

腎尿細管細胞の浸透圧応答転写因子 NFAT5 の欠損による食塩感受性高血圧の発症機序の検討

泉 裕一郎¹, 向山 政志²

¹ 熊本大学病院地域医療連携ネットワーク実践学寄附講座, ² 熊本大学大学院生命科学研究部腎臓内科学講座

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) の欠損によって生じる食塩感受性高血圧の発症機序を明らかにすることを目的とした。

これまで、当研究助成財団の助成を得て、腎臓における NFAT5 の意義について研究を続けている。近年、薬剤誘導性尿細管細胞特異的 NFAT5 ノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型の解析を進めてきた。その結果、KO マウスは野生型 (WT) マウスに比し、血清 Na 値と収縮期血圧が高い (tail cuff 法) ことを見出した。また、高食塩食を与えることにより、WT マウスよりも早期から血圧が上昇し、高ナトリウム血症が増悪することを確認した。さらに、KO マウスでは、尿素トランスポーター UT-A1 の発現と低下と腎組織内の尿素蓄積の著しい減少を示す一方で、上皮型 Na チャネル (ENaC) の発現増加、尿中 Na 排泄の減少と共に腎組織内の Na 蓄積の増加を認めた。

今回、NFAT5 KO マウスが呈する血圧変化について、テレメトリー法を用いてさらに詳細に検討した。また、KO マウスの食塩感受性高血圧の原因と推測される腎臓の ENaC の過剰発現について、組織内の ENaC の分布、細胞内局在などを詳細に検討した。その結果、KO マウスは、WT マウスに比し、暗期 (活動期) に有意な血圧高値を生じ、さらに、高食塩食を与えるとその傾向が増強する、すなわち食塩感受性高血圧を呈することが明らかとなった。また、KO マウスでは、特に腎髄質の集合尿細管の上皮型ナトリウムチャネル (ENaC) の細胞膜上での発現が増加し、食塩感受性高血圧の原因となることが確認された。KO マウスは多尿と高ナトリウム血症を呈することから体液量が減少している可能性があったが、血中バソプレッシン濃度、レニン活性、アルドステロン濃度、ヘマトクリット値の測定結果より、KO マウスの体液量はむしろ増加していることが示唆された。これまでの結果を総合すると、次のように考えられた。NFAT5KO マウスは、食事摂取により尿中 Na 再吸収が増加し、血清 Na 濃度が上昇するとともに水分の貯留が進み、体液量が増加する。高食塩食を与えるとその傾向はより増強される。そのため、マウスが食餌を摂取する暗期に体液貯留と血圧上昇を呈する。一方で、KO マウスは多尿を呈するため、明期 (入眠期) にはやや体液量は減少傾向となり、血圧は WT と同程度に下がり、高ナトリウム血症を呈するものと考えられた。

1. 研究目的と背景

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) の欠損によって生じる食塩感受性高血圧の発症機序を明らかにすることを目的とした。

NFAT は 1~5 のアイソフォームによる family を形成し、全身にユビキタスに発現し、主に免疫応答に関することが知られる。NFAT1 から 4 は、免疫抑制薬であるシクロスポリンやタクロリムスが作用するカルシニューリン経路により活性化されることで有名である。一方で、NFAT5 は、1 から 4 と同じ Rel homology domain (DNA binding domain) を

持ち、比較的相同性が高いことから NFAT ファミリーに、含まれるものの、カルシニューリン経路で活性化はされず、その代わり高浸透圧により活性化す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、sorbitol や betaine など浸透圧物質 (organic osmolyte) を細胞内に産生に関わる遺伝子群の発現を亢進し、細胞の保護と生存に貢献する。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食塩 (NaCl) や尿素といった浸透圧物質 (inorganic osmolyte) を組織間質に蓄積することで浸透圧の濃度勾配を形成するが、そのため、髄質の間質浸透圧は 1000 mOsm/Kg·H₂O を超える。そのような著しい高浸透圧環境では、NFAT5 が強く発現する²⁾。NFAT5 の腎臓における生理的な役割として、集合尿管の水チャネルや尿素トランスポーターの発現を誘導し、尿濃縮の調節に関与することが示唆されているが、*in vitro* の実験を根拠としたものであり、その役割についてはまだ十分に明らかとは言えない^{3,4)}。一方で、最近のゲノムワイド解析 (GWAS) で、高血圧や血清ナトリウム (Na) 高値の集団で、NFAT5 の多型が有意に多いことが報告されている^{5,6)}。NFAT5 がヒトの体液恒常性の維持や血圧の調節に重要であることが示唆され、腎臓における NFAT5 の役割の解明は意義のあるものであると考える。

