

## 腎臓排出リンパ管の局所 RAS は食塩感受性高血圧症の治療標的となる

水野 理介

岡山理科大学獣医学部獣医学科獣医薬理学講座

### 概要

【目的】本研究では、腎内リンパを腎外に排出する腎臓排出リンパ管 (Renal Drainage Lymph Vessels: RDLV) における局所 RAS の生理学的役割を解析し、さらに食塩感受性高血圧症における RAS の変調を明らかにする。そして、この高血圧の発症機序に RDLV の RAS 異常という新たな要素を加え、RDLV が治療標的となることの創生を目指す基盤研究である。今回は、4 週間の高食塩負荷が、アンジオテンシン I およびアンジオテンシン II による RDLV の反応性に影響を与えるか検証することを第一目的とする。

【方法】Wistar ラット(オス・4 週令)を、Normal salt diet (NSD)と High salt diet (HSD)の 2 群に分け、NSD 群にはオリエンタル酵母 MF を HSD 群にはオリエンタル酵母 8%高食塩食を 4 週間与えた。また、両群に水を与えた。摘出 RDLV の機能解析は、video-microscope system を用いて行い、標本に対して薬物(アンジオテンシン I およびアンジオテンシン II)を投与し、その収縮反応のパラメーターである最大径 (D<sub>max</sub>, μm)と最小径 (D<sub>min</sub>, μm)を計測し、収縮幅である Amplitude (D<sub>max</sub>-D<sub>min</sub>, μm)を算出した。合わせて両群の標本におけるリアルタイム PCR を行い、AT1a,b 受容体、アンジオテンシノーゲンと ACE の mRNA レベル解析とリンパ節内(腸骨・腎臓)の細胞数とリンパ球のサブセットを FACS 解析した。

【結果】4 週間の HSD は、アンジオテンシン I による RDLV 収縮(%D<sub>max</sub>)を有意に増強し、その結果としてリンパ管ポンプ作用のパラメーターである %Amplitude を有意に低下させた。HSD 群の RDLV における AT1a 受容体、アンジオテンシノーゲン、ACE の mRNA レベルは、NSD 群に比べて高値を示す傾向にあった。HSD 群の腎臓リンパ節における 総リンパ球数は、NSD 群に比べて減少している傾向にあった。

【考察】今回の結果は、1)ラットへの HSD 負荷がアンジオテンシン I による RDLV 収縮増強し、RDLV の拡張性低下とリンパ輸送能を減弱し、2)その結果、腎臓リンパ節における細胞構成に影響を与える可能性を示唆するものである。

### 1. 研究目的

食塩感受性高血圧は、食塩過剰摂取により惹起される本態性高血圧症の一つであり、食塩摂取量の多い日本人で本態性高血圧の 4 割程度を占めると言われている。この病態には、神経系、心血管系および腎臓の 3 つの臓器におけるレニン-アンジオテンシン系 (RAS) のバランス失調が複合的に関わることが知られている。申請者は最近、モデル動物を用いて高食塩負荷によって集合リンパ管の収縮機能が変化する事を見出し、上記の 3 つの要素に加え

て「リンパ循環系の RAS」が第 4 の要素として高血圧症の病態生理に関わる可能性を指摘した<sup>(1-4)</sup>。

リンパは毛細リンパ管で産生され、その下流に連結する集合リンパ管のポンプ作用によって能動輸送される。ヒトにおいてもこの集合リンパ管平滑筋の自発性収縮は、リンパ管ポンプ作用の動力源として生理学的に必須の機能である<sup>(5)</sup>。最近、高食塩負荷高血圧症モデル動物の腎臓実質において、Vascular Endothelial Growth Factor-C/D 依存性に毛細リンパ管新生・過形成を引き起こすことが報告さ

れている<sup>(6,9)</sup>。仮に、この毛細リンパ管新生・過形成が腎外の集合リンパ管にまで及ぶとすれば、リンパ管系の全体的な構造変化が高食塩負荷による血圧上昇を緩衝していることを意味している。しかしながら、食塩感受性高血圧症における集合リンパ管の病態変化は明らかにされていない。生理学的状態では、腎臓の再吸収能・尿排泄の統合的オペレーションによって腎臓から排出されるリンパ流は僅少とされるが、病態時の腎臓リンパ動態に関する情報は十分得られていない。

