

食塩摂取量が腎糸球体内圧、アルブミン尿、老化腎臓に及ぼす影響の解明

森 潔¹, 横井 秀基², 森 慶太²

¹静岡県立大学薬学部分子臨床薬理学, ²京都大学大学院医学研究科腎臓内科学

概要 高血圧・糖尿病は透析導入の主原因であり, その病態生理において, 糸球体内圧上昇によるアルブミン尿増加が重要な役割を果たしていると考えられているが, 解明は不十分である。また食塩摂取量は血圧の規定因子である。糸球体内圧測定は技術的に極めて難しいため, サロゲートマーカーとして糸球体濾過されるアルブミン総量を測定し, 塩分負荷, 糖尿病惹起, 老化腎臓モデルでの変化を検討した。

2 種類の遺伝子改変動物を交配し, 近位尿細管でのアルブミン再吸収ができないメガリンノックダウンマウスを作成し, 食餌中の塩分含有量の変更あるいは糖尿病の誘発を行った。マウスへの塩分負荷はアルブミン尿を変化させなかったが, 糸球体ろ過アルブミン量を3倍に増加させた。またマウスへの糖尿病惹起は糸球体ろ過アルブミン量を2倍に増加させた。老化腎臓モデルとして近位尿細管でのアルブミン再吸収を抑制したマウスで塩分制限を行うと塩類喪失傾向を示した。

以上より, 塩分負荷および糖尿病状態では糸球体内圧が増加していることが示唆され, 高血圧あるいは糖尿病において全身血圧低下・糸球体内圧低下を目指すことが推奨されている現状のガイドラインに対して基礎医学的根拠を提示した。また, 高齢者の塩類喪失の原因として近位尿細管の機能不全も考える必要があると考えられた。

1. 研究目的

申請者らは心房性および脳性ナトリウム利尿ペプチド (ANP, BNP) の腎保護作用に着目し, BNP 過剰発現トランスジェニックマウスおよび, ANP/BNP 受容体である guanylyl cyclase A の欠損マウス (GCA-KO) を用いて, 血圧・糸球体内圧の調節・腎障害におけるナトリウム利尿ペプチド/GCA 系の意義を解明し, この分野をリードしてきた⁽¹⁻³⁾。最近では腎ポドサイト特異的な GCA-KO を作製し, 塩分+アルドステロン負荷によるナトリウム貯留, 高血圧, 糸球体内圧上昇を伴う腎障害の病態において, ANP のポドサイトへの直接作用が腎保護効果を示すことを証明し, 広範囲に及ぶ ANP の多彩な作用の新しいターゲットとしてポドサイトを同定している^(4,5)。

糸球体内圧の上昇は高血圧症^(6,7)や糖尿病⁽⁸⁾などの生活病関連腎症で共通に見られると考えられているが, その測定は極めて難しいため, 病態への関わりは十分には解明されていない。また尿中アルブミン排泄量は糸球体内圧のサロゲートマーカーと考えられており, 心血管イベ

ントを予測する重要な因子としても注目されている⁽⁹⁻¹¹⁾。しかしながら糸球体をろ過されたアルブミンの大半が近位尿細管にて再吸収されるため, 尿中アルブミン排泄量は糸球体内圧のみならず, 尿細管の機能の影響をも強く受けてしまうという問題があった^(12,13)。今回, 遺伝子改変技術を用いて^(14,15), 尿細管におけるアルブミン再吸収を遮断し, 糸球体をろ過されたアルブミンのすべてが尿中に排泄されるマウスを作製し, 糸球体アルブミンろ過量を正確に測る方法を考案した。

食塩摂取量は血圧の規定因子であるので⁽¹⁶⁾, 本研究では, 腎糸球体内圧の鋭敏な指標として糸球体アルブミンろ過量に着目し, 塩分負荷および塩分制限が及ぼす影響をリアルタイムに検出する。この方法は, 疾患モデルへ応用可能であるため, 次には糖尿病性腎症モデルにおけるアルブミンろ過量を明らかにする。さらに, 尿細管の再吸収能を遮断したマウスは, 老化に伴って生じる萎縮腎のモデルとも考えられるので^(15,17), 塩分摂取量が腎老化モデルに及ぼす影響を検討する。以上の研究により, 糸