私たちは、これまで、当研究助成財団の助成を得て、腎臓における NFAT5 の意義について研究を続けている。近年、薬剤誘導性尿管細胞特異的 NFAT5 ノックアウト (KO) マウスを作製し、その表現型の解析を進めてきた。その結果、KO マウスは野生型 (WT) マウスに比し、血清 Na 値と収縮期血圧が高い (tail cuff 法) ことを見出した。また、高食塩食を与えることにより、WT マウスよりも早期から血圧が上昇し、高ナトリウム血症が増悪することを確認した (図1)。さらに、KO マウスでは、尿素トランスポーター UT-A1 の発現と低下と腎組織内の尿素蓄積の著しい減少を示す一方で、上皮型 Na チャネル (ENaC) の発現増加、尿中 Na 排泄の減少と共に腎組織内の Na 蓄積の増加を認めた。

本研究においては、NFAT5 KO マウスが呈する血圧変化について、さらに詳細に検討した。また、KO マウスの食塩感受性高血圧の原因と推測される腎臓の ENaC の過剰発現について、組織内の ENaC の分布、細胞内局在などを詳細に検討した。

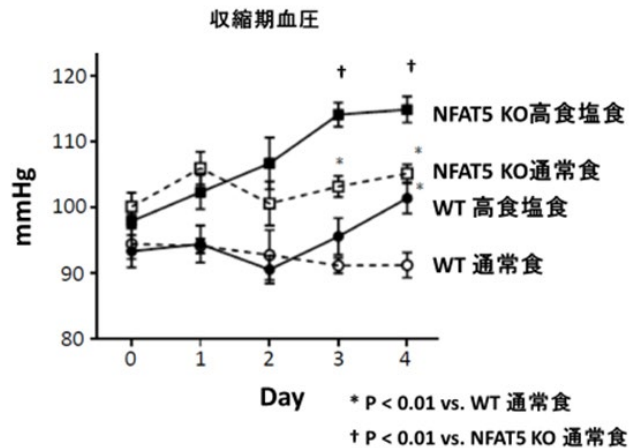


図1. NFAT5KO マウス, WT マウスの通常食または高食塩食下の血圧変化 (Tail cuff 法)

2. 研究方法

2.1 NFAT5KO マウスの血圧変化の詳細な解析

これまでの結果の血圧測定は、tail cuff 法により行われてきた。Tail cuff 法は侵襲が少なく、比較的容易に測定できる利点があるが、拡張期血圧や脈圧は測定できず、日内変動の評価は困難である。そこで、無拘束で持続的な血圧測定が可能であるテレメトリー法を用いて、収縮期血圧だけでなく、拡張期血圧、脈圧、血圧の日内変動などを詳細に検討した。初めに、basal condition の血圧を測定したのち、通常食 (0.3% 食塩含有食) または高食塩食 (8% 食塩含有食) を与え、食塩感受性を検討した。その後さらに、ENaC の直接阻害薬であるアミロライドの腹腔内投与を行い、血圧低下作用を検証した。

2.2 ENaC の発現変化の検討

これまでに、KO マウスにおける ENaC の発現増加は全腎組織を用いたリアルタイム PCR 法とウェスタンブロット法で確認している。さらに詳細な解析のために、腎組織の膜分画を用いたウェスタンブロット法と、蛍光免疫染色法を用いて、ENaC の腎組織内での分布と、尿管細胞内での局在を検討した。NFAT5 は、間質浸透圧の高い髄質側で特に活性が高く、尿素と Na 貯留も髄質側に多い。KO マウスにおける間質の微小環境の変化は髄質側で大きいことが推測される。そのため、ENaC は通常皮質集合尿管に多く発現するが、KO マウスにおいては髄質側で発現が増加することが推測される。

