

腎不全モデルにおける腎内 RAS, 脳内 RAS 活性化を介した食塩嗜好性亢進の解明

磯部 伸介, 松山 貴司, 石垣 さやか, 大橋 温, 安田 日出夫

浜松医科大学第一内科

概要

- (背景) レニン-アンジオテンシン系(RAS)は腎での Na 排泄を調節する主要な因子である。一方, Na 摂取の調節に関しては不明な点が多いが, 脳内の RAS 活性化によって食塩嗜好性が高まることが知られている。腎不全モデルラットに高食塩食を摂取させると脳内 RAS が活性化することが報告されているが, この脳内 RAS 活性化により食塩嗜好性亢進が生じるかは不明である。我々は腎不全患者で食塩制限が難しい原因として, 食塩嗜好性亢進が生じていると仮説を立て, 検証を行うため本研究を行った。
- (方法) 慢性腎不全モデルとして 5/6 腎臓摘出モデル(Nx 群)を作成, 偽手術を行ったコントロールラット(C 群)と比較した。各群において Day 14-28 にかけて, それぞれ高 Na 食負荷(C+HS 群, Nx+HS 群), 低 Na 食負荷(C+LS 群, Nx+LS 群)を行った。Day 29-35 にかけて食塩嗜好性を評価, 血圧測定後 Day 35 に安楽死を行い, 腎臓検体を採取, 腎内 RAS 活性化を評価した。
- (結果) Nx 群は C 群と比較して, 有意に血清 Cr が上昇, 体重が減少, 血圧は高い傾向にあった。一方, 食塩負荷の違いによって各群間での差は認めなかった。腎臓内 RAS 活性化の指標となるアンジオテンシノーゲン(AGT), アンジオテンシン II(Ang II)の免疫染色では, C 群と比較して Nx 群で有意に陽性細胞面積が増加していた。しかし, 各群間で食塩負荷の違いによる差は認めなかった。食塩嗜好性の評価では C+HS 群と比較して Nx+HS 群で高い傾向にあったが, 統計学的な有意差は認めなかった。
- (結論) 慢性腎不全モデルに高食塩負荷を行うとコントロールラットと比較して食塩嗜好性が高まる傾向にあったが, 有意な差は認めなかった。今後, 脳内 RAS 活性化の評価を行い食塩嗜好性亢進が生じなかった原因を評価する必要がある。

1. 背景

体液量を適切に維持するためには, Na の排泄, 摂取のバランスが取れていることが重要である。Na 排泄の調節因子に関しては様々な因子が検討されている。これらには, レニン-アンジオテンシン系(RAS), アルドステロン, Na 利尿ペプチドをはじめ尿細管の Na トランスポーターに作用する様々なホルモンが知られている¹⁾。RAS は Na 排泄の調節に中心的な働きを担っている一連のカスケードである。循環血漿中の RAS では, 肝臓で産生された基質であるアンジオテンシノーゲン(AGT)を腎臓の傍糸球体装置から分泌されるレニンが切断してアンジオテンシン I

を産生, さらに肺や血管内皮に存在するアンジオテンシン変換酵素などが切断して生理活性を有するアンジオテンシン II(AngII)が産生される。一方, 腎臓や脳, 心臓, 血管などの諸臓器には循環血漿中の RAS とは独立して制御される臓器特異的 RAS が存在している。これらの臓器特異的な RAS は組織機能の制御, 障害に関与していることが明らかになってきた²⁾。腎臓内 RAS は, 正常では Na 欠乏により活性化し, 尿細管での Na 再吸収を亢進させ, 体液量維持に働いている。一方, 様々な腎臓疾患モデルでは腎臓内 RAS が活性化しており, Na 欠乏(減塩)により腎臓内 RAS の活性化が減弱され, Na 過剰では逆

