

## 高食塩食に伴う血中アンジオテンシン(1-7)の変動が下部尿路に与える影響

堀田 祐志

名古屋市立大学大学院薬学研究科

**概要** 高齢化の進行に伴い、尿意切迫感や頻尿、尿失禁などの下部尿路症状(Lower Urinary Tract Symptoms: LUTS)を訴える患者が増加している。近年、高食塩食が夜間頻尿の原因の一つであることが報告されている。食塩の過剰摂取はレニン-アンジオテンシン系の亢進を介して高血圧を惹起する。これは、強力な血管収縮作用を有するアンジオテンシン II が増加することが要因である。一方、アンジオテンシン I やアンジオテンシン II から作られるアンジオテンシン(1-7)は Mas 受容体を介して降圧作用を示す。レニン-アンジオテンシン系の異常を伴う様々な疾患において、アンジオテンシン II とアンジオテンシン(1-7)の不均衡が悪影響を及ぼすことが知られている。本研究は、アンジオテンシン(1-7)に着目し、食塩過剰摂取が下部尿路機能にどのような影響を与えるのか検討することを目的とした。検討には Dahl-salt sensitive rat を用い、通常食を投与した NS 群、8%食塩含有食を投与した HS 群、8%食塩含有食を投与し、アンジオテンシン(1-7)を持続投与した HS+1-7 群の 3 群を作成した。1 週間の観察期間ののち、血圧、膀胱重量、膀胱機能、膀胱組織中および血清中のアンジオテンシン II、アンジオテンシン(1-7)、および関連因子の mRNA 発現量を評価した。膀胱重量は NS 群と比較して HS 群、HS+1-7 群で増加していた。また、血圧も HS 群、HS+1-7 群で上昇していた。排尿筋条片の収縮力を評価したところ、NS 群と比較して HS 群でカルバコールに対する反応性の増強が観察され、アンジオテンシン(1-7)の投与により回復傾向が見られた。血清中アンジオテンシン II は NS 群と比較して HS 群で増加しており、アンジオテンシン(1-7)の投与による変化は見られなかった。一方、膀胱組織中アンジオテンシン II は NS 群と比較して HS 群では減少が見られ、アンジオテンシン(1-7)投与によりわずかに回復が見られた。アンジオテンシン(1-7)に関しては血清中、膀胱組織中ともに 3 群間で差は観察されなかった。また、HS 群の膀胱組織中において、アンジオテンシン II の生成に関わる因子の mRNA 発現量が増加していた。これらの結果より、食塩の過剰摂取は膀胱組織中においてもレニン-アンジオテンシン系の異常を惹起していることが示唆された。また、高食塩食が排尿筋条片のカルバコールに対する反応性を増強することも明らかとなった。しかし、レニン-アンジオテンシン系の異常が直接下部尿路機能障害に影響を及ぼしていることを証明するためにはさらなる研究が必要と考えられる。

### 1. 背景・目的

高齢化の進行に伴い、尿意切迫感や頻尿、尿失禁などの下部尿路症状(Lower Urinary Tract Symptoms: LUTS)を訴える患者が増加している。特に夜間頻尿は、本邦でも約 4,500 万人が罹患していると推定されており、患者の生活の質を著しく低下させる<sup>[1]</sup>。LUTS の原因は多岐にわたり、その原因に応じた予防法、治療法が求められている。近年、高食塩食が夜間頻尿の原因の一つであることが報告され、注目されている。我々はこれまでの研

究から、高食塩食を投与した Dahl-salt sensitive rat において膀胱組織中の上皮性 Na チャネル(ENaC)の発現が増加すること、増加した ENaC が膀胱上皮において知覚受容器として作用し過敏な反応(頻尿症状)を呈することを明らかにした<sup>[2]</sup>。ENaC はナトリウムの再吸収を制御しており、アンジオテンシン(Ang) II により活性化されることも報告されている<sup>[3]</sup>。レニン-アンジオテンシン(RA)系は生体のナトリウム排泄に関与しており、RA 系の亢進は血圧を上昇させる。通常、血圧上昇後にはレニンの分泌が抑制

