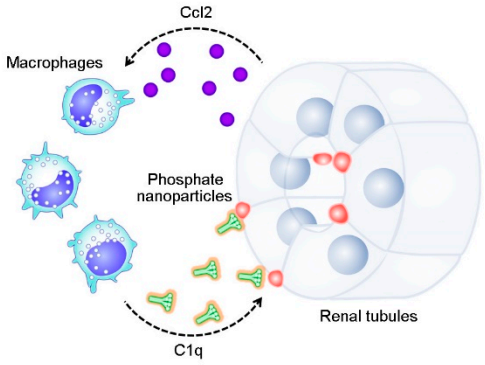
61　食塩感受性の分子基盤の解明	柴田　茂

【目的】高血圧は日本人の国民病であり、脳心血管疾患や腎臓病の進展を介して国民の健康に重大な影響を及ぼしている。高血圧は食塩の摂取量と密接に関連するものの、食塩摂取に伴う血圧上昇には大きな個人差があり、食塩摂取が心血管系や腎機能に及ぼす影響も一律ではない。このような食塩感受性の本態や、食塩感受性高血圧に伴う臓器障害の分子基盤については多くの未解明の領域が残されている。昨今、慢性腎臓病に合併する無機リン酸（以下リン）の代謝異常と臓器障害との関連が注目されているが、腎臓においては近位尿細管でナトリウムとリンが共輸送されている。本研究では、食塩感受性高血圧に合併する心腎障害におけるリン代謝異常の関与を検討した。

【方法】Dahl 食塩感受性高血圧ラットを用い、通常食飼育群（DSN）、高食塩食飼育群（DSH）、および腸管においてリンを吸着するスクロオキシ水酸化鉄を投与した群（DSH＋2.5%SF 群）にて検討を行った。4 週後に心・腎を採取し、組織所見や蛋白発現を比較検討するとともに、マイクロアレイにより網羅的に遺伝子プロファイルを解析した。また近位尿細管由来の NRK-52E 細胞を用いてリンの直接作用を検討した。

【結果】DSN 群と比較し DSH 群では有意な血圧上昇とアルブミン尿の増加が認められた一方で、DSH＋2.5%SF 群では血圧は DSH 群と同程度であったものの尿中アルブミン排泄は有意に軽減しており、組織所見においても腎障害の軽減が確認された。DSH 群では近位尿細管近傍に顕著な炎症細胞浸潤が認められたが、DSH＋2.5%SF 群ではこの所見が改善していた。本モデルでリン代謝に関連するパラメータについて詳細な検討を行ったところ、血中リン濃度については群間で有意差が認められなかったが、尿中リン排泄量ならびにリン排泄分画は DSH 群で有意に上昇していることが判明した。DSH＋2.5%SF 群ではこの変化が抑制されており、リン排泄分画と炎症細胞浸潤との間に有意な相関が認められたことから、リン排泄分画の変化が近位尿細管の炎症誘導と関連する可能性が考えられた。腎尿細管におけるナトリウム・リン共輸送体については、NaPi2a・NaPi2c ともに DSN 群と DSH 群では明らかな差異が認められず、DSH＋2.5%SF 群にて有意な上昇が認められた。心組織での検討では、DSH 群、DSH＋2.5%SF 群ともに同程度の心肥大が認められたが、炎症細胞の浸潤は DSH＋2.5%SF 群で有意に軽減していた。リン代謝異常と臓器障害との関連を明確にするため、近位尿細管細胞由来の NRK-52E での検討を行ったところ、リン添加によって炎症性サイトカインである Ccl2 の発現誘導が認められた。この変化は NaPi2a のノックダウンでは消失しなかった一方で、リン含有微粒子（phosphate-containing nanoparticle）の除去によって完全に抑制されたことから、calciprotein particle などのリン含有微粒子が近位尿細管で炎症誘導作用を有することが示唆された。最後に、マイクロアレイ解析により DSH 群と DSH＋2.5%SF 群の遺伝子発現を比較したところ、補体成分の遺伝子発現に差異が認められた。実際に DSH 群では主に近位尿細管近傍に C1q の沈着が認められたが、DSH＋2.5%SF 群ではこの変化が抑制されていることが明らかとなった。以上の解析から、食塩感受性高血圧ではリン代謝異常の合併が認められ、尿細管へのリン負荷がリン含有微粒子の形成を介して尿細管の炎症を誘導する可能性が示された。