球体内圧・アルブミン尿・老化腎臓の視点から塩分摂取量と腎障害の関係を解明することを目的としている。

2. 研究方法

2. 1. 糸球体内圧の指標として糸球体アルブミンろ過量を計測する方法の開発

薬剤誘導性に尿細管でのメガリン依存的アルブミン再吸収を阻害できるメガリンノックダウンマウスを作製した。そのために megalin floxed mice⁽¹⁴⁾と Ndrp1-CreERT2 mice⁽¹⁵⁾を交配し、6週令でタモキシフェンを投与し(150 mg/kg body weight, ip, 3日間; Sigma-Aldrich), 高効率な遺伝子組み換えを行った⁽¹⁸⁾。マウスの尿細管再吸収能を評価する方法の一つとして蛍光標識 (Alexa546, Life Technologies)した retinol binding protein (RBP)を尾静脈より投与した(1 µg/g body weight)。RBPの分子量はアルブミンの1/3であり、糸球体を効率よく通過し、近位尿細管にて再吸収された。

2. 2. 経口塩分摂取量の影響の評価

食塩の含有量が0.03%(低塩分), 0.8%(通常), 6%(高塩分)の食餌を購入した(日本クレア)。これらの食餌がマウスの塩分再吸収能に及ぼす影響の検討では食餌変更のとくに最初の3日間に着目した。7日後には定常状態となると想定された。畜尿施行時には、マウスを一匹ずつ代謝ケージに収容し、本番の前に慣らし収容を行った。尿中アルブミンは Sandwich ELISAにて測定した(Lbis, Shibayagi)。血圧は tail cuff法(MK-2000ST, Muromachi Kikai)を用いて測定し、連続6回の測定の平均値をその

個体の血圧とした。

2. 3. 老化腎臓モデルにおける塩分再吸収の検討

高齢者では尿濃縮能の低下、夜間頻尿、腎皮質の萎縮、低ナトリウム血症などをしばしば認め、塩分の再吸収力が低下していることが示唆されてきたが⁽¹⁹⁾、その分子機構には不明な点が多い。

柳田らは最近、急性腎障害のあとの回復期に腎機能は一見回復していても、近位尿細管の長さには完全に回復せず短縮し腎萎縮をもたらすことを見出だしており、急性腎障害から慢性腎臓病あるいは老化腎臓へ変化する新しいメカニズムを提唱している^(15, 17)。このような病態では近位尿細管の再吸収能力も低下すると予想されるため、老化腎臓のモデルとしてメガリンノックダウンマウスを解析した。