2. 3 NFAT5KO マウスの体液量の評価

これまでに、NFAT5KO マウスは多尿を呈し、高ナトリウム血症を呈することが明らかとなっている。このような所見は、一般的に尿崩症とそれによる脱水を疑う。一方で、KO マウスは血圧高値を呈し、高食塩食負荷時には体液貯留の更新による血圧上昇が疑われる。KO マウスの体液量の評価するために、通常食と高食塩食を与えた際の血中のバソプレッシン(AVP)濃度、レニン活性(PRA)、アルドステロン濃度(PAC)、ヘマトクリット(Ht)値を測定した。

3. 研究結果

3. 1 NFAT5KO マウスの血圧変化の詳細な解析

WT マウス 3 匹と KO マウス 3 匹の頸動脈に圧センサーを留置し、マウスの拡張期・収縮期血圧、脈拍を持続的にモニタリングした(図 2A)。平均血圧を算出し評価したところ、通常食を摂取時は、明期(入眠期)には WT と KO に差異は認めなかったが(図 2B)、暗期(活動期)には KO マウスで有意に高値であった(図 2B)。高食塩食を与える、WT と KO で明期、暗期ともに平均血圧は上昇したが、KO マウスは暗期でより顕著に上昇した。高食塩食摂取と共にアミロライドを投与したところ、WT マウスではアミロライドの効果は認めなかったが、KO マウスでは暗期で上昇した血圧が WT と同程度まで低下した。脈拍については、WT と KO の間で、いずれの条件においても明らかな差は認めなかった。

3. 2 ENaC の発現変化

蛍光免疫染色法により腎組織の ENaC γ の発現を検討したところ、WT マウスにおいては、その発現がほとんど皮質にのみ認められたのに対して、KO マウスにおいては、皮質の発現増加と共に、髄質の発現も明らかに増加していた(図 3A)。細胞膜上の発現を検討するため、皮質と髄質の膜分画を抽出し、ENaC の発現をウェスタンブロット法で検討したところ、WT マウスに比し KO マウスにおいて、皮質の膜分画においては発現の増加は認めなかったが、髄質の膜分画では明らかに増加していた(図 3B)。また、髄質の膜分画の ENaC の活性型である ENaC γ の cleaved form の発現も増加を確認した。これらの膜分画上の ENaC の発現は高食塩食下においても変わりはなく、ENaC γ の cleaved form の発現は減少したものの、WT マウスのそれと比べると高い発現が維持されていた(図 3C)。ENaC を介した尿中 Na 再吸収時には、同じく集合尿細管細胞に発現するカリウム(K)排泄トランスポーターROMK

(renal outer medullary K⁺ channel)からの K 排泄が促進する。そこで、髄質の膜分画の ROMK の発現を検討したところ、WT マウスと KO マウス間で通常食下では差異はなかったが、高食塩食下では KO マウスで有意な増加を認めた(図 3D)。

3. 3 NFAT5KO マウスの体液量の評価

通常食下において、WT マウスと KO マウス間で PRA と PAC に有意な差は認めなかったが、KO マウスでは PAC はやや低い傾向を認めた(表 1)。AVP 濃度は、KO マウスでやや高い傾向を認めた。Ht 値は、KO マウスで有意に低値であった。高食塩食下においては、通常食に比べ、WT マウスと KO マウスのいずれも PRA と PAC の低下を認め、両群間に差異は認めなかった。AVP 濃度は、通常食に比べ、WT マウスと KO マウスのいずれも高い傾向を認めた。高食塩食下の KO マウスでは、通常食下の WT マウスよりも有意差をもって高値であった。Ht 値は、WT マウスと KO マウスのいずれも高食塩食による変化は認めず、したがって、KO マウスの Ht 値は高食塩食下においても WT マウスのそれよりも有意に低値であった。

4. 考察

本研究の推進により、テレメトリー法を用いて尿細管細胞特異的 NFAT5KO マウスの血圧変化を詳細に検討し、KO マウスが血圧高値を呈し、食塩感受性高血圧を生じることが明らかとなった。血圧日内変動を観察すると、KO マウスの血圧は暗期(活動期)に上昇し、明期(入眠期)には WT マウスと差異がないことが確認された。この傾向は、高食塩食を与えることにより明確となった。KO マウスは、高血圧を呈する一方で、多飲多尿と高ナトリウム血症を生じており、尿崩症による体液量の減少を生じている可能性があったが、今回の実験により、KO マウスはむしろ体液過剰であることが示唆された。これまでの結果から、KO マウスの血圧上昇については、次のように考察する。KO マウスは食事摂取により尿中 Na 再吸収が増加し、血清 Na 濃度が上昇するとともに水分の貯留が進み、体液量が増加する。高食塩食を与えるとその傾向はより増強される。そのため、マウスが食餌を摂取する暗期に体液貯留と血圧上昇を呈する。一方で、KO マウスは多尿を呈するため、明期(入眠期)にはやや体液量は減少傾向となり、血圧は WT と同程度に下がり、高ナトリウム血症を呈するものと考ええる。今回の血液検査は明期に行われており、その他の結果と矛盾しない。