本研究では、腎内リンパを腎外に排出する腎臓排出リンパ管 (Renal Drainage Lymph Vessels: RDLV) における局所 RAS の生理学的役割を解析し、さらに食塩感受性高血圧症における RAS の変調を明らかとする。すなわち本申請は、この高血圧の発症機序に RDLV の RAS 異常という新たな要素を加え、RDLV が治療標的となることの創生を目指す基盤研究である。そして今回は、ラットへの 4 週間の高食塩食荷が、アンジオテンシン I およびアンジオテンシン II による RDLV の収縮反応性に影響を与えるか検証することを第一目的とする。

## 2. 研究方法

### 2.1 実験動物

Wistar ラット(オス・4 週令)を、Normal salt diet (NSD) と High salt diet (HSD) の 2 群に分け、NSD 群にはオリエンタル酵母 MF を HSD 群にはオリエンタル酵母 8% 食塩含有食を 4 週間与えた。また、両群に自由飲水を与えた。4 週間後に両群のラットをイソフルレン飽和麻酔後脱血犠牲死させ、RDLV とリンパ節(腸骨・腎臓)を採取して実験を行った。本実験は、岡山理科大学動物実験計画書(今治キャンパス)承認番号実 2021-087(変 02)の承認を得て実施した。

### 2.2 摘出 RDLV の収縮機能解析方法:

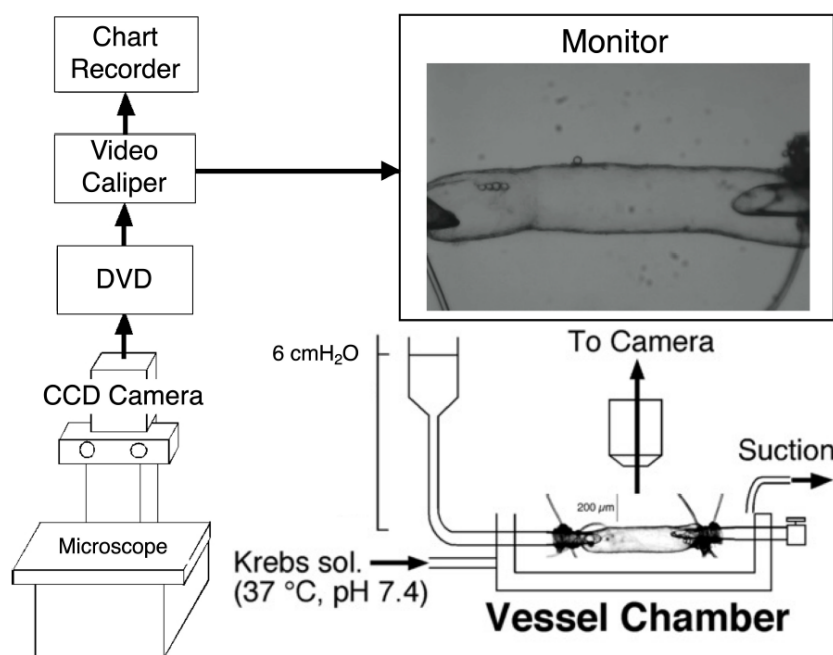
#### Video-Microscope System (Fig. 1)<sup>(10, 11)</sup>

両群から摘出した RDLV を Vessel chamber 内のガラスビペットでその両端をカニレーションし、流入口に圧カラムを連結し、流出口を三方活栓にて閉鎖し、定圧還流標本を作成した(Monitor in Fig. 1)。

標本外腔は、10%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub>-85%N<sub>2</sub> で飽和したクレブス液(37°C-pH7.4)を持続的に還流した。標本内腔に内圧 6 cmH<sub>2</sub>O を負荷して自発性収縮を惹起させた。標本に対して薬物(アンジオテンシン I 1~100 nM およびアンジオテンシン II 1~100 nM)を外腔側から投与して RDLV の内径変化を video caliper を用いて on-line で DVD と chart recorder に記録し、最大径(Dmax, μm)と最小径(Dmin, μm)を計測し、収縮幅である Amplitude(Dmax-Dmin, μm)を算出した。各々のパラメーターは、薬物投与前を 100%として基準化した。両群の比較は、2way-repeated ANOVA post-hoc test とし Holm-Sidak を用いて統計解析し、p < 0.05 を有意とした。

