Na クリアランスがうまく働かず皮膚の Na 貯留が増大し,食塩感受性高血圧が生じる可能性を検証するため,リンパ管染色(Lyve-1), TonEBP, VEGF-C, VEGFR3 発現解析を行った。

2.4 遺伝子発現解析

マウス腎より RNeasy mini kit(Qiagen)を用いて total RNA を抽出し, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems)を用いて逆転写反応後,遺伝子発現を ABI 7500 Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems)を用いて定量的に解析した。プライマーは市販のものを使用した。

2.5 統計解析

データは平均±標準誤差で表示した。2 群間の比較は unpaired t-test で解析した。

3. 結果

3.1 マクロファージ特異的 MR KO マウスの作製

Cre-loxP システムを用いて, LysM^{cre/+} MR^{fllox/fllox} ♂マウスと LysM^{+/+} MR^{fllox/fllox} ♀マウスを交配し,マクロファージ特異的 MR KO マウス(M-MR KO; LysM^{cre/+} MR^{fllox/fllox})と同腹の対照マウス(M-MR Fc: LysM^{+/+} MR^{fllox/fllox})を得た。産仔の遺伝子型はメンデルの法則に従っており,胎生期異常は認められなかった。また, M-MR KO マウスは通常飼育条件下で明らかな腎臓の形態・機能異常を発症しなかった。

3.2 片腎摘/食塩/アルドステロン負荷モデルの表現型解析

そこでこれらマウスを用いて、片腎摘+食塩+アルドステロン持続投与マウスを作製した。6週間後、体重、BUN、血清クレアチニン濃度、tail-cuff法で測定した収縮期血圧、心/体重比、腎/体重比は、両群で有意差を認めなかつ