に腎臓内 RAS が活性化し、不適切な Na 再吸収や腎臓組織障害を惹起していることが明らかにされてきた³⁾。

その一方で、Na 摂取の調節因子に関しては不明な点が多い。腎不全、高血圧、心不全のように Na が体内に貯留している病態では減塩食が有効であるが、減塩食の遵守率は低く、疾患の加療を困難にしている⁴⁾。食塩嗜好性 (sodium appetite) は Na を摂取しようとする欲求であり、口渇と同じような原始的欲求である。食塩嗜好性は Na 欠乏により増加するが、Na 欠乏がない状態でも自由に食塩が摂取できる状況では常に必要量以上の Na を摂取している。病的状態における検討では、自然発症高血圧ラット⁵⁾ や心不全モデルラット⁶⁾ で食塩嗜好性が亢進していることが報告されているが、この疾患モデルで食塩嗜好性が亢進している理由は不明である。食塩嗜好性は脳室周囲の終板器官(OVLT)、脳弓下(SFO)の脳内 RAS の活性化により亢進し、脳内 RAS を抑制する介入によって食塩嗜好性が減弱することが報告されている⁷⁾。慢性腎不全モデルラットでは、減塩食で飼育をするとコントロールと比較して腎臓内 RAS は軽度な亢進にとどまり脳内 RAS 亢進は認めないが、高食塩負荷食で飼育を行うと腎臓内 RAS が著明に亢進し、求心性交感神経活性化を介して脳内 RAS 亢進が生じることが報告された⁸⁾。このように腎臓と脳の臓器特異的 RAS の間に相互関係が存在し、臓器特異的 RAS が協調して Na バランスを調節している可能性がある。しかし、腎臓疾患で Na 負荷を行ったときに生じる脳内 RAS 亢進によって食塩嗜好性亢進が生じるか、これに介入が可能であるかは不明である。

2. 目的

腎不全モデルに Na 負荷をした際に、腎臓内 RAS 亢進による脳内 RAS 亢進が生じることが知られている。腎臓内 RAS 亢進により Na 排泄障害が生じるが、これに加えて脳内 RAS 亢進による食塩嗜好性亢進により Na 摂取の増加が生じるか検討する。

3. 実験方法

Day 0~13 の間、すべての群を通常 Na 食(0.4%)、飲水(自由水)を自由に摂取できる環境で飼育する。Day 0 に左腎臓摘出、Day 7 に右腎臓の 2/3 を摘出し、慢性腎不全モデルである 5/6 腎臓摘出モデル(Nx)を作成する。

Day 0, Day 7 に偽手術を行い、コントロール(C)群を作成する。

C 群, Nx 群それぞれ Day 12 に血清クレアチニン(sCr)値を測定。C 群, Nx 群各々を腎機能が同等な 2 群に分け、以下の①~④群に割り当てる。低 Na 食(LS)群(C+LS 群, Nx+LS 群)には 0.04%食塩含有食を、高 Na 食(HS)群(C+HS 群, Nx+HS 群)には 4%食塩含有食を、Day 14~28 の 2 週間食べさせる(飲水は自由水)。

- ① コントロール+低 Na 食(C+LS)群
- ② コントロール+高 Na 食(C+HS)群
- ③ 5/6 腎臓摘出モデル+低 Na 食(Nx+LS)群
- ④ 5/6 腎臓摘出モデル+高 Na 食(Nx+HS)群

その後、すべての群を 0.04%食塩含有食に変更する。飲水については、自由水、0.9%食塩水を自由に選択摂取できる環境下で、Day 29~35 にかけて飼育する。Day 29~35 において、0.9%食塩水と自由水の飲水量を計測する(2 ボトルテスト)。全飲水量のうち 0.9%食塩水摂取量を salt preference score とし、食塩嗜好性の評価を行う。

Day34 に血圧測定を行う。Day35 断頭にて安楽死を行い、腎臓、脳検体を採取。腎組織障害、腎臓内 RAS 活性として AGT, Ang II の免疫染色を半定量的に評価した。

4. 結果

4. 1 各群の体重, 血清 Cr 値, 血圧の推移

Day 12 の血清 Cr は C+LS 群, C+HS 群間に差を認めず、Nx+HS 群, Nx+LS 群間で差を認めなかった。Day 35 における体重, 血清 Cr 値は C+LS 群, C+HS 群では、Nx+HS 群, Nx+LS 群と比較してそれぞれ有意に高値, 低値となっていた。一方、収縮期血圧, 拡張期血圧は Nx+HS 群, Nx+LS 群で高い傾向にあったが、有意差は認めなかった(**Table 1**)。全期間を通じて、C 群, Nx 群それぞれにおいて、高 Na 食, 低 Na 食群間で体重, 血清 Cr 値, 血圧に差を認めなかった。