### 2.3 リアルタイム PCR

両群から RDLV を摘出し、以下のプロトコールに従ってリアルタイム PCR を行った。単離したリンパ管を速やかに RNAlater (Thermo Fisher Scientific) に浸潤し、RNA 抽出まで -30°C に保存した。NucleoSpin RNA Plus XS (MACHEREY-NAGEL) キットを用いて RNA を抽出した。組織はキット付属の Buffer LB1 中で MN Bead Tubes Type A ビーズ (MACHEREY-NAGEL) ビーズ式細胞破碎装置 MP Bio FastPrep (MP Biomedicals) により混合破碎した。抽出された RNA の量を NanoDrop One で定量した。抽出されたトータル RNA を鋳型とし ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix (東洋紡) を用いて cDNA へ逆転写反応を行った。逆転写で得られた cDNA を鋳型として PrimeTime<sup>™</sup> qPCR Probe Assays (Integrated DNA Technologies, Inc.) のプレデザインプライマー/プローブを用いて標的とする遺伝子を検出・定量した。標的遺伝子のプローブは FAM, ハウスキーピング遺伝子 (Hrpt1) のプローブは Cy5 で蛍光標識した。cDNA とプライマー/プローブは THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (東洋紡) を用い、QuantStudio<sup>®</sup> 5 リアルタイム PCR システム (Thermo Fisher Scientific) によりマルチプレックス (1 本のチューブで標的遺伝子とハウスキーピング遺伝子を同時検出) 解析を行った。Table. 1 に実験に使用した、プライマーを示す。



**Fig. 1** An experimental layout of a video-microscope system.  
A picture of cannulated and pressurized, at 6 cmH<sub>2</sub>O, RDLV isolated from the rat renal lymph node.

**Table.1** List of primers used in the present study.

Gene name		length	Sequence
HPRT1	forward	21	GCT TTT CCA CTT TCG CTG ATG
	reverse	21	GGT GAA AAG GAC CTC TCG AAG
AT1a	forward	23	CAC TAT TCG AAA TCC ACT TGA CC
	reverse	20	CTC TCA GCT CTG CCA CAT TC
AT1b	forward	25	TGC TCT CTG ACA CTA TTT AAA ATG C
	reverse	19	GAC ACA CAC AGC CTT TCC A
ANG	forward	21	CAG GTC AGG ATG CAG AAG ATG
	reverse	20	GGA TAG CTG TGC TTG TCT GG
ACE	forward	21	CAC CAA TTC CTC CAT GTT CAC
	reverse	21	TGT TAG AGA AGC CAA CCG ATG

Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1), angiotensin type 1a, b receptors (AT1a, b), angiotensinogen (ANG), and angiotensin converting enzyme (ACE).

#### 2. 4 リンパ節内のリンパ球フローサイトメトリー

両群からリンパ節(腸骨・腎臓)を摘出し、以下のプロトコールに従って、リンパ球のサブセット解析を行った。ポア70μmのメッシュを用いて各リンパ節からリンパ球を採取し1.0×10<sup>5</sup>/tubeに調整した。以下の抗体、CD32(FC receptor blocking, BD 550270), CD4-FITC (Biolegend, 201505),

CD8-PE ( Biolegend , 201705 ) , CD45R(B220)-PEcy7 (eBioscience, 25-0460-80)を用いた。FACS 解析は、Becton Dickinson FACSAria III を使用した。

### 3. 研究結果

#### 3.1 RDLV の% Dmax, % Dmin および% Amplitude に対するアンジオテンシン II とアンジオテンシン I の反応性検討

両群において摘出 RDLV は、6 cmH<sub>2</sub>O の内圧負荷によって安定した自発性収縮を示した。アンジオテンシン II (1~100 nM) は、用量依存的に% Dmax (Fig. 2A) および% Dmin (Fig. 2B) を減少させ、両群において有意な差は見られなかった。アンジオテンシン II (1~100 nM) は、用量依存的に% Amplitude を減少させ、NSD 群の% Amplitude は、HSD 群に比べて有意に低値を示した (Fig. 2C)。