本研究により, NFAT5KO マウスの食塩感受性高血圧に ENaC が関与することが明確となった。これまでの研究により, 尿細管細胞の NFAT5 の欠損により, 腎組織の ENaC の発現が亢進していることは確認していたが, 本研究により, 特に, 腎髄質の ENaC の発現増加と, 膜分画への局在, ENaC の活性亢進が生じていることが明らかとなった。高食塩食下に ROMK の膜分画の発現が増加していることと, アミロライドを投与すると KO マウスの血圧高値が WT と同程度まで是正されることは, 高食塩食下の KO マウスの ENaC を介した尿中 Na 再吸収量の増加を示唆している。

これまでの研究は, 論文としてまとめ, 国際誌へ掲載されるに至った⁷⁾。

5. 今後の課題

尿細管細胞の NFAT5 がどのように ENaC の発現を調節するのか, その分子機序については今後さらに検討が必要である。現在のところ, NFAT5 が直接 ENaC の発現を調節することを示唆する報告はない。NFAT5 は転写活性を亢進するだけでなく, 他の転写因子との相互作用の中で, 転写活性を抑制する可能性も示唆されている。ENaC の発現は, 主にレニン-アンジオテンシン-アルドステロン(RAA)系により調節されるが, KO マウスにおいて血

中のレニン活性やアルドステロン濃度の上昇は認めていない。しかし, 高食塩食下の KO マウスでは腎組織の SGK1 の mRNA の発現が増加する傾向を確認している。SGK1 は, ENaC を尿細管管腔側膜上への局在化を促進する重要な分子であり, RAA 系の下流のミネラルコルチコイド受容体(MR)の活性化により発現増加する。KO マウスでは, RAA 系に依存しない腎組織の MR 経路の活性化が生じていることが予想される。高食塩食下には, 腎組織の Rac1 を介した MR の活性化が生じることが報告されている。よって, KO マウスにおいては, Rac1-MR-SGK1 経路の活性化が ENaC の発現を増加させている可能性がある。そのため, 現在, KO マウスの ENaC の発現に対する MR 阻害薬の効果を検討するための実験を計画している。また, AVP による ENaC の活性化についても報告がある。高食塩食の NFAT5KO マウスは, 通常食の WT マウスに比し AVP 濃度が有意に高値であり, その意義についての検討も必要である。さらに, KO マウスでは腎組織内の尿素濃度が著しく減少しており, 代わりに Na 濃度が上昇している。腎組織の Na 濃度の上昇は免疫反応の活性化を介して高血圧を生じることが示唆されており, この点についても KO マウスでの検討が必要であろう。

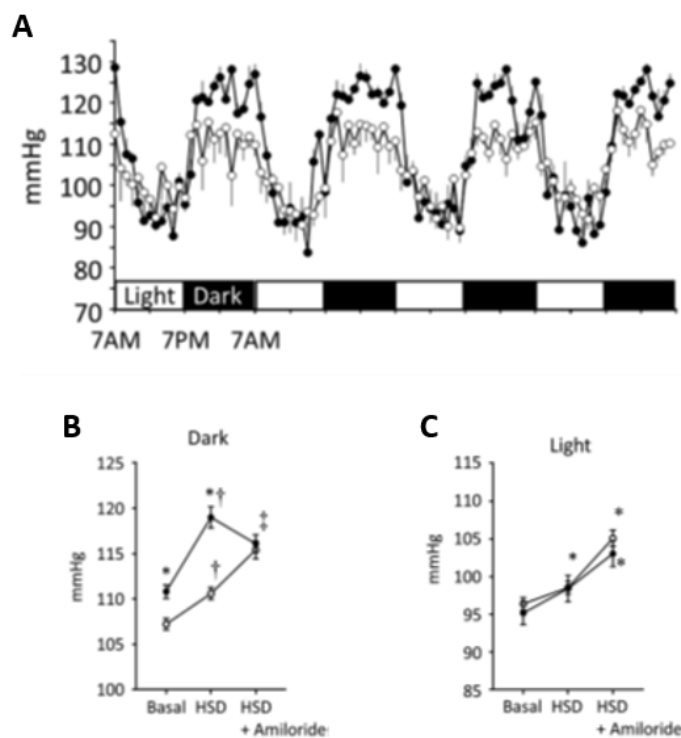


図 2. NFAT5KO マウス, WT マウスの通常食または高食塩食下の血圧変化(テレメトリー法)

