

主論文の要約

**Sodium chloride promotes tissue inflammation via osmotic stimuli in subtotal-nephrectomized mice**

〔 腎不全マウスにおいて食塩負荷は、  
浸透圧刺激によって炎症を惹起する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：丸山 彰一 教授)

名倉 史子

## 【緒言】

慢性腎臓病（CKD）患者は、心疾患発症率や死亡率が高い。また、慢性炎症に関連した栄養障害や動脈硬化が問題となっている。血液透析患者を含むCKD患者では、炎症マーカーの高値がしばしば観察され、心血管予後、生命予後の予測因子と報告されている。CKD患者の炎症は克服すべき重要な課題であるが、そのメカニズムについては不明な部分が多い。近年、血液透析患者の下腿の皮膚や筋肉にNa<sup>+</sup>が蓄積しているという報告や、高塩分摂取はNa<sup>+</sup>やCl<sup>-</sup>の蓄積に伴う局所浸透圧の刺激でリンパ血管新生や自己免疫疾患を誘導するという報告がみられる。

我々は、末期腎不全患者の腹膜透析カテーテル挿入時に採取した腹膜組織にマクロファージが浸潤していることを見出し、腹膜透過性に強く相関することを報告した。CKD患者は減塩が守られていないことが多く、腎排泄も低下していることからNaが蓄積しやすい状態にある。しかし今日まで、腎不全状態における塩の臓器毒性に関しては、ほとんど研究がなされていない。

本研究では、食塩負荷が全身性あるいは局所の炎症の惹起に関わっているか、その進展メカニズムは何かを検討した。

## 【方法】

8-10 週齢の 129SvJ マウスの左腎 2/3 を摘出し、一週間後に右片腎摘を行い、5/6 腎摘を作製、腎不全にした。食塩負荷の方法は 1%食塩水を飲水させた。1) sham 手術 に水道水 (sham/水), 2) sham 手術に食塩水 (sham/塩), 3) 5/6 腎摘に水道水 (腎不全/水), 4) 5/6 腎摘に食塩水 (腎不全/塩)の 4 群を各々 2 週群と、4 週群にグループ分けした。血圧と体重を 2 週間毎に測定した。腹壁、心臓、大動脈周囲組織において、マクロファージ浸潤、MCP-1、IL-6 などの炎症、Sgk1 のミネラルコルチコイド受容体活性、NOX-2、NOX-4 の酸化ストレス、高浸透圧下で誘導される Tonicity-responsive enhancer binding protein (TonEBP)などの発現を免疫組織化学や real-time PCR 法を用いて検討した。腹壁における Na 含有量の測定も行った。全身炎症のマーカーとして血清 IL-6 を ELISA 法にて測定した。

塩負荷をキャンセルする実験として、腎不全塩負荷にフロセミド投与する実験、腎不全塩負荷 4 週間後に水に戻す実験を行った。また、MCP-1 の役割を検討するために野生型マウスと CCR-2 欠損型マウスを用いて、同様の腎不全塩負荷実験を行った。

中皮細胞 cell line である Met5A とヒト心筋細胞 (HCM)に Na190mEq/l の NaCl 刺激を行い TonEBP、MCP-1、Sgk1 の発現を real-time PCR 法を用いて解析し、さらに TonEBP siRNA を用いて抑制実験を施行した。

## 【結果】

腎不全/塩群と腎不全/水群において、血圧、血清クレアチニン値、血清 IL-6 は上昇していたが、両群に有意差は認めず。しかし、4 週腎不全/塩群では腹壁、心臓で CD68 陽性、ER-HR3 陽性マクロファージ浸潤が有意にみられた (Figure 1)。腹壁は CD68、