アンジオテンシン I (1~100 nM) は、用量依存的に% Dmax および% Dmin を減少させた。HSD 群の% Dmax (Fig. 2D) は、HSD 群に比べて有意に低値を示したが (アンジオテンシン I 100 nM)、両群における% Dmin (Fig. 2E) に有意な差は認められなかった。アンジオテンシン I (1~100 nM) は、用量依存的に% Amplitude (Fig. 2F) を減少さ

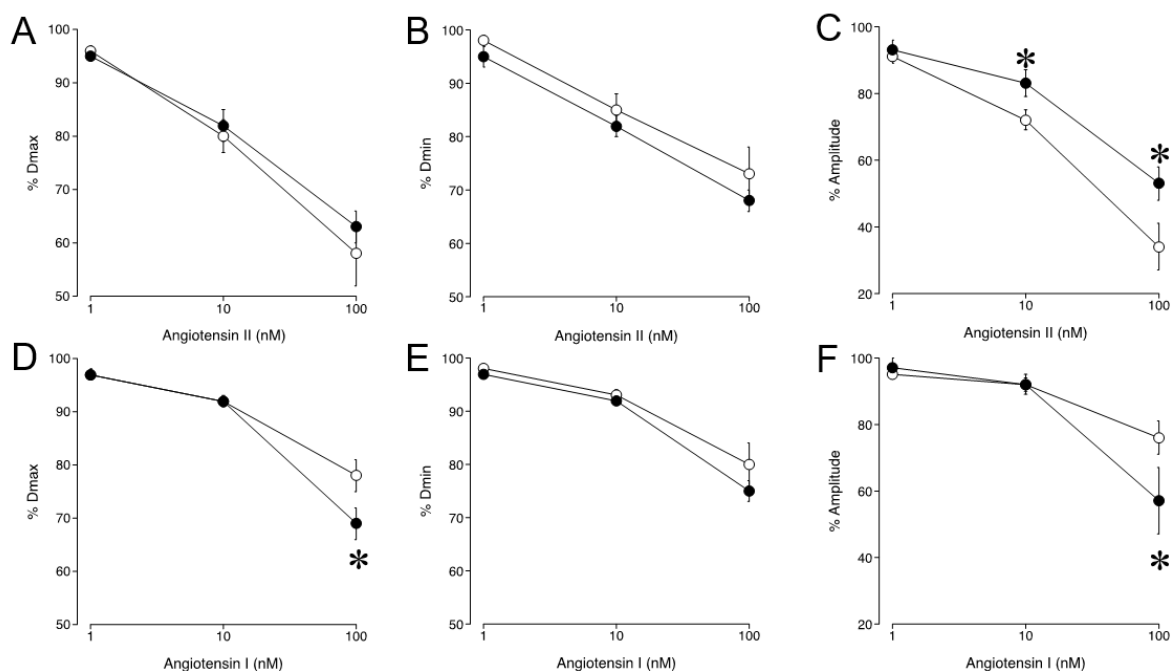
せ、HSD 群の% Amplitude を、HSD 群に比べて有意に減少させた (アンジオテンシン I 100 nM)。

#### 3.2 両群の RDLV における AT1a, AT1b, アンジオテンシノーゲン, ACE の mRNA のリアルタイム PCR 解析

HSD 群の AT1a, アンジオテンシノーゲン, ACE の mRNA レベルは、NSD に比べて高値を示す傾向にあった。一方、HSD 群の AT1b の mRNA レベルは、NSD に比べて低値を示す傾向にあった (Fig. 3)。