され、RA系の働きは低下する。しかし、食塩感受性高血圧患者では、食塩の過剰摂取がRA系の抑制不全を引き起こし、RA系が亢進し続け高血圧状態が維持される。これは、強力な血管収縮作用を有するAng IIが増加することが要因とされている。一方、Ang IやAng IIからAng変換酵素(ACE)2により作られるAng(1-7)は、Mas受容体を介して血管拡張物質として働き、降圧作用を有することが最近報告された<sup>[4]</sup>。さらに、Ang(1-7)はAT2受容体への結合を介し、AT1R/AngIIシグナルを抑制することも報告されている<sup>[5]</sup>(Fig. 1)。食塩の過剰摂取により惹起される様々な疾患において、AngIIの増加だけでなく、Ang(1-7)の減少が悪影響を及ぼすとされている<sup>[6]</sup>。しかし、高食塩摂取時においてRAS系やAng(1-7)が下部尿路機能に及ぼす影響は不明である。本研究は、Ang(1-7)に着目し、食塩の過剰摂取が下部尿路にどのような影響を与えるのか検討することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 高食塩負荷を行ったDSラット膀胱内におけるRA系の亢進

#### 2.1.1 実験動物の作成、血圧測定、組織摘出

実験には6週齢の雄性Dahl-salt sensitive(DS) ratを用いた。通常食(0.3% NaCl含有CE-2)を与えて1週間飼育

したNS群、高食塩食(8% NaCl含有CE-2)を与えて1週間飼育した群HS群、高食塩食を与え、さらにAng(1-7)を20 ng/minの速度で1週間慢性持続投与したHS+1-7群を作成した。Ang(1-7)の投与は薬液を封入したALZET Osmotic Pumps(DURECT Corporation)を観察期間初日(Day0)に皮下に埋め込んで行った。DS+NS群、DS+HS群には生理食塩水を封入したポンプを同様に埋め込む処置を行った。観察期間中は飲水量、摂餌量の計測を行った。観察期間初日(Day0)および最終日前日(Day6)には、tail-cuff法により血圧および心拍数の測定を行った。観察期間終了後、血清、膀胱を採取し、膀胱重量を測定した。4°Cに冷やしたKrebs溶液(mM: NaCl 119, KCl 4.6, CaCl<sub>2</sub> 1.5, MgCl<sub>2</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 15, D-glucose 11 and NaHPO<sub>4</sub> 1.2)中で摘出した膀胱から膀胱三角部以下を切除した。膀胱組織は長軸方向に4等分し、以下の検討に用いた。

#### 2.1.2 等尺性張力測定

2.1.1で作成した排尿筋条片を95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>で通気した37°CのKrebs溶液で満たしたorgan bathに固定し、薬物による張力変動を測定した。静止張力は1 gとし、定常状態に達するまで1時間安定化させた。80 mM high K<sup>+</sup> Krebs溶液(mM: NaCl 36.7, KCl 80, CaCl<sub>2</sub> 2.2, MgCl<sub>2</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25, D-glucose 14 and KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2)を用いて収縮

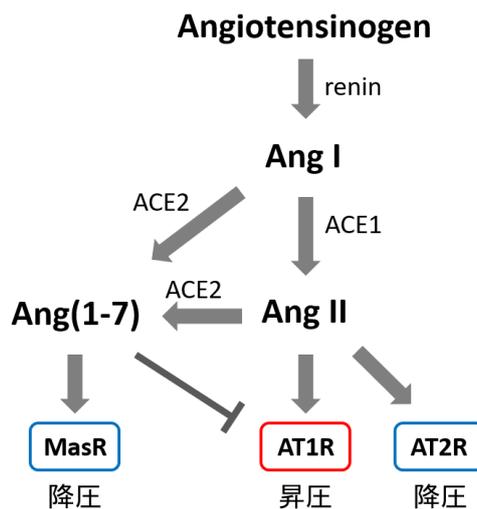


Fig. 1. レニン-アンジオテンシン系

Ang I; Angiotensin I, Ang II; Angiotensin II, ACE; angiotensin-converting enzyme,

