

食塩感受性高血圧の発症における炎症細胞の役割

研究者氏名	教授 小室一成
日本所属機関	東京大学大学院医学系研究科循環器内科学
中国研究者氏名	教授 鄒 雲増
中国所属機関	復旦大学附属中山病院上海心血管病研究所

要旨

わが国には高血圧患者は約4,000万人いると言われている。日本、中国ともに食塩摂取量が多く、高血圧発症の大きな要因となっている。また、高血圧は心筋梗塞、脳卒中などの心血管疾患の原因として最も重要であることが知られているが、その成因については不明な点が多く残されている。私たちはこれまでに、高血圧による臓器障害としての心肥大および心不全の発症機序について共同研究を行い、これまでに数多くの研究成果を挙げてきた。そこで本研究では、高食塩食による血圧上昇の機序について、食塩感受性高血圧症モデルラット（Dahl ラット）と、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集による遺伝子改変ラットを用いて、炎症という観点から解析を行った。

8週齢の Dahl-S ラットに8%食塩添加飼料を与えると、3週間後に高血圧を発症するとともに、心肥大を呈することを tail-cuff 法による血圧測定や心エコーによる心機能評価により確認した。さらに、末梢血や脾臓、腎臓、心臓、腸における炎症細胞浸潤をフローサイトメトリーにより検討した。炎症の準用名メディエーターである IL-17 を CRISPR/Cas9 による遺伝子編集によりノックアウトした Dahl-S ラットおよび Sprague-Dawley (SD) ラットを作成し、食塩感受性高血圧の発症の有無について現在検討を進めている。

Key Words CRISPR/Cas9、Dahl ラット、IL-17、Th17 細胞、Treg 細胞

緒言:

わが国には高血圧患者は約4,000万人いると言われている。日本、中国ともに食塩摂取量が多く、高血圧発症の大きな要因となっている。平成23年（2011年）国民健康・栄養調査結果では、国民一人一日あたりの食塩摂取量は平均10.4g（男性11.4g、女性9.4g）であり、徐々に低下傾向にある。しかし、2012年策定の健康日本21（第2次）では、2022年までに国民の平均食塩摂取量を8.0gにすることが目標とされる一方で、2012年に発表された世界保健機構（WHO）のNa摂取量に関するガイドラインでは、一般成人の食塩摂取量を5g/日未満にすべきとされており、わが国の現状はこれらに遠く及ばない状況である。

また、高血圧は心筋梗塞、脳卒中などの心血管疾患の原因として最も重要であることが知られているが、その成因については不明な点が多く残されている。心臓は高血圧の最も重要な標的臓器の一つであり、高血圧と心臓病との関連性は強く、血圧水準が高いと心疾患の罹患率や死亡率が高くなる。わが国の心不全患者の登録研究であるJCARE-CARDによると、登録された心不全患者のうち高血圧の既往は52.6%にも見られる。高血圧の心臓における臓器障害は、後負荷の増大にともなう心肥大やリモデリングといった心筋への直接的な影響と、糖尿病や脂質代謝異常などの他の危険因子との相乗効果によって進行する冠動脈硬化の影響とがあるが、それらが複合的に作用することで心血管イベントのリスクが増大する。私たちはこれまでに、高血圧による臓器障害としての心肥大および心不全の発症機序について共同研究を行い、これまでに数多くの研究成果を挙げてきた。

近年、様々な病態における炎症の役割が大きな注目を集めている。炎症のプロセスには、感染や組織損傷

により誘導される急性炎症の機序だけでなく、組織への持続的なストレスによって軽度の炎症反応が誘導され、線維化などの組織リモデリングや機能障害を促進する慢性炎症の機序があることが明らかとなっている。

そこで本研究では、高食塩食による血圧上昇の機序について、食塩感受性高血圧症モデルラット（Dahl ラット）と、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集による遺伝子改変ラットを用いて、炎症という観点から解析を行った。

対象と方法:

