

フラボノイドによる食塩感受性高血圧抑制機序の解明 —アルドステロン異常制御とフラボノイドの作用機序—

新里直美*・丸中良典

京都府立医科大学大学院医学研究科

Suppressive Regulation of Salt-sensitive Hypertension by Flavonoids — Abnormal Regulation of Aldosterone-induced ENaC Gene Expression —

Naomi NIISATO and Yoshinori MARUNAKA

Graduate School of Medical Science,
Kyoto Prefectural University of Medicine Kyoto 602-8566

ABSTRACT

Renal Na^+ reabsorption has a crucial role in controlling blood pressure through regulation of mineral balance in our body. We have demonstrated that high salt diet causes hypertension through induction of renal epithelial Na^+ channel (ENaC) gene expression in Dahl-salt sensitive (DS) but not in Dahl salt-resistant (DR) rats, and that one of flavonoids, quercetin, suppresses high salt diet-induced ENaC gene expression. To clarify the regulatory mechanism of salt-sensitive hypertension and the quercetin action, we assessed regulation of ENaC mRNA expression in the kidney of DS rats by aldosterone and quercetin. Chronic high-salt-diet caused hypertension by increasing α -ENaC mRNA expression in DS rats with a reduction of plasma aldosterone. Simultaneous quercetin intake suppressed the high-salt-diet-induced hypertension in DS rats by reducing α -ENaC mRNA expression. Acute application of aldosterone to adrenalectomized rats reduced mRNA expression of β - and γ -ENaC in DS rats unlike DR rats, whereas aldosterone increased α -ENaC mRNA expression in both DS and DR rats. Furthermore, we found that aldosterone increased serum and glucocorticoid-regulated kinase 1 (SGK1) mRNA expression in DR rats but not in DS rats. Taken together, it is suggested that, in salt-sensitive hypertension, regulation of ENaC and SGK1 gene expression by aldosterone might be disturbed and that abnormal aldosterone regulation of Na^+ reabsorption in the kidney might be one of the factors to cause salt-sensitive hypertension by elevating plasma volume. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 147-152, 2006.

Key words : ENaC, quercetin, aldosterone

* 〒602-8566 京都市上京区河原町広小路上る梶井町465

体内ナトリウムは、体液量・血漿浸透圧や血圧調節に重要な役割を果たしており、腎臓の皮質集合管における上皮型ナトリウムチャネル (epithelial Na⁺ channel; ENaC) を介するナトリウム再吸収により緻密に制御されている。ENaCは α 、 β 、 γ の3つのサブユニットが、2つの α 、1つの β 、1つの γ で4量体を形成し、アミロライドという利尿剤に感受性のあるチャネルとして特徴付けられている。上皮組織を介するナトリウム再吸収は、管腔側のENaCを介するナトリウム流入過程と、血管側のNa⁺/K⁺ ATPaseを介するナトリウム排出過程により構成されている。一般に、腎尿細管におけるナトリウム再吸収の律速段階は、ENaCを介するナトリウム流入過程だと考えられており、多くの場合、ナトリウム再吸収の調節因子の標的は、律速段階を構成するENaCである。従って、体液量バランスを介した血圧調節機構においては、ENaCの活性・発現調節を解明することが重要である。ENaCは、これまでの研究成果からアルドステロンやインスリン、バゾプレッシンなどのホルモンや血漿浸透圧により、その活性や発現の調節を受けていることが知らされている。しかしながら、食塩感受性高血圧症とENaCの関係は未だ不明であった。