た(図 1A-F)。アルブミン尿は pre, 2週, 4週, 6週と経時的に解析したが、ばらつきが大きく有意差は認められなかった(図 2)。

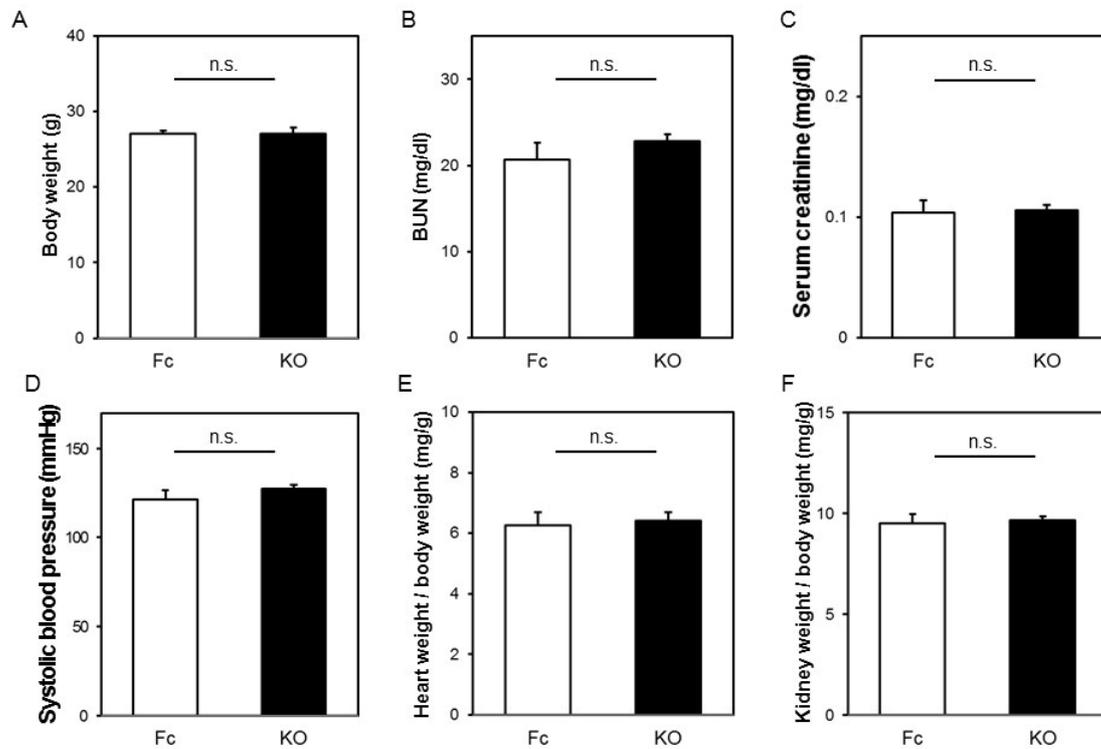


図 1. 対照マウス(Fc)とマクロファージ特異的 MR KO マウス(KO)における片腎摘/食塩/アルドステロン負荷モデルの作製

A. 体重 B. BUN C. 血清クレアチニン濃度 D. 収縮期血圧 E. 心/体重比 F. 腎/体重比

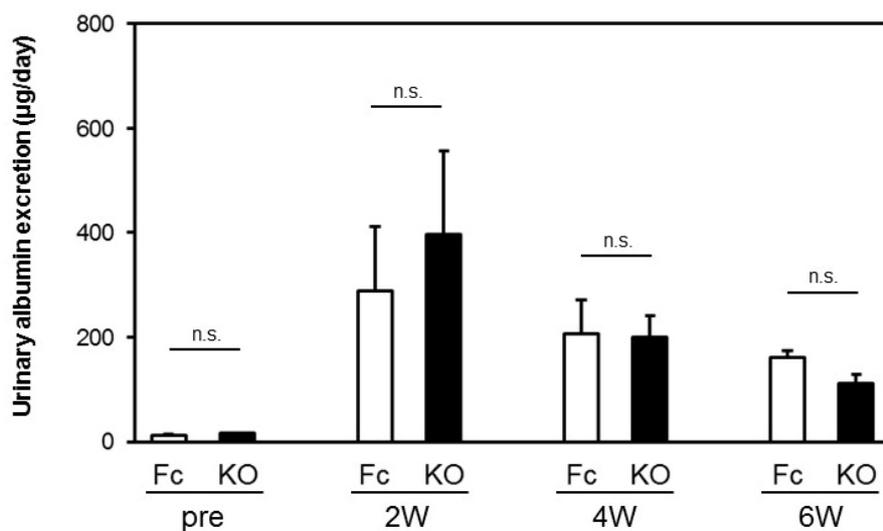


図 2. 対照マウス(Fc)とマクロファージ特異的 MR KO マウス(KO)における片腎摘/食塩/アルドステロン負荷モデルのアルブミン尿の経時的変化

3.3 片腎摘／食塩／アルドステロン負荷モデルの腎臓における炎症関連遺伝子発現の変化

次に、負荷6週後の腎臓におけるM1マクロファージ関連遺伝子発現(図3), M2マクロファージ関連遺伝子発現(図4)をFc, KOマウスで比較した。

M1マクロファージ関連遺伝子としてIL6の発現は予想に反してKO群で亢進していた。TNF α , IL1 β 遺伝子発現

は両群間で有意差を認めなかった。M2マクロファージ関連遺伝子としてIL10とFizz1の発現は片腎摘／食塩／アルドステロン負荷モデルの腎臓で著明に亢進していた。IL10とMannose receptor遺伝子発現はKO群で有意に増大していた。Fizz1とArg1はKO群で増加している個体が多かったが、個体間でのばらつきが大きく、有意差がつかなかった。Ym1は本モデルで減少し、KOで低めであった