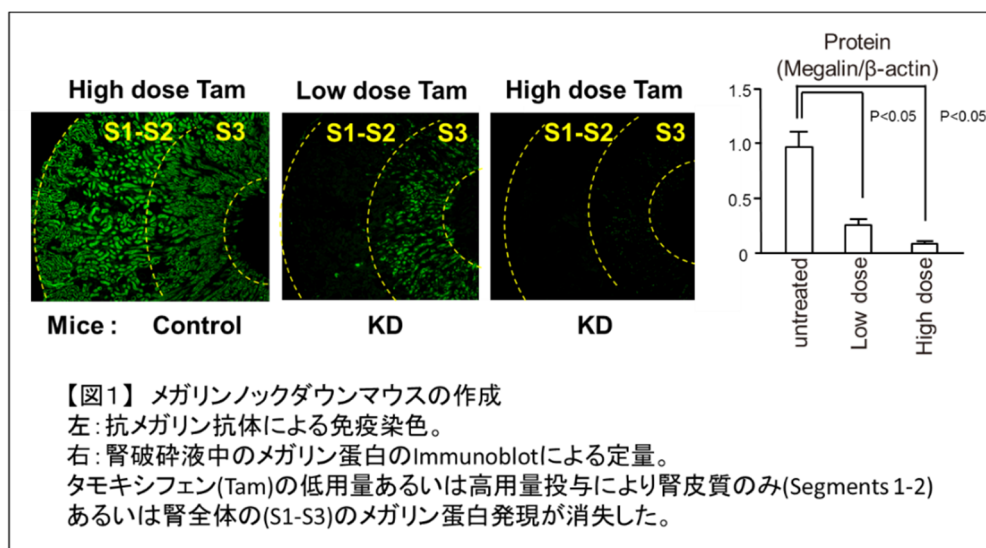
2. 4. 糖尿病性腎症モデルの検討

糖尿病の惹起のためにストレプトゾトシンを投与した(100 mg/kg, ip, 3日間; Sigma-Aldrich)⁽²⁰⁾。

3. 研究結果

3. 1. 糸球体アルブミンろ過量の計測

薬剤誘導性メガリンノックダウンマウスに対して、タモキシフェンを3日間あるいは5日間(低用量あるいは高用量)連日投与すると、腎臓におけるメガリン蛋白の発現はそれぞれ74%, 92%減少した【図1】。これらのマウスにおいて尿中アルブミン、あるいは尿細管障害バイオマーカーである尿中NGALを測定すると、低用量と高用量のタモキシフェン投与の双方において、尿中アルブミンが16倍、尿中



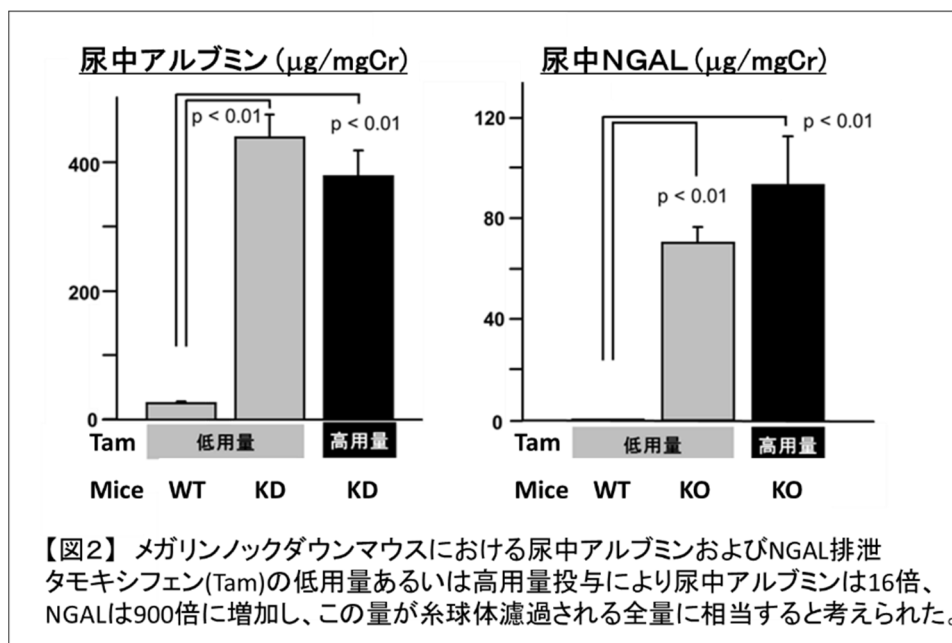
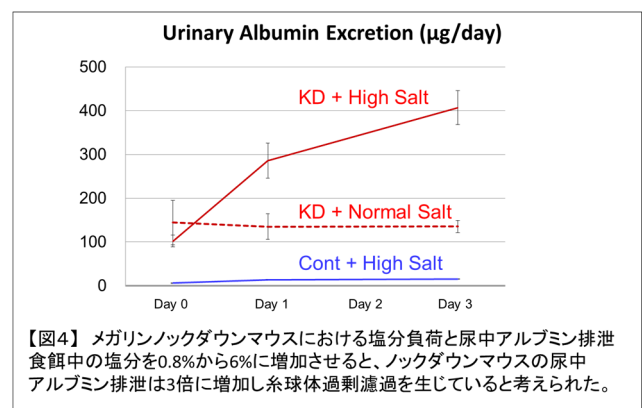
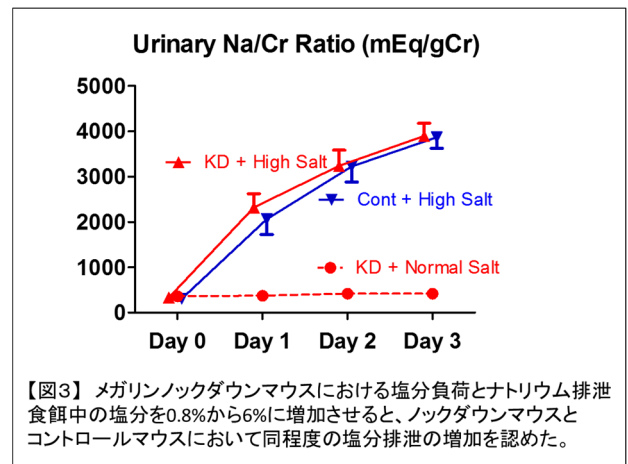
NGAL が 900 倍に増加し、タモキシフェンの投与量としては低用量で十分であることが示された【図2】。またメガリンノックダウンマウスの尿中アルブミン濃度は 400 $\mu\text{g/gCr}$ であり、正常マウスの糸球体を濾過されるアルブミンの総濃度はヒトの微量アルブミン尿の上限 (300 $\mu\text{g/gCr}$) を超えて、顕性アルブミン尿に相当する量であることが明らかとなった。糸球体濾過される NGAL の総濃度は 80 $\mu\text{g/gCr}$, 40 $\mu\text{g/ml}$ 程度であり、ヒトでは敗血症による最重症の急性腎障害に匹敵する濃度であった。

