

## 食塩感受性高血圧に対する腎内因性アセチルコリン分泌機構介入による 降圧作用の検討

清水 秀二, 秋山 剛, 川田 徹, 宍戸 稔聡, 山崎 悟

国立循環器病研究センター

**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  $\text{Na}^+$ 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、Rivastigmine などの薬剤を用いて腎内因性 ACh 分泌機構に介入し、腎保護作用を発揮することで、高食塩食負荷時における血圧上昇を抑制し、生存率を改善できるかを動物実験にて検証し、食塩感受性高血圧の新しい治療法の開発に繋げ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、高血圧を誘発した。高食塩食負荷と同時に、ACh 分解酵素阻害薬である Rivastigmine (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を経口投与し、負荷開始8週間後まで、1週間毎に tail-cuff にて血圧を測定し、薬剤投与による降圧効果を検討した。8~9週間後(生後14~15週)に  $\alpha$ クロラロース・ウレタン麻酔下にて腎臓を摘出し、腎皮質組織を得た。腎皮質中の上皮性  $\text{Na}^+$ チャネル(ENaC)の mRNA(SCNN1a)の発現量を PCR 法にて測定した。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した。

**結 果:**Rivastigmine 投与群においては、観察期間中に死亡例はなかったが、対照群においては、49, 53, 55 日目に 1匹ずつの死亡が観察され、Rivastigmine 投与により生存率は改善する傾向にあった( $P=0.065$ )。収縮期血圧は、負荷開始1, 3~6週間後において、Rivastigmine 投与群で有意に低値であった。ENaC  $\alpha$  subunit の mRNA 発現量は、両群間において差を認めなかった( $\text{SCNN1a}/\text{TBP}: 2.77 \pm 1.14$  vs.  $2.74 \pm 0.59$ ,  $P=0.97$ )。また、PAS 染色による病理組織学的検討では、対照群の一部糸球体に硬化像(glomerular sclerosis)が認められた。

**考 察:**Rivastigmine による腎内因性 ACh 分泌機構への介入は、Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおいて腎組織障害を低減することで、血圧上昇を抑制し、生存率を改善する傾向にあった。一方で、その詳細なメカニズムについては、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

### 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。食塩感受性高血圧の発症には、腎臓が大きな役割を担うことが知られており、Dahl 食塩抵抗性ラットに、Dahl 食塩感受性高血圧ラットの腎臓を移植すると、高食

塩食負荷により高血圧を発症することが知られている(文献1)。

我々は、先行研究にて正常血圧ウサギにおける腎皮質細胞内の  $\text{Na}^+$ 濃度の上昇が、腎皮質でのアセチルコリン(ACh)分泌を促すことを発見した(文献2)。さらに、Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおいては、この腎内因性 ACh 分泌機構が障害されていることから、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で、腎組織障害を抑制できることをすでに報告している(ソルト・サ

イェンス研究財団第 28 回助成研究発表会にて報告)。そこで本研究においては、これらの薬剤を用いて腎内因性 ACh 分泌機構に介入し、腎保護作用を発揮することで、高食塩食負荷時における血圧上昇を抑制し、生存率を改善できるかを動物実験にて検証し、食塩感受性高血圧の新しい治療法の開発に繋げることを目的とする。

## 2. 研究方法

### 2. 1 実験動物の取り扱い

実験動物の取扱いは、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 Rivastigmine 投与による Dahl 食塩感受性高血圧ラットの血圧上昇抑制効果および生存率改善効果の検討

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。Rivastigmine 投与群においては、水 1.0L に対して 50 mg の Rivastigmine を溶かした薬液 (50  $\mu$ g/ml) を、高食塩食開始と同時に自由飲水にて摂取させた。Rivastigmine 投与群と対照群において、1 週間毎に体重の変化を記録した。また、tail-cuff 法 (MK-200ST, Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて、1 週間毎に心拍数・収縮期血圧を測定した。さらに、高食塩食負荷後 8 週間の生存率を観察した。