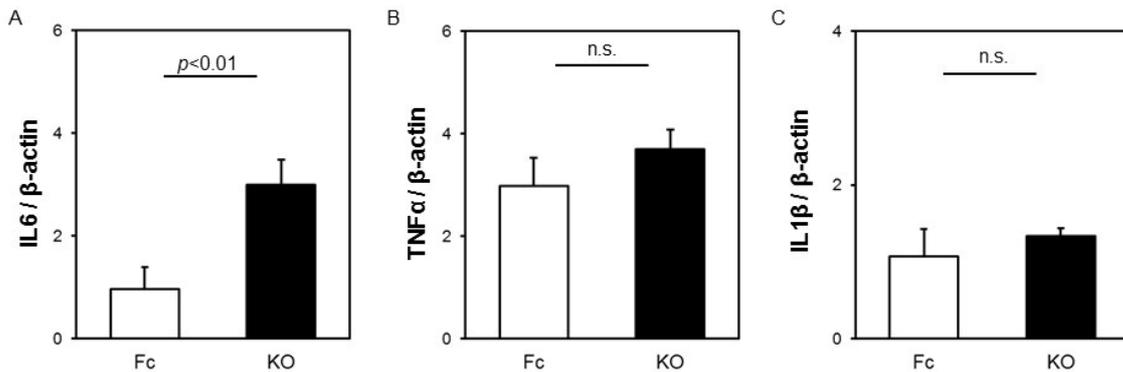


図3. マクロファージ特異的MR欠損が片腎摘／食塩／アルドステロン負荷モデルの腎臓におけるM1マクロファージ関連遺伝子発現に及ぼす影響。A. IL6 B. TNF α C. IL1 β , 非負荷Fcマウスでの発現を1とした。

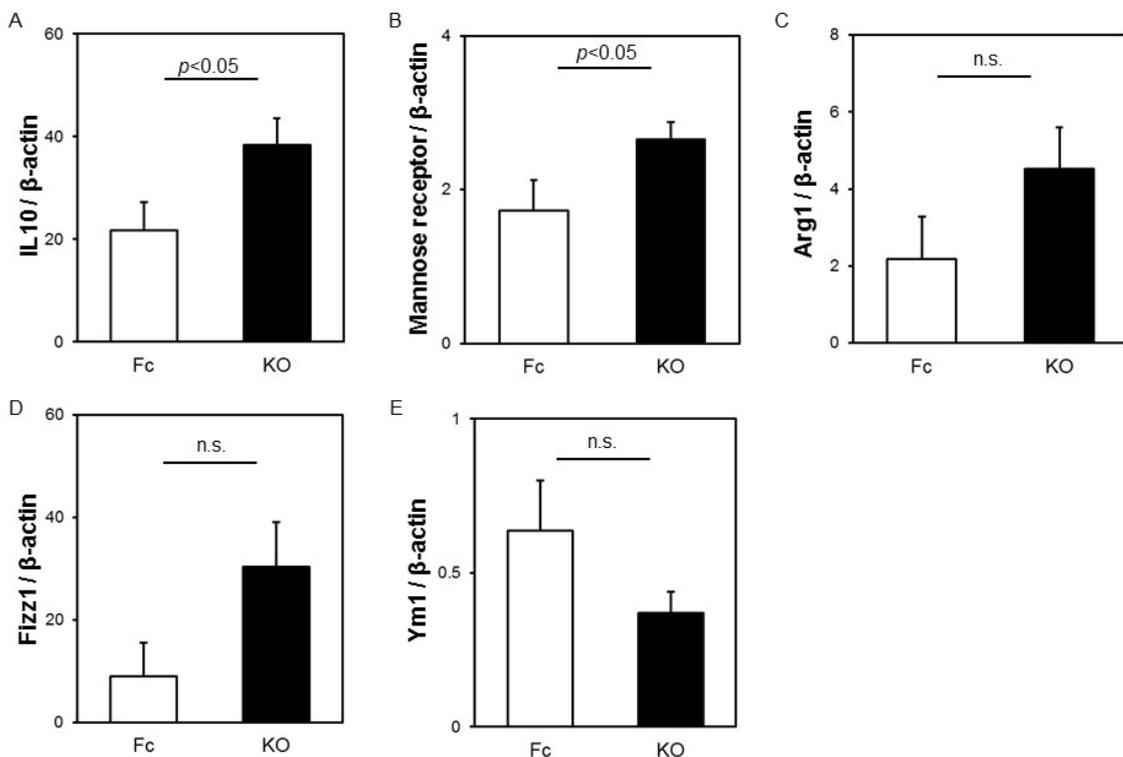


図4. マクロファージ特異的MR欠損が片腎摘／食塩／アルドステロン負荷モデルの腎臓におけるM2マクロファージ関連遺伝子発現に及ぼす影響。A. IL10 B. Mannose receptor C. Arg1 D. Fizz1 E. Ym1, 非負荷Fcマウスでの発現を1とした。