3. 2. 経口塩分摂取量が糸球体アルブミンろ過量におよぼす影響

メガリンノックダウンマウスおよびコントロールマウスにおいて、食餌中の NaCl 含有量を 0.8% (正常食) から 6% (高塩分食) に変更すると、同様の速度で経時的に尿中 Na 排泄が増加し、3 日間で 300 mEq/gCr からその 10 倍に増加し【図3】、14 日後まで同様のレベルであった。次に尿中アルブミン排泄を検討すると、ノックダウンマウスに高塩分食を与えた場合にはアルブミン排泄量が 3 倍に増加し、糸球体内圧の上昇を反映しているものと考えられた【図4】。コントロールマウスに塩分負荷をしても、明らかなアルブミン尿の増加を認めなかった。

メガリンノックダウンマウスおよびコントロールマウスにおいて正常食時と高塩分食負荷後の血圧を測定したところ、

4 群のすべてにおいて収縮期血圧は約 95 mmHg であり、差を認めなかった。



3. 3. 老化腎臓モデルにおける塩分再吸収の検討

メガリンノックダウンマウスは腎近位尿細管での再吸収能が低下した、腎皮質萎縮のモデルと考えられる。食餌中の NaCl を 0.8% から 0.03% に制限すると、メガリンノックダウンマウスおよびコントロールマウスともに 3 日後に尿中 Na 排泄が 1/3 に減少したが、1 日後の時点ではメガリンノックダウンマウスの尿中 Na 排泄は相対的高値を示しており、Na の再吸収不全・塩類喪失の病態が存在すると考えられた。

3. 4. 糖尿病性腎症モデルの検討

ストレプトゾトシン投与 10 週後に平均随時血糖は 159±11 mg/dl から 619±84 mg/dl まで上昇した。また糖尿病状態では糸球体アルブミンろ過量は約 2 倍に増加し、糸球体内圧の上昇が示唆された。