#### 2. 2. 2 Rivastigmine 投与による Dahl 食塩感受性高血圧ラットでの腎皮質上皮性 Na<sup>+</sup>チャンネル mRNA 発現の検討および病理組織学的検討

高食塩食負荷後 8~9 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。外頸動脈にカテーテルを挿入し、平均血圧を測定した。その後、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 の生理食塩水にて摘出した腎臓を洗浄した後、腎皮質の一部 (約 100 mg) を採取し、液体窒素にて直ちに凍結し、-80°C の冷凍庫にて保存した (mRNA 測定用)。また、腎皮質組織の一部を 10%ホルマ

リンで固定し、PAS (Periodic Acid-Schiff) 染色を行い、病理組織学的検討を行った。

採取した腎皮質組織中の上皮性 Na<sup>+</sup>チャンネル (ENaC) の mRNA 発現を下記 (2. 3) の Droplet digital PCR 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. 3 Droplet digital PCR による ENaC mRNA の定量評価

-80°C で保存した組織サンプルを、液体窒素にて再凍結した後、ハンマーで粉碎し、RNA-Bee™ (Tel-Test, Inc., Texas, USA) 中でホモジナイズした。クロロホルムを加え、混和した後、遠心分離機 (15,000 rpm, 20 min, 4°C) にて上清を分離した。上清を別のサンプルチューブに移した後に、同量の 10% イソプロパノールを加えた。再度、遠心分離 (15,000 rpm, 20 min, 4°C) を行い、上清を廃棄した。サンプルチューブに残ったペレットに 75% エタノールを加え、遠心分離 (15,000 rpm, 10 min, 4°C) を行い、上清を完全に廃棄した。残ったペレットを蒸留水に溶解し、Total RNA を得た。

Nano Drop (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) にて RNA 量を測定し、各サンプルで RNA 量が 1  $\mu$ g/ $\mu$ l 前後になるように蒸留水で希釈・調整した。High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) を用いて、逆転写を行い、cDNA を得た。cDNA に、ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP)、各 Assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) を加え、droplet generator にて droplet を作製し、サーマルサイクラー (GeneAmp, Astec Co., Ltd., Fukuoka, Japan) にて polymerase chain reaction (PCR) を行った。Droplet digital PCR システム (QX200™ Droplet Digital™ PCR system, Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて ENaC  $\alpha$  subunit mRNA (SCNN1a) 量を測定した。内部標準として TATA-binding protein (TBP) を使用し、SCNN1a/TBP を計算した。

### 2. 4 統計検定

データは、mean  $\pm$  standard deviation 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

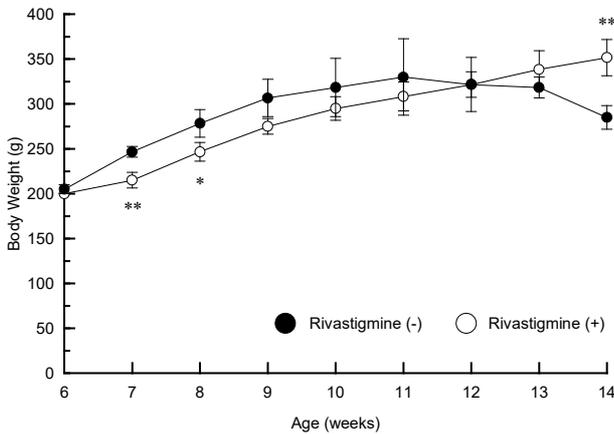
#### 3. 1 Rivastigmine 投与による Dahl 食塩感受性高血圧ラットの血圧上昇抑制効果および生存率改善効果の検討

高食塩食負荷後の体重の変化を **Fig.1** に示す。Rivastigmine 投与群では、負荷後 1 週間目(7 weeks,  $P<0.01$ ), 2 週間目(8 weeks,  $P<0.05$ )の体重が、対照群に比べ有意に低かった。一方で、負荷後 8 週間目(14 weeks,  $P<0.01$ )の体重は、Rivastigmine 投与群で有意に高かった。