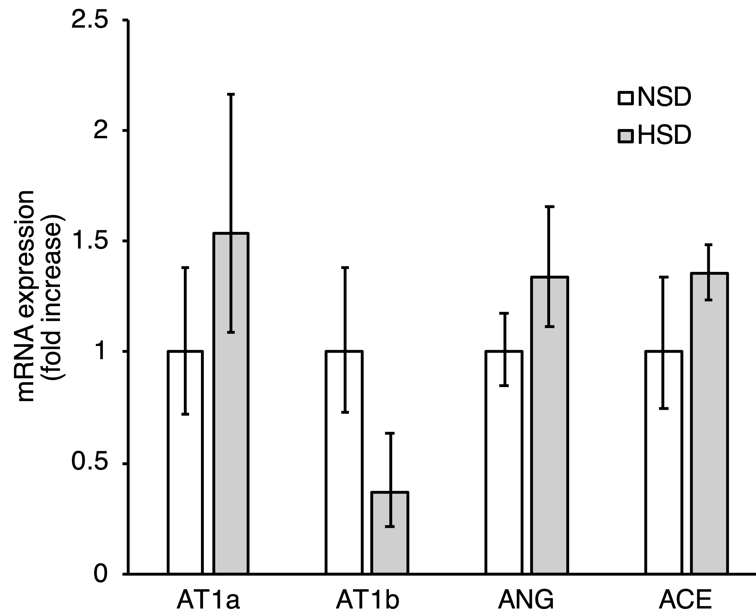
#### 3.3 両群のリンパ節(腸骨および腎臓)における総リンパ球数と細胞のサブセット解析

腸骨リンパ節における総リンパ球数は、両群において有意な差は、認められなかった (Fig. 4A, IL-NSD and IL-HSD)。一方、HSD 群の腎臓リンパ節における総リンパ球数は、NSD 群に比べて減少している傾向にあった ( $p = 0.06$ , Fig. 4A, RL-NSD and RL-HSD)。HSD 群腎臓リンパ節において、CD4+細胞数は減少、B 細胞数は増加する傾向にあった (Fig. 4B)。

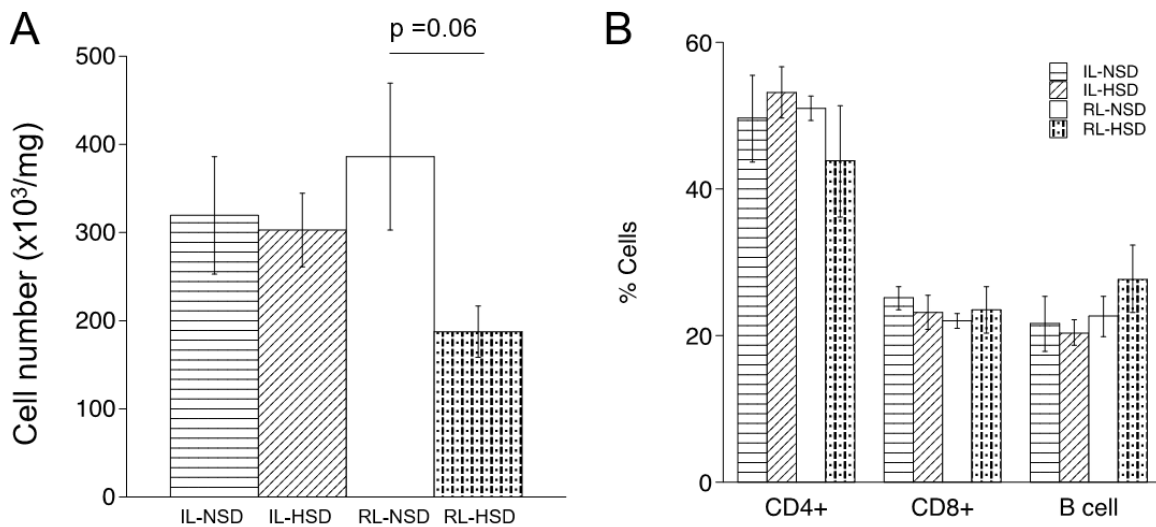


**Fig. 2** Changes in the parameters in mechanical activities of RDLV in response to angiotensin II and angiotensin I. Angiotensin II (1-100 nM, A: %Dmax, B: %Dmin, C: %Amplitude, n=6), Angiotensin I (1-100 nM, D: %Dmax, E: %Dmin, F: %Amplitude, n = 5).

Open and closed circles indicated NSD and HSD rats, respectively. \*:  $p < 0.05$  from NSD by 2way-repeated ANOVA followed by Holm-Sidak post-hoc test.



**Fig. 3** mRNA expression levels of angiotensin type1a receptor (AT1a), angiotensin type1b receptor (AT1b), angiotensinogen (ANG), and angiotensin converting enzyme (ACE) in the wall of RDLV in NSD (n = 6) and HSD rats (n = 6).