が, Fc と KO 間で有意差はつかなかった。

3. 4 片腎摘／食塩／アルドステロン負荷モデルの腎臓における線維化関連遺伝子発現の変化

次に, 負荷 6 週後の腎臓における線維化関連遺伝子発現を Fc, KO マウスで比較した(図 5)。M2 マクロファージマーカーの増大が見られた KO 群では, 線維化マーカーの Collagen I, Collagen III, Fibronectin の発現が有意に増加していた。線維化のメディエーターとされる因子のうち, TGF β の発現は不変で, PAI-1 や CCN5 の発現が本モデルで誘導され, その程度は KO 群で有意に大きかつ

た。

3. 5 片腎摘／食塩／アルドステロン負荷モデルの腎臓におけるポドサイト関連遺伝子発現の変化

次に, 負荷 6 週後の腎臓におけるポドサイト関連遺伝子発現を Fc, KO マウスで比較した(図 6)。前述したように, 本モデルではアルブミン尿が認められたが, Fc, KO 間でアルブミン尿に有意差は認められなかった。ポドサイト関連因子の遺伝子発現も Fc, KO 間で有意差は認められなかった。

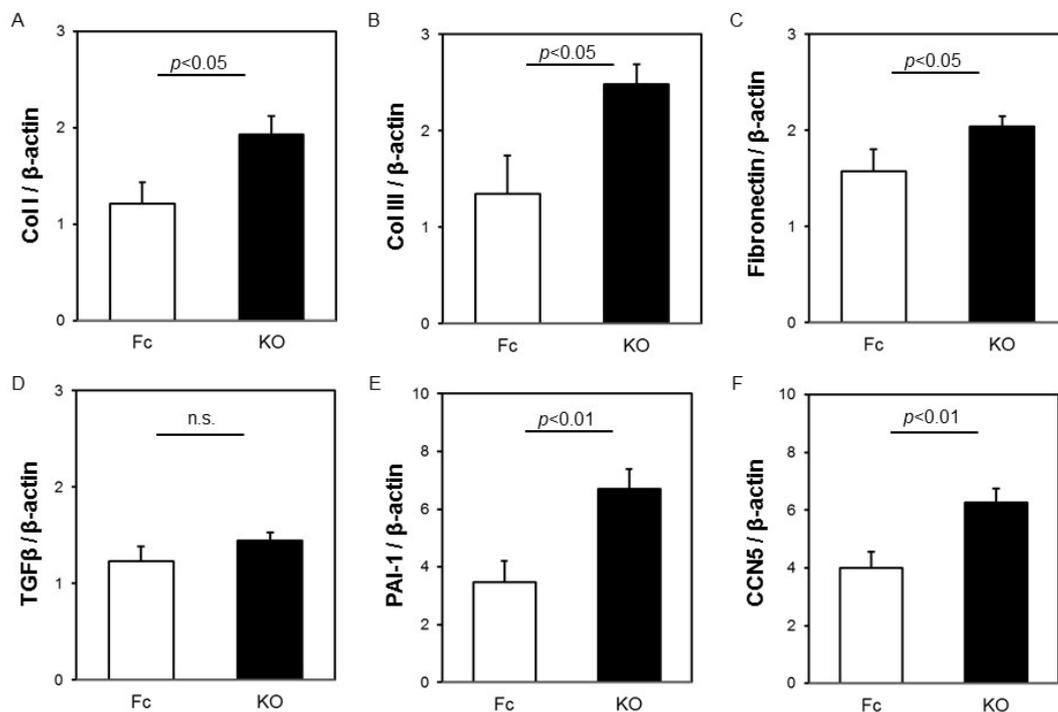


図 5. マクロファージ特異的 MR 欠損が片腎摘／食塩／アルドステロン負荷モデルの腎臓における線維化関連遺伝子発現に及ぼす影響。A. Collagen I B. Collagen III C. Fibronectin D. TGF β E. PAI-1 F. CCN5