AT1R; angiotensin II receptor, type 1, AT2R; angiotensin II receptor, type 2,

MasR; Mas receptor

させ、wash out したのち、以下の実験を行った。張力が基礎値まで戻り 30 分経過したところで、 $10^{-10}$  M~ $10^{-4}$  M のカルバコール(carbachol: Cch)をorgan bath内に累積投与し、それぞれの濃度における収縮反応の張力を記録した。High  $K^+$  Krebs 液による収縮を 100%として、それぞれの濃度における収縮の割合を算出し、濃度反応曲線を作成した。続いて経壁電気刺激による収縮反応実験を行った。経壁電気刺激(electrical field stimulation; EFS)は、organ bath の中に 2 本の白金電極を設置し、標本をこの電極間に懸垂して行った。電気刺激は、電気刺激装置(electronic Stimulator SEN-3301, NIHON KOHDEN)を用いて行い、刺激頻度: 1~64 Hz, duration: 5 msec, voltage: 160 V のパルス電流を加えた。刺激時間は 3 秒、刺激の間隔(main interval)は 180 s とした。コントロールの収縮反応を記録した後、ムスカリン受容体遮断薬である atropine( $10^{-6}$  M), ATP 受容体阻害薬である suramin( $10^{-4}$  M), 電位依存性ナトリウムチャンネル阻害剤である tetrodotoxin (TTX,  $10^{-6}$  M)を順に投薬し、阻害剤存在下での EFS に対する収縮反応を記録した。この一連の電気刺激の間に organ bath 内の Krebs 液は交換していない。EFS 誘発収縮反応のうち、アトロピン投薬により抑制される成分をコリン作動性成分、スラミン投薬により抑制される成分をプリン作動性成分、TTX 投薬によって抑制される成分を非コリン非プリン作動性成分とみなした。残存する

成分を TTX 抵抗性成分とした。High  $K^+$  Krebs 液による収縮を 100%として、各反応の割合を算出した。

### 2. 1. 3 血清中、膀胱組織中 Ang II, Ang (1-7) 測定

摘出した膀胱組織、および血清を用いて、ELISA 法により AngII, Ang (1-7)を測定した。Ang IIの測定には Rat Angiotensin II ELISA Kit(Lifespan Biosciences)を、Ang (1-7)の測定には Angiotensin (1-7) ELISA Kit (AVIVA SYSTEMS BIOLOGY)をそれぞれ用いた。膀胱組織中の測定値は検体中のタンパク質量で除して補正した。タンパク質量は BCA assay により算出した。

### 2. 1. 4 リアルタイム PCR

NS 群、HS 群より摘出した膀胱組織から PureLink® RNA Mini Kit (ThermoFisher SCIENTIFIC)を用いて RNA を抽出し、ReverTra Ace (TOYOBO)を用いて cDNA を合成した。CFX Connect™ Real-Time System (BIO-RAD)により定量的 PCR を行った。結果の解析は CFX Manager™を用い、 $\Delta\Delta Ct$ 法により $\beta$ -actin との比として算出した。

## 3. 結果

高食塩食(8%NaCl 含有)を 1 週間投与した HS 群では、通常食(0.3%NaCl 含有)を投与した DS+NS 群と比較して、摂餌量に変化は見られなかったが、飲水量は増加し、血圧が高値を示した(Fig. 2A, B, E)。膀胱重量は HS 群で