4. 2 各群の腎組織障害

C 群では PAS 染色において明らかな糸球体障害は認めず、Masson Trichrome 染色において尿細管間質領域の線維化を認めなかった。一方、Nx 群では巣状に分節性糸球体硬化の所見を認め、広範に尿細管の萎縮、間質の線維化を認めた。C 群, Nx 群において、低 Na 食, 高

Na 食群間に明らかな組織障害の変化は認めなかった (Fig 1)。

4. 3 各群の腎内 RAS 活性化の指標

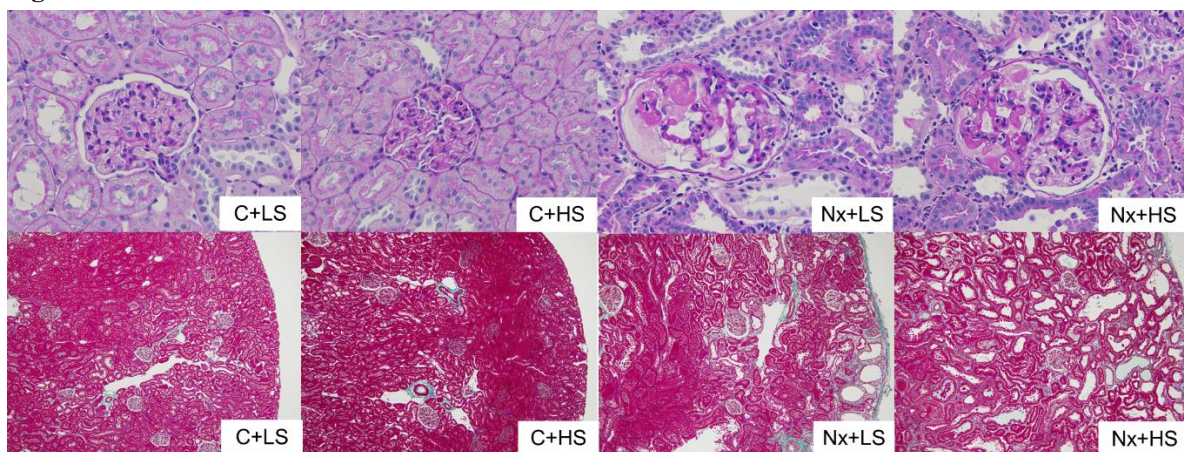
腎臓内 RAS 活性化の指標として、AGT、Ang II の免疫染色を行い、半定量的に評価を行った。AGT の免疫染色では、C 群において近位尿細管細胞がわずかに染色され、Nx 群において染色強度、陽性面積が有意に増加した (C+LS: 4.0 ± 0.2 , C+HS: 3.8 ± 0.3 , Nx+LS: 8.2 ± 0.6 , Nx+HS: 9.8 ± 0.8 . C+LS vs Nx+LS: $P = 0.03$, C+HS vs Nx+HS: $P = 0.02$)。しかし、C 群、Nx 群それぞれにおいて、

低 Na 食、高 Na 食間の比較では明らかな差を認めなかった (C+LS vs C+HS: $P = 0.89$, Nx+LS vs Nx+HS: $P = 0.76$)。Ang II の免疫染色において、C 群では遠位尿細管細胞がわずかに染色されるのみであったが、Nx 群では遠位尿細管細胞の染色強度が増強し、近位尿細管細胞も陽性となった。尿細管領域における陽性細胞数の比較では、Nx 群において C 群より有意に高値となったが (C+LS: 5.2 ± 0.5 , C+HS: 4.8 ± 0.5 , Nx+LS: 13.5 ± 1.5 , Nx+HS: 14.2 ± 1.3 . C+LS vs Nx+LS: $P = 0.042$, C+HS vs Nx+HS: $P = 0.03$)、低 Na 食、高 Na 食間で差を認めなかった (C+LS vs C+HS: $P = 0.88$, Nx+LS vs Nx+HS: $P = 0.66$) (Fig 2)。

