

腎尿細管細胞内浸透圧応答転写因子 NFAT5 の 食塩感受性高血圧における意義の検討

泉 裕一郎, 向山 政志

熊本大学大学院生命科学研究部腎臓内科学

概要 本研究は、腎尿細管細胞に発現する浸透圧応答転写因子 Nuclear Factor of Activated T-Cells 5 (NFAT5) の、食塩感受性高血圧における意義を明らかにすることを目的とした。

NFAT5 は、ユビキタスに発現する転写因子であるが、NFAT1-5 のファミリーの中で唯一高浸透圧により活性化されるといったユニークな性質を有する。高浸透圧環境において活性化した NFAT5 は、細胞の保護と生存に関わる遺伝子群を誘導する。そのため、尿濃縮機構のために著明に高い間質浸透圧を有する腎臓においては細胞の生存の上でも、尿濃縮の機能を維持する上でも重要である。私たちは以前、当研究財団の助成を得て、薬剤誘導性尿細管特異的 NFAT5 欠損 (KO) マウスの作製に成功し、NFAT5 KO マウスが多尿と尿中ナトリウム (Na) 排泄の減少、血清 Na 濃度の上昇を呈することを発見している。

近年皮膚組織の NFAT5 の活性化による VEGF-C (vascular endothelial growth factor-C) の発現亢進がリンパ管新生を促進し、食塩感受性高血圧を緩和する機序が明らかとなった。本研究においては、NFAT5 KO マウスを用いて、尿細管 NFAT5 の食塩感受性高血圧における意義と腎組織内 VEGF-C 発現への関与について検討した。尿細管上皮細胞由来の HEK293 細胞に NaCl 負荷による高浸透圧 (500 mOsm/kg \cdot H₂O) 刺激を施したところ、NFAT5 蛋白と VEGF-C mRNA の発現の増加を認めた。次に、野生型 (C57BL/6J) マウスに片腎摘+アルドステロン持続皮下投与+1%NaCl 飲水投与を施したところ、腎組織内 VEGF-C 蛋白の増加を認めた。NFAT5 KO マウスに同様の処置を施したところ、アルドステロン投与一週間ほどで死亡し、実験の完遂に至らなかった。アルドステロンにより著明な高ナトリウム血症と低カリウム血症を生じたことが原因と考えられた。そのため、マウスに通常食または 8%NaCl 含有食 (高塩食) のみを与えたところ、高塩食摂取 WT マウスに比し高塩食摂取 KO マウスで有意に収縮期血圧の上昇を認めた。

以上より、尿細管 NFAT5 の欠損は食塩感受性高血圧を増悪させることが明らかとなった。現在、NFAT5 KO マウスの食塩感受性高血圧の原因となるナトリウム再吸収に関連するトランスポーターの同定と、VEGF-C の発現について検討を進めている。

1. 研究目的

本研究は、腎尿細管細胞に発現する浸透圧応答転写因子 Nuclear Factor of Activated T-Cells 5 (NFAT5) の、食塩感受性高血圧における意義を明らかにすることを目的とした。

NFAT5 は、ユビキタスに発現する転写因子であるが、NFAT1-5 のファミリーの中で唯一高浸透圧により活性化されるユニークな性質を有する。高浸透圧環境において活

性化した NFAT5 は、細胞の保護と生存に関わる遺伝子群を誘導する⁽¹⁾。腎臓は尿の濃縮機構の維持のために、皮質から髄質にかけて NaCl や尿素といった浸透圧物質を間質に蓄積することで浸透圧物質の濃度勾配を形成し、そのため髄質の間質浸透圧は 1,000 mOsm/kgH₂O を超える。そのような著しい高浸透圧環境では NFAT5 が強く発現し、尿細管細胞の生存を可能にしている。また、NFAT5 の腎生理的な役割として、集合尿細管の水チャネル⁽²⁾や

尿素トランスポーター⁽³⁾の発現を誘導し、尿の濃縮能を調節することが示唆されている。NFAT5 によるトランスポーター発現調節は、細胞レベルで考える時、物質輸送を調節することで細胞内外の浸透圧差を緩和し、細胞の生存を容易にする機能でもある。