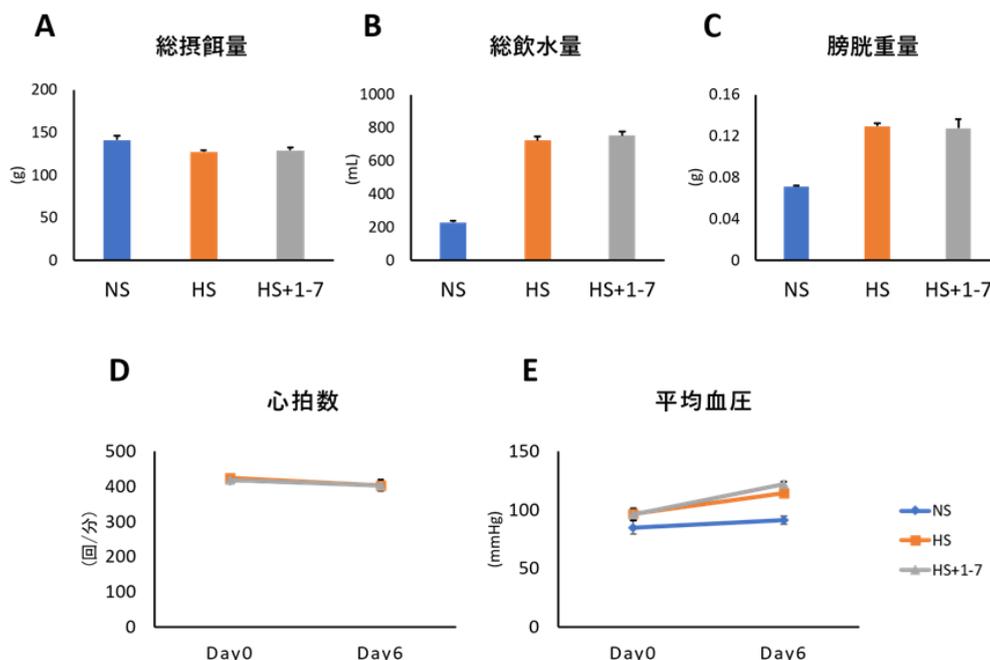


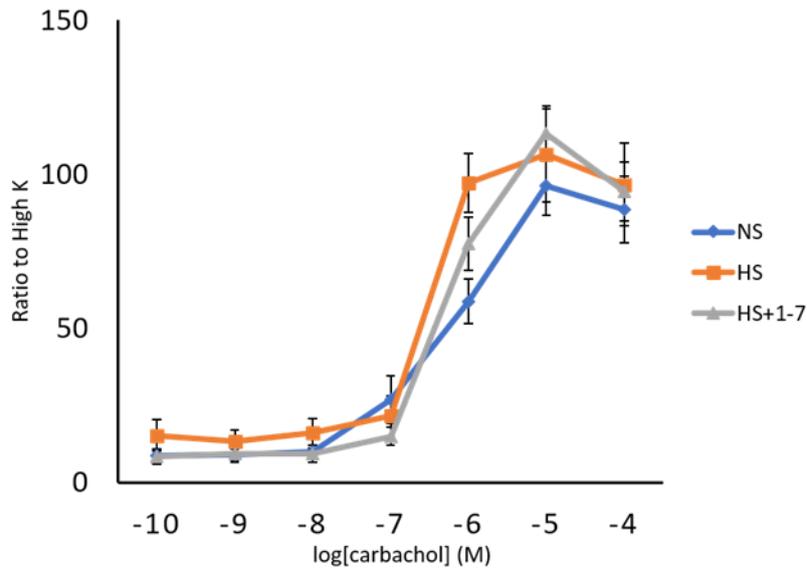
Fig. 2. 各群の摂餌量、総飲水量、膀胱重量、心拍数、平均血圧

増加しており、膀胱の肥大化が認められた (Fig. 2C)。HS+1-7 群では、HS 群と比較してこれらの値に変化はなく Ang(1-7)投与による改善は見られなかった (Fig. 2)。