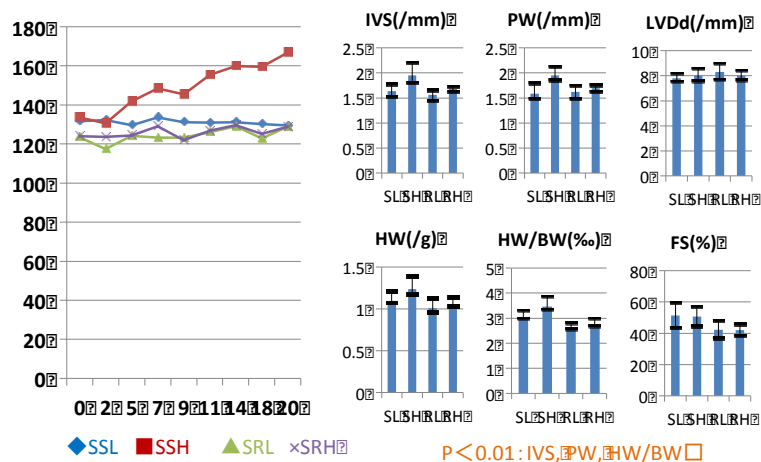
- 1) 高血圧モデルラットの作成 : Dahl-Iwai S (Dahl-S) ラット 8 週齢より 3 週間 8% 食塩添加飼料あるいは通常飼料を与え、tail-cuff 法により血圧を測定する。Dahl-Iwai R (Dahl-R) ラットをコントロールとして用いる。また、心エコー法により心肥大や左室収縮能を評価する。安楽死させた後で、心重量と体重を測定する。
- 2) 炎症細胞浸潤の評価 (qRT-PCR 法) : Dahl-S ラットおよび Dahl-R ラットに 8% 食塩添加飼料あるいは通常飼料を与え、安楽死させた後で各種臓器（小腸、大腸、皮膚、腎臓、脾臓）を摘出し、total RNA を抽出した後、qRT-PCR を行って *Il17a*, *Foxp3*, *Cd68*, *Rorc*, *Tgfb1*, *Il23p19*, *Il6* の遺伝子発現を比較検討した。
- 3) 炎症細胞浸潤の評価 (フローサイトメトリー法) : Dahl-S ラットおよび Dahl-R ラットに 8% 食塩添加飼料あるいは通常飼料を与え、安楽死させた後で小腸と腎臓を摘出し、フローサイトメトリーにより Th17+/CD3+CD4+ の Th17 細胞と Foxp3+/CD3+CD4+ の Treg 細胞の浸潤を比較検討した。
- 4) IL-17 ノックアウトラットの作成 : ラット *Il17a* 遺伝子に対する single-guide RNA を合成し、Cas9 mRNA とともに、Dahl-S ラットおよび SD ラットの受精卵にマイクロインジェクションを行い、胚を仮親ラットの卵管に移植、仮親から産仔を得た。Dahl-S ラットを用いたノックアウトラットの作成は日本側で行い、SD ラットを用いたノックアウトラットの作成は中国側で行った。

結果:

- 1) 高血圧モデルラットの作成 : Dahl-S ラットおよび Dahl-R ラットに、8 週齢より 3 週間 8% 食塩添加飼料あるいは通常飼料を与え、tail-cuff 法により血圧を測定した (図 1)。Dahl-S ラットは高食塩負荷後 7