食塩感受性高血圧とリン代謝異常による尿細管障害のメカニズム



61. 食塩感受性の分子基盤の解明

柴田　茂

帝京大学 医学部 内科学講座 腎臓研究室

Key words：食塩感受性高血圧，慢性腎臓病，リン代謝異常，ナトリウム・リン共輸送体

緒　言

本邦における高血圧患者は4,300万人に上ると推定され、脳心血管病や腎臓病の発症・進展に寄与する最大の要因となっている。高血圧とその合併症の制圧を阻む様々な要因の中で最重要課題のひとつが食塩感受性の問題である。高血圧が食塩の摂取量と密接に関係することは広く知られているが、食塩摂取に伴う血圧上昇や臓器障害の程度には大きな個人差があることも明らかとなっており「食塩感受性」、食塩摂取量が同程度であっても、心血管系や腎機能に及ぼす影響は一律ではないと考えられる。

食塩と高血圧の病態の関連において、中心的な役割を果たす臓器が腎臓である。遺伝学的研究の進歩に伴って食塩の再吸収を制御する分子の本体が次々と同定され、中心的課題はこれらの分子間ネットワークの解明に移行している。当研究室では食塩のハンドリングに関わる分子群の相互作用に焦点をあてて一連の解析を行い、翻訳後修飾を介した分子カスケードを明らかにしてきた［1］。一方で、食塩感受性の本態や、食塩感受性高血圧に伴う臓器障害のメカニズムについては十分に解明されていない。食塩感受性に関する様々な課題の中で、本報告では食塩感受性高血圧に合併する臓器障害における無機リン酸（以下リン）代謝異常の役割についての研究成果を詳述する。昨今、慢性腎臓病に合併するリン代謝異常と臓器障害との関連が注目されているが、腎近位尿細管ではナトリウムとリンが共輸送されている。我々は食塩感受性高血圧モデルに合併する心腎障害におけるリン代謝異常の関与を検討した［2］。

方　法

1. 食塩感受性高血圧における食塩代謝とリン代謝の相互作用の検討

Dahl食塩感受性ラットを用い、通常食飼育群（DSN）、高食塩食飼育群（DSH）、および腸管においてリンを吸着するスクロオキシ水酸化鉄を投与した群（DSH＋2.5%SF群）の3群にて検討を行った。3群全てで食餌中のリン濃度は一定（0.3% AIN-93G）とした。4週後に心・腎を採取し、組織所見や蛋白発現を比較検討するとともに、マイクロアレイにより網羅的に遺伝子プロファイルを解析した。

2. 培養近位尿細管細胞におけるリン負荷の影響の評価

ラット近位尿細管由来の培養細胞であるNRK-52E細胞を用いて、リン負荷による直接作用を検討した。

結果および考察

1. 食塩感受性高血圧モデルの腎障害におけるリンの病的役割

DSNと比較しDSH群では有意な血圧上昇が認められ、DSH＋2.5%SF群ではDSH群と同程度の血圧レベルであった（図1a～c）。DSH群では進行性に尿中アルブミン排泄の増加が認められ、4週にてDSN群と比較し有意に増加していた。しかしながらDSH＋2.5%SF群における尿中アルブミン量はDSH群よりも有意に低値であった（図1d～f）。