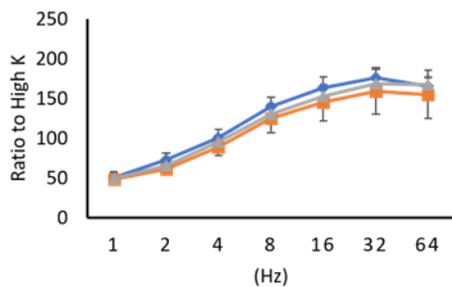
3 群から摘出した排尿筋条片に Cch を累積投与した。Cch  $10^{-6}$  M 添加時において、HS 群において NS 群と比較

して収縮反応の増強が認められた (Fig. 3)。HS 群と比較して HS+1-7 群ではわずかに収縮力が改善したものの、有意な変化は見られなかった。EFS による神経刺激に伴う排尿筋条片の収縮力はいずれの条件においても 3 群間で変化は見られなかった。

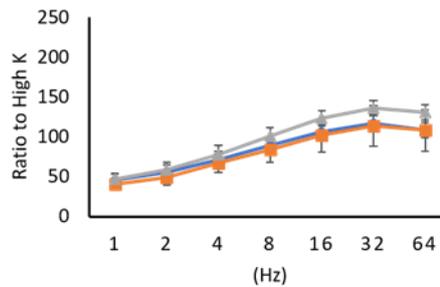
### カルバコール累積投与



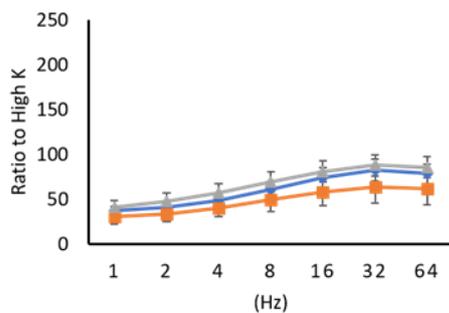
#### 阻害剤なし



#### suramin



#### suramin+atropin



#### suramin+atropin+TTX

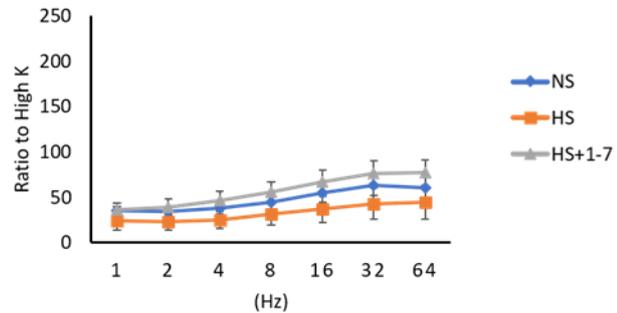


Fig. 3. 膀胱切片を用いた等尺性収縮弛緩実験

次に、血清中および膀胱組織中の Ang II, Ang(1-7)を ELISA 法にて測定した。血清中 Ang II は NS 群と比較して HS 群で増加しており, Ang(1-7)投与による変化は見られなかった (Fig. 4)。一方, 膀胱組織中における Ang II は NS 群と比較して HS 群で顕著に減少し, Ang(1-7)の投与によってやや改善した。Ang(1-7)に関しては血清中, 膀胱組織中ともに 3 群間で顕著な変化は認められなかった。アンジオテンシンの前駆体である Angiotensinogen,

Ang II の合成酵素である ACE1, Ang(1-7)の合成酵素である ACE2, Ang II 受容体(AT1R)のアイソフォームである Agtr1a, Ang(1-7)の受容体である MasR に関して, 膀胱組織中における mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて測定した。DS+HS 群の膀胱組織中において, Angiotensinogen, ACE1, Agtr1a の mRNA 発現量が顕著に増加していた。ACE2, MasR に関しては 2 群間で差は見られなかった (Fig. 5)。

