―Review―

食塩負荷から血管トーヌス亢進へのメカニズム：Na^+ ポンプ・Na^+/Ca^{2+} 交換体共役系の役割

喜多紗斗美,* 岩本隆宏

Mechanisms for Linking High Salt Intake to Vascular Tone: Role of Na^+ Pump and Na^+/Ca^{2+} Exchanger Coupling

Satomi KITA* and Takahiro IWAMOTO
Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Fukuoka University, 7–45–1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814–0180, Japan

(Received June 15, 2010)

Excessive salt intake is a major risk factor for hypertension. However, the underlying molecular relationship between salt and hypertension is not fully understood. Recently discovered cardiotonic steroids, such as endogenous ouabain and other steroids, have been proposed as candidate intermediaries. Plasma cardiotonic steroids are significantly elevated in patients with essential hypertension and in salt-dependent hypertensive animals. Generally, it is believed that cardiotonic steroids inhibit Na^+ pump activity and lead to an increase in the cytosolic Na^+ concentration. Cellular Na^+ accumulation raises the cytosolic Ca^{2+} concentration through the involvement of Na^+/Ca^{2+} exchanger type 1 (NCX1). In isolated arteries from $\alpha 2$ Na^+ pump knockout mice ($\alpha 2^{+/-}$), myogenic tone is increased, and NCX inhibitor normalizes the elevated myogenic tone in $\alpha 2^{+/-}$ arteries. The NCX inhibitor lowers arterial blood pressure in salt-dependent hypertensive rats but not in other types of hypertensive rats or in normotensive rats. Furthermore, smooth muscle-specific NCX1 transgenic mice are hypersensitive to salt, whereas mice with smooth muscle-specific knockout of NCX1 ($NCX1^{SM-/-}$) have low salt sensitivity. These results suggest that functional coupling between the vascular $\alpha 2$ Na^+ pump and NCX1 is a critical molecular mechanism for salt-induced blood pressure elevation.

Key words――Na^+/Ca^{2+} exchanger; Na^+ pump; excessive salt intake; hypertension; smooth muscle; myogenic tone

1. はじめに

高血圧は生活習慣病の中でも最も頻度が高く，日本における高血圧患者は約 4000 万人と言われている．高血圧は，脳卒中，虚血性心疾患及び慢性腎不全などの危険因子となることから，高血圧の病態解明及びその予防・治療法の開発は医学的・社会的に重要な研究課題となっている．高血圧の発症には，遺伝的素因と環境的要因が関係している．環境的要因としては，食塩摂取，肥満，飲酒，運動不足などが指摘されている．特に，食塩摂取が血圧を上昇させることは，様々な疫学的研究から広く知られている．高血圧患者の 9 割以上は原因不明の本態性高血圧に分類されるが，その約 4 割は食塩摂取で血圧が上昇する食塩感受性高血圧であると言われている．近年，食塩感受性高血圧患者において心血管系イベントの発生率が高いことが指摘されており，食塩感受性高血圧は早期治療を要する高血圧として位置付けられている．

一般に，食塩感受性高血圧患者では，高食塩摂取により Na^+ が体内に貯留し，体液量が増加することにより，血圧が上昇すると考えられている．しかし，食塩感受性高血圧の発症機序はかならずしも明確ではなく，Na^+ 貯留や体液量の増加がどのように血圧を上昇させるかについては不明な点が多い．最近，筆者らは Na^+/Ca^{2+} 交換体（NCX）の特異的阻害薬及び遺伝子改変マウスを用いた研究から，1 型 Na^+/Ca^{2+} 交換体（NCX1）を介する Ca^{2+} 流入が食塩感受性高血圧の発症に関与することを明らかにしてきた．本総説では，高食塩摂取による高血圧発症の機序について，筆者らの最近の知見を中心に紹介したい．