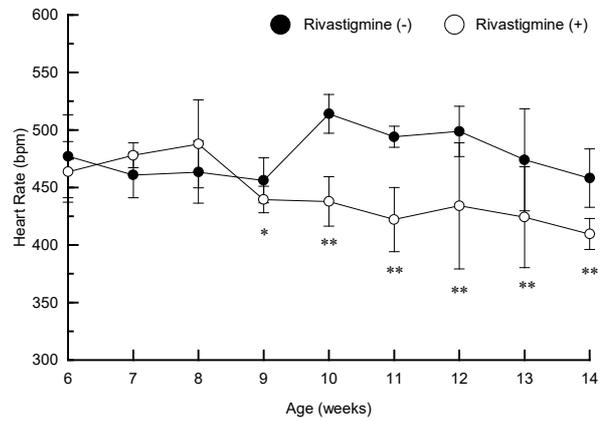
高食塩食負荷後の心拍数・収縮期血圧の変化を、それぞれ **Fig. 2**, **Fig. 3** に示す。Rivastigmine 投与群では、心拍数は 3 週間目以降有意に低下していた(9 weeks,

$P<0.05$ ; 10-14 weeks,  $P<0.01$  for each)。また、Rivastigmine 投与群では収縮期血圧が、負荷後 1 週間目(7 weeks,  $P<0.01$ )と負荷後 3~6 週間目(9 weeks,  $P<0.05$ ; 10-12 weeks,  $P<0.01$  for each)で有意に低下していた。対照群では、収縮期血圧は、負荷後 6 週間目(12 weeks)をピークに、その後、低下したのに対して、Rivastigmine 投与群では、負荷後 8 週間目(14 weeks)まで緩やかに上昇した。

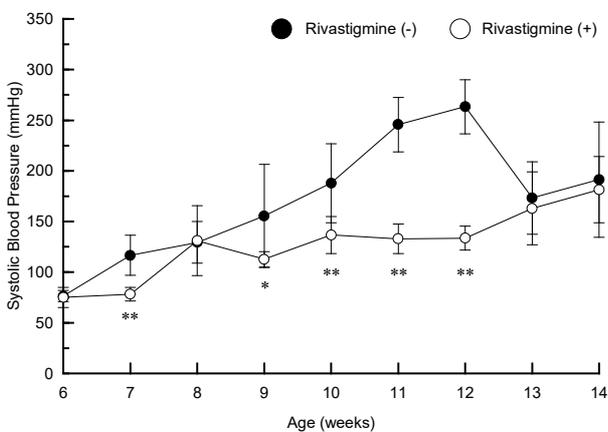
負荷後 8 週間目(14 weeks)までの生存率(Kaplan Meier 曲線)を、**Fig. 4** に示す。対照群においては、観察期間中に 3 匹が死亡した(49, 53, 55 日目)。Log-rank test では、Rivastigmine 投与群において生存率が改善する傾向にあった( $P=0.065$ )。



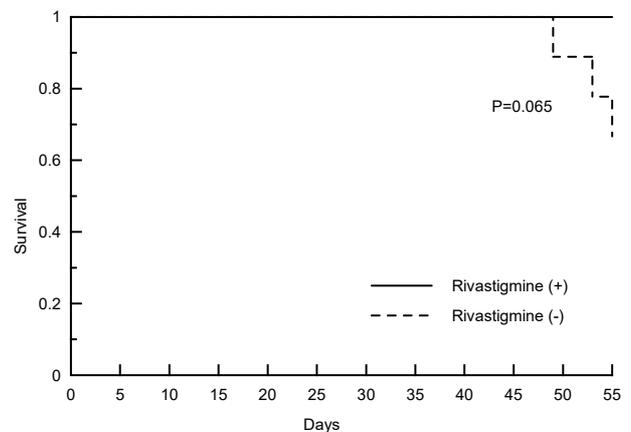
**Fig. 1.** Changes in body weight after high-salt diet. \*\*,  $P<0.01$ ; \*,  $P<0.05$