我々は、これまでに食塩感受性高血圧症モデルラット (Dahl salt-sensitive rat; DSラット) とその対照として食塩抵抗性ラット (Dahl salt-resistant rat; DRラット) を用い、高食塩摂取による腎皮質集合管でのナトリウム再吸収を担うENaCの遺伝子発現の亢進が高血圧症発症の一因であり、フラボノイドはENaCの遺伝子発現を抑制して、この食塩感受性高血圧症を抑えることを明らかにしてきた¹⁾。一般に、過剰な食塩を摂取すると、体液量 (血圧) の増大を感知してアルドステロンの分泌は抑制されてナトリウム再吸収も減少し、正常な体液量 (血圧) を維持する仕組みが備わっている。このようにENaCを介した腎ナトリウム再吸収は、血圧調節において重要な因子であり、我々のこれまでの報告で、食塩感受性高血圧症は、本来あるべき正常な血圧調節フィードバック機構が破綻しているために引き起こされると考えることができる。本研究では、DSラットでの高食塩食による血圧調節のフィードバック異常のメカニズムにアルドステロンを介したENaC遺伝子発現制御異常が関与しているという研究仮説の証明とその異常制御機構の解明、およびフラボノイドによるENaC遺伝子発現抑制メカニズムの解明をその研究目的とし、食塩感受性高血圧症のフラボノイド摂取による予防法の確立を目指すものである。

方 法

実験材料

①慢性実験系: DSラット (4 w) を1週間の予備飼育の後、4群に分け、普通食塩食 (0.3% NaCl)、普通食塩食 (0.3% NaCl) +ケルセチン (10 mg/kg BW)、高食塩食 (8.0% NaCl)、高食塩食 (8.0% NaCl) +ケルセチン (10 mg/kg BW) を与えて、4週間の血圧、尿成分を測定した。4週間後に、腎臓摘出と血液採取をした。摘出した腎臓はすぐに液体窒素で凍結させ、total RNAを抽出し、血中のアルドステロン、バゾプレッシン量を測定した。

②急性実験系: DS, DRラット (9 w) の副腎を摘出し、1週間普通食塩食と生理食塩水を与えた後、アルドステロン (1.5 mg/kg body weight) あるいはコントロールとしてアルドステロンの溶媒であるアルコール (400 μ l/kg body weight) を腹腔内に投与した。6時間後に腎臓摘出と血液採取をした。摘出した腎臓はすぐに液体窒素で凍結させ、total RNAを抽出し、血中のアルドステロン、バゾプレッシン量を測定した。

Realtime RT-PCR

total RNAからfirst strand cDNAを合成し、TaqMan probeプローブを用いてrealtime RT-PCRを行い、 β -actin遺伝子をコントロールとして各遺伝子の発現レベルを測定した。

ウェスタンブロット解析

凍結した腎臓をプロテアーゼ阻害剤を加えたLysis buffer中でホモジネートした後、4℃で1時間放置し、遠心分離して上清を実験に供与した。Cell lysateはSDS-PAGEで分離してからニトロセルロース膜に転写し、SGK1, PDK1, ERKの抗体あるいはリン酸化特異的認識抗体により各タンパク質の発現レベルとリン酸化レベルの測定をした。

なお、本実験は京都府立医科大学動物実験委員会の承認を受け行った。

結 果

長期的高食塩食による高血圧発症とアルドステロン分泌制御

「DSラットでの高食塩食による血圧調節のフィードバック異常のメカニズムにアルドステロンを介したENaC遺伝子発現制御異常が関与している」という研究仮説を考える上で、最初の疑問は、食塩感受性高血圧症の血圧調節フィードバックでの異常がアルドステ

ロン分泌にあるのではないかという仮説のもと、以下の実験を行った。そこで、DSラットに長期間（4週間）高食塩食を摂取させた。4週間後、血圧は著しく上昇しており、血中アルドステロン量を測定したところ、普通食塩食摂取ラットに比べて顕著に減少していた¹⁾。従って、DSラットにおいて、高食塩食摂取時のアルドステロン分泌制御機構に異常は認められなかった（Fig. 1）。また、長期的に高食塩食を摂取したDSラットの腎臓におけるENaC遺伝子発現は、アルドステロンが減少しているにもかかわらず、 α -サブユニットの発現が亢進していた（Fig. 2）。