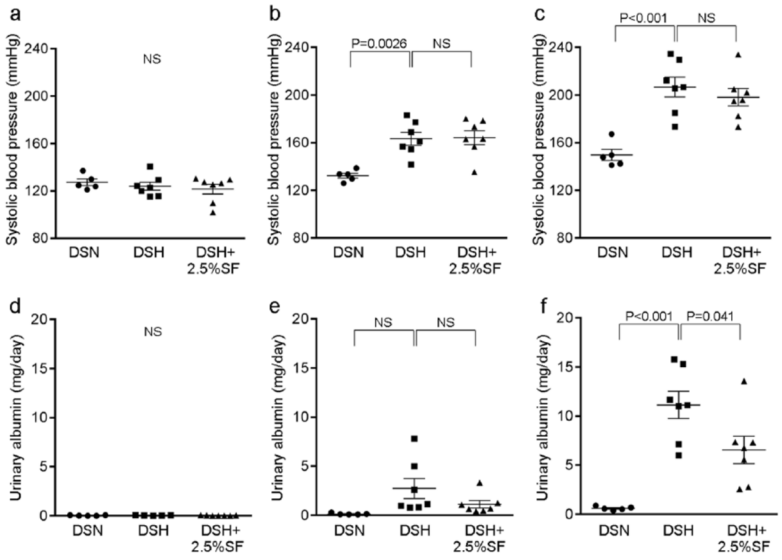


図 1. DSN、DSH、DSH＋2.5%SF 群における血圧と尿中アルブミン量の推移

a～c）a）実験開始時、b）2 週時、c）4 週時における収縮期血圧。

d～f）d）実験開始時、e）2 週時、f）4 週時における尿中アルブミン量。

ANOVA and Tukey post-hoc test。

DSH＋2.5%SF 群における腎障害の軽減は組織学的検討においても確認され、PAS 染色検体の評価では糸球体硬化ならびに尿細管間質障害は有意に軽減していた。さらに、CD68 陽性マクロファージならびに炎症性サイトカインである Ccl2・osteopontin・IL-6・IL-1β等を評価したところ、DSH 群と比較し DSH＋2.5%SF 群で有意に軽減あるいは軽減する傾向が認められた。DSH 群における炎症細胞の浸潤や Ccl2 の誘導は主に近位尿細管とその周囲に認められ、これらの変化が DSH＋2.5%SF 群にて軽減していた（図 2）。

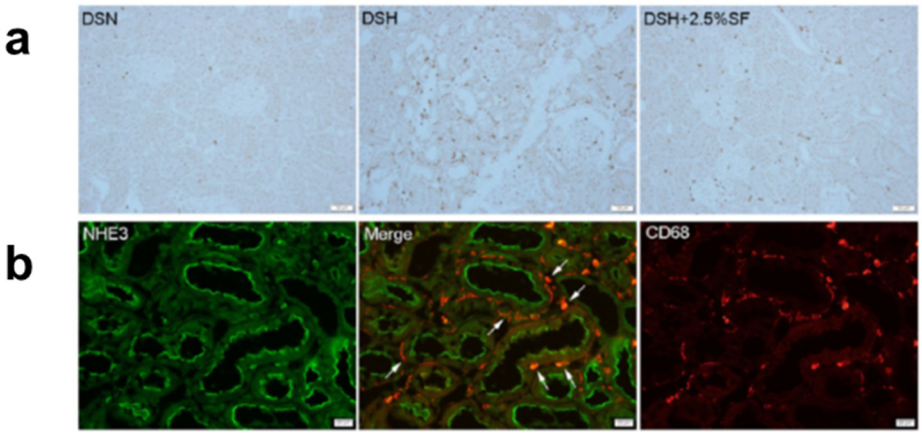


図 2. DSN、DSH、DSH＋2.5%SF 群の腎臓における炎症性変化

a）DSH、DSH、DSH＋2.5%SF 群における CD68 陽性マクロファージ（スケールバー：50μm）。

b）DSH 群における近位尿細管マーカ（NHE3、緑）と CD68 陽性細胞（赤）の二重染色。CD68 陽性細胞は近位尿細管近傍に認められた（矢印）（スケールバー：20μm）。