**Fig. 2.** Changes in heart rate after high-salt diet. \*\*,  $P<0.01$ ; \*,  $P<0.05$



**Fig. 3.** Changes in systolic blood pressure after high-salt diet. \*\*,  $P<0.01$ ; \*,  $P<0.05$



**Fig. 4.** Kaplan-Meier curve after high salt diet

### 3. 2 Rivastigmine 投与による Dahl 食塩感受性高血圧ラットでの腎皮質上皮性 Na<sup>+</sup>チャンネル mRNA 発現の検討および病理組織学的検討

高食塩食負荷後 8~9 週間目 (14~15 weeks) の麻酔下での平均血圧は、対照群と Rivastigmine 投与群で有意差を認めなかった ( $127.6 \pm 40.9$  vs.  $149.8 \pm 30.0$  mmHg,  $P=0.28$ )。

Droplet digital PCR 法で測定された ENaC  $\alpha$  subunit mRNA 発現量 (SCNN1a/TBP) は、対照群と Rivastigmine 投与群で有意差を認めなかった (SCNN1a/TBP:  $2.77 \pm 1.14$  vs.  $2.74 \pm 0.59$ ,  $P=0.97$ ) (Fig. 5)。

対照群の PAS 染色を Fig. 6a に示す。対照群ラットの糸球体の一部には硬化像を認めた。Rivastigmine 投与群の PAS 染色を Fig. 6b に示す。Rivastigmine 投与群においては、対照群と比べて糸球体硬化は少なかった。

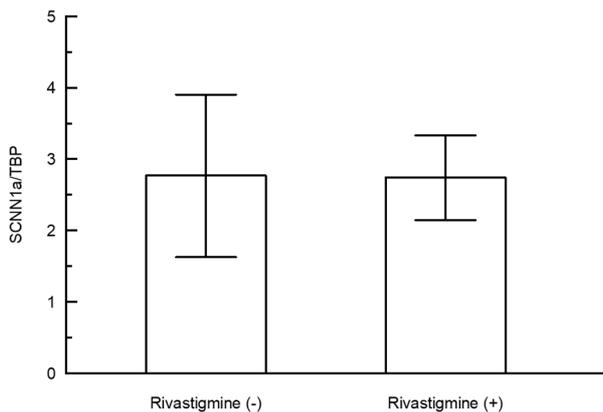


Fig. 5. The expression of ENaC  $\alpha$  subunit mRNA (SCNN1a/TBP)

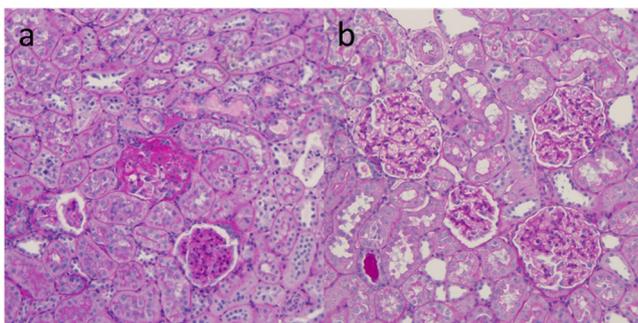


Fig. 6. The Periodic Acid-Schiff (PAS) staining of renal cortex. a, control rat; b, rivastigmine-treated rat

### 4. 考察

本研究において、ACh 分解酵素阻害薬である Rivastigmine の投与が、高食塩食負荷時の Dahl 食塩感受性高血圧ラットの血圧上昇を抑制し、生存率を改善する傾向にあることが明らかとなった。また、Rivastigmine が糸球体硬化などの腎病変の進行を抑制し、腎保護作用を発揮する可能性があることが示された。一方で、Rivastigmine の降圧メカニズムについては、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