アルドステロンによるENaC遺伝子発現制御異常

次に、食塩感受性高血圧発症に関与すると考えられるのは、アルドステロンによるENaC遺伝子発現制御異常である。そこで、副腎摘出したDSおよびDRラットにアルドステロンを投与し、ENaC遺伝子発現がどのように制御されているかをrealtime RT-PCRで検討した。アルドステロンを投与したラットでは、血中でのアルドステロン濃度は有意に増大していた（DR； 293 ± 67 pg/mL, DS； 359 ± 44 pg/mL）が、非投与ラットでは検出限界以下であった。その結果、DS、DRラット共にアルドステロン投与により α -ENaC発現は亢進していたが、DSラットでは、アルドステロン投与により β -、 γ -ENaCの発現が有意に減少してい

た²⁾（Fig. 3）。DRラットでは、 β -、 γ -ENaCの発現に変化は認められなかった。また、ナトリウム再吸収やENaCの制御に関与する因子の発現について検討したところ、serum and glucocorticoid-regulated kinase 1（SGK1）の発現はこれまでの知見どおりにDRラットではmRNA、たん白質レベルで増加していたが、DSラットでは増大は認められなかった。さらに、ENaC発現のネガティブな制御因子であるextracellular signal-regulated kinase（ERK）のmRNA、たん白質レベルでの変化はDS、DRラット共に認められなかった。

フラボノイドによるENaC遺伝子を介した血圧調節

これまで疫学調査においてフラボノイドを多く含有する食品（豆腐など）を継続して摂取すると、有意に血圧上昇を抑制する効果があることが知られていた。また、その原因として研究されてきたのは、循環器系の制御を介する血圧調節という観点からの研究であった。今回我々は、その効果の一因として腎臓におけるナトリウム再吸収制御に対する影響について検討した。実際に、DSラットに長期的に高食塩食を摂取させる際に、フラボノイドであるケルセチンを同時摂取

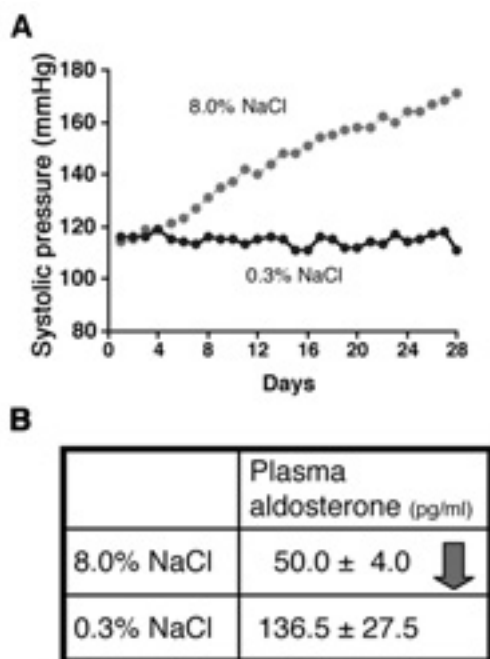


Fig. 1. Effects of high salt diet-induced hypertension and plasma aldosterone concentration.

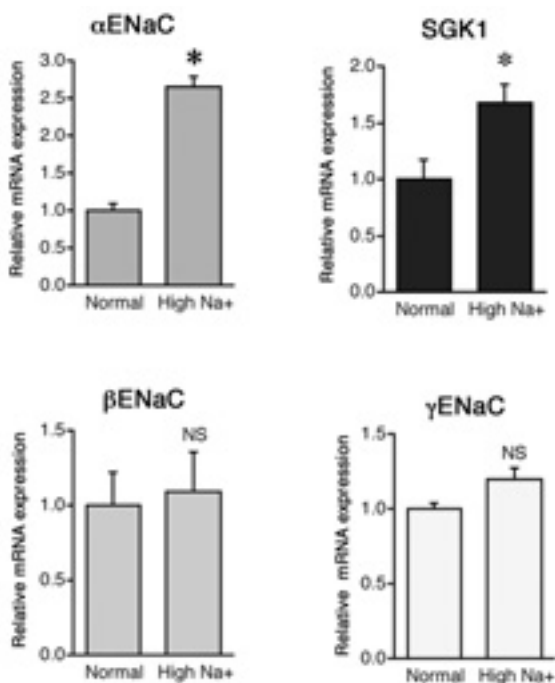


Fig. 2. Effects of high salt diet-induced ENaC and SGK1 mRNA expression. Alpha-ENaC and SGK1 mRNA expression increased, whereas plasma aldosterone decreased by high salt diet in DS rats.