一方で NFAT5 は、その他の NFAT ファミリーと同様に、活性化の性質は異なるものの免疫系の調節にも関与する^(4, 5)。腫瘍の発生や関節炎、動脈硬化の進展などに関与し、NFAT5 の細胞保護作用を超えた役割が他臓器で示唆されている⁽⁶⁻⁸⁾。しかし腎臓における NFAT5 の疾患病態的な意義はほとんど検討されていない。

近年、食塩の過剰摂取は皮膚の VEGF-C (vascular endothelial growth factor-C) の発現を介してリンパ管新生を促し、リンパ管へナトリウム (Na) を貯留することで、食塩感受性高血圧を緩和する機序が明らかとなった。さらに、VEGF-C の発現誘導は、皮膚の間質の Na 蓄積を刺激とした、マクロファージの NFAT5 の活性化を介していた^(9, 10)。NFAT5 による VEGF-C 調節の存在が明らかとなった興味深い知見である。

申請者らは最近、薬剤誘導性尿細管特異的 NFAT5 欠損 (KO) マウスの作製に成功し、尿細管細胞の NFAT5 の意義について、多面的に検討を始めている。その予備実験において、NFAT5 のノックアウトマウスは多尿を生じる一方で、尿中 Na 排泄の減少と高ナトリウム血症を生じることを見出した。生体への Na の蓄積が疑われ、尿細管細胞の NFAT5 もまた、食塩感受性高血圧の発症抑制に貢献している可能性がある。尿細管 NFAT5 ノックアウトマウスでは、食塩過剰摂取に対する VEGF-C を介した代償機構が働かず、容易に高血圧を生じることが予想される。本研究においては、初めに食塩過剰摂取が腎臓の VEGF-C 発現にどのように影響するか検討した。その後、NFAT5 KO マウスを用いて食塩過剰摂取モデルを作成し、食塩感受性高血圧において腎尿細管の NFAT5 が役割を果たす役割について検討した。

2. 研究方法

2.1 VEGF-C 発現に対するナトリウムの直接作用の検討

NFAT5 は *in vitro* において食塩 (NaCl) 負荷による高浸透圧刺激で発現が増加し、活性化されることが知られて

いる。既報においても、皮膚組織の Na 濃度の上昇が NFAT5 を活性化し、VEGF-C の発現を誘導することが示されている。そこで、NFAT5 の活性化により VEGF-C の発現が増加するかを腎臓由来の細胞株で検討した。腎尿細管上皮細胞由来の HEK293 細胞または NRK52E 細胞に、NaCl 負荷による高浸透圧 (500 mOsm/kg·H₂O) 刺激を 24 時間施し、VEGF-C と NFAT5 の mRNA と蛋白の発現を real time PCR 法とウェスタンブロッティングによって検討した。

2.2 食塩/アルドステロン負荷高血圧モデルマウスにおける、腎組織 VEGF-C の発現の検討

塩分負荷または食塩感受性高血圧における腎組織内 VEGF-C の発現を検討するため、野生型 (C57BL/6J) マウスを用いて以下の実験モデルを作製した。1) 1%NaCl 飲水投与、2) 片腎摘+1%NaCl 飲水投与 3) アルドステロン持続皮下投与+1%NaCl 飲水投与、4) 片腎摘+アルドステロン持続皮下投与+1%NaCl 飲水投与。モデル作製 2 週間後にサクリファイスし、腎臓を採取した。全腎組織内の VEGF-C と NFAT5 の発現をウェスタンブロッティングと real time PCR 法、蛍光免疫染色法を用いて検討した。

2.3 NFAT5KO マウスを用いた 8%食塩含有食餌投与による食塩感受性高血圧モデルの作製

片腎摘+アルドステロン持続皮下投与下の 1%食塩水飲水による塩分負荷モデルでは NFAT5 は 1 週間ほどで NFAT5KO マウスのすべてが死亡した。NFAT5KO マウスが元来呈する多尿が増悪し、高度な脱水と高ナトリウムを生じ、またそれ故に血圧はむしろ低下していたものと推測されたため、片腎摘とアルドステロン投与を行わず、8%食塩含有食餌負荷のみで飼育し高血圧モデルを作製した。血圧測定、尿検査、血液検査を行った。