#### 4. 1 Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける Rivastigmine の降圧効果

Rivastigmine 投与は、高食塩食負荷後 1 週間目、3~6 週間目の収縮期血圧を、対照群に比して有意に低下させた (Fig. 3)。一方で、負荷後 7, 8 週間目の収縮期血圧および 9 週間目にカテーテルにて測定した平均血圧は有意差を認めなかった。これは対照群のラットが心不全を発症し、塩分の摂取量が低下したことが原因と考えられる。対照群においては、高食塩食負荷 5 週間目を境に、体重が増加から減少に転じており (Fig. 1)、このことから食事からの塩分摂取量の低下していることが推察される。したがって、対照群における高食塩食負荷後 7, 8 週間目の血圧の低下は、ラットの状態の改善を意味するのではなく、むしろ心不全の増悪とそれに伴う衰弱が原因であると考えられる。

Rivastigmine 投与群においては、負荷開始が 8 週間を経過しても収縮期血圧の上昇が続いており、Rivastigmine 投与下においても病状が徐々に進行していくことが示唆されている。しかしながら、Rivastigmine 投与群では、体重の減少が見られないことから、心不全は発症してはいないと推察される。Rivastigmine が病状の進行をどの程度、抑制できるかについては、さらに長期間の追跡調査が必要であると考えられる。

#### 4. 2 Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける Rivastigmine の生存率改善効果

本研究では Rivastigmine 投与群において、負荷開始後 8 週間目の生存率が改善する傾向にあったものの ( $P=0.065$ )、統計的に有意な改善とは言えなかった。Rivastigmine 投与群において観察期間中に死亡した例はなかったが、対照群では 3 匹が観察期間中に死亡した。死亡した 3 匹は、49, 53, 55 日目と観察期間の終盤に死亡

していることから、より長期の観察期間を設定すれば、有意に生存率が改善される可能性がある。

#### 4.3 Dahl 食塩感受性高血圧ラットにおける Rivastigmine の ENaC mRNA 発現への影響

Dahl 食塩感受性ラットにおいては、高食塩食負荷により腎での ENaC mRNA が過剰発現していることがすでに知られている。一方で、我々の先行研究では、ENaC を介した Na<sup>+</sup>の細胞内への取り込みが、腎皮質での ACh 分泌に重要な役割を担っていることが分かっている(文献2)。また、高食塩食負荷をした Dahl 食塩感受性ラットにおいては、腎皮質での ACh 含量が低下することがすでに分かっている(ソルト・サイエンス研究財団第 28 回助成研究発表会にて報告)。

Aoiらの研究では、Flavonoid が ENaC  $\alpha$  subunit mRNA の過剰発現を抑制し、降圧効果を発揮することが報告されており(文献3)、本研究でも、Rivastigmine を投与することで、腎皮質での ACh 含量を増加させることにより、ENaC  $\alpha$  subunit mRNA の過剰発現を抑制できるのではないかと考え、ENaC  $\alpha$  subunit mRNA の測定を行った。しかしながら、本研究においては、Rivastigmine 投与群と対照群では、ENaC  $\alpha$  subunit mRNA の発現量に有意差を認めなかった。

この原因として、ENaC の subunit 間の発現量の差異が考えられる。Aoi らの報告では、Dahl 食塩感受性ラットに対して高食塩食を負荷した場合、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  subunit すべての mRNA 発現量が増加するとしている一方で(文献4)、Kakizoe らは、Dahl 食塩感受性ラットに対して高食塩食を負荷した場合、ENaC  $\beta$  および  $\gamma$  subunit の mRNA 発現量とタンパク量のみが上昇し、ENaC  $\alpha$  subunit の mRNA 発現量とタンパク量は変化しなかったことを報告している(文献5)。そのため、今後、Rivastigmine が、ENaC  $\beta$  および  $\gamma$  subunit の mRNA 発現量に及ぼす影響についても検討を加えていく必要があると考えられた。また、ENaC subunit 間の mRNA 発現の差異が、病態にどのような影響を及ぼすかについては分かっておらず、さらに詳しく検討する必要があると考えられた。