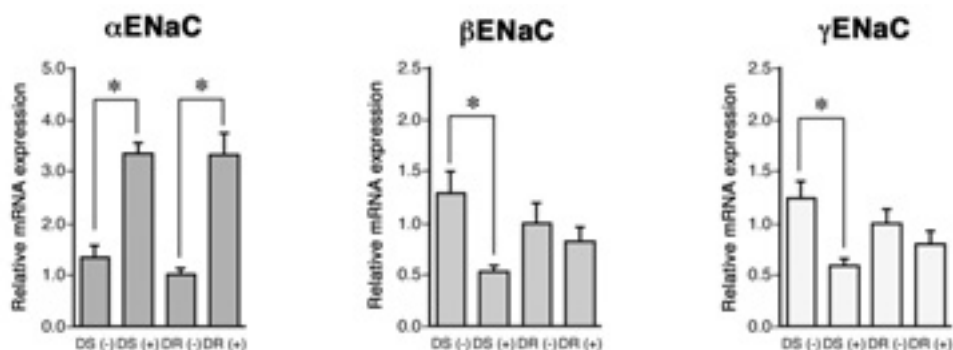


Fig. 3. Acute effects of aldosterone on ENaC mRNA expression in adrenalectomized DS and DR rats. In DS rats, the increased aldosterone caused reduction of beta- and gamma-ENaC mRNA expression.

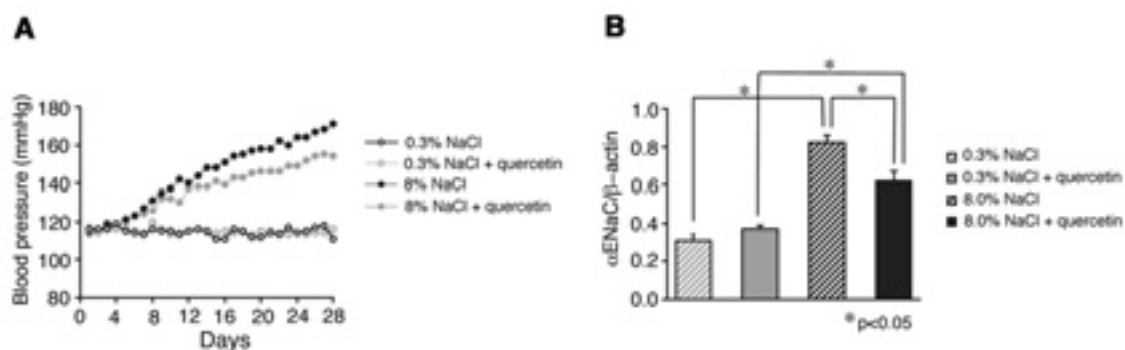


Fig. 4. Effects of quercetin on high-salt-diet-induced hypertension and alpha-ENaC mRNA expression. Simultaneous quercetin intake reduced high salt diet-induced hypertension by suppressing alpha-ENaC mRNA expression.