Table 1

| | C+LS | C+HL | Nx+LS | Nx+HL | P |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------|
| BW (day 0), g | 287.3 ± 12.0 | 284.0 ± 8.7 | 276.2 ± 5.8 | 286.5 ± 8.6 | 0.25 |
| Cr (day 12), mg/dL | 0.32 ± 0.02 | 0.31 ± 0.02 | 0.84 ± 0.08 | 0.89 ± 0.09 | 0.01 |
| BW (day 35), g | 393.3 ± 27.1 | 407.0 ± 23.1 | 353.0 ± 16.8 | 351.5 ± 16.6 | 0.02 |
| Cr (day 35), mg/dL | 0.31 ± 0.03 | 0.31 ± 0.03 | 0.82 ± 0.20 | 0.82 ± 0.20 | 0.01 |
| SBP, mmHg | 108.0 ± 11.3 | 122.5 ± 17.7 | 155.0 ± 21.2 | 132 ± 32.2 | 0.34 |
| DBP, mmHg | 78.5 ± 2.1 | 94.5 ± 12.0 | 104.0 ± 5.7 | 99.3 ± 24.1 | 0.09 |
| Pulse, /min | 257.0 ± 11.3 | 297.5 ± 21.9 | 391.0 ± 25.5 | 317.7 ± 30.6 | 0.06 |