4. 考 察

遺伝子改変技術を用いて、アルブミン再吸収を抑制したメガリンノックダウンマウスを作成した。このマウスに塩分負荷あるいは糖尿病惹起を行うと、糸球体濾過されるアルブミン総量がそれぞれ 3 倍あるいは 2 倍に増加し、糸球体内圧の上昇を反映する結果と考えられた。これまで糸球体内圧の実測は極めて困難であったが、本研究によりサロゲートマーカーの変動として定量的な評価が可能となった。

今回、塩分負荷は尿中アルブミン排泄をほとんど増加させない範囲内であっても、糸球体アルブミンろ過量を増加させることが示され、塩分負荷は糸球体の構造、とくにポドサイトに対して物理的なストレスを与え続けることが推測された。この成績は高血圧、糖尿病や慢性腎臓病を有する患者において塩分制限を行うことが、アルブミン尿・蛋白尿を軽減させるという臨床研究⁽²¹⁾や現行のガイドライン推奨^(9, 22)の基礎医学的根拠の一つとなると考えられた。

一方、メガリンノックダウンマウスを腎皮質の萎縮した老化腎臓のモデルとしてとらえた場合には、塩分制限時にこのモデルマウスは塩類喪失の表現型を示した。このことより、老化腎臓における塩類喪失傾向の原因として、遠位ネフロンにおけるアルドステロンの作用不足のみならず、近位尿細管の Na 再吸収不全も関する可能性があることを明らかにした。本研究の限界としては、食餌摂取量を厳密にコントロールしていないため、メガリンノックダウンマウスと

コントロールマウスの食餌・塩分摂取量に差異がある可能性は否定できない。

今回、メガリンノックダウンマウスとコントロールマウスの両者において、糸球体濾過アルブミン量自体には差異がないものと推定されるが、遠位ネフロンでのアルブミン再吸収量を無視すると、遠位ネフロン内腔まで到達する尿中のアルブミン量はメガリンノックダウンマウスではコントロールマウスの 16 倍にまで増加していた。一般にネフローゼでは高度浮腫、塩分貯留が見られ、その機序として under filling (血管内脱水による代償的 Na 再吸収亢進) と over filling (血行動態、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系活性化によらない Na 再吸収の直接的促進) の両者の関与が想定されている^(23, 24)。今回、メガリンノックダウンマウスへの急性の塩分負荷では Na 排泄に異常は見られないものの塩分制限では塩類喪失の結果となった。今後の課題として、このような Na ハンドリングの特性に関して、腎での Na 再吸収で重要な役割を果たすトランスポーター群である近位尿細管の Slc9a3 (NHE3)、ヘンレ上行脚の Slc12a1 (NKCC2)、遠位曲尿細管 Slc12a3 (NCC)、遠位ネフロンの Scnn1b (ENaC β) などの発現変化と機能について検討する必要がある。

5. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大な支援を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団に心より感謝申し上げます。

6. 引用文献

1. Kasahara, M., Mukoyama, M., Sugawara, A., Makino, H., Suganami, T., Ogawa, Y., Nakagawa, M., Yahata, K., Goto, M., Ishibashi, R., Tamura, N., Tanaka, I., and Nakao, K. (2000) Ameliorated glomerular injury in mice overexpressing brain natriuretic peptide with renal ablation. *J Am Soc Nephrol* **11**, 1691-1701
2. Suganami, T., Mukoyama, M., Sugawara, A., Mori, K., Nagae, T., Kasahara, M., Yahata, K., Makino, H., Fujinaga, Y., Ogawa, Y., Tanaka, I., and Nakao, K. (2001) Overexpression of brain natriuretic peptide in mice ameliorates immune-mediated renal injury. *J Am*

