

補体 C3 の高血圧病態への関与(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
内科系内分泌代謝内科学専攻

根岸 英理子

修了年 2017 年

指導教員 相馬 正義

本態性高血圧モデル動物である高血圧自然発症ラット *spontaneously hypertensive rats (SHR)* は間葉系組織が合成型に形質変換している事が認められている¹⁻²⁾。その原因として補体 C3 が関与している事がわかってきた。SHR の間葉組織で過剰発現した補体 C3 は、形質を合成型にし、間葉組織からの Ang II 産生と間葉系細胞の増殖亢進を起こしていた。³⁾。一側腎尿管結紮(UUO)モデルにおいて発現が亢進した補体 C3 は、尿細管上皮細胞を間葉系細胞に上皮間葉化する現象(EMT)を起こし、脱分化した間葉細胞はレニンと Ang II を産生しており、腎内 RA 系を活性化している事が判明した⁴⁾。以上より、補体 C3 は上皮間葉化現象(EMT)から組織レニン・アンジオテンシン(RA)系を活性化し高血圧に関与している事が認められた。

高血圧性腎硬化症における補体 C3 の役割を検討するため、今回の研究では SHR からジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)法を用いて C3 ノックアウト(KO) SHR/Izm を系統樹立した。C3 KO SHR 系統樹立の確認のため、PCR 増幅産物を電気泳動で比較し、C3 遺伝子領域における塩基対の欠損を確認した。また 8 週齢の腎皮質における補体 C3 発現をウエスタンブロット法にて検討した。補体 C3 蛋白 α chain は WKY ラット、SHR 由来腎皮質でのみ発現しており、C3 KO SHR 由来腎皮質では発現していないことが確認された。血清補体価 CH50 測定では、SHR の CH50 は WKY に比して高く、C3 KO SHR では低値であった。これらから補体 C3 がノックアウトされ発現していないことが確認された。

WKY ラット、SHR、C3 KO SHR を正常塩分(正塩)および 1% 高食塩水(高塩)負荷し、血圧、心血管腎臓の組織を比較した。In vitro で腎メサンジウム細胞(MC)の増殖能、合成型形質マーカーを評価した。

正塩と高塩を負荷した 4 週齢から 20 週齢のラットの収縮期血圧を Tail cuff 法で測定した。正塩負荷では C3 KO SHR と同週齢 SHR の収縮期血圧は同等であった。

SHR では正塩負荷群に比し高塩負荷群で血圧上昇がみられ塩分感受性高血圧を示した。高塩負荷下 C3 KO SHR では高塩負荷下 SHR に比較して有意 ($P < 0.05$) に血圧が低く、塩分感受性が SHR より低下しており、補体 C3 が SHR の塩分感受性高血圧に関与している事が確認された。また、8 週齢から 20 週齢時に 48 時間テレメリー法で血圧測定を行った。Tail Cuff 法と同様、正塩での SHR と C3 KO SHR の血圧は同等であった。テレメリー法による塩分感受性の評価は、16 週齢測定後、高塩負荷を 1 週間行い 16 週齢の測定結果との差で評価した。SHR では WKY に比し有意 ($P < 0.05$) に血圧上昇がみられ塩分感受性を示したが、C3 KO SHR では塩分感受性が SHR より有意 ($P < 0.05$) に低下していた。この事より、SHR の塩分感受性高血圧に内因性 C3 の高発現が関与していると考えられた。

今回の研究では、高塩負荷下 SHR の腎内 Ang II が C3 KO SHR に比較し有意に高値であった。腎内 RA 系亢進により産生された腎内 Ang II が、SHR での塩分感受性に関与している可能性がある。

SHR の塩分感受性高血圧には RA 系の亢進、ノルエピネフリン、ドパミン、Na 排泄異常などが複雑に絡み合っていることが予想される。食塩感受性高血圧患者では、食塩摂取時に交感神経系の不適切な緊張が生じ、腎臓の交感神経活動が亢進すると想定されている⁵⁾。交感神経系には脳から末梢組織への遠心線維のみならず、腎から脳への求心線維が存在する⁶⁾。最近カテーテルアブレーションによる腎除神経がヒトの治療抵抗性重症高血圧に臨床応用され効果を認めている。これは腎臓から脳への求心交感神経系活性による血圧上昇があることを意味している。また、SHR ではノルエピネフリン投与による血圧上昇が塩分により増強される報告がある⁷⁾。今回我々は高塩負荷下で WKY ラット、SHR、C3 KO SHR の尿中ノルエピネフリン排泄量を比較した。SHR では WKY ラットに比し尿中ノルエピネフリン排泄量が著明に増加し、C3 KO SHR では尿中ノルエピネフリン排泄量が低下していた。このことから SHR で亢進