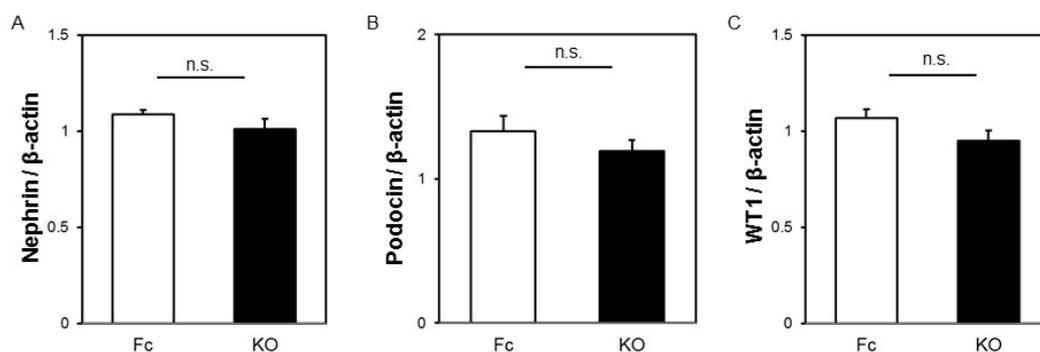


図 6. マクロファージ特異的 MR 欠損が片腎摘／食塩／アルドステロン負荷モデルの腎臓におけるポドサイト関連遺伝子発現に及ぼす影響。A. Nephrlin B. Podocin C. WT1

3.6 片腎摘／食塩／アルドステロン負荷モデルの腎臓における免疫細胞関連遺伝子発現の変化

負荷 6 週後の腎臓における浸潤免疫細胞関連遺伝子発現を Fc, KO マウスで比較した(図 7)。マクロファージ浸潤を促進する MCP1 発現は KO 群で増大しており、マクロファージマーカーである F4/80 発現も KO 群で有意に増加していた。T 細胞浸潤を促進する Rantes 発現や CD8a 遺伝子発現は両群間で有意差を認めなかったが、CD4 遺伝子発現は KO 群で有意に増加していた。

4. 考 察

食塩による腎障害ではしばしば尿細管間質や糸球体にマクロファージや T 細胞の浸潤が認められ、これらが炎症、線維化のプロセスに深く関与することが知られている。そして MR 拮抗薬によりしばしばこのプロセスは劇的に改善する。こうした MR を介する炎症、線維化にマクロファージ MR が深く関与することが最近示唆されている。我々も、LPS 投与による急性腎障害モデルの解析を通して、マクロファージ MR が LPS 投与によるマクロファージからの炎症性サイトカイン IL6, TNF α 発現誘導を介して腎臓の炎症機

転、尿細管障害を引き起こすこと、マクロファージ特異的 MR KO マウスではこの変化が劇的に改善することを見出した。同様のことがマクロファージ特異的 Rac1 KO マウスでも示され、マクロファージにおける Rac1-MR シグナルのクロストークが示唆されている。本研究ではマクロファージの MR が片腎摘／食塩／アルドステロンモデルの腎の炎症・線維化に関与する可能性を、マクロファージ特異的 MR KO マウスを用いて検証した。当初、片腎摘／食塩／アルドステロンモデルの腎臓の炎症、線維化はマクロファージ MR を介する可能性を考えていたが、KO マウスでむしろ線維化が増強しており、マクロファージを介する炎症反応が生じないと、M2 マクロファージが増加し、線維化が遷延する可能性が示唆された。しかしながら、現時点ではまだデータのばらつきのために有意差がついていない解析結果も多いため、サンプル数を増やして再現性を検討する予定である。また、今回得られた mRNA 解析データをサポートする免疫染色、腎組織解析などを進め、実際にどのような免疫炎症細胞の浸潤が生じているかを明らかにする予定である。