1. 食塩感受性高血圧モデルにおけるリン代謝とナトリウム・リン共輸送体（NaPi）の変化

DSH 群と DSH＋2.5%SF 群では血圧レベルに差異はなく、摂食量や塩分摂取量、尿中ナトリウム排泄量なども全て同程度であったことから、DSH＋2.5%SF 群における腎障害の軽減は血行動態とは独立したメカニズムが考えられた。そこで、リン代謝に関連するパラメータについて検討を行った。本モデルでは食餌中のリン含有量は一定であり、血中リン濃度については 3 群間で有意差が認められなかった（図 3a）。しかしながら、尿中リン排泄量ならびにリン排泄分画（FEPi）は DSH 群で有意に上昇しており、この変化は DSH＋2.5%SF 群ではほぼ完全に抑制されていた（図 3b、c）。FEPi と腎炎症性マーカとの間には有意な相関が認められ（図 3d～f）、ネフロンへのリン負荷が炎症のトリガーとなっている可能性が示された。尚、心肥大については DSH 群と DSH＋2.5%SF 群で明らかな差異が認められなかったが、心臓における炎症細胞の浸潤は DSH＋2.5%SF 群で有意に軽減していた。リン代謝に関連するホルモンについても検討したところ、FGF-23 は DSH 群で有意に上昇しており、DSH＋2.5%SF 群で抑制されていた（DSN 群：740.9±60.4 pg/ml、DSH 群：1193.0±147.6 pg/ml、DSH＋2.5%SF 群：371.3±44.1 pg/ml）。FGF-23 の受容体である Klotho は DSH 群で低下、DSH＋2.5%SF 群ではこの変化が抑制されており、腎障害を反映している可能性が考えられた。

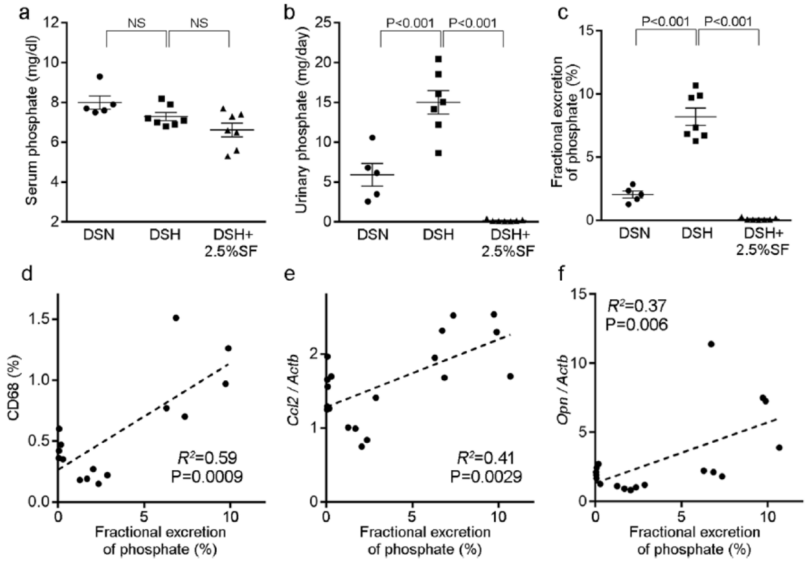


図 3. DSN、DSH、DSH＋2.5%SF 群における血清および尿中リンの変化

a～c）各群における a）血清リン濃度、b）尿中リン排泄、c）リン排泄分画の変化。ANOVA and Tukey post-hoc test。

d～f）リン排泄分画と腎組織 d）CD68 陽性エリア、e）Ccl2 発現、f）Opn 発現量との関連。Pearson's correlation test。

本モデルにて腎尿細管のリン輸送体についても評価した。近位尿細管における主要なナトリウム・リン共輸送体である NaPi2a および NaPi2c はどちらも DSH＋2.5%SF 群にて有意な発現上昇が認められたが、DSN 群と DSH 群では明らかな差異が認められなかった（図 4）。一方、同じく近位尿細管に発現するナトリウム輸送体である Na/H exchanger 3（NHE3）については DSN 群に比して DSH 群および DSH＋2.5%SF 群で抑制されていた。これらのことから、DSH 群における FEPi の増加にはリン輸送体発現の変化とは independent なメカニズムが寄与しているものと考えられた。DSH＋2.5%SF 群におけるナトリウム・リン共輸送体の変化は腸管におけるリン吸着の代償機転と思われる。DSH 群、DSH＋2.5%SF 群における NHE3 の抑制には食塩の負荷に伴う体液量の増加、レニン・アンジオテンシン系の抑制などが関与しているものと想定された。