している補体 C3 が腎尿細管の間葉化から腎内 RA 系を活性化し、この活性化した腎内 RA 系が求心交感神経系活性を刺激し、塩分感受性高血圧を起こしていると考えられた。

また、我々は正塩負荷、高塩負荷での尿中 Na 排泄量を比較検討した。SHR と WKY とでは、正塩負荷、高塩負荷ともに SHR で WKY に比し尿中 Na 排泄量が高値であった。SHR と C3 KO SHR を比較すると、正塩負荷では尿中 Na 排泄量がほぼ変わらず、高塩負荷では SHR が C3 KO SHR に比し尿中 Na 排泄量が高値であった。

SHR では内因性ジギタリス用物質とドパミン産生が亢進し、腎臓では尿細管 Na-K-ATPase を抑制して Na 利尿を起こすことが報告されている。そして内因性ジギタリス用物質とドパミンは、血管壁に対しては細胞内 Ca 濃度を上昇させて血管壁を収縮し、血圧を上昇させる作用を持つ⁸⁾⁹⁾。今回の研究で 20 週齢正塩負荷 SHR では尿中ドパミン排泄量が著明に高く、C3 KO SHR では WKY ラットと同等であった。高塩負荷では 20 週齢 SHR の尿中ドパミン排泄量は WKY ラットと同等であり、C3 KO SHR は SHR に比し減少していた。この結果から、SHR の塩分感受性には腎臓由来ドパミンが尿細管 Na-K-ATPase を抑制して Na 利尿を起こし、血管壁 Na-K-ATPase を抑制して血圧上昇を起こしていると考えられた。

今回、WKY ラット、SHR および C3 KO SHR の 4 週齢から 20 週齢の体重はすべての週齢で C3 KO SHR は SHR に比し低体重であった。補体 C3 には間葉系細胞を脱分化させる作用があり、SHR では間葉系細胞の内臓脂肪が脱分化して脂肪サイズが増加し、C3 KO SHR では脱分化が抑制されて脂肪細胞サイズが低下した可能性が考えられた。

補体 C3 が腎組織での血圧上昇に関与し、その結果、臓器障害が起きているのかを検討するため、糸球体と尿細管の障害の程度をスコア化し、腎障害を比較した。SHR

の糸球体、腎間質の組織変化は大変軽微であったが、スコア化すると SHR の糸球体損傷スコア (GIS) は WKY より高値で、C3 KO SHR で低下していた。SHR の尿細管間質傷害スコア (TIS) は WKY より高値で C3 KO SHR で低下していた。従って SHR の腎髄質では UUO マウスでみられる著明な EMT はないが、軽度な EMT を起こしていると考えられた。そして EMT により軽度に RA 系が活性化され、塩分感受性高血圧が形成されると考えられた。

これを検証するため、腎髄質の E-カドヘリン染色とレニン染色を行った。SHR の腎髄質の尿細管上皮では生直後に比し 20 週齢で E-カドヘリン発現が低下していた。C3 KO SHR の腎髄質の E-カドヘリンは保たれており、SHR では補体 C3 が EMT に関与している可能性が考えられた。一方、腎髄質でのレニンの発現は SHR および C3 KO SHR では生直後より尿細管において、WKY に比し発現していた。20 週齢では SHR の尿細管はさらに発現が亢進したが、C3 KO SHR ではレニンの発現は SHR に比し抑制されていた。週齢が進むにつれ SHR の腎髄質では EMT 現象が起こり、尿細管上皮が間葉化して脱分化した間葉系組織となり、尿細管上皮からレニンが産生されていると考えられた。そしてレニン産生が増加し、腎内 RA 系が活性化しているのではないかと考えられた。

さらに我々は、20 週齢時の正塩負荷の WKY ラット、SHR および C3 KO SHR で、腎髄質における mRNA 発現を検討した。20 週齢ラットの腎髄質でのアンジオテンシノゲン、レニン、レニンの転写因子 LXR α 、合成型に形質変換する転写因子 KLF-5 の mRNA 発現は、すべて SHR では WKY ラットに比して亢進し、C3 KO SHR では低下していた。

TIS スコア、GIS スコアが微弱であること、またレニン免疫染色レベルが傍糸球体細胞に比し弱いこと、mRNA 発現の結果から、SHR の腎髄質では UUO マウスでみられる著明な EMT はないが、週齢がすすむと補体 C3 の産生亢進が軽度な EMT を

起こし、これに伴い腎髄質尿細管上皮が間葉化し、脱分化した間葉系組織となり、レニンの転写因子 $LXR \alpha$ が尿細管上皮細胞の核内に移動してレニン産生が増加し、腎内 RA 系の活性化から高血圧を起こしていると考えられた。