させると有意に血圧上昇を抑制することがわかり、 α -ENaCの遺伝子発現も有意に抑制していた¹⁾ (Fig. 4)。しかし、自然発症型高血圧症ラット (spontaneously hypertensive rat; SHR) が週齢を経るごとに上昇する血圧をケルセチンは有意に抑制することができず、ENaC発現にも影響を及ぼさなかった。また、腎臓の培養細胞を用いた系では、アルドステロンおよび細胞外浸透圧刺激により増大したENaC発現をケルセチンは有意に抑制し (Fig. 5, 6)、そのメカニズムには、細胞内クロライド濃度の制御が深く関わっていることが示された^{3,4)}。

考 察

正常人では、一定の範囲内であれば高食塩食を摂取してもアルドステロンの分泌を抑制してナトリウムを排泄し、高血圧症を引き起こさないよう恒常性が維持されている。この恒常性維持には、腎臓の遠位尿細管/皮質集合管でのENaCを介するナトリウム再吸収

が重要な役割を担っていることが知られている。しかし、食塩感受性高血圧症患者では、このような恒常性維持が破綻し、血圧が上昇すると考えられる。このメカニズムを解明するために、食塩感受性高血圧症モデル動物のDSラットとその対照のDRラットを用いてアルドステロンによるENaCの発現制御について検討したのが本研究である。長期的、短期的な実験で、DSラットでの食塩感受性高血圧発症には、アルドステロンによるENaC遺伝子発現の異常制御とそのことによる体内ナトリウムバランスの異常がその一因になると考えられる。また、食塩感受性高血圧症の一因と考えられるENaC遺伝子発現亢進をフラボノイドであるケルセチンは有意に抑制し^{3,4)}、そのメカニズムとして我々がすでに見いだしたケルセチンによる $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体の活性化⁵⁾を介した細胞内クロライド濃度制御であることが示唆された。

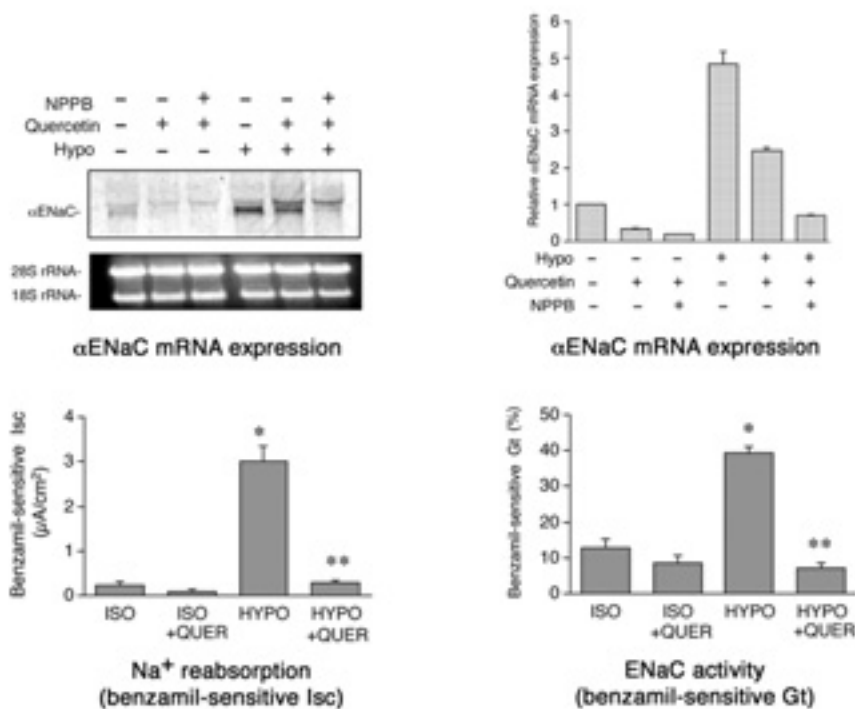


Fig. 5. Effects of quercetin on hypotonicity-induced alpha-ENaC mRNA expression and Na⁺ reabsorption in renal epithelial A6 cells. Quercetin treatment suppressed hypotonicity-induced alpha-ENaC mRNA expression and benzamil-sensitive short-circuit current.