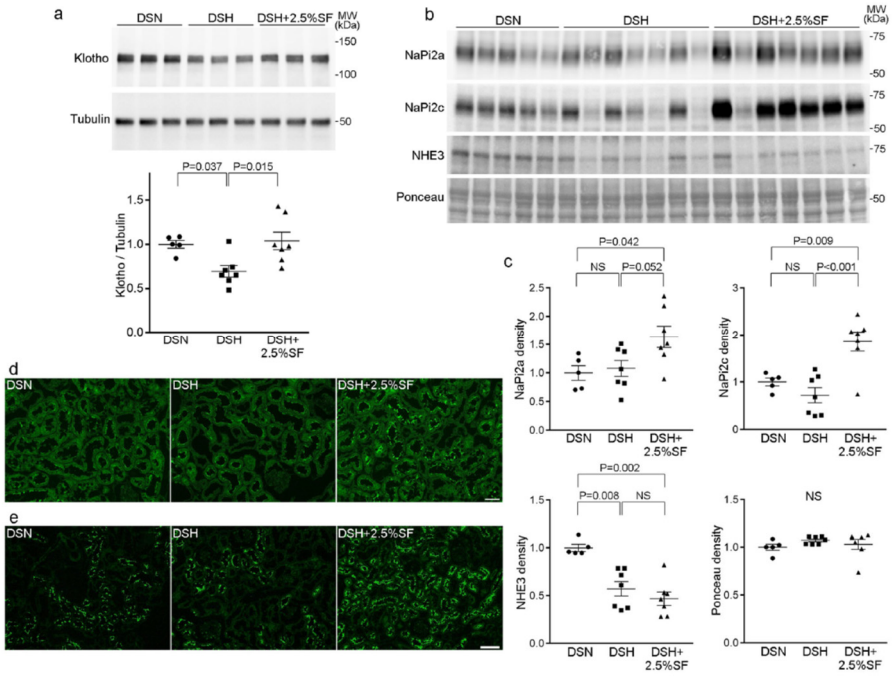


図 4. DSN、DSH、DSH＋2.5%SF 群におけるナトリウム・リン共輸送体の評価

a）各群における腎 Klotho の発現。

b）各群における NaPi2a、NaPi2c、NHE3 の発現。

c）NaPi2a、NaPi2c、NHE3 の定量的評価。

d）各群における NaPi2a の免疫染色（スケールバー：50μm）。

e）各群における NaPi2c の免疫染色（スケールバー：50μm）。

ANOVA and Tukey post-hoc test。

3. 近位尿細管におけるリン含有微粒子の炎症誘導作用と補体の役割

リン代謝異常と腎障害との関連をより明確にするため、培養細胞での検討を行った。ラット由来の近位尿細管細胞である NRK-52E をリンの存在下で培養したところ、6 時間、24 時間で有意な炎症性サイトカイン Ccl2 の上昇が認められた（図 5）。この変化は NaPi2a をコードする *Slc34a1* をノックダウンした NRK-52E においても消失しなかった（図 6）。そこで遠心法によりリン含有微粒子（phosphate-containing nanoparticle）を単離し、炎症誘導作用を検討したところ、リン含有微粒子を含む画分では Ccl2 誘導作用が認められた一方で、リン含有微粒子を除去した画分では Ccl2 の誘導作用が認められなかった（図 6）。以上の検討より、食塩感受性高血圧モデルで認められた尿細管へのリン負荷は、リン含有微粒子の形成を介して炎症性サイトカインを誘導することものと考えられた。

