

食塩感受性高血圧に対する腎交感神経を標的とした新たな治療戦略の確立

山本 英一郎

熊本大学附属病院循環器内科

概要 背景・目的: 食塩感受性高血圧患者での血圧上昇メカニズムはいまだ解明されていないが、交感神経中枢の神経活動亢進が血圧上昇や続発する臓器障害にも深く関与している可能性が示唆されている。不全心や腎不全においても交感神経が活性化されることがよく知られ、我々も以前より食塩感受性高血圧と“心腎連関”のモデル動物:ダール食塩感受性ラット(DSラット)を用いてその合併心血管病の分子機序を基礎的に検討してきた。本研究では、DSラットなどの動物モデルに腎交感神経除神経(RDN)を行いその役割を検討する基礎研究と、腎交感神経アブレーションを施行した治療抵抗性高血圧患者に対する心拡張能などへの効果を検討する臨床研究を行う。

方法: (研究1) 食塩過剰負荷 DSラットに高食塩を負荷し、高血圧性心腎連関および心拡張不全を惹起させ、同モデルにRDNを行いその効果を生化学的に検討した。(研究2) アンジオテンシンII (AngII) 注入およびeNOS遺伝子欠損マウスに腎交感神経切除術を行いその効果を検討した。(研究3) 当科で実施中の治療抵抗性高血圧患者に対する腎デナベーション術により、その後の心拡張機能や腎機能、血管内皮機能障害が改善するか前向きに臨床的に検討した。

結果: (研究1) 高食塩負荷した DSラットでは血管における酸化ストレス(ROS)が増加し、血管内皮機能障害を介して心拡張不全が惹起されていたが、RDNにより血管におけるROS産生が抑制され、血管内皮機能が改善した。さらに、左室におけるROSも低下し、左室肥大も有意に改善した。これにより、RDNによる直接的な心拡張不全の改善効果、さらには心不全死を抑制する効果も期待される。(研究2) AngII注入マウスは non-dipper 型の高血圧を呈し、臓器における ROS 増加と臓器障害をきたすが、RDN はこれらを抑制することがわかった。(研究3) RDN の対象となった治療抵抗性高血圧患者では Endo-PAT2000 による末梢血管内皮機能(RHI 値)が有意に低下しており、その RHI 値低下は RDN 治療への高反応群(3ヶ月後に収縮期血圧 10 mmHg 以上低下)の選別に有用であると考えられた。さらに RDN によりその RHI 値は改善し、心エコーにて測定した左室拡張機能の指標である E/e', 心不全のマーカーである BNP も有意に改善することが明らかになった。

結論: 食塩感受性高血圧における血管内皮機能障害は様々な臓器障害の伸展に関与している。RDN による腎交感神経中枢の神経活動抑制はその血管内皮機能異常を抑制し、それによる重要な心合併症である心拡張不全への新たな治療標的になりうる可能性が示唆された。

1. 研究目的

食塩感受性高血圧が脳卒中や心血管病などの合併症リスクになることは数々の疫学研究から明らかである。従って、食塩感受性の強い日本人にとって、食塩感受性高血圧の病態や、その合併症であり本邦でも昨今の社会問題である慢性腎臓病(CKD)や心拡張不全の発症機序を解明することは極めて重要な課題である。

食塩感受性高血圧患者での食塩摂取による血圧上昇

のメカニズムはいまだ完全には解明されていないが、交感神経中枢(延髄吻側腹外側領域;RVLM)の神経活動の亢進が相対的に末梢交感神経活動をも亢進させ、血圧上昇や続発する臓器障害にも深く関与している可能性が数々の報告により示唆されている。実際、CKD 患者では下腿筋肉における交感神経活動(MSNA)が亢進しており(JASN, 2004)、不全心においても交感神経が活性化されることがよく知られている。我々も以前より食塩感受性高血

庄のモデル動物:ダール食塩感受性ラット(DS ラット)を用いてその合併心血管病の分子機序を基礎的に検討してきたが、同モデルでも腎臓での末梢交感神経活性が亢進し、CKD の発症やこれに続発する心拡張不全といったいわゆる“心腎連関”の進展に関与することが明らかになっている(図1)。