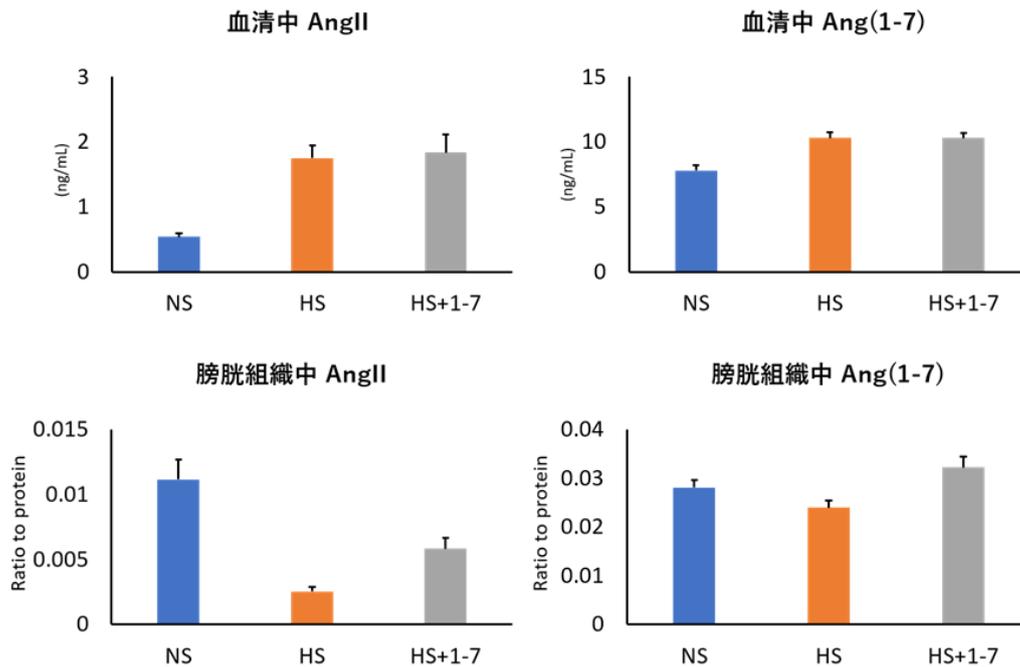


Fig. 4. 血清および膀胱組織中 Ang II と Ang (1-7) レベル

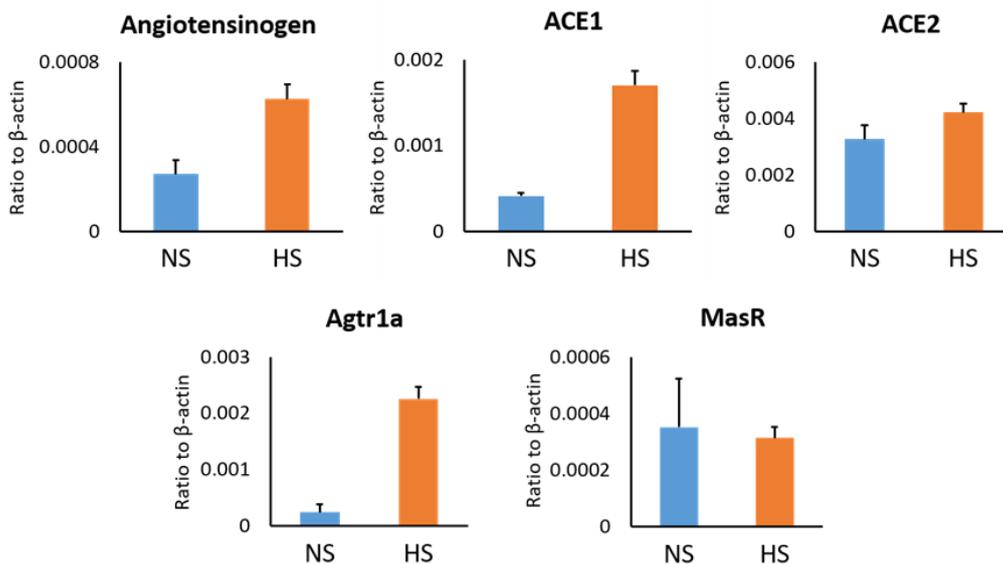


Fig. 5. 膀胱組織中の RAS 関連因子 mRNA 発現量

#### 4. 考 察

高食塩食を1週間投与したDSラットでは、排尿筋条片においてコリン作動薬であるCch累積投与時の収縮力が上昇しており、ムスカリン受容体を介した収縮反応が亢進していることが示唆された。排尿平滑筋には主にM3受容体が局在していることが知られており、コリン作動性神経から放出されたアセチルコリンが収縮を誘発する。DSラット膀胱組織中において、M3受容体以降のシグナルが活性化し、収縮反応が増強したと考えられる。一方、EFSにより神経を刺激した際の収縮力は3群間に差は見られなかった。また、アトロピンによるムスカリン受容体遮断、スラミンによるP2受容体遮断、TTXによる電位性ナトリウムチャンネル遮断、いずれの遮断によっても3群間で刺激への応答に差は見られなかった。Ang IIが膀胱上皮からのATPやPGE2の放出を惹起し、排尿反射を誘発するという報告<sup>7)</sup>があるが、今回の研究では、食塩負荷によるEFSへの反応性に変化はなかった。

次に血清中および膀胱組織中のAng IIとAng(1-7)濃度の測定を行った。高食塩食を与えたラットでは既存の報告と同様に血清Ang IIレベルが増加していた。このことより、腎臓をはじめとして全身でAng II/AT1Rシグナルが亢進し、血圧の上昇に関与していることが推察される。逆に、膀胱組織中ではAng IIレベルの低下が認められた。Ang IIの合成酵素であるACE1は主に血管内皮細胞に存在することが知られている<sup>8)</sup>が、今回の研究では、Ang IIの測定に膀胱組織全体を用いていることが要因として考えられる。通常食を与えたラットと比較して高食塩食を与えたラットでは膀胱重量の増加が認められ、膀胱組織の器質的な変化が生じていた。