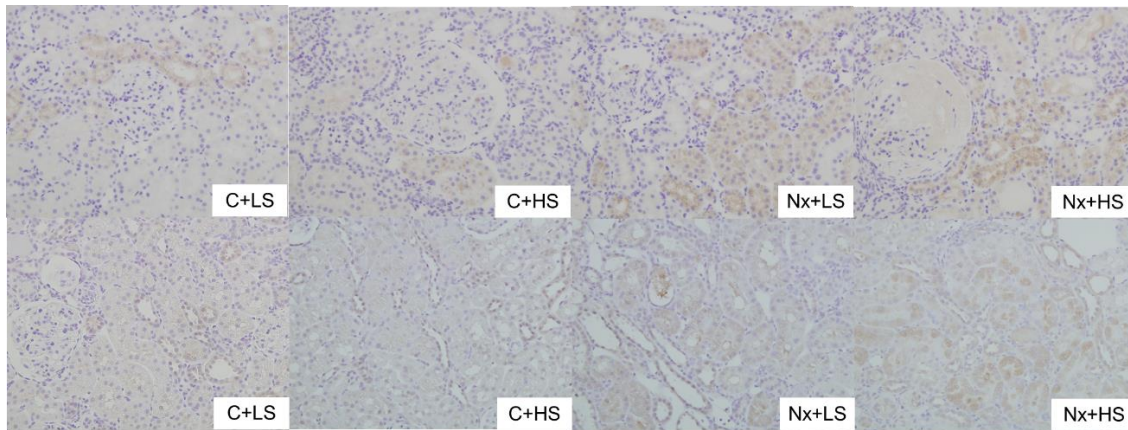
Fig 1



上段: PAS 染色、 $\times 400$ 倍

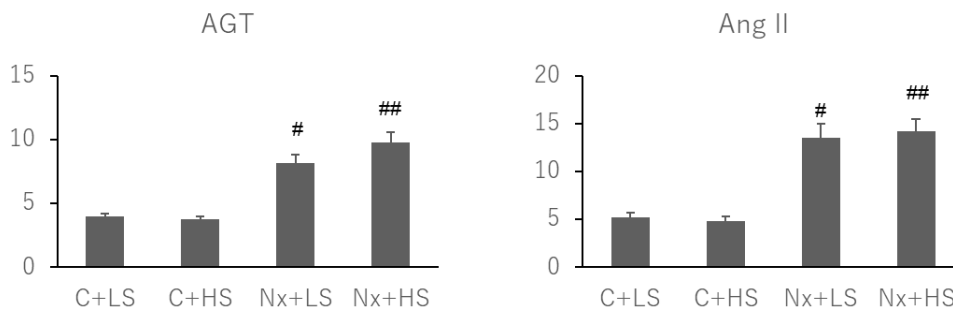
下段: Masson Trichrome 染色、 $\times 100$ 倍

Fig 2



上段:AGT 免疫染色、×400 倍

下段:Ang II 免疫染色、×400 倍



AGT、Ang II による免疫染色。尿細管領域における陽性面積の割合。#:P<0.05, vs C+LS, ##:P<0.05, vs C+HS

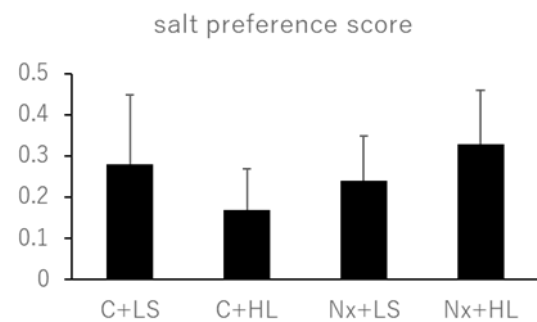
4. 4 各群の食塩嗜好性

C 群において、C+HS 群は C+LS 群より低い傾向にあったが有意差は認めなかった (C+HS: 0.17 ± 0.10 , C+LS: 0.28 ± 0.17 , $P = 0.53$)。Nx 群において、Nx+HS 群は Nx+LS 群と比較し、有意ではないが高い傾向にあった (Nx+HS: 0.33 ± 0.13 , Nx+LS: 0.24 ± 0.11 , $P = 0.62$)。同一塩分摂取モデルで検討を行うと、C+LS 群、Nx+LS 群には差を認めなかったが、Nx+HL 群は C+HL 群と比較して、有意ではないが高い傾向にあった (C+LS vs Nx+LS: $P = 0.92$, C+HS vs Nx+HS: $P = 0.32$) (Fig 3)。

5. 結論と考察

今回の検討において、5/6 腎臓摘出モデルに高食塩負荷を行うと食塩嗜好性が亢進する傾向にあったが有意な差は認めなかった。5/6 腎臓摘出モデルは比較的高度な腎機能障害を有しており、腎臓内 RAS の活性化を認める腎不全モデルとして確立している。本研究においても 5/6

Fig. 3



Salt preference score = $0.9\% \text{食塩水摂取量} / (0.9\% \text{食塩水摂取量} + \text{自由水摂取量})$

腎臓摘出モデルを作成すると、血清 Cr 値、腎組織障害の増悪を認め、腎臓内 RAS 系活性化のマーカーとなる腎内 AGT、腎内 AngII の増加を認めた。

Cao 等は 5/6 腎臓摘出モデルに食塩を付加することにより、腎臓内 RAS 活性化に起因する脳内 RAS 活性化が

生じることを明らかにした⁸⁾。我々の検討では脳内 RAS 活性化の評価が行えていないが、腎臓内 RAS 活性化は再現できており脳内 RAS が活性化されていることが期待される。食塩嗜好性は脳室周囲に存在する終板器官 (OVL), 脳弓下 (SFO) の脳内 RAS の活性化により亢進することが示されている⁷⁾。本研究において、食塩嗜好性亢進を認めなかった原因を検討するために脳内 RAS の評価が必要となる。

食塩嗜好性亢進を認めている疾患モデルとして自然発症高血圧ラット⁹⁾や心不全モデルラット⁶⁾がある。これらの疾患モデルでは腎臓や心臓の RAS 活性化が知られている。これらのモデルに脳内 RAS を抑制する介入を行なうと食塩嗜好性が減弱するため、これらのモデルでは脳内 RAS が活性化している事が示唆され、脳内 RAS 活性化が食塩嗜好性亢進に関与していることが示された。一方、腎不全モデルにおいて食塩嗜好性の検討はなされていないが、アドリアマイシンで誘導したネフローゼモデルでは食塩嗜好性が亢進していないことが報告されている⁹⁾。アドリアマイシン誘導のネフローゼモデルで脳内 RAS 活性化の検討はなされていないが、腎臓内 RAS は活性化している¹⁰⁾。腎臓内 RAS 亢進が食塩嗜好性に影響しない可能性を示唆していると考えられる。

一方、食事や飲水による食塩負荷によって食塩嗜好性が変化することも知られている。胎生期や出生後早期に高食塩食を摂取すると、成人期の食塩嗜好性が亢進する。しかし、この現象は大人になってからの高食塩負荷では再現されず¹¹⁾、本研究での食塩負荷はその後の食塩嗜好性に影響していないと考えられる。さらに、通常食塩食 + 高食塩水摂取による塩分負荷では短期間の食塩嗜好性低下が生じるが、高食塩食 + 自由な飲水による塩分負荷では食塩嗜好性への影響がない事が報告されている¹²⁾。このため本研究では食塩水による塩分負荷ではなく、高食塩食による塩分負荷を選択した。高食塩食負荷がその後の食塩嗜好性に影響しないことは、コントロールラットにおける我々の検討でも確認された。