3. Makino, H., Mukoyama, M., Mori, K., Suganami, T., Kasahara, M., Yahata, K., Nagae, T., Yokoi, H., Sawai, K., Ogawa, Y., Suga, S., Yoshimasa, Y., Sugawara, A., Tanaka, I., and Nakao, K. (2006) Transgenic overexpression of brain natriuretic peptide prevents the progression of diabetic nephropathy in mice. *Diabetologia* **49**, 2514-2524
4. Ogawa, Y., Mukoyama, M., Yokoi, H., Kasahara, M., Mori, K., Kato, Y., Kuwabara, T., Imamaki, H., Kawanishi, T., Koga, K., Ishii, A., Tokudome, T., Kishimoto, I., Sugawara, A., and Nakao, K. (2012) Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A protects podocytes from aldosterone-induced glomerular injury. *J Am Soc Nephrol* **23**, 1198-1209
5. Kato, Y., Mori, K., Kasahara, M., Osaki, K., Ishii, A., Mori, K. P., Toda, N., Ohno, S., Kuwabara, T., Tokudome, T., Kishimoto, I., Saleem, M. A., Matsusaka, T., Nakao, K., Mukoyama, M., Yanagita, M., and Yokoi, H. (2017) Natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A pathway counteracts glomerular injury evoked by aldosterone through p38 mitogen-activated protein kinase inhibition. *Sci Rep* **7**, 46624
6. Dworkin, L. D., Hostetter, T. H., Rennke, H. G., and Brenner, B. M. (1984) Hemodynamic basis for glomerular injury in rats with desoxycorticosterone-salt hypertension. *J Clin Invest* **73**, 1448-1461
7. Bigazzi, R., Bianchi, S., Baldari, D., Sgherri, G., Baldari, G., and Campese, V. M. (1994) Microalbuminuria in salt-sensitive patients. A marker for renal and cardiovascular risk factors. *Hypertension* **23**, 195-199
8. Cooper, M. E. (2001) Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* **44**, 1957-1972
9. Levey, A. S., Coresh, J., Balk, E., Kausz, A. T., Levin, A., Steffes, M. W., Hogg, R. J., Perrone, R. D., Lau, J., Eknoyan, G., and National Kidney, F. (2003) National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* **139**, 137-147
10. Hillege, H. L., Fidler, V., Diercks, G. F., van Gilst, W. H., de Zeeuw, D., van Veldhuisen, D. J., Gans, R. O., Janssen, W. M., Grobbee, D. E., de Jong, P. E., Prevention of, R., and Vascular End Stage Disease Study, G. (2002) Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation* **106**, 1777-1782
11. Ito, S., Nagasawa, T., Abe, M., and Mori, T. (2009) Strain vessel hypothesis: a viewpoint for linkage of albuminuria and cerebro-cardiovascular risk. *Hypertens Res* **32**, 115-121
12. Tojo, A., Onozato, M. L., Kurihara, H., Sakai, T., Goto, A., and Fujita, T. (2003) Angiotensin II blockade restores albumin reabsorption in the proximal tubules of diabetic rats. *Hypertens Res* **26**, 413-419
13. Dickson, L. E., Wagner, M. C., Sandoval, R. M., and Molitoris, B. A. (2014) The proximal tubule and albuminuria: really! *J Am Soc Nephrol* **25**, 443-453
14. Leheste, J. R., Melsen, F., Wellner, M., Jansen, P., Schlichting, U., Renner-Muller, I., Andreassen, T. T., Wolf, E., Bachmann, S., Nykjaer, A., and Willnow, T. E. (2003) Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *FASEB J* **17**, 247-249
15. Endo, T., Nakamura, J., Sato, Y., Asada, M., Yamada, R., Takase, M., Takaori, K., Oguchi, A., Iguchi, T., Higashi, A. Y., Ohbayashi, T., Nakamura, T., Muso, E., Kimura, T., and Yanagita, M. (2015) Exploring the origin and limitations of kidney regeneration. *J Pathol* **236**, 251-263
16. Appel, L. J., Brands, M. W., Daniels, S. R., Karanja, N., Elmer, P. J., Sacks, F. M., and American Heart, A. (2006) Dietary approaches to prevent and treat hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension* **47**, 296-308
17. Takaori, K., Nakamura, J., Yamamoto, S., Nakata, H., Sato, Y., Takase, M., Nameta, M., Yamamoto, T., Economides, A. N., Kohno, K., Haga, H., Sharma, K., and Yanagita, M. (2016) Severity and Frequency of

- Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis. *J Am Soc Nephrol* **27**, 2393-2406
18. Yokoi, H., Kasahara, M., Mukoyama, M., Mori, K., Kuwahara, K., Fujikura, J., Arai, Y., Saito, Y., Ogawa, Y., Kuwabara, T., Sugawara, A., and Nakao, K. (2010) Podocyte-specific expression of tamoxifen-inducible Cre recombinase in mice. *Nephrol Dial Transplant* **25**, 2120-2124
19. Ishikawa, S., Fujita, N., Fujisawa, G., Tsuboi, Y., Sakuma, N., Okada, K., and Saito, T. (1996) Involvement of arginine vasopressin and renal sodium handling in pathogenesis of hyponatremia in elderly patients. *Endocr J* **43**, 101-108
20. Kuwabara, T., Mori, K., Mukoyama, M., Kasahara, M., Yokoi, H., Saito, Y., Ogawa, Y., Imamaki, H., Kawanishi, T., Ishii, A., Koga, K., Mori, K. P., Kato, Y., Sugawara, A., and Nakao, K. (2012) Exacerbation of diabetic nephropathy by hyperlipidaemia is mediated by Toll-like receptor 4 in mice. *Diabetologia* **55**, 2256-2266
21. Esnault, V. L., Ekhlās, A., Delcroix, C., Moutel, M. G., and Nguyen, J. M. (2005) Diuretic and enhanced sodium restriction results in improved antiproteinuric response to RAS blocking agents. *J Am Soc Nephrol* **16**, 474-481
22. Stevens, P. E., Levin, A., and Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group, M. (2013) Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med* **158**, 825-830
23. Humphreys, M. H. (1994) Mechanisms and management of nephrotic edema. *Kidney Int* **45**, 266-281
24. Vande Walle, J. G., Donckerwolcke, R. A., van Isselt, J. W., Derkx, F. H., Joles, J. A., and Koomans, H. A. (1995) Volume regulation in children with early relapse of minimal-change nephrosis with or without hypovolaemic symptoms. *Lancet* **346**, 148-152

Effects of Salt Intake upon Glomerular Blood Pressure, Albuminuria and Aging Kidneys

Kiyoshi Mori¹, Hideki Yokoi², Keita Mori²

¹Department of Molecular and Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

²Department of Nephrology, Graduate School of Medicine, Kyoto University

Summary

Hypertension and diabetes are major causes of end-stage renal disease. Intraglomerular hypertension and subsequent increase in albuminuria, presumably, play a pathophysiologically important role in such renal disorders. However, detailed and quantitative analysis have remained elusive. Furthermore, salt intake is one of determinants of blood pressure. Since measurement of intraglomerular pressure is technically quite difficult, total amount of albumin filtered through glomeruli was measured as its surrogate marker. Changes in filtered albumin were also investigated in response to salt loading, induction of diabetes and in a model of aging kidneys.

Two lines of genetically modified mice were mated and megalin knockdown mice were generated, in which albumin reabsorption was potently suppressed at the proximal tubules. Salt intake was altered or diabetes was induced in those mice. Salt loading did not alter urinary albumin excretion, but glomerular albumin filtration was increased by 3-fold. Moreover, diabetic mice exhibited 2-fold larger amount of glomerular albumin filtration compared to control mice. Salt restriction in megalin knockdown mice, as a model of aging kidneys with impaired albumin reabsorption activity at proximal tubules, resulted in salt losing phenotypes.

Through these findings, it was suggested that intraglomerular pressure is elevated by salt loading and hyperglycemia. The present study in basic science provides a rationale for the current guidelines recommending to aim reduction of systemic blood pressure and intraglomerular pressure among patients with hypertension or diabetes. Furthermore, malfunctioning of proximal tubules seems to be a possible cause of salt losing syndrome in the elderly.