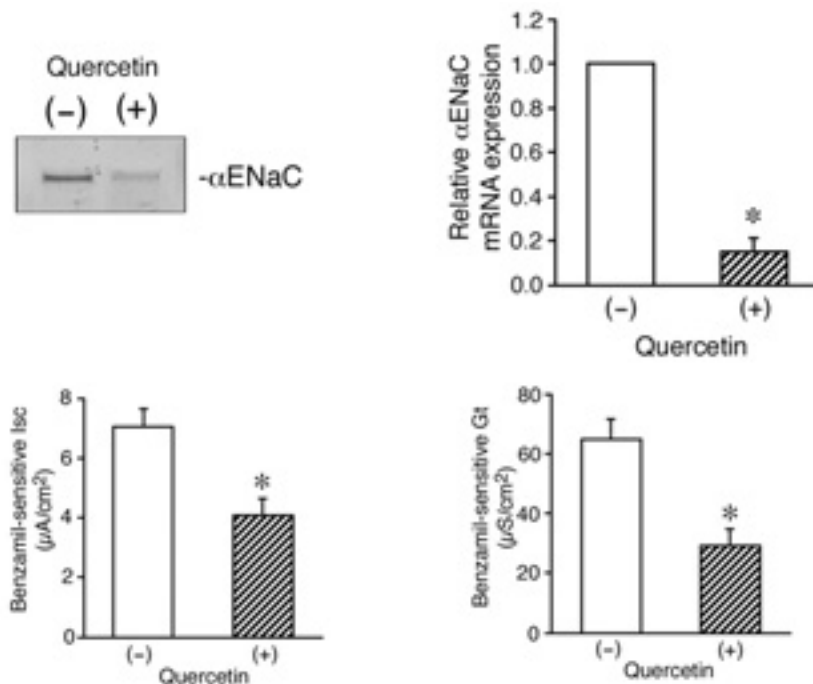


Fig. 6. Effects of quercetin on aldosterone-induced Na⁺ reabsorption and alpha-ENaC mRNA expression in renal epithelial A6 cells. Pretreatment with quercetin significantly suppressed aldosterone-induced Na⁺ reabsorption and alpha-ENaC mRNA expression.

要 約

本研究は、フラボノイドの新しい生理機能の探索と腎機能による体液量調節に着目して食塩感受性高血圧発症機構の解明を目的に行われた研究である。食塩感受性高血圧発症モデルラットでは、高食塩食摂取によるアルドステロン分泌制御は正常であったが、アルドステロンによるナトリウム再吸収に寄与する上皮型ナトリウムチャネル (ENaC) の遺伝子発現制御が破綻していることが明らかになった。つまり、高食塩食摂取により血中アルドステロンは低下しているにもかかわらず、ENaC遺伝子発現・ナトリウム再吸収が亢進し、体液量が増大して血圧上昇の一因になることを明らかにした。また、高食塩食摂取によるENaC遺伝子発現亢進と血圧上昇をフラボノイドであるケルセチンが抑制することを見出した。このように、新しい視点からの高血圧発症機序の解明の糸口とフラボノイドの新たな生理作用を示した研究である。

文 献

- 1) Aoi W, Niisato N, Miyazaki H and Marunaka Y (2004): Flavonoid-induced reduction of ENaC expression in the kidney of Dahl salt-sensitive hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 892-896.
- 2) Aoi W, Niisato N, Sawabe Y, Miyazaki H and Marunaka Y (2006): Aldosterone-induced abnormal regulation of ENaC and SGK1 in Dahl salt-sensitive rat. *Biochem Biophys Res Commun*, **341**, 376-381.
- 3) Fujimoto S, Niisato N, Sugimoto T and Marunaka Y (2005): Quercetin and NPPB-induced diminution of aldosterone action on Na⁺ absorption and ENaC expression in renal epithelium. *Biochem Biophys Res Commun*, **336**, 401-407.
- 4) Niisato N, Eaton DC and Marunaka Y (2004): Involvement of cytosolic Cl⁻ in osmoregulation of alpha-ENaC gene expression. *Am J Physiol Renal Physiol*, **287**, F932-939.
- 5) Niisato N, Nishino H, Nishio K and Marunaka Y (2004): Cross talk of cAMP and flavone in regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl⁻ channel and Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter in renal epithelial A6 cells. *Biochem Pharmacol*, **67**, 795-801.