2. 細胞内 Ca^{2+} 濃度による血管トーヌス制御

血管平滑筋収縮は，細胞内 Ca^{2+} シグナルにより

福岡大学医学部薬理学（〒814–0180 福岡市城南区七隈 7–45–1）
*e-mail: satokita@fukuoka-u.ac.jp
本総説は，日本薬学会第 130 年会シンポジウム S52 で発表したものを中心に記述したものである．

巧みに制御されている．この Ca^{2+} シグナルは，細胞膜 Ca^{2+} チャネルや小胞体 Ca^{2+} 放出チャネルなどの Ca^{2+} 動員系により誘導され，細胞膜 NCX や細胞膜及び小胞体の Ca^{2+} ポンプなどを介した Ca^{2+} 除去により終結される．血管平滑筋細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇すると，Ca^{2+}・カルモデュリン複合体がミオシン軽鎖リン酸化酵素（MLCK）を活性化し，さらにリン酸化したミオシン軽鎖がアクトミオシン ATPase を活性化させてアクチン・ミオシンのクロスブリッジが回転し，血管収縮が引き起こされる（血管トーヌスの増大）．一方，血管平滑筋細胞内の Ca^{2+} 濃度が低下すると，MLCK が不活性化され，ミオシン脱リン酸化酵素の働きによりミオシン軽鎖が脱リン酸化され，血管が弛緩する（血管トーヌスの低下）．

血圧は心拍出量と末梢血管抵抗の積として算出されるが，本態性高血圧患者や実験高血圧動物の心拍出量は正常であることが多く，ほとんどの高血圧は末梢血管抵抗の増加により生じる．この末梢血管抵抗は細動脈の血管トーヌスによりダイナミックに調節されている．実験動物の場合，生理的な灌流圧を負荷した摘出腸間膜動脈の血管トーヌスを測定することにより（後述の Fig. 5），末梢血管抵抗を推定することができる．実際，実験的に測定した血管トーヌスレベルは全身血圧とよく相関することが報告されている．[1]

また，血管機能は神経やホルモンなどによる調節に加えて，血圧や血流などによっても制御を受けている．血管の最も基本的な収縮要素である筋原性収縮（マイオジェニックトーン）は，血管内圧の上昇に応じて生じる自発的な収縮として知られており，末梢血管抵抗の調節，細動脈の静止張力形成，血流の自己調節などに重要であると考えられる．筋原性収縮の寄与は血管の由来部位によって異なり，腸間膜細動脈などの細い血管では大動脈のような太い血管に比べて筋原性収縮が大きい．この筋原性収縮が引き起こされる機序についてはいまだ不明な点が多くあるが，血管壁の伸展により平滑筋が脱分極すると，電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した細胞内への Ca^{2+} 流入が起こり，さらに筋小胞体からの Ca^{2+} 遊離が引き起こされて血管平滑筋が収縮すると考えられている．また，ラット脳動脈において内腔圧負荷による筋原性反応が Ca^{2+} 透過性カチオンチャネルである transient receptor potential canonical（TRPC）6 のアンチセンスオリゴヌクレオチドによって抑制されることから，伸展刺激による脱分極の機序として TRPC6 の関与が報告されている．[2] さらに最近，筋原性収縮の機序として，Rho キナーゼを介した収縮タンパクの Ca^{2+} 感受性亢進機構の関与も報告されている．[3]

3. Na^+/Ca^{2+} 交換体の生理機能

NCX は，細胞膜を介して Na^+ と Ca^{2+} を交換輸送するイオントランスポーターである．通常，この輸送体は細胞膜を介する Na^+ の濃度勾配に従って Ca^{2+} を細胞外へ汲み出す役割を担っているが（Ca^{2+} 流出モード），細胞内に Na^+ が蓄積する特殊な状態では，逆に細胞外から Ca^{2+} を流入させる（Ca^{2+} 流入モード）．この輸送体には，哺乳動物において 3 種のアイソフォーム（NCX1–NCX3）が存在する．NCX1 は心臓，血管，腎臓，脳を始めとする種々臓器に普遍的に発現し，NCX2 と NCX3 は主に脳，骨格筋に発現している．[4] 心筋細胞において，NCX1 は L 型電位依存性 Ca^{2+} チャネルとともに T 管膜に沿って多く局在し，心拍毎に筋小胞体のリアノジン受容体チャネルから放出される Ca^{2+} を部分的に細胞外へ汲み出す役割を担っている．血管平滑筋においても NCX は細胞内 Ca^{2+} 濃度の調節に重要な役割を果たしていることが報告されているが，心筋に比べてその詳細は不明な点が多い．