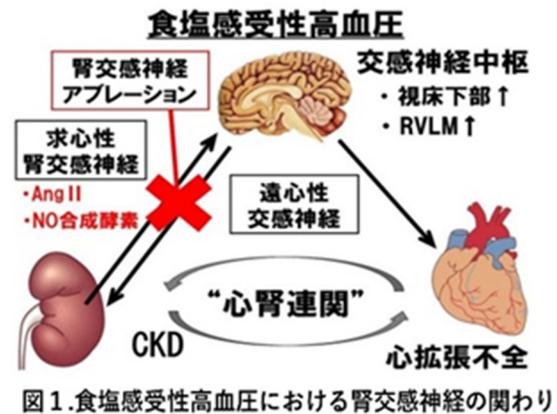
そこで本研究では、食塩感受性高血圧が中枢・末梢交感神経の活性化を介して特異的に CKD や心拡張不全に関与するメカニズムを、DS ラットや内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS) 遺伝子欠損マウスに腎交感神経除神経(アブレーション)を行い腎交感神経の役割を検討する基礎研究と、腎交感神経アブレーションの治療抵抗性高血圧患者に対する実際の効果や、心拡張不全患者における血中ナトリウム(Na)濃度の意義を検討する臨床研究を行う。これらの研究により、食塩感受性高血圧や合併する心血管病における腎交感神経の役割の分子機序を解明し、さらに腎デナベーションの効果を検討することにより新たな食塩感受性高血圧に対する治療戦略の確立に寄与することを目的とする。

2. 研究方法

昨今、治療抵抗性高血圧に対する新たな治療として、アブレーションカテーテルで腎動脈周囲の腎交感神経を焼灼する「腎交感神経アブレーション」が注目されている。動物実験では「腎交感神経除神経」は以前より行われており、高血圧への腎求心性・遠心性交感神経の関与の機序が検討されてきたが、持続的交感神経活性化が発症・維持に関与する CKD や慢性心不全といった病態への腎交感神経アブレーションの効果ならびに機序に関しては基礎研究を含め報告が少ないのが現状である。そこで、本研究(1),(2)では、とくに報告が皆無である食塩感受性高血圧およびその合併病態に対する腎交感除神経の効果、病態モデル動物を用いて基礎的に検討する。

(1)DS ラットの食塩感受性臓器障害における腎交感神経系の役割についての検討

CKD では糸球体濾過量(GFR)の低下から食塩感受性が亢進することが知られ、DS ラットでも食塩負荷早期よりCKD を発症し食塩感受性がさらに増悪することから食塩感受性亢進へのCKDの関与が示唆される。さらに前述のようにCKD患者ではMSNAが亢進、CKDモデル動物で



は腎求心性交感神経が亢進しており(Kidney Int, 1997),つまり、食塩感受性高血圧でのCKD進展に腎交感神経活性化が関与している可能性が高いと考えられる。

そこで我々は、本研究(1)でDSラットに腎交感神経切除術を行いその効果を検討する。DSラットは食塩負荷により速やかに高血圧を発症し、やがてCKDから心拡張不全へと至る食塩高感受性の“心腎連関”モデル動物といえるが、同モデル動物に食塩負荷と同時に両側の腎交感神経切除術を施行し、蛋白尿をともなうCKDを発症する負荷後5-6週間後と、続発する心拡張不全をきたす10-11週間後に解剖し、高血圧や食塩感受性に対する影響とともに、それぞれの病期におけるCKDや心拡張不全に対する効果を生化学的に検討する。

(2)eNOS 遺伝子欠損マウスに対する腎交感除神経の効果についての検討

前述のように、CKDラット腎ではNOSが減少し交感神経系の活性化を介しCKDのさらなる増悪をきたす悪循環を形成しているが、我々は以前、eNOS遺伝子の欠損(KO)マウスが高血圧を呈し、腎糸球体の硬化や炎症細胞浸潤を主体とした蛋白尿を伴ったCKDをきたすのみならず、心拡張障害の主因となる心臓への炎症細胞浸潤や間質の線維化を基盤とした心肥大を呈することを報告している。

本研究(2)では、とくに心血管、腎臓でのNO産生に重要な役割を果たし、予備実験でもCKDや心肥大・心拡張不全への関与が示唆されるNOS isoformであるeNOSのKOマウスを用い検討をおこなう。具体的には、野生型(WT)マウスとeNOS KOマウスに腎除神経術を行い、それぞれのマウスでの心肥大やCKDに対する効果を偽手