3. 研究結果

3.1 VEGF-C 発現に対するナトリウムの直接作用の検討

HEK293 細胞において、NaCl 負荷による高浸透圧刺激により NFAT5 蛋白は約 2 倍に増加した。また VEGF-C mRNA は約 3.5 倍に増加し、VEGF-A も 3 倍に増加した (図 1)。NRK52E 細胞においても、NaCl 負荷により VEGF-C が約 2 倍、VEGF-A が約 5 倍に増加した。VEGF-C 蛋白の増加も確認された。

3. 2 食塩/アルドステロン負荷高血圧モデルマウスにおける、腎組織 VEGF-C の発現の検討

各種塩分負荷または食塩感受性高血圧モデルにおいて腎組織内 VEGF-C の発現を検討したところ、3)アルドステロン持続皮下投与+1%NaCl 飲水投与、4) 片腎摘+アルドステロン持続皮下投与+1%NaCl 飲水投与の2つのモデルにおいて VEGF-C の発現の増加が認められた(図 2)。4) 片腎摘+アルドステロン持続皮下投与+1%NaCl 飲水投与モデルにおいては sham 手術+vehicle + tap water 飲水投与群に比し収縮期血圧が有意に上昇することを確認した。しかし、同モデルにおいて全腎組織

内の NFAT5 mRNA の発現は増加していなかった。腎組織における NFAT5 による VEGF-C の発現調節機構の有無を検討するため、同様の高血圧モデルを NFAT5 KO マウスで作製したところ、アルドステロン持続皮下投与開始一週間で全ての KO マウスが死亡し、実験の完遂に至らなかった。KO マウスは basal condition で多尿と高ナトリウム血症を呈するが確認されているが、アルドステロンの投与はさらに著明な多尿を呈し、おそらく致命的な高ナトリウム血症または低カリウム血症を呈した事が原因と推測された。そこで KO マウスにおいて作製可能な塩分負荷高血圧モデルマウスの作製をさらに進めた。