Ang(1-7)を投与した群でも膀胱組織には改善は見られなかった。そのような器質的な変化により、膀胱全体に占めるAng IIの割合が減少した可能性が考えられる。一方、Ang(1-7)を投与したラットでは膀胱組織重量は増加したままだが、膀胱組織中のAng IIレベルにわずかな増加が見られた。Ang(1-7)とAng IIは互いに拮抗して生体の血圧を制御することが知られており<sup>9)</sup>、Ang(1-7)を投与することでそれに拮抗してAng IIも増加する可能性があり、代償的にAng IIレベルが増えたかもしれない。しかしながら、血清中、膀胱組織中のいずれにおいてもAng(1-7)レベルに変化は見られず、その関与については不明な点も存在している。Ang(1-7)レ

ベルの結果から、今回のAng(1-7)投与量では効果を検討する上で不十分であったことも考えられる。

高食塩食負荷に伴う上述の変化に膀胱組織中のRA系亢進が関与するか評価するためにNS群、HS群の膀胱組織中における各mRNA発現量をリアルタイムPCR法により評価を行った。その結果、アンジオテンシンの前駆体であるAngiotensinogen、Ang IIの合成酵素であるACE1、およびAng IIの受容体AT1RのアイソフォームAgtr1aのmRNA発現が1週間の食塩負荷により亢進していた。Ang II/AT1R経路は強力な血管収縮作用を有し、昇圧を惹起する<sup>10)</sup>。本研究ではこのAng II/AT1R経路が食塩負荷を行ったDSラットの膀胱組織中においても亢進していることを初めて明らかにした。一方、Ang(1-7)の合成酵素であるACE2、およびAng(1-7)の受容体であるMasRの発現量は2群間に差が認められなかった。

Ang IIとAng(1-7)の不均衡は高血圧をはじめとする様々な疾患に悪影響を及ぼすことが報告されている。本研究ではこの不均衡が下部尿路機能に影響を及ぼすか検討を試みたが、その関係性については証明できなかった。今後、条件を変更し、さらなる検討をすすめる必要があると考えられる。