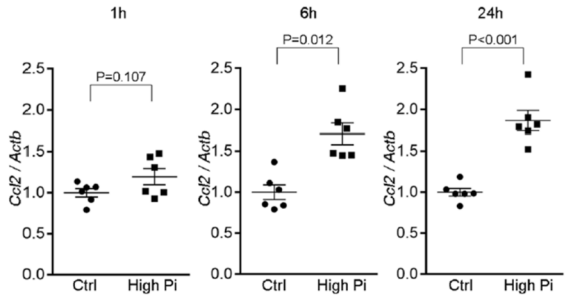


図 5. NRK-52E 細胞におけるリン添加の作用

リン添加後 1、6、24 時間で Ccl2 の発現量を評価した。Unpaired t-test。

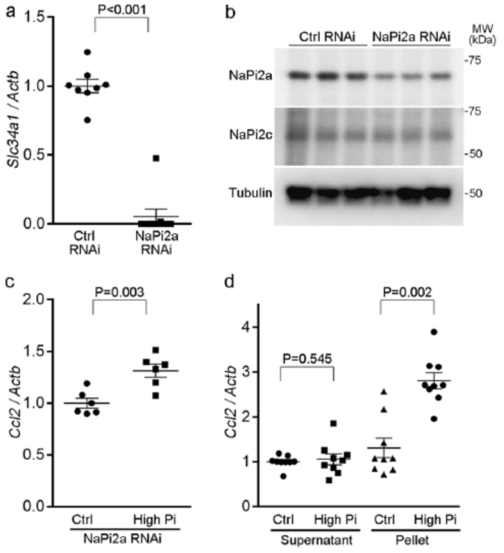


図 6. リン添加に伴う Ccl2 の誘導における NaPi2a とリン含有微粒子の役割

a、b） siRNA による Slc34a1 のノックダウン（a：mRNA、b：蛋白量の評価）。

c） *Slc34a1* ノックダウン NRK-52E 細胞におけるリンの作用。

d） リン含有微粒子非含有画分（supernatant）と含有画分（pellet）による Ccl2 の変化。

Unpaired t-test（a、c、d）。

炎症細胞がリン含有微粒子を認識する機構としてはスカベンジャー受容体の働きが示唆されているが、詳細については十分に明らかにされていない。そこで最後に、マイクロアレイ解析により DSH 群と DSH＋2.5%SF 群の遺伝子発現プロファイルを比較検討した。この解析により補体成分の遺伝子発現に差異が認められ、補体成分である C1q について評価したところ、DSH 群では主に近位尿細管近傍に C1q の沈着が認められた一方で、DSH＋2.5%SF 群ではこの変化が抑制されていることが明らかとなった。

以上の結果から、食塩感受性高血圧において食塩負荷が尿細管へのリン負荷を増大させ、phosphate-containing nanoparticle の形成を介して腎臓の炎症と組織障害を誘導することが明らかとなった。本モデルにおけるリン代謝異常を介した臓器障害は血圧の変化とは独立した機序に由来するものと想定され、食塩感受性高血圧に合併する心・腎障害を加速させている可能性がある。食塩が如何なるメカニズムによりリン代謝異常を惹起するのか、その詳細については更なる検討が必要と考えられる。

文　献

1） Ishizawa K, Wang Q, Li J, Yamazaki O, Tamura Y, Fujigaki Y, Uchida S, Lifton RP, Shibata S. Calcineurin dephosphorylates Kelch-like 3, reversing phosphorylation by angiotensin II and regulating renal electrolyte handling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Feb 19;116(8):3155-3160. doi: 10.1073/pnas.1817281116. Epub 2019 Feb 4. PMID: 30718414; PMCID: PMC6386661.

2） Wang Q, Ishizawa K, Li J, Fujii W, Nemoto Y, Yamazaki O, Tamura Y, Miura Y, Nie X, Abe R, Segawa H, Kuro-O M, Shibata S. Urinary phosphate-containing nanoparticle contributes to inflammation and kidney injury in a salt-sensitive hypertension rat model. Commun Biol. 2020 Oct 15;3(1):575. doi: 10.1038/s42003-020-01298-1. PMID: 33060834; PMCID: PMC7562875.