

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	山内 崇宏
学位授与の条件	学位規則第4条第㉑・2項該当		
論文題目 Na ⁺ -Cl ⁻ cotransporter-mediated chloride uptake contributes to hypertension and renal damage in aldosterone-infused rats (Na ⁺ -Cl ⁻ 共輸送体を介したクロライド輸送はアルドステロン投与ラットの血圧上昇と腎障害に関与する)			
論文審査担当者			
主 査	教授	吉栖 正生	印
審査委員	教授	田中 信治	
審査委員	准教授	石田 万里	
〔論文審査の要旨〕			
<p>食塩は高血圧の発症・進展に関与する因子であるが、その感受性は個体や個々の病態によって異なる。食塩はナトリウムとクロライドからなり、近位尿細管およびヘンレ係蹄での再吸収が量的に重要であるが、遠位尿細管・集合管の一部での再吸収はアルドステロンを介して調節され、質的な重要度は高いプロセスであると考えられている。食塩感受性高血圧の成因および進展の一部には、後者に存在し、アルドステロンによる制御を受けると考えられているナトリウム-クロライド共輸送体（NCC）や上皮ナトリウムチャネル（ENaC）、ペンドリン（pendrin）などの輸送体に関与すると考えられる。</p> <p>従来は食塩感受性をナトリウム感受性と呼称するなどナトリウムに関心が払われてきた。一方で食塩感受性動物において、クロライドを欠くナトリウム負荷は血圧を上昇させないことや、クロライドの負荷は腎血管を収縮させるなどが知られている。これらの結果は、食塩感受性高血圧の成因にクロライドの存在が重要であることを示唆しているが、クロライドの輸送体に与える影響については検討されていない。</p> <p>近年、食塩の過剰摂取が腎臓においてヘルパーT17細胞由来のインターロイキン-17A（IL-17A）を介した炎症を引き起こすことが示されている。同教室の研究では、アルドステロン投与によって食塩感受性を亢進させたラットで、高血圧の進展に慢性炎症が重要な働きを示すことを過去に報告した。したがって、クロライドが炎症を惹起する経路について解明することで食塩感受性高血圧の病態解明につながると期待される。</p> <p>本研究では、尿細管での再吸収により惹起される食塩感受性という観点からクロライドの役割を検証することを目的とした。アルドステロンで誘導された食塩感受性高血圧ラットにおいて、遠位尿細管～集合管の輸送体のナトリウム/クロライド輸送と血圧上昇、炎症、および腎障害への関与を検討した。</p> <p>8週齢雄性 Sprague-Dawley ラットに対して片腎摘出後に皮下に植え込んだ浸透圧ポンプを用いてアルドステロンの薬液注入を行い、食塩感受性モデルを作製した。</p> <p>実験1；通常飼料（含有食塩量0.3%）を摂取させた条件で、1.0%食塩、1.44%炭酸水素ナトリウム、蒸留水を各群ラットに自由飲水させて血圧測定を行い、6週間後の</p>			

腎組織を検討した。収縮期血圧、尿蛋白量の定量を行ったところ、炭酸水素ナトリウム群では食塩群と比較して血圧上昇、尿蛋白量は軽度であった。また、膜分画における輸送体蛋白 α ENaC、pendin、NCC、リン酸化 NCC の発現をイムノブロットで比較したところ、炭酸水素ナトリウム群では食塩群と比較して NCC やリン酸化 NCC の膜分画への誘導は低下し、一方で α ENaC や pendin は有意な差を認めなかった。

腎障害の程度を評価するため、固定染色（Hematoxylin Eosin 染色、Periodic acid-Schiff 染色、Masson-Trichrome 染色）で組織の障害を比較した。さらにより特異的な障害評価のため、Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling 法で細胞死の評価を、免疫組織染色で線維化マーカーである平滑筋 α アクチン (α SMA：筋線維芽細胞マーカー)、1 型コラーゲン (collagen type1：線維基質マーカー) の評価を行った。また、 α SMA の蛋白発現をイムノブロットで比較した。炎症のマーカーとして CD3 (T 細胞マーカー)、CD68 (マクロファージ/単球のマーカー) を免疫組織染色で、IL-17A の蛋白発現をイムノブロットで比較した。いずれの所見においても、炭酸水素ナトリウム群では食塩群と比較して組織の障害、線維化、細胞死、炎症マーカーは軽減していた。

実験 2；アルドステロン持続投与ラットに調製食を与え同様に観察・比較した。調整食は 8.0%高塩分食（高クロライド食）と、同じナトリウム含有量で含有クロライドが半分になるようにクエン酸ナトリウムを調整して作製した半クロライド食との比較を行った。観察期間中の食餌摂取量、体重変化、尿中のナトリウム排泄量は高クロライド食と半クロライド食ではほぼ同等であり、クロライドの排泄量のみ差があることを確認したうえで血圧の推移を観察した。半クロライド食では高クロライド食に比べ血圧上昇は軽度であった。実験 1 と同様に膜分画における α ENaC、pendin、NCC、リン酸化 NCC の蛋白発現をイムノブロットで比較した。リン酸化 NCC の膜分画への誘導は、同等のナトリウムの摂取条件下においてクロライド摂取量に依存していた。

実験 3；アルドステロン/食塩ラットに hydrochlorothiazide (HCTZ) を投与し、NCC 阻害による病態改善効果を検討した。収縮期血圧、尿蛋白量および α SMA、IL-17A の蛋白発現をイムノブロットで比較した。HCTZ による NCC の阻害は高血圧性の腎障害および T 細胞を介した炎症を抑制していた。膜分画におけるナトリウム、クロライドの輸送体 (α ENaC、pendin、NCC、リン酸化 NCC) の発現をイムノブロットで比較したところ、HCTZ は NCC およびリン酸化 NCC の膜分画への誘導を強力に抑制した。

以上の結果から、 α ENaC や pendin に比較して NCC が血圧上昇や炎症、腎障害に関連していることが明らかとなり、また NCC 阻害薬である HCTZ の投与により NCC、リン酸化 NCC の発現の抑制と共に血圧上昇および腎障害が抑制された。

以上より、食塩感受性高血圧動物モデルにおける尿細管の輸送体、特に NCC の活性化に焦点をあてクロライドの影響を検討することで、塩化ナトリウムが腎障害に関与する一方でその他のナトリウム塩は高血圧症における腎障害を進展させにくいことが示された。

これらの内容から、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。

第9号様式

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	山内 崇宏
学位授与の条件	学位規則第4条第④・2項該当		
論文題目			
Na ⁺ -Cl ⁻ cotransporter-mediated chloride uptake contributes to hypertension and renal damage in aldosterone-infused rats (Na ⁺ -Cl ⁻ 共輸送体を介したクロライド輸送はアルドステロン投与ラットの血圧上昇と腎障害に関与する)			
最終試験担当者			
主 査 教 授	吉 栖 正 生	印	
審査委員 教 授	田 中 信 治		
審査委員 准教授	石 田 万 里		
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年5月7日の第74回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年5月1日本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 モデル作製で配慮した点とそのモデルとしての妥当性・再現性について 2 低カリウム血症の意義とカリウム補充を行った場合に予測される変化 3 NCCのリン酸化の機序、動態について 4 食塩感受性モデルで血圧のみを調整した場合、腎障害の程度に差はあるのか 5 実臨床において、どのように利尿薬を選択すべきか <p>これら試問に対して適切に回答し、本委員会が学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			