4. 食塩負荷による血管トーヌス亢進と Na^+/Ca^{2+} 交換体

筆者らは，最近，NCX 阻害薬及び NCX1 遺伝子改変マウスを用いた研究により，血管平滑筋 NCX1 と食塩感受性高血圧との関係について検討した．ここでは，筆者らの知見を中心に，“食塩負荷から血管トーヌス亢進へのシグナル伝達機構”に Na^+ ポンプ・NCX の機能共役が係わる分子機構について述べる．

4-1. 内因性ウアバイン 1991 年に，Hamlyn らはヒト血漿から内因性ウアバインを単離・同定した．[5] 内因性ウアバインは主に副腎皮質や視床下部で合成・貯蔵され，ヒトや動物の血液中にナノモルレベルで存在している．この内因性ウアバインの分泌は ACTH により亢進される．実際，ACTH 誘発高血圧動物モデルでは内因性ウアバインの血中レベ

ルが増加している．また，食塩感受性高血圧と内因性ウアバインの関連については多くの報告がある．[6] 食塩感受性高血圧患者や実験高血圧動物では血中の内因性ウアバインが増加しており，その増加量は血圧上昇とよく相関する．正常血圧者（食塩感受性）に強制的に食塩負荷すると，血中の内因性ウアバインが増加し，血圧が上昇する．低濃度のウアバインをげっ歯類（ラットやマウス）に長期投与すると血圧が上昇し，その高血圧はウアバイン拮抗薬 PST2238（rostafuroxin）により抑制できる．これらの報告は，食塩感受性高血圧の発症に内因性ウアバインが関与することを強く示唆している．

2004 年に，筆者らは NCX 阻害薬及び NCX 遺伝子改変マウスを用いた研究から，動脈平滑筋に発現する NCX1 が食塩感受性高血圧の発症に重要な役割を果たすことを見い出した．[7] 一方，Lingrel らのグループは，Na^+ ポンプ変異体のノックインマウスを用い，内因性 Na^+ ポンプ抑制因子（内因性ウアバイン）が血圧調節に密接に係わることを実験的に証明した．[8] 興味深いことに，NCX1 を介する食塩感受性高血圧の発症には内因性ウアバインが関与する可能性が高いと考えられた（後述）．[7]

4-2. 内因性ウアバインの作動環境としての細胞膜ミクロドメイン　Na^+ ポンプ（Na^+,K^+-ATPase）は細胞膜を介する Na^+ と K^+ のイオン濃度勾配を形成する重要なイオントランスポーターである．Na^+ ポンプは ATPase 活性，ウアバイン結合部位，リン酸化部位を持つ α subunit（α1–α4）とポンプ活性の構造と機能に重要な β subunit（β1–β3）から構成される．α subunit は組織特異的な発現分布を示し，α1 は普遍的に（腎臓に多い），α2 は心臓，骨格筋，血管に，α3 は脳に，α4 は精子に存在している．α2 と α3 は細胞膜と筋小胞体の隣接部位“PLasmERosome”（細胞膜ミクロドメイン）に局在することが知られている（Fig. 1）．[6] 興味深いことに，同部位には NCX1 も共存している．一方，α1 は同部位には共存せず，細胞膜全体に広く分布している．PLasmERosom の間隙は 12–20 nm，その容積は 10^{-19}–10^{-18} l と推定される．PLasmERosom において局所的なイオン濃度変化（高濃度）が誘導された場合，“bulk cytosol”への拡散はかなり制限されると考えられる．