術 (Sham) 群と比較する。また、摘出した心・腎組織を生化学的・病理学的に解析し、これらの分子機序を明らかにする。これまでの報告で、CKD における交感神経亢進にアンジオテンシンII(AngII)が関与することが明らかになっている (Hypertension, 2002) が、我々はさらに上記の WT マウス、eNOS KO マウスに対して AngII を浸透圧ポンプで持続投与し、同時に腎交感神経除神経術をおこない、AngII による交感神経活動の活性化に eNOS が関与するか直接的に検証する。すでに我々の予備実験で、AngII を持続投与した WT マウスにおいて腎交感神経除神経を行い、AngII による心筋肥大と間質の線維化を基盤とした心肥大と、腎系球体硬化や尿アルブミンを随伴する CKD が抑制されることが明らかとなっている。本研究 (2) では、AngII 持続投与 eNOS KO マウスに対しても腎交感神経除神経が同様の効果を発揮するか検討し、高血圧性の心・腎リモデリングでの腎交感神経活性における AngII と eNOS 関与の分子メカニズムの詳細を明らかにしたい。

本研究 (1), (2) により、食塩感受性高血圧に特異的に合併する CKD や心拡張不全における腎交感神経の役割や分子機序を AngII や eNOS を中心に明らかにし、これらに対する新たな治療法の確立に寄与したい。

(3) 腎デナベーション患者における心拡張能および CKD への効果

近年、心不全症例の約半分は左室拡張機能のみが障害される心拡張不全によることが明らかとなり予後不良なことから本邦でも社会問題となっている。心拡張不全は心収縮不全と異なる病態とされているが (Hypertension, 2005)、その発症機序や治療法は心収縮不全と違い全く明確になっていない。我々の DS ラットを用いた基礎研究はじめ数々の基礎検討では、食塩感受性高血圧が交感神経活性化を介して CKD や心拡張不全発症に特異的に関与している可能性が示唆されるため、本研究 (3) では実際のヒト病態でこれらを検討する臨床研究を行う。

前述のように、当科では現在、治療抵抗性高血圧患者に対して両側腎動脈をカテーテルにて焼灼する腎デナベーション術を施行している。治療抵抗性高血圧患者は多くの場合、CKD や左室肥大を合併し心拡張機能が低下しているが、腎デナベーションによりその後の心拡張機能や腎機能が改善するか前向きに検討を行う。

具体的には、腎デナベーション施行半年後に、心エコ

ー上の E/e' や DcT など拡張能の指標とされるパラメーターで心拡張機能を評価、さらに末梢血管内皮機能を Endo-PAT2000 で測定し、腎機能を GFR や尿中アルブミン量、血中シスタチン C などの腎障害の特異的なマーカーで評価し治療前と比較検討する。

3. 研究結果

(1) DS ラットの食塩感受性臓器障害における腎交感神経系の役割についての検討

我々や他のグループにより、DS ラットに 7 週齢から高食塩食を負荷すると、速やかに食塩感受性の高血圧をきたし、12 週齢で高血圧性心肥大を呈し、その後 16 週齢には著明な心拡張不全をきたすことが明らかにされている。そのため今回の実験では、7 週齢から高食塩食を負荷した DS ラットに同時に両側の腎交感神経切除術を施行し、血管内皮機能障害や CKD、さらには続発する心拡張不全や著明な左室肥大に対する効果を検討した。

まず、DS ラットは高濃度食塩負荷にて直ちに高血圧を呈するが、同モデルの高血圧を腎交感神経切除術は有意に低下させることがわかった。降圧そのものによる臓器保護効果の可能性を鑑別するために血管拡張作用による降圧効果のみをもつ薬剤である Hydralazine (Hyd) 群を設定し、同程度に降圧した同群と腎交感神経切除術 (RDN) 群とを比較検討した。

まず、アセチルコリン (ACh) によるラット頸動脈の血管内皮依存性弛緩反応を測定すると、DS ラットで有意に低下した血管内皮依存性弛緩反応は、Hyd 群と比較しても RDN 群で有意に改善していた。また、頸動脈を酸化ストレスの 1 つである superoxide のプローブである dihydroetidium (DHE) で染色すると、やはり DS ラットで亢進していた superoxide 産生は、RDN 群で有意に抑制されていた。さらに、解剖摘出した左室を病理学的に検討すると、マクロファージ細胞をあらわす ED-1 染色で評価した左室への炎症細胞浸潤、シリウスレッド染色で評価した左室間質および冠動脈周囲の線維化の定量はいずれも Hyd 群と比較しても RDN 群で有意に改善していた。