**Fig. 4** The total number of lymphocytes in the iliac (IL-NSD n = 4, IL-HSD n = 4) and renal (RL-NSD n = 4, RL-HSD n = 3) lymph nodes of NSD and HSD rats. B: Distribution of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and B cells in the iliac (IL-NSD n = 4, IL-HSD n = 4) and renal (RL-NSD n = 4, RL-HSD n = 3) lymph nodes of NSD and HSD rats.

#### 4. 考察

リンパは毛細リンパ管で産生され、その下流に連結する集合リンパ管のポンプ作用によって能動輸送される。ヒトにおいてもこの集合リンパ管平滑筋の自発性収縮は、リンパ管ポンプ作用の動力源として生理学的に必須の機能である<sup>6)</sup>。この集合リンパ管の自発性収縮は、下肢をはじめ多くの臓器・組織において観察されている。最近、ラットの

RDLVにも自発性収縮の存在が確認され、血管平滑筋同様に、様々な物質(ホルモン・神経伝達物質・利尿剤を含む薬物)による収縮制御を受けていることが報告されている<sup>12)</sup>。また腎臓リンパは、RASを調節するレニンやアンジオテンシンIを多量に含み、腎臓リンパ系が全身RASの調節に関与していることが知られている<sup>13)</sup>。しかしながら、この腎臓由来のRASがRDLVに与える影響は、全く解明

されていない。本研究は、RDLV における局所 RAS の関与を *ex vivo* の実験系で初めて明らかとし、さらに高食塩負荷がこの局所 RAS に影響を与える可能性を示唆するものである。本研究において高食塩負荷は、アンジオテンシン I による筋原性収縮のパラメーターである%Dmax を有意に増強した。その結果として高食塩負荷は、リンパ管ポンプ作用のパラメーターである%Amplitude を有意に低下させた。これは、アンジオテンシン I による RDLV 収縮が、RDLV の拡張性低下とリンパ輸送を減弱することを示唆する。高食塩負荷によって RDLV の ACE の mRNA レベルの上昇傾向を示したことは、このアンジオテンシン I の反応増強を一部サポートする。アンジオテンシンを始め多くの生理活性ペプチドは、ACE 以外の酵素(ネプリライシンなど)による調節制御を受けている。今後、高食塩負荷によるこれらの酵素の発現や関与を検討する必要があると考えられる。

最近、高血圧症の病態において、免疫細胞の関与が報告されているが<sup>(14)</sup>、高食塩負荷が腎臓リンパ節内の細胞構成に与える影響は未だ明らかではない。本研究では、高食塩負荷は腎臓からのリンパ流を受ける腎臓リンパ節においては、総リンパ球数の減少、またそのサブセットとして CD4+ の比率低下と B 細胞比率増加する傾向があることを示した。しかしながら、この現象が腎臓リンパ流による変化か、高食塩負荷による調節作用かは、明らかにすることが出来なかった。今後、リンパ管ポンプ作用によるリンパ流調節機構と免疫担当細胞との関連性も検討する必要があると考えられる。

## 5. 今後の課題

今後の課題は以下である。

1. NSD 群と HSD 群の RDLV における RAS を構成する分子のタンパク質発現を、ウェスタンブロットングで解析する。
2. NSD 群と HSD 群の腎臓リンパ節の FACS データを蓄積する。
3. RDLV におけるリンパ流測定方法を新たに確立する。
4. ブラジキニン-ACE 軸が、RDLV の機能調節に関与するかを検討する。