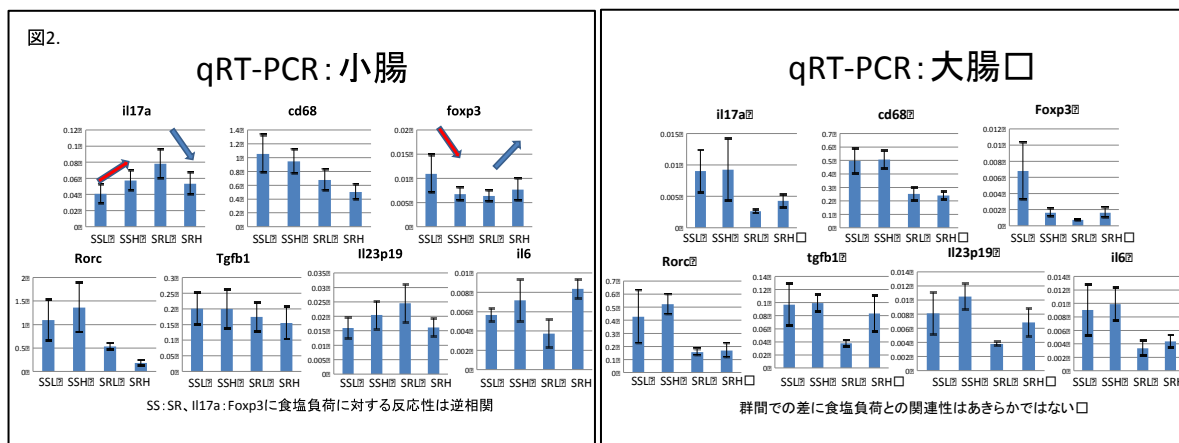
図 1. □

血圧変化と心重量変化 □



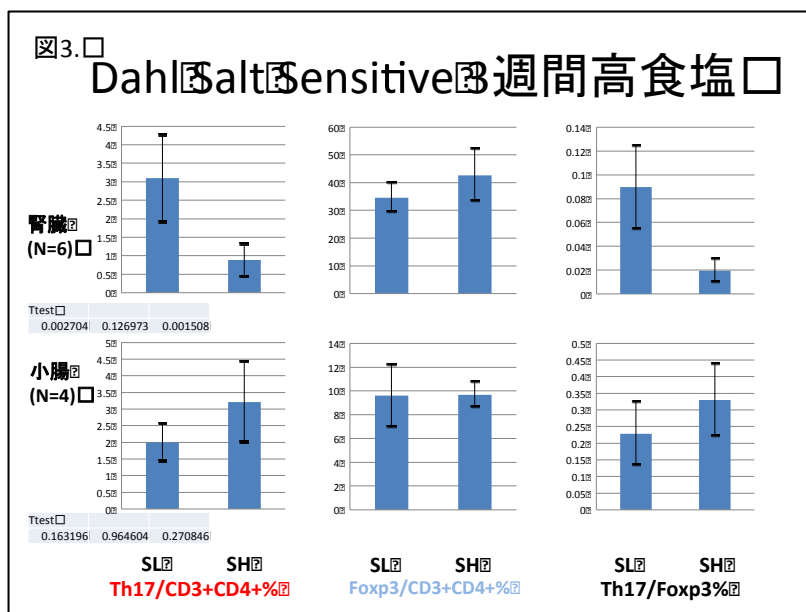
日目には血圧の有意な上昇を示した (SSH)。また、投与 3 週間後に行った心エコーでは、高食塩負荷を行った Dahl-S ラット (SH) で心室中隔厚 (IVS) や後壁厚 (PW) の有意な増加を認め、心体重比 (HW/BW) も有意に増加していた。ただし、左室内径短縮率 (FS) は有意な差は認めなかった。したがって、高食塩負荷を行った Dahl-S ラットは食塩感受性高血圧のモデルとして適していることが確認された。

- 2) 炎症細胞浸潤の評価 (qRT-PCR 法) : Dahl-S ラットおよび Dahl-R ラットに 8%食塩添加飼料あるいは通常飼料を与え、小腸、大腸、皮膚、腎臓、脾臓を摘出し、total RNA を抽出後した後に、qRT-PCR を行なって *Il17a*, *Foxp3*, *Cd68*, *Rorc*, *Tgfb1*, *Il23p19*, *Il6* の遺伝子発現を比較検討した。小腸と大腸において *Il17a* の発現が多く認められ、とくに小腸では *Il17a* と *Foxp3* の遺伝子発現は逆の変化を認めた (図 2)。しかし、いずれの臓器においても、食塩感受性との関連性において十分な差異を見出すことができなかった。qRT-PCR による遺伝子発現では炎症細胞浸潤の評価は困難と判断し、フローサイトメトリーでの評価を行うこととした。



- 3) 炎症細胞浸潤の評価 (フローサイトメトリー法) : Dahl-S ラットおよび Dahl-R ラットに 8%食塩添加飼

料あるいは通常飼料を与え、小腸と腎臓を摘出し、フローサイトメトリーにより Th17+/CD3+CD4+ の Th17 細胞と Foxp3+/CD3+CD4+ の Treg 細胞の浸潤を比較検討した (図 3)。Dahl-S ラットの



- 4) IL-17 ノックアウトラットの作成 : ラット *Il17a* 遺伝子に対する single-guide RNA を合成し、Cas9 mRNA とともに、Dahl-S ラットおよび SD ラットの受精卵にマイクロインジェクションを行い、胚を仮親ラットの卵管に移植、仮親から産仔を得た。Dahl-S ラットを用いたノックアウトラットの作成は日本側で行い、SD ラットを用いたノックアウトラットの作成は中国側で行った。

Dahl-S ラットは 3 ラインのノックアウトラットを得ることができ、Exon2 にそれぞれ 13 塩基、4 塩

基、7塩基の挿入変異を確認できている。今後は、Dahl-S ラットに対しては高食塩負荷、SD ラットに対しては DOCA-salt 負荷を行い、食塩感受性高血圧の発症の有無について検討を進めている。

考察:

食塩負荷や摂取により、IL-17 産生 T 細胞 (Th17 細胞) の分化が促進され、Th17 が病態に関与する多発性硬化症モデルで症状が悪化することが最近報告された (Nature. 2013;496, 513-517, 518-522)。Th17 細胞は腸管に多く存在することから、高食塩負荷により腸管で Th17 が活性化する可能性がある。高食塩負荷をしていない Dahl-S ラットに、高食塩負荷をした Dahl-S ラットから腎移植をすると食塩感受性を獲得することから、腎臓が食塩感受性高血圧発症のエフェクターとして重要であることが示唆されている。

私たちのフローサイトメトリーの解析結果からは、小腸で確かに Th17 細胞が増加するが、逆に腎臓では減少する傾向にあった。このことが食塩感受性高血圧の病態にどのような意義があるのかは、IL-17 ノックアウトラットにおいて食塩感受性高血圧の発症がどのような影響を受けるかを検討することで明らかとなる。現在、Dahl-S ラットを用いたノックアウトラットの解析を日本側で、SD ラットを用いたノックアウトラットの解析を中国でひきつづき行っている。

本研究を通して、食塩感受性高血圧の病態に炎症細胞、とくに Th17 細胞が果たす役割について大きな知見が得られることと期待される。

最後になりましたが、研究助成金をサポートいただいた公益財団法人日中医学協会に深く感謝申し上げます。

作成日 : 2016 年 3 月 14 日