つまり、RDN による腎交感神経活性化の抑制は降圧とは独立して血管内皮保護効果と心保護効果を認めることが明らかになった。

(2) eNOS 遺伝子欠損マウスに対する腎交感神経の効果についての検討

まず前述のように、AngIIを浸透圧ポンプで持続投与し、同時に腎交感神経除神経術をおこない、その効果を検討した。AngIIの薬理作用は中枢および末梢での交感神経活性を亢進させることが¹⁾、さらに交感神経の亢進は尿管のNaCl共輸送体活性の抑制遺伝子でありWNK4を低下させ、食塩再吸収が増加することにより、交感神経の亢進が直接的に食塩感受性を増大させると考えられている²⁾。

AngII注入マウスは有意な血圧の上昇と左室重量増加にて測定される左室肥大が惹起され、本研究でも前述のように食塩再吸収の増加によると思われる尿中Na濃度の低下を認めた。同マウスに腎交感神経除神経術にて交感神経を抑制すると、血圧上昇と左室肥大は有意に抑制され、食塩再吸収の増加の抑制により尿中Na濃度は正常化した。以上から、レニン・アンジオテンシン系は腎交感神経の活性化を介して食塩再吸収の増加を促し、食塩感受性亢進を直接的に惹起することが示唆された。

また、我々は以前、eNOS遺伝子(KO)欠損マウスが高血圧を呈し、さらに腎糸球体の硬化や炎症細胞浸潤を主体としたCKDをきたすことを報告しているが、今回の検討で、eNOS KOマウスの高血圧のcircadianリズムが食塩感受性高血圧患者に特徴的なnon-dipper型であることを明らかにした。つまり、NOの調節障害・機能不全がnon-dipper型高血圧(食塩感受性高血圧)に強く関与することが示唆される。

今後は、eNOS KOマウスに高食塩負荷やAngII注入をおこない、その血圧変動をテレメトリ自動血圧計にて正確に測定するとともに、諸臓器におけるeNOS活性の日内変動の有無を比較検討する。これにより、食塩感受性高血圧での血圧日内変動の障害であるnon-dipper型高血圧における末梢臓器でのeNOS活性の重要性やその機序を明らかにできると考えている。

(3) 腎デナベーション患者における心拡張能およびCKDへの効果

前述のように、当科では現在、治療抵抗性高血圧患者に対して両側腎動脈をカテーテルにて焼灼する腎デナベーション術を施行している。治療抵抗性高血圧患者は多くの場合、CKDや左室肥大を合併し心拡張機能が低下しているが、腎デナベーションによりその後の心拡張能や腎機能が改善するか前向きに検討を行っている。また、血管内皮機能検査を生理的血管内皮機能測定装置：Endo-PAT2000を用いて測定し、治療前および治療後に

比較検討した。

当科では現在まで計5名の治療抵抗性高血圧患者に対して腎デナベーション術を施行しているが(高周波アブレーション4名、超音波アブレーション1名)、結果はResponder(降圧効果が ≥ 10 mmHg以上:収縮期血圧)が4名、Non-Responder(降圧効果が < 10 mmHg以下:収縮期血圧)が1名であったが、4名のResponder患者はEndo-PAT2000にて測定した治療前の末梢血管内皮機能が低下(RHI値低値)していた。他のパラメーター(baPWV; 脈波伝播速度など)においては、とくにResponder, Non-Responder間で有意差を認めなかった。さらに、その低下したRHI値は腎デナベーション術治療後に改善する傾向であった。つまり、基礎研究(1)でしめされたように、臨床研究においても腎交感神経活性抑制による末梢血管内皮機能改善効果が示唆されるとともに、現在腎デナベーション治療における最大の問題点である“Responder/Non-Responder群の選別”において、Endo-PAT2000による末梢血管内皮機能の測定が有用である可能性が考えられた。

さらに、我々はDSラットを用いた基礎研究で、心拡張不全モデルでは有意に末梢の血管内皮機能が有意に障害されており、それが直接的にCKDや左室の拡張機能障害に関与することを明らかにしており(*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007, *Hypertension* 2007)、臨床研究でもEndo-PAT2000にて測定したRHI値が心拡張不全患者において非心不全患者よりも有意に低いことを以前報告している(図2, *J Am Coll Cardiol.* 2014)。