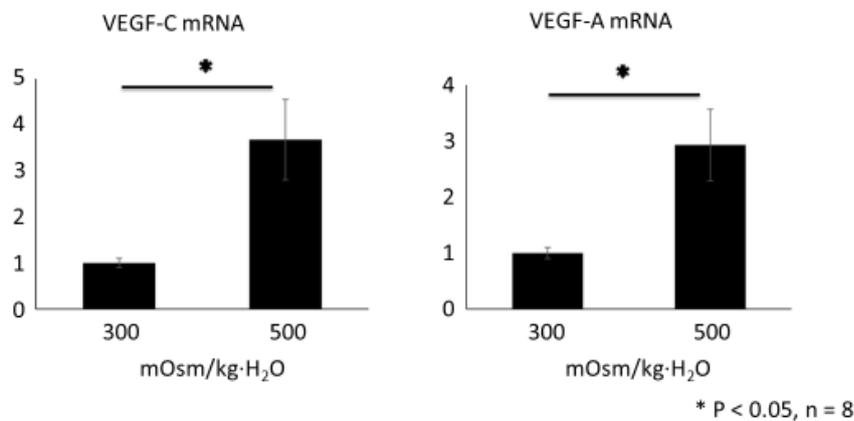


図 1: HEK293細胞におけるVEGF発現に対する高浸透圧刺激の効果

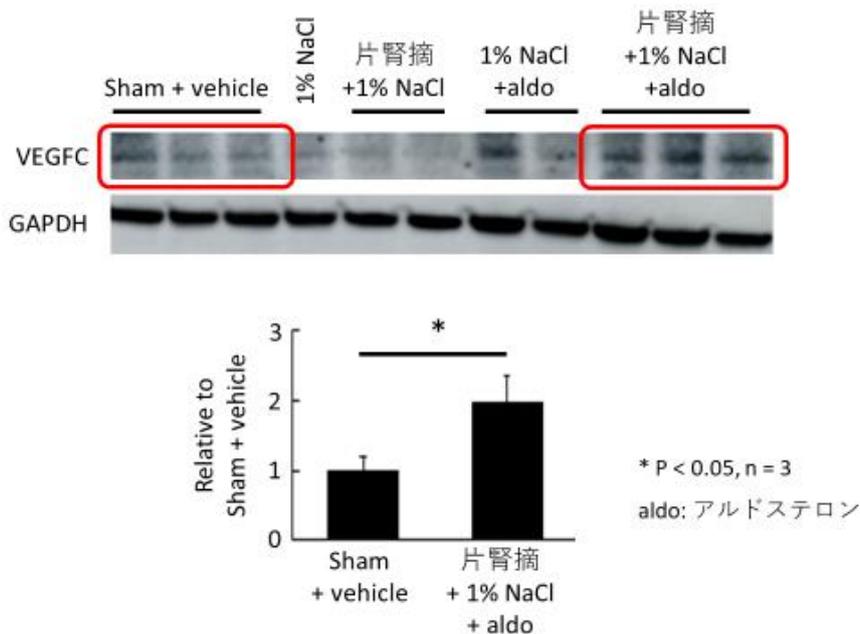


図2: 片腎摘+1%食塩水/アルドステロン負荷モデル(野生型マウス)におけるVEGFC蛋白発現の変化

3. 3 NFAT5 KO マウスを用いた 8%食塩含有食餌摂取による食塩感受性高血圧モデルの作製

上述のように、NFAT5 KO マウスに対してアルドステロンの持続皮下投与は高度な高ナトリウム血症と低カリウム血症、さらに高張性脱水を呈したことが推測された。また脱水のために血圧上昇にも乏しいと考えられた。アルドステロン投与を必要としない高血圧モデルとして、8%食塩含有食餌摂取による塩分負荷モデルマウスを作製した。WT マウスと KO マウスに通常食餌(通常食)または 8%食塩含有食餌(高塩食)を与えて 1 週間ごとに tail cuff 法にて血圧を測定したところ、通常食摂取 WT マウスに比し、高塩食摂取 WT マウスで収縮期血圧が有意に上昇し、高塩食摂取 KO マウスではさらに上昇を認めた(図 3)。

4. 考 察

平成 29 年度の当研究財団の研究助成により、私達は薬剤誘導性尿細管特異的 NFAT5 KO マウスの作製に成功した。その後表現系の解析により、KO マウスは多尿を呈する一方で、尿中 Na 排泄の減少と、血清 Na 濃度の上昇を生じることを見出した。さらに、KO マウスは WT マウスに比し収縮期血圧がむしろ高い傾向にあり、血中のレニン活性、アルドステロン濃度の上昇は認められなかった。多尿と高ナトリウム血症は呈するものの、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系の活性化を生じる循環血液量の減少(脱水)は生じていないものと考えられた。このことより NFAT5 KO マウスは、塩分貯留傾向にあり、食塩感受

性高血圧を生じることが推測された。近年、食塩の過剰摂取が皮膚組織における VEGF-C の活性化を介してリンパ管新生を生じ、リンパ管へのナトリウム貯留により食塩感受性高血圧を緩和する機序が報告された。さらに、VEGF-C の発現誘導は、皮膚組織の Na 蓄積を刺激とした、マクロファージの NFAT5 の活性化を介することが示された^{9,10}。そこで私達は、腎尿細管細胞内 NFAT5 の腎組織内の VEGF-C の発現への関与を検討することを最初の目的として、当該年度実験を開始した。

初めに、塩分感受性高血圧モデルとして一般に用いられる片腎摘+1%NaCl 飲水投与+アルドステロン持続皮下投与マウスを作製し、WT マウスにおいて検討したところ、腎組織内 VEGF-C 蛋白の増加を認めた。同様のモデルを NFAT5 KO マウスで作製したところ、多尿の増悪と早期の死亡を生じ、実験の完遂に至らなかった。以前の KO マウスの表現系の解析結果と合わせて考えると、アルドステロン投与により高ナトリウム血症と低カリウム血症、多尿が著明に増悪したためと推測された。その後、ややマイルドな負荷として、片腎摘+8%食塩含有食+アルドステロン持続皮下投与マウスを作製したところ、KO マウスは死亡には至らなかったものの多尿の増悪を生じ、収縮期血圧の上昇は認められなかった。NFAT5 KO マウスに対してアルドステロン 持続皮下投与は食塩感受性高血圧モデル作製には不適な印象を得た。