6. 今後の予定

腎不全モデルで食塩嗜好性亢進を証明できなかった原因として、我々のモデルで脳内 RAS が亢進していない

可能性を検討する。また、腎臓内 RAS 活性化では食塩嗜好性亢進が生じない可能性を検討する必要がある。

7. 参考文献

- 1) Strazzullo P, Galletti F, Barba G. Altered renal handling of sodium in human hypertension: short review of the evidence. *Hypertension*. 2003; 41: 1000-5.
- 2) Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev*. 2007; 59: 251-87.
- 3) Huang Y, Yamamoto T, Misaki T, Suzuki H, Togawa A, Ohashi N, Fukawawa H, Fujigaki Y, Ichihara A, Nishiyama A, Senbonmatsu T, Ikegaya N, Hishida A. Enhanced intrarenal receptor-mediated prorenin activation in chronic progressive anti-thymocyte serum nephritis rats on high salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2012; 303: F130-8.
- 4) Korhonen MH, Litmanen H, Rauramaa R, Vaisanen SB, Niskanen L, Uusitupa M. Adherence to salt restriction diet among people with mildly elevated blood pressure. *Eur J Clin Nutr*. 1999; 53: 880-5.
- 5) DiNicolantonio R, Hutchinson JS, Mendelsohn FA. Exaggerated salt appetite of spontaneously hypertensive rats is decreased by central angiotensin-converting enzyme blocker. *Nature*. 1982; 298: 846-8.
- 6) Fransis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Beltz TG, Zimmerman K, Felder RB. Central mineralocorticoid receptor blockade improves volume regulation and reduces sympathetic drive in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281: H2241-51.
- 7) Geerling JC, Loewy AD. Central regulation of sodium appetite. *Exp physiol*. 2008; 93: 177-209.
- 8) Cao W, Li A, Wang L, Zhou Z, Su Z, Bin W, Wilcox CS, Hou FF. A Salt-Induced Reno-Cerebral Reflex Activates Renin-Angiotensin System and Promotes CKD Progression. *J Am Soc Nephrol*. 2015; 26: 1619-33.

- 9) Xu J, Johnson AK, Thunhorst RL. Thirst and sodium appetite in rats with experimental nephrotic syndrome. *Physiol Behav.* 2015; 149: 317-323.
- 10) Takenaka T, Inoue T, Miyazaki T, Kobori H, Nishiyama A, Ishii N, Hayashi M, Suzuki H. Klotho suppresses the renin-angiotensin system in Adriamycin nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 2017; 32: 791-800.
- 11) Priehs TW, Mooney KJ, Bernard RA. High dietary sodium enhances gustatory nerve activity and behavioral responses to NaCl. *Am J Physiol.* 1991; 261: R52-58.
- 12) Greenwood MP, Greenwood M, Paton JF, Murphy D. Salt appetite is reduced by a single experience of drinking hypertonic saline in the adult rat. *PLoS One.* 2014; 9: e104802

Relationship between Renal and Cerebral Renin-Angiotensin System and Sodium Appetite in CKD Model Rats

Shinsuke Isobe, Takashi Matsuyama, Sayaka Ishigaki, Naro Ohashi, Hideo Yasuda

Hamamatsu University School of Medicine

Summary

(Background) Regulation of sodium intake and excretion is essential to maintain body fluid balance. The circulating renin-angiotensin system (RAS) is one of the most powerful hormones that regulates arterial pressure and sodium homeostasis. It has been confirmed that activation of the intrarenal RAS has a critical role in the pathophysiology of hypertension and renal injury independent of the circulating RAS. In normal kidney function models, a high-sodium diet causes downregulation of intrarenal RAS. However, intrarenal RAS is remarkably activated with a high-sodium diet in chronic kidney disease models. Activated intrarenal RAS in a disease models increases inappropriate sodium reabsorption and worsened renal injury. Conversely, little is known about the regulation to control of sodium intake. Sodium restriction is a cornerstone to treat hypertension, renal failure and heart failure. However, among these morbidity patients, adherence to the sodium restriction diet is extremely low.