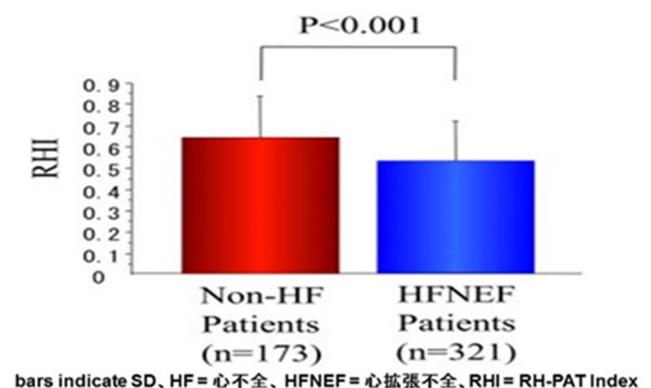


図2：非心不全患者と心拡張不全患者のRHI値の比較

本研究でも、対象の治療抵抗性高血圧患者の心拡張機能を心エコー上の E/e' で評価し、腎デナベーション術前後で比較検討したが、結果5名中4名では明らかな E/e' の低下がみられ、腎デナベーション術による心拡張能の改善が示唆された。

4. 考察ならびに今後の課題

食塩感受性高血圧と、これに合併しやすいとされる心拡張不全の詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究(1)では、食塩感受性高血圧のモデル動物であり高濃度食塩負荷により心拡張不全を呈する DS ラットを用いて腎交感神経切除術をおこない検討をおこない、その降圧をこえた血管内皮保護効果を証明した。

我々は以前の DS ラットを用いた検討で、その血管内皮機能障害に対する介入が内皮機能改善を介して直接的に CKD や心拡張不全の改善につながることを報告している。本研究でも同様に腎交感神経切除術による交感神経活性化の抑制が直接的に血管内皮機能の改善や血管における酸化ストレスを低減させることが明らかになったことから、これが直接的に CKD や心拡張不全に対する新たな治療になりうる可能性が示唆される。

また今後は、この DS ラットにテレメトリー自動血圧計にて正確に血圧日内変動を評価し、食塩感受性高血圧におおいとされる non-dipper 型血圧リズムに対する腎交感神経の関与を詳細に検討したいと考えている。我々は以前メタボリック症候群のモデルラットに腎交感神経切除術をおこない、腎交感神経切除が腎臓における Na-Cl トランスポーター (NCC) の upregulation を抑制することを明らかにしているが、今後本研究での DS ラットにおいても同様に腎臓における NCC や前出の WNK4 や AT1 受容体などの発現も生化学的に検討したいと思っている。また、腎交感神経には遠心性経路と求心性経路が存在するが、それぞれ臓器障害における役割は異なっている。基礎的に行う腎交感神経切除術はいずれの経路も切除することから、除神経術による効果がみられた部分とみられなかった部分を明確化することによって、腎神経における遠心路・求心路の食塩感受性高血圧における役割の違いを明らかにできると考えている。具体的には、脂肪量やインスリン抵抗性など遠心路の関与がより深い骨格筋における変化も検討したいと考えている。

また、研究(2)ではマウスを用いた検討をおこない、まず食塩感受性を助長すると言われる AngII をマウスに注入して、同モデルに腎除神経をおこなった。結果、このモデルでは増悪した食塩再吸収を抑制して、食塩感受性と血圧の改善をもたらすことがわかった。また、これにより左室肥大も改善することがわかり、左室肥大は心拡張機能障害のベースに存在することが多いことから、このモデルにおいても食塩感受性高血圧と合併する心拡張不全への腎交感神経に対する介入が新たな治療法になる可能性が示唆された。今後はこの抑制効果の分子機序における NO の関与を詳細に検討するために、eNOS の欠損マウスを用いて食塩負荷や AngII 投与をおこない、詳細な分子機序を明らかにしたいと思っている。

最後に、実際の臨床において治療抵抗性高血圧患者に腎デナベーション術をおこない、その治療効果を検討した。結果前述のように RHI 値(末梢血管内皮機能)低値が腎デナベーション術の治療 Responder 群の層別化において有用である可能性が示された。同時に、その低下した RHI 値は腎デナベーション術治療後に改善する傾向があり、我々の DS ラットの結果と同様の傾向を認めた。また基礎研究(1)でしめされたように DS ラットの検討と同様に、腎交感神経活性抑制による心拡張不全への効果もある程度認めるようである。