## 6. 文献

1. Mizuno R, Isshiki M, Ono N, Nishimoto M, Fujita T. A high salt diet alters pressure-induced mechanical activity of the rat lymphatics with enhancement of myogenic characteristics. *Lymphat Res Biol.* 2015, 13(1):2-9.
2. Mizuno R, Isshiki M, Ono N, Nishimoto M, Fujita T. A high-salt diet differentially modulates mechanical activity of afferent and efferent collecting lymphatics in murine iliac lymph nodes. *Lymphat Res Biol.* 2015, 13(2):85-92.
3. Mukohda M, Mizuno R, Saito F, Matsui T, Ozaki H. Hypertension is linked to enhanced lymphatic contractile response via RGS16/RhoA/ROCK pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2022, 323(6):H1118-H1129.
4. Mukohda M, Mizuno R, Ozaki H. Increased blood pressure causes lymphatic endothelial dysfunction via oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2020, 76(2): 598-606.
5. Breslin JW, Yang Y, Scallan JP, Sweat RS, Adderley SP, Murfee W. Lymphatic vessel network structure and physiology. *Compr Physiol.* 2018, 9: 207-299.
6. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, et al. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. *Nat Med.* 2009, 15: 545-552.
7. Lopez Gelston CA, Balasubramanian D, Abouelkheir GR, Lopez AH, Hudson KR, Johnson ER, et al. Enhancing renal lymphatic expansion prevents hypertension in mice. *Circ Res.* 2018, 122: 1094-1101.
8. Balasubramanian D, Gelston CAL, Lopez AH, Iskander G, Tate W, Holderness H, et al. Augmenting renal lymphatic density prevents angiotensin II-induced hypertension in male and female mice. *Am J Hypertens.* 2020, 33: 61-69.
9. Balasubramanian D, Baranwal G, Clark MC, Goodlett BL, Mitchell BM, Rutkowski JM. Kidney-specific lymphangiogenesis increases sodium excretion and lowers blood pressure in mice. *J Hypertens.* 2020, 38: 874-885.

10. Ono N, Mizuno R, Nojiri H, Ohhashi T. Development of an experimental apparatus for investigating lymphatic pumping activity of murine mesentery in vivo. *Jpn J Physiol.* 2000, 50(1):25-31.
11. Mizuno R, Ono N, Ohhashi T. Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in spontaneous activity of isolated lymph microvessels in rats. *Am J Physiol.* 1999, 277(4): H1453- H1456.
12. Shelton EL, Yang HC, Zhong J, Salzman MM, Kon V. Renal lymphatic vessel dynamics. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2020, 319: F1027-F1036.
13. Proud D, Nakamura S, Carone FA, Herring PL, Kawamura M, Inagami T, et al. Kallikrein-kinin and renin-angiotensin systems in rat renal lymph. *Kidney Int.* 1984, 25: 880-885.
14. Rucker AJ, Rudemiller NP, Crowley SD. Salt, hypertension, and immunity. *Annu Rev Physiol.* 2018, 80:283-307.

## Local RAS in the Renal Drainage Lymph Vessels Involves a Therapeutic Target for Salt-Sensitive Hypertension.

Risuke Mizuno

Laboratory of Veterinary Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Okayama University of Science

### Summary

The renal lymphatic system contributes to the regulation of intra-renal fluid homeostasis as well as pathogenesis of acute kidney disease, kidney fibrosis, polycystic kidney disease, hypertension, and kidney implantation. Roles of local renin-angiotensin-system (RAS) in the renal drainage lymph vessels (RDLV) still is not clear, although the kidney is the most important organs of pathogenesis in salt-sensitive hypertension via RAS imbalance. The purpose of the present study is to investigate that a high salt diet (4 weeks) for rats alter function of RDLV in response to angiotensin I or angiotensin II. Wistar rats (male, 4 weeks) were divided to normal salt diet (NSD) and high salt diet (HSD, 8% NaCl) groups. After 4 weeks treatment with NSD or HSD, we isolated the RDLV and lymph nodes in the iliac and renal regions, and then examined pharmacological (video-microscope system), biochemical (real time PCR), and immunological (FACS) studies. Angiotensin I (1-100 nM) or angiotensin II (1-100 nM) dose-dependently constricted RDVL of NSD and HSD rats. HSD significantly enhanced the angiotensin I-induced constriction of RDLV and slightly upregulated mRNA levels of angiotensin type I receptors, angiotensinogen, and angiotensinogen converting enzyme (ACE) in the wall of RDLV. The total number of lymphocytes in the renal lymph nodes of HSD rats were slightly less than those of NSD rats. We conclude that HSD may reduce distensibility of RDLV and suppress lymph drainage from the intra-renal space through the angiotensin I-mediated constriction of RDLV, suggesting that HSD influence cell population in the renal drainage lymph nodes of rats.