CD86、CD206、CD163 陽性マクロファージが各々2週群から有意に増加しており、心臓においては、CD68、CD206、CD163 陽性マクロファージの有意な増加を認めた。また、同群では IL-6、MCP-1 の発現増加 (Figure 2)、酸化ストレス応答に関わる NOX-2、NOX-4 mRNA の有意な増加も確認した。腹壁組織における Na<sup>+</sup>含有量は、腎不全/塩群で有意に増加していた (Figure 3a)。組織での Na 蓄積が証明されたため、高浸透圧下で誘導される転写因子である TonEBP を確認したところ、腎不全/塩群では、腹壁、心臓ともに発現が増加しており、Sgk1 の発現も増加していた (Figure 3b)。また、同群では心筋細胞の核内に移行している TonEBP の染色像を確認できた (Figure 3c)。腎不全/塩群で上昇した TonEBP、MCP-1、Sgk1、マクロファージ浸潤は、フロセミド投与により抑制された (Figure 4)。また、塩負荷をキャンセルする実験の二つ目として、腎不全作製後4週間の塩負荷後に、さらに4週間塩負荷を継続する群、水に変更する群とで比較検討した。水に変更した群では、腹壁、心臓において、マクロファージ浸潤の有意な減少を認め、さらに TonEBP、Sgk1、MCP-1 のいずれも有意な抑制が確認できた (Figure 5)。続いて MCP-1 増加がマクロファージ浸潤をきたすかを検証するために、野生型と CCR-2 欠損型マウスを用いた検討を行った。腎不全塩負荷モデル両群において、TonEBP、MCP-1、Sgk1 の発現に有意差は見られなかったが、CCR-2 欠損型においては組織マクロファージ浸潤が有意に減少していた (Figure 6)。これにより、腎不全塩負荷モデルにみられるマクロファージ集積には CCR-2 が必要であることを確認した。食塩負荷はアデニン誘発性腎不全モデルにおいても、同様に組織にマクロファージ浸潤をきたした。

Met5A と HCM に、Na190mEq/l の Na 刺激をすると MCP-1、Sgk1、TonEBP mRNA は増加した。TonEBP siRNA による抑制実験では TonEBP siRNA の濃度依存性に MCP-1、Sgk1 mRNA は抑制された (Figure 7)。これにより、MCP-1、Sgk1 は TonEBP の下流に位置することを示した。

### 【考察】

本研究では、塩負荷は TonEBP-MCP-1 pathway を介してマクロファージ浸潤をきたし、炎症を惹起することを示した。腎不全/塩群では腹壁、心臓、大動脈周囲の3か所の組織で炎症を確認した。組織の Sgk1、NOX-2、NOX-4 mRNA が増加していたことから、塩負荷によるミネラルコルチコイド受容体の活性化や酸化ストレスも炎症に影響していたと考えられた。アデニン誘導性腎不全モデルにおいても同様の現象を確認した。

フロセミド投与実験や4週目から塩水を水に変更する塩負荷抑制実験では、組織炎症が軽減しており、塩負荷が炎症に密接に関与していると考えられた。高塩分摂取により、皮膚や軟部組織に Na<sup>+</sup>蓄積が生じることが動物やヒトで報告されている。TonEBP は、腎臓髄質における高浸透圧に対する細胞の保護的な作用をもつ転写因子として報告されたが、現在は全身の臓器の細胞に発現が認められている。本研究でも、腎不全/塩群において、組織の Na<sup>+</sup>蓄積や TonEBP の発現増加が確認され、局所の浸

透圧上昇が予測された。この結果は、血液透析患者の下腿に  $\text{Na}^+$  が貯留しているという報告と一致する。In vitro では食塩刺激下に TonEBP siRNA 実験を行い、増加していた MCP-1 が抑制されたことから、TonEBP-MCP-1 pathway を明らかにした。

腎不全患者の高食塩摂取は血圧上昇に関連している。血圧の影響を最小限にして初期の炎症を評価するため、腎不全/塩群と腎不全/水群で血圧に有意差がつかなかった 4 週群での解析をした。また 5/6 腎摘腎不全モデルよりも血圧上昇が緩徐なアデニン腎不全マウスにおいても、同様に塩群では組織炎症を確認できた。

腎不全において、高食塩摂取は TonEBP を介して局所のマクロファージ浸潤を誘導する重要な因子であることを示した。今後、TonEBP を介したシグナル経路が腎不全にみられる炎症に対する治療ターゲットとなる可能性がある。

### 【結論】

腎不全の予後を規定する炎症は、腎不全に加え、塩分負荷に密接に関連することが明らかとなった。この組織内炎症誘導に、TonEBP-MCP-1 pathway が関与していることを示した。