A. 高食塩食下の平均血圧の変化。B. 暗期(活動期)の平均血圧。C. 明期(入眠期)の平均血圧。

(n = 3, * p<0.05 vs WT, † p<0.05 vs 通常 (basal condition), ‡ p<0.05 vs 高食塩食下 KO マウス)

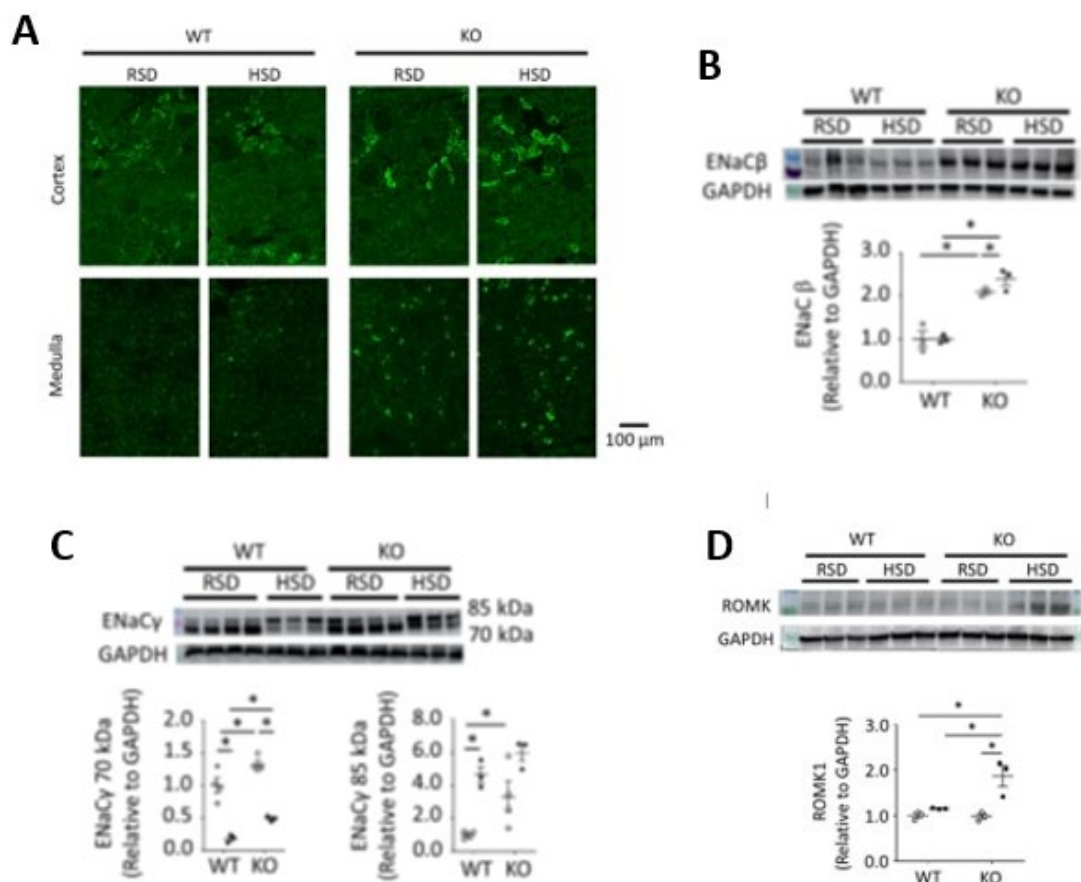


図 3. A. 腎組織の ENaC γ の発現, B. 髄質の膜分画の ENaC β の発現, C. 髄質の膜分画の ENaC γ の cleaved form と uncleaved form の発現 (n = 3-4, * p<0.05)