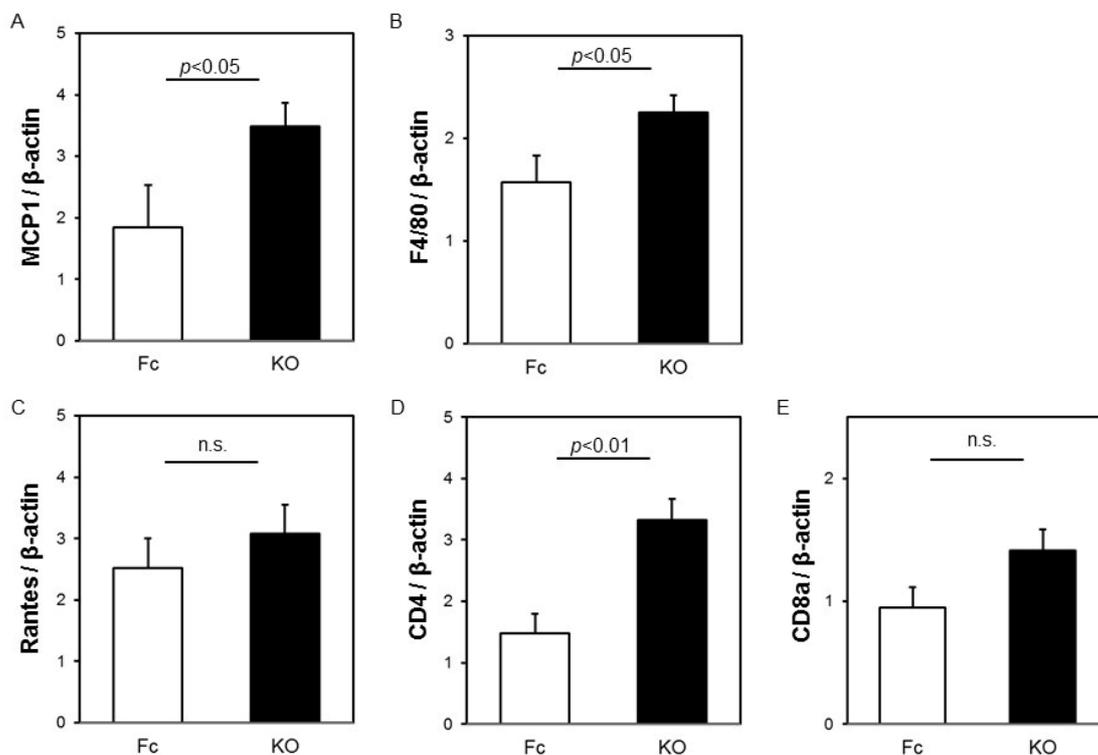


図 7. マクロファージ特異的 MR 欠損が片腎摘／食塩／アルドステロン負荷モデルの腎における免疫細胞関連遺伝子発現に及ぼす影響。A. MCP1 B. F4/80 C. Rantes D. CD4 E. CD8a

Role of Macrophage Mineralocorticoid Receptor in the Pathogenesis and Target Organ Complications of Salt-Sensitive Hypertension

Miki NAGASE

Juntendo University

Summary

I had been engaged in the research exploring the mechanisms of salt-sensitive hypertension and its target organ complications, and found pivotal roles of Rac1-mediated mineralocorticoid receptor (MR) activation. Recently, association of salt and the immune system have been highlighted. In the present study, I created salt-loaded uninephrectomized aldosterone infused model in macrophage-specific MR KO mice and their control Fc mice, and explored the role of macrophage MR in the pathogenesis of salt-induced hypertension and renal injury.

I generated macrophage-specific MR KO mice (M-MR KO; $LysM^{cre/+} MR^{flox/flox}$) and their flox control (M-MR Fc: $LysM^{+/+} MR^{flox/flox}$), using the Cre-loxP system. M-MR KO mice did not develop obvious kidney abnormalities. Therefore, we created the uninephrectomy/salt/aldosterone model. After 6 weeks, there were no significant differences in body weight, BUN, serum creatinine, systolic blood pressure, or urinary albumin excretion. The results suggest that macrophage MR did not play a central role in the pathogenesis of salt-induced hypertension or albuminuria of this model.

On the other hand, the expression of renal fibrosis markers, such as collagen I, collagen III, and fibronectin, was more pronounced in the kidney of M-MR KO mice. The expression of PAI-1 and CCN5 was significantly greater in the KO group. Gene expression of podocyte-related molecules did not differ between Fc and KO mice.

As for macrophage properties, the expression of $TNF\alpha$ and $IL1\beta$, M1 macrophage markers, did not differ between Fc and KO mice, and the expression of IL6 was rather enhanced in the KO mice. The expressions of M2 macrophage markers (IL10, Fizz1, Mannose receptor, Arg1) were enhanced in the kidney of salt-loaded uninephrectomized aldosterone model, which was further enhanced in the KO group.

Salt is known to promote accumulation of bone marrow-derived immune cells. The expression of macrophage-specific marker F4/80, a T lymphocyte subset marker CD4, as well as MCP-1, a macrophage chemoattractant, were significantly increased in the KO group.