Sodium appetite is a behavioral drive to ingest food or fluid that contain sodium. Sodium appetite is stimulated by physiological sodium deficiency. However, when animals can available salty foods freely, they take excess amount of sodium that need to maintain fluid balance or growth. In the morbidity states, increased sodium appetite has been reported in patients on dialysis, in rat models of heart failure and spontaneous hypertensive rats, though exact mechanisms that increase the sodium appetite in these models remain incompletely understood. Activated intra-cerebral angiotensin II at the subfornical organ (SFO) and the organum vasculosum of the lamina terminal (OVLT) is known to stimulate the sodium appetite. Cao, et al reported that in CKD model rats fed high sodium diet, intra-cerebral angiotensin II including SFO is activated by intra-renal RAS activation via afferent sympathetic nerve activation.

However, little is known whether sodium appetite is increased in CKD model. Therefore, we performed to clarify that activated intra-cerebral RAS mediated CKD models increase the sodium appetite.

(Methods) All animal procedures were conducted with the approval of the Animal Committee of the Hamamatsu University School of Medicine. Six-week-old male Sprague-Dawley rats were purchased from SLC (Hamamatsu, Japan) and Kept under a 12:12h light-dark cycle. Five-sixths nephrectomy (Group Nx) or sham (Group C) operation was performed at day 0 and day 7. All rats received a normal-salt (0.4%) diet and free access to water for 2 weeks. At day 14, Group Nx and C divided to another two groups receiving a low-salt (0.04%) diet (C+LS, Nx+LS) or high-salt (4%) diet (C+HS, Nx+HS). All four groups had at libitum access to fixed sodium diet and water during day 14 to 28. For tow-bottle test, rats were given access to two-bottle of tap water including isotonic saline (0.9%) and water for 7 day. The blood pressure

(BP) was measured using non-invasive rail-cuff method before euthanasia, at day 35. Blood samples and kidneys were collected immediately.

(Results)

1. Body weight, blood pressure and serum creatinine

Body weight (BW) in group C was not heavier than group Nx at day 0 but heavier at day 35. Serum creatinine (sCr) in group Nx was significantly higher than that in group C at day 35. Systolic BP (SBP) and diastolic BP (DBP) in group Nx were higher tendency but not significantly higher than that in group C. There were no significant difference in BW, SBP, DBP and sCr between LS and HS both in group C and Nx.

2. Histological findings

Glomerular damage such as global and segmental sclerosis, and tubulointerstitial fibrosis were more increased in group Nx than that in group C. However, there were no obvious histological differences among the high and low sodium diet.

3. The intrarenal AGT and Ang II activities

We conducted quantitative evaluation by immunostaining for AGT and Ang II. Immunostaining for AGT in group C revealed slight expression in the proximal tubular cells and dramatically increased in group Nx (C+LS: 4.0 ± 0.2 , C+HS: 3.8 ± 0.3 , Nx+LS: 8.2 ± 0.6 , Nx+HS: 9.8 ± 0.8 . C+LS vs Nx+LS: $P = 0.03$, C+HS vs Nx+HS: $P = 0.02$). However, there were no significant difference between LS and HS (C+LS vs C+HS: $P = 0.89$, Nx+LS vs Nx+HS: $P = 0.76$). Immunostaining for Ang II was weak and mainly seen in distal tubules in group C. In group Nx, immunostaining for Ang II was significant expression in proximal and distal tubules. Though, the degree of immunoreactivity of Ang II was significantly higher in group Nx than that in group C, but no significant change has existed between LS and HS (C+LS: 5.2 ± 0.5 , C+HS: 4.8 ± 0.5 , Nx+LS: 13.5 ± 1.5 , Nx+HS: 14.2 ± 1.3 . C+LS vs Nx+LS: $P = 0.042$, C+HS vs Nx+HS: $P = 0.03$, C+LS vs C+HS: $P = 0.88$, Nx+LS vs Nx+HS: $P = 0.66$).

4. The sodium appetite

We evaluated the sodium preference score as a marker of sodium appetite. There were no significant differences in the sodium preference score between the LS and HS (C+HS: 0.17 ± 0.10 , C+LS: 0.28 ± 0.17 , $P = 0.53$, Nx+HS: 0.33 ± 0.13 , Nx+LS: 0.24 ± 0.11 , $P = 0.62$). There was also no significant difference in the sodium preference score between group C+LS and Nx+LS (C+LS vs Nx+LS: $P = 0.92$). The group Nx+HS showed higher tendency in that score but not statistically significant compared that score of group C+HS (C+HS vs Nx+HS: $P = 0.32$).