いままでの臨床研究では、我々の今回の基礎研究での結果と相反し、腎デナベーション後の圧-Na 利尿曲線は傾きを変えずに左方偏位することが報告されており、維持透析中の末期腎不全患者でもデナベーション治療の降圧効果は認めることから、降圧に対する Na 利尿の関与は小さいことが推察されている³⁾。むしろ臨床的には交感神経による食塩感受性高血圧発症には Na 貯留より腎血管抵抗の上昇が寄与している可能性が示唆されており⁴⁾、その意味では腎デナベーション治療による心拡張機能や高血圧改善効果は、より血管内皮機能の改善を介している可能性が高いとも考えられる。

心拡張不全患者への効果的な治療法が確立されていない現状があり、心拡張不全はしばしば急性増悪し再入院を余儀なくされるため、良好な予後を与えるために至適な治療法を確立することが重要である。より効果的・实际的な心拡張不全治療のみならず、その上流にある食塩感受性高血圧の改善なども期待できる血管内皮機能障害をタ

ターゲットとした治療戦略が新たな治療法の確立に寄与できる可能性が考えられる。

5. 謝辞

本研究遂行におきまして、研究費の助成を頂き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いたします。

6. 参考文献

1) Averill DB, Diz DI, et al. Angiotensin peptides and baroreflex control of sympathetic outflow: pathways

and mechanisms of the medulla oblongata. *Brain Res Bull.* 51:119-128, 2000.

2) Mu S, Shimosawa T, Ogura S, et al. Epigenetic modulation of the renal β -adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension. *Nat Med.* 2011;17:573-580.

3) Schlaich MP, Bart B, Hering D, et al. Feasibility of catheter-based renal nerve ablation and effects on sympathetic nerve activity and blood pressure in patients with end-stage renal disease. *Int J Cardiol.* 168:2214-2220, 2013.

4) 木村玄次郎: 腎交感神経アブレーションの降圧効果 *血圧* 20:1021-1026, 2013.

The Novel Therapeutic Strategy for Salt-Sensitive Hypertension Via Inhibition of Renal Sympathetic Nerve Activation

Eiichiro Yamamoto

Department of Cardiovascular Medicine, Kumamoto University Hospital

Summary

Objectives: The mechanism of high-salt sensitive hypertension and its induced cardiovascular injury are still unknown. However, renal sympathetic nerve activation was reported to be closely involved in various cardiovascular injuries. Hence, the present study was undertaken to examine whether long-term renal denervation (RDN) is involved in salt-sensitive hypertension and salt-induced cardiovascular injury (chronic kidney disease: CKD and cardiac diastolic heart failure: DHF).

Methods: (Experiment I) High-salt (HS) diet DS rats were divided into RDN group and a sham operation group to examine the effect of long-term RDN on cardiovascular injury. (Experiment II) Angiotensin II (Ang-II) infused Wild type (WT) and eNOS^{-/-} mice were compared on blood pressure rhythm and cardio-renal injuries. (Experiment III) We evaluated the changes of cardiac function by echocardiography, and noninvasively assesses peripheral endothelial function as the reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry index (RHI) in treatment-resistant hypertensive patients clinically treated with RDN therapies.

Results: (Experiment I) HS-diet DS rats exhibited severe hypertension, left ventricular (LV) hypertrophy and endothelial dysfunction, and RDN treatments significantly ameliorated them compared to hydralazine group despite of same degree of hypotensive effects in HS-diet DS rats. Furthermore, these beneficial effects were associated with the attenuation of vascular reactive oxygen species by dihydroethidium staining and of LV interstitial and peri-coronary fibrosis by Sirius-Red staining.

(Experiment II) Blood pressure of eNOS^{-/-} mice was significantly higher than that of WT, and eNOS^{-/-} mice exhibited a nondipper-type hypertension. Moreover, cardiovascular injuries in Ang-II-infused WT mice treated with RDN were significantly improved compared to sham operated Ang-II-infused WT mice.

(Experiment III) RHIs in RDN responder group in treatment-resistant hypertensive patients were lower than that in RDN non-responder patients, and were improved by RDN treatment, indicating the feasibility of RHI measurements in selecting therapeutic responder for RDN. Furthermore, cardiac diastolic function estimated by E/e' in echocardiography was improved by RDN treatments.

Conclusions: These studies suggested that salt sensitive hypertension and salt-sensitive hypertensive cardiovascular injuries are closely associated with renal sympathetic nerve activation, and RDN could be new therapy for salt sensitive hypertension and its induced cardiovascular injuries. Furthermore, clinical RDN therapy also improved endothelial dysfunction and diastolic dysfunction in treatment-resistant hypertensive patients.