表 1. 通常食, 高食塩食下の WT マウスと KO マウスの各種血中パラメーター

	WT		KO	
	通常食	高食塩食	通常食	高食塩食
PRA (ng/ml perh)	10.6 ± 2.45	6.3 ± 1.42*	11.6 ± 2.12	2.96 ± 0.84†
PAC (pg/mL)	517.6 ± 70	210 ± 32.8*	417.6 ± 46.2	204.6 ± 16.4†
AVP (pg/ml)	5.3 ± 0.5	10.5 ± 6.6	7.2 ± 1.0	11.7 ± 1.7 *
Hematocrit (%)	42.6 ± 0.5	42.8 ± 0.6	38.3 ± 0.4 *	39.0 ± 0.4 *

n = 4, 平均値 ± SEM. * P<0.05 vs 通常食 WT, † P<0.05 vs 通常食 KO

6. 文献

- Lee N, Kim D, Kim WU. Role of NFAT5 in the immune system and pathogenesis of autoimmune diseases. *Front Immunol.* 10: 270, 2019.
- Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev.* 87: 1441-1474, 2007.
- 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.

4. 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.
5. Tragante V, Barnes MR, Ganesh SK, et al. Gene-centric meta-analysis in 87,736 individuals of European ancestry identifies multiple blood-pressure-related loci. *Am J Hum Genet.* 94:349–360, 2014.
6. Böger CA, Gorski M, McMahon GM, et al. NFAT5 and SLC4A10 loci associate with plasma osmolality. *J Am Soc Nephrol.* 28:2311–2321, 2017.
7. Hiramatsu A, Izumi Y, Eguchi K, et al. Salt-sensitive hypertension of the renal tubular cell-specific NFAT5 (nuclear factor of activated T-cells 5) knockout mice. *Hypertension.* 78: 1335-1346, 2021.

Pathogenic Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension Caused by Renal Tubular Cell-Specific NFAT5 Deficiency

Yuichiro Izumi¹, and Masashi Mukoyama²

¹ Department of Regional Medical Cooperation Network, Kumamoto University Hospital

² Department of Nephrology, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences

Summary

Nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5) is a transcription factor that is expressed in various tissues including Kidney. NFAT5 is activated by hypertonic conditions as observed in the renal medulla. The role of NFAT5 in the kidney and the regulation of blood pressure (BP) remains obscure. We have found that inducible and renal tubular cell-specific NFAT5 knockout (KO) mice exhibit high BP, hypernatremia, polyuria, and low urinary sodium excretion.

In the present study, we examined measurement of BP for KO mice and wild type (WT) mice using radiotelemetry method. To investigate salt-sensitive hypertension of KO mice, the expression of epithelial sodium channel (ENaC) in the kidney was examined. To assess body fluid volume, plasma renin activity (PRA), plasma aldosterone concentration (PAC), antidiuretic hormone (AVP: arginine vasopressin), and hematocrit (Ht) were measured.

As the results, mean BP was significantly higher in dark period, but not in light period, in KO mice. While high salt diet (HSD) enhanced the increase in the BP, treatment with amiloride significantly decreased the BP in KO mice to the level of WT mice in dark period, but not in light period.

The expression of ENaC was increased in membrane fraction of the renal medulla, not cortex, in KO mice both with RSD and HSD.

PRA and PAC are not significantly different between in WT mice and KO mice with regular salt diet (RSD) (basal condition), although PAC tended to be low in KO mice compared to WT mice. HSD suppressed PRA and PAC both in WT mice and KO mice. AVP level was not different between WT mice and KO mice with RSD. HSD tended to increase AVP level both in WT mice and KO mice. AVP level was significantly higher in KO mice with HSD than in WT mice with RSD. Ht level was lower in KO mice than in WT mice both with RSD and HSD.

In summary, deficit of renal tubular NFAT5 increases the expression of ENaC and urinary sodium reabsorption, leading to the increase in BP by gaining of body fluid. HSD enhances the phenotype and exhibits salt-sensitive hypertension. Therefore, the BP is increased in dark period (eating time for mice), not in light period in KO mice. Because KO mice exhibit polyuria, body fluid volume could be decreased in light period (sleep period).

In conclusion, renal tubular NFAT5 should play an important role in regulating sodium reabsorption through ENaC under high-salt condition, thereby preventing salt-dependent hypertension.