#### 引用文献

1. 後藤百万. 下部尿路機能障害へのアプローチ. 初版 2007.
2. Yamamoto S, Hotta Y, Maeda K, Kataoka T, Maeda Y, Hamakawa T, Shibata Y, Sasaki S, Ugawa S, Yasui T, Kimura K. High salt loading induces urinary storage dysfunction via upregulation of epithelial sodium channel alpha in the bladder epithelium in Dahl salt-sensitive rats. *J Pharmacol Sci.* 2017;135:121-125.
3. Zaika O, Mamenko M, Staruschenko A, Pochynyuk O. Direct activation of ENaC by angiotensin II: recent advances and new insights. *Curr Hypertens Rep.* 2013;15:17-24.
4. Raffai G, Durand MJ, Lombard JH. Acute and chronic angiotensin-(1-7) restores vasodilation and reduces oxidative stress in mesenteric arteries of salt-fed rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301:H1341-52.

5. Ohshima K, Mogi M, Nakaoka H, Iwanami J, Min LJ, Kanno H, Tsukuda K, Chisaka T, Bai HY, Wang XL, Ogimoto A, Higaki J, Horiuchi M. Possible role of angiotensin-converting enzyme 2 and activation of angiotensin II type 2 receptor by angiotensin-(1-7) in improvement of vascular remodeling by angiotensin II type 1 receptor blockade. *Hypertension*. 2014.;63:e53-9.:
6. Samuel P, Ali Q, Sabuhi R, Wu Y, Hussain T. High Na intake increases renal angiotensin II levels and reduces expression of the ACE2-AT(2)R-MasR axis in obese Zucker rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012;303:F412-9
7. Kurokawa T, Zha X, Ito H, Aoki Y, Akino H, Kobayashi M, Yokoyama O. Underlying mechanisms of urine storage dysfunction in rats with salt-loading hypertension. *Life Sci*. 2015;141:8-12.
8. Kohlstedt K, Brandes RP, Müller-Esterl W, Busse R, Fleming I. Angiotensin-converting enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells. *Circ Res*. 2004;94:60-7.
9. Chappell MC. Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension*. 2007;50:596-9.
10. Te Riet L, van Esch JH, Roks AJ, van den Meiracker AH, Danser AH. Hypertension: renin-angiotensin-aldosterone system alterations. *Circ Res*. 2015;116:960-75.

## The Effects of the Change of Angiotensin (1-7) by High Salt Intake on Lower Urinary Tract

Yuji Hotta

Nagoya City University

### Summary

**Background.** High salt-intake is related to be nocturia. However, the mechanisms have been unknown. In this study, we investigated the association between renin-angiotensin system (RAS) and bladder function using Dahl salt sensitive rats and the effects of the treatment of angiotensin (1-7).

**Methods.** Six-week-old male Dahl salt sensitive rats were divided into three groups; normal salt (NS), high salt (HS) and high salt+angiotensin (1-7) (HS+1-7). Rats in HS and HS+1-7 groups were given 8% NaCl in CE-2 and those in NS were given normal diet. Rats in HS+1-7 were also treated continuously by angiotensin (1-7). After 6 days, bladder weight, blood pressure, bladder function, the levels of angiotensin II and (1-7) and related mRNA were evaluated.

**Results.** Bladder weight increased in HS and HS+1-7 groups compared with that in NS group. Blood pressure also increased in HS and HS+1-7 groups compared with that in NS group. The contractile response to carbachol  $10^{-6}$  mol/L in HS group was significantly enhanced compared with that in NS group. The response in HS+1-7 group was slightly decreased compared with that in HS group. Serum angiotensin II levels in HS were higher than those in NS group and those in HS+1-7 were not changed and remained to be higher. On the other hand, the levels in bladder tissue were lower in HS and HS+1-7 groups compared with those in NS group. There are no changes in angiotensin 1-7 levels among all groups.

**Conclusions.** High salt intake enhanced contractile response to carbachol and RAS in rats. The further studies would be needed to prove the association between RAS and LUTS.