そこで、NFAT5 KO マウスの検討に適した食塩感受性高血圧モデルとして、8%食塩含有食餌のみを与える塩分

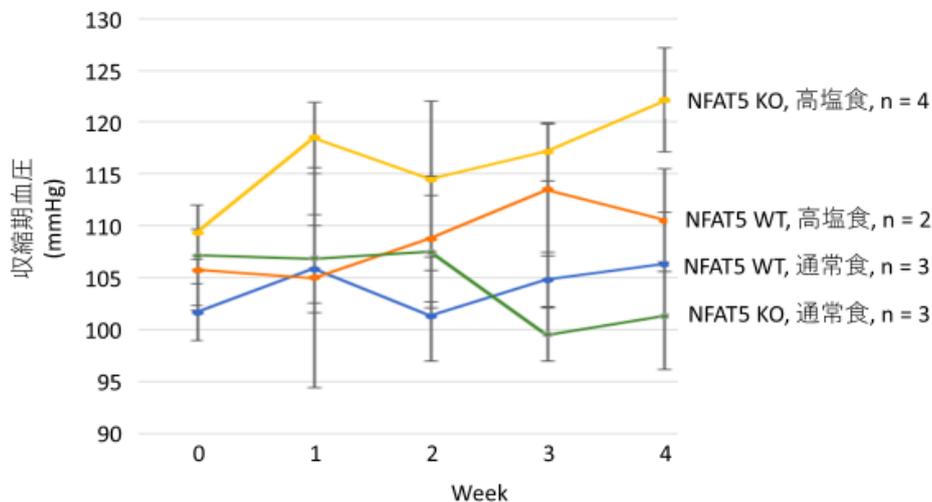


図3：高塩分食の収縮期血圧に対する効果

負荷モデルを作製したところ、KO マウスは死亡に至らず、且つ WT に比して収縮期血圧の有意な上昇も認めた。

これまでの経緯より、NFAT5 KO マウスは多尿を呈する一方、尿中ナトリウム排泄量が減少しており、塩分貯留を生じやすい状態にあると考えられる。また、血中のレニン活性やアルドステロン濃度の変化はないものの、アルドステロンの投与は死亡に至る著しい変化を生じることから、NFAT5 KO マウスにおいては、アルドステロンに依存的な尿中ナトリウム再吸収が亢進していることが推測される。

5. 今後の課題

腎尿細管細胞の NFAT5 による VEGF-C の発現調節機序の有無については、今後の検討課題である。現在のところ、腎臓における VEGF-C の発現調節についての報告は少なく、VEGF-C の発現誘導因子の一つとして、腎線維化モデルである片側尿管結紮モデルで誘導される TGF- β が挙げられる。今回の実験によって、WT マウスにおいては食塩/アルドステロン負荷が腎組織の VEGF-C の発現を誘導することが明らかとなった。一方で、1%食塩水または片腎摘+1%NaCl 飲水投与群においては VEGF-C の発現は誘導されなかったことから、VEGF-C の発現誘導は食塩負荷よりもアルドステロンを介したものであるかもしれない。アルドステロンが腎組織の TGF- β 発現を誘導することは以前から指摘されている。今後 KO マウスを用いた高塩食投与モデルを検討することで、NFAT5 と VEGF-C の関連を明らかにしていく。

一方で、今回の実験結果により得られた考察として、NFAT5 KO マウスがアルドステロン作用に過剰に反応する可能性が挙げられる。アルドステロンは尿細管上皮細胞に発現する Na 再吸収関連のトランスポーターの中でも上皮型 Na チャネル ENaC との関連が最も強いと言える。今後 NFAT5 KO マウスにおいて ENaC も含めて尿細管細胞に発現する水、Na 再吸収関連の遺伝子群の発現を検討していくことで、NFAT5 KO において生じる食塩感受性高血圧の原因を明らかにしていく。

6. 文献

1. Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response

to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* 87: 1441–1474, 2007.