#### 4.4 まとめ

本研究においては、Dahl 食塩感受性高血圧ラットに Rivastigmine を投与することで、腎保護作用を発揮し、高食塩食負荷時の血圧上昇を抑制することで、生存率を改

善する可能性があることが示唆された。一方で、そのメカニズムの詳細は不明であり、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

#### 5. 今後の課題

本研究では Rivastigmine 投与が、対照群と比して Dahl 食塩感受性高血圧ラットの生存率を改善する傾向にあることが明らかになったが、8 週間の観察期間中に Rivastigmine 投与群での死亡例はなかったため、Rivastigmine がどの程度の期間に渡って、生存率を改善するのかは不明であり、今後さらなる長期間の検討が必要である。

また、Rivastigmine がなぜ降圧メカニズムを発揮し、生存率を改善するのかは、本研究ではその詳細を明らかに出来なかった。本研究では、ENaC の関与を疑い、ENaC mRNA 発現量の測定を行ったものの、対照群と Rivastigmine 投与群の間で有意差を認めなかった。したがって、ENaC を介したメカニズム以外にも目を向けたより幅広い検討が今後、必要であると考えられる。

#### 6. 文献

- 1) Morgan DA, DiBona GF, Mark AL. Effects of interstrain renal transplantation on NaCl-induced hypertension in Dahl rats. *Hypertension*. 15:436-42, 1990.
- 2) Shimizu S, Akiyama T, Kawada T, Sata Y, Turner MJ, Fukumitsu M, Yamamoto H, Kamiya A, Shishido T, Sugimachi M. Sodium ion transport participates in non-neuronal acetylcholine release in the renal cortex of anesthetized rabbits. *J Physiol Sci*. 67:587-593, 2017.
- 3) Aoi W, Niisato N, Miyazaki H, Marunaka Y. Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 315:892-6, 2004.
- 4) 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.* 31:1288-91, 2007.

- 5) Kakizoe Y, Kitamura K, Ko T, Wakida N, Maekawa A, Miyoshi T, Shiraishi N, Adachi M, Zhang Z,

Masilamani S, Tomita K. Aberrant ENaC activation in Dahl salt-sensitive rats. *J Hypertens.* 27:1679-89, 2009.

## Depressor Effect of an Intervention in Renal Endogenous Acetylcholine Release on Salt-Sensitive Hypertension

Shuji Shimizu, Tsuyoshi Akiyama, Toru Kawada, Toshiaki Shishido, Satoru Yamazaki

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 rivastigmine, may suppress an elevation of blood pressure and improve the mortality in salt-sensitive hypertension through ACh-induced renal protective effects.

**Purpose:** To investigate the effects of rivastigmine on arterial pressure and mortality in 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. Systolic blood pressure was measured every week for 8 weeks by a tail-cuff method. Eight to nine weeks later, these rats were anesthetized with  $\alpha$ -chloralose and urethane and the left kidney was extracted. The expression of epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC)  $\alpha$ -subunit mRNA (SCNN1a) in the renal cortex was measured using a droplet digital PCR. Histological examination with Periodic Acid Schiff's (PAS) staining was also performed.

**Results:** There were no deaths in the rivastigmine treated group, but 3 rats died in the control group (P=0.065 by a log-rank test). At first and 3<sup>rd</sup> to 6<sup>th</sup> week, systolic blood pressure was significantly lower in the rivastigmine-treated group. There were no significant differences in the expression of SCNN1a between the control and rivastigmine-treated groups. Histological examination demonstrated severer glomerular sclerosis in the control group.

**Conclusions:** An ACh esterase inhibitor, rivastigmine, significantly suppresses the elevation of blood pressure and tends to improve the mortality of Dahl salt-sensitive rats through renal protective effects. However, further investigations are needed to clarify the detailed mechanism.