補体 C3 の間葉系組織の脱分化への関与、そして合成型形質を保持することへの関与をみるため、WKY、SHR および C3 KO SHR の大動脈中膜平滑筋に於ける収縮型形質マーカー SM1, 合成型形質マーカー SMemb の発現を検討した。SM1 は生直後で WKY の大動脈で発現し、SHR や C3 KO SHR では明確には発現していなかった。合成型形質マーカー SMemb 発現は SHR で亢進し、C3 KO SHR で抑制されていた。この事から、SHR での過剰発現している補体 C3 は、腎臓のみならず血管においても合成型形質変換に関わり、補体 C3 は間葉系組織の形質変換から高血圧の心血管腎臓病の病態に関与していると考えられた。

in vitro において、補体 C3 の間葉系組織の脱分化、合成型形質への関与を明確にするため、WKY ラット、SHR、C3 KO SHR 由来糸球体 MC の性質を検討した。WKY、SHR、C3 KO SHR 由来メサンギウム細胞 (MC) の細胞数の変化は、48 および 72 時間後で SHR 由来 MC は WKY ラット由来 MC に比し有意 ($P < 0.01$) に高く、C3 KO SHR では低下していた。SHR 由来 MC で内因性 C3 が増殖能を亢進させていることが示唆された。WKY、SHR、C3 KO SHR 由来 MC の合成型形質マーカーであるオステオポンチン mRNA は SHR 由来 MC で有意 ($P < 0.05$) に亢進し、C3 KO SHR 由来 MC で発現低下がみられた。SHR 由来 MC は C3 によって合成型に形質転換をしている事が認められた。

本研究は、補体 C3 は高血圧に関与していること、また塩分感受性に関与していることを明らかにした。今回、補体 C3 が尿細管の上皮間葉化と脱分化の維持し RA 系を活性化していることを強く示唆されたが、腎髄質でのレニン蛋白発現などを比較検討していく必要がある。また塩分摂取による交感神経刺激と補体 C3 への関与はのまま

で報告がなく、全く新しい知見である。今後は補体 C3 のコントロールが高血圧の治療に貢献できる可能性があると考えられる。

引用文献

- 1) Lin Z-H, Fukuda N, Jin X-Q, Yao E-H, Ueno T, Endo M, Saito S, Matsumoto K, Mugishima H. Complement 3 is involved in the synthetic phenotype and exaggerated growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2004; 44: 1-6
- 2) Han Y, Fukuda N, Ueno T, Endo M, Ikeda K, Xueli Z, Matsumoto T, Soma M, Matsumoto K. Role of complement 3a in the synthetic phenotype and angiotensin II-production in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*. 2012; 25:284-289
- 3) Ikeda K, Fukuda N, Ueno T, Endo M, Kobayashi N, Soma M, Matsumoto K. Role of complement 3a in the growth of mesangial cells from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clinical and Experimental Hypertension*. 2014; 36:58-63
- 4) Zhou X, Fukuda N, Matsuda H, Endo M, Wang X, Saito K, Ueno T, Matsumoto T, Matsumoto K, Soma M, Kobayashi N, Nishiyama A. Complement 3 activates the renal renin-angiotensin system by induction of epithelial-to-mesenchymal transition of the nephrotubulus in mice. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 2013; 305: F957-F967.
- 5) Nagae A, Fujita M, Kawarazaki H, Matsui H, Ando K, Fujita T. Sympathoexcitation by oxidative stress in the brain mediates arterial pressure elevation in obesity-induced hypertension. *Circulation*. 2009 Feb 24;119(7):978-86.
- 6) Aikawa M, Yamaguchi H, Yazaki Y, Nagai R. Smooth muscle phenotypes in developing and atherosclerotic human arteries demonstrated by myosin expression. *J Atheroscler Thromb*. 1995;2:14-23.
- 7) Hermsmeyer K, Abel PW, Trapani AJ. Norepinephrine sensitivity and membrane potentials of caudal arterial muscle in DOCA-salt,

Dahl, and SHR hypertension in rat. *Hypertension*. 1982;4:49-51

- 8) Seri I, Kone BC, Gullans SR, Aperia A, Brenner BM, Ballermann BJ. Influence of Na⁺ intake on dopamine-induced inhibition of renal cortical Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase. *Am J Physiol*. 1990 Jan;258(1 Pt 2):F52-60.
- 9) Ferrandi M1, Manunta P, Rivera R, Bianchi G, Ferrari P . Role of the ouabain-like factor and Na-K pump in rat and human genetic hypertension. *Clin Exp Hypertens*.1998 Jul-Aug;20(5-6):629-39.