2. Hasler U, Jeon US, Kim JA, et al. Tonicity-responsive enhancer binding protein is an essential regulator of aquaporin-2 expression in renal collecting duct principal cells. *J Am Soc Nephrol.* 17: 1521-1531, 2006.
3. Nakayama Y, Peng T, Sands JM, et al. The TonE/TonEBP pathway mediates tonicity-responsive regulation of UT-A urea transporter expression. *J Biol Chem.* 275: 38275-38280, 2000.
4. López-Rodríguez C, Aramburu J, Rakeman AS, et al. NFAT5, a constitutively nuclear NFAT5 protein that does not cooperate with Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 7214-7219, 1999.
5. Kim NH, Choi S, Han EJ, et al. The xanthine oxidase-NFAT5 pathway regulates macrophage activation and TLR-induced inflammatory arthritis. *Eur J Immunol.* 44: 2721-2736, 2014.
6. Halteman JA, Kwon HM, Leitinger N, et al. NFAT5 expression in bone marrow-derived cells enhances atherosclerosis and drives macrophage migration. *Front Physiol.* 3: 313, 2012.
7. Hernández-Ochoa EO, Robinson P, Contreras M, et al. Elevated extracellular glucose and uncontrolled type 1 diabetes enhance NFAT5 signaling and disrupt the transverse tubular network in mouse skeletal muscle. *Exp Biol Med (Maywood).* 237: 1068-1083, 2012.
8. Halterman JA, Kwon HM, zargham, et al. Nuclear factor of activated T cells 5 regulates vascular smooth muscle cell phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31: 2287-2296, 2011.
9. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med.* 15: 545-552, 2009.
10. Wiig H, Schroder A, Neuhofer W, et al. Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure. *J Clin Invest.* 123: 2803-15, 2013.

Investigation of the Role of NFAT5 in Renal Tubular Cells in Salt-Sensitive Hypertension

Yuichiro Izumi, Masashi Mukoyama

Department of Nephrology, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences

Summary

Nuclear factor of activated T-cells 5, NFAT5, is a transcription factor, which is activated by hyperosmolality and induces the expression of osmoprotective genes, contributing to cell survival even in extremely high osmolality conditions such as renal inner medulla. In skin tissue, involvement of NFAT5 activation in the alleviation of salt-sensitive hypertension has been suggested. High-salt diet induces the accumulation of sodium (Na) in interstitium of the skin, which activate NFAT5 in macrophage. The activation of NFAT5 increases the expression of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) and cause its secretion by macrophages. VEGF-C induces lymphangiogenesis and increases lymph capillary, resulting in the alleviation of hypertension induced by high-salt diet. Recently, we generated renal tubular cell-specific NFAT5 conditional knock out (KO) mice, which exhibited polyuria, decrease in urinary sodium excretion, and hypernatremia.

In the present study, we investigated the roles of renal tubular NFAT5 in salt-sensitive hypertension and VEGF-C expression in the kidney. *In vitro* experiments, NaCl-added hypertonicity (500 mOsm/kg•H₂O) induced the expression of NFAT5 protein and VEGF-C mRNA in HEK293 and NRK52E cells. *In vivo* experiments, the expression of VEGF-C protein in the kidney was increased by 1%NaCl drinking and subcutaneous administration of aldosterone with uninephrectomy in wild type mice (C57BL/6J). NFAT5 KO mice subjected to 1%NaCl drinking and administration of aldosterone with uninephrectomy died in a week, being suspected extreme hypernatremia, hypokalemia, and dehydration by aldosterone. Therefore, WT and KO mice were fed with regular diet or 8% NaCl containing high-salt diet and all mice survived for a month. High-salt diet induced hypertension both in WT and KO mice. Systolic blood pressure in KO mice with high-salt diet was significantly higher than that in WT mice with high-salt diet.

In conclusion, renal tubular NFAT5 could regulate urine concentration and urinary sodium excretion, which is important to alleviate hypertension induced by high-salt diet. The investigations of causative sodium-related transporter and VEGF-C expression in the kidney of NFAT5 KO mice are ongoing.