げっ歯類の α1 はウアバインに低感受性（>100 μM）であり，ナノモルレベルのウアバインは α2（高感受性）のみを阻害する．つまり，げっ歯類の動脈平滑筋細胞において，内因性ウアバインは PLasmERosom に限局して Na^+ 濃度を変化させる．ヒトの α1 はウアバインに高感受性（<0.05 μM）であるが，ナノモルレベルのウアバインは α1 を部分的に阻害し，基本的にはげっ歯類と同じ現象が引き起こされると考えられる．α1 は housekeeping 遺伝子で種々組織に発現し細胞膜に広く分布し

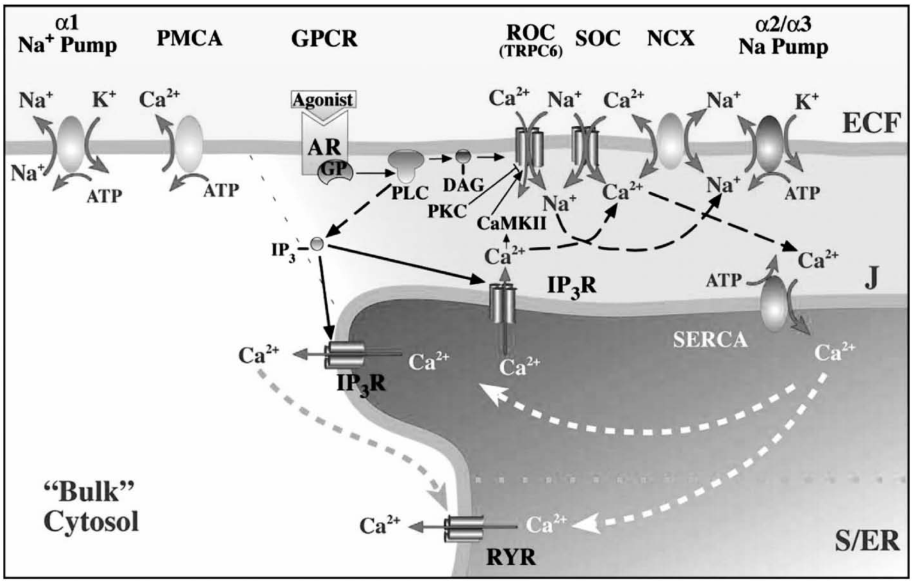

Fig. 1. Model of Plasma Membranemicrodomains Situated Adjacent to ''junctional'' Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum
(Reprinted with permission).[3]

ているため，“bulk cytosol”の Na^+ 濃度を調節していると考えられる．一方，α2 と α3 は PLasmERosom に限定分布しているため，局所の Na^+ 濃度の調節に特化した役割を有すると考えられる．この PLasmERosom には NCX1 が共発現しており，この細部膜ミクロドメインにおいて Na^+ ポンプ（α2）・Na^+/Ca^{2+} 交換輸送体（NCX1）の機能的共役が形成される．つまり，内因性ウアバインが動脈平滑筋細胞“PLasmERosom”の α2Na$^+$ ポンプに作用すると（局所 Na^+ 濃度の増加），NCX1 を介した Ca^{2+} 流入が誘導され，血管トーヌスが増大することにより血圧が上昇すると考えられる（Fig. 2，詳細は後述）．

4-3. α2Na$^+$ ポンプと Na^+/Ca^{2+} 交換体の機能共役　上述のように，げっ歯類にウアバインを長期投与すると血圧が上昇する．もしウアバイン（外因性及び内因性）が動脈平滑筋の α2Na$^+$ ポンプを阻害することにより血圧上昇を誘導しているなら，α2Na$^+$ ポンプの発現抑制でも同様の血圧上昇が観察されるはずである．そこで，私達は α1 及び α2 のヘテロ欠損マウス（$\alpha1^{+/-}$, $\alpha2^{+/-}$）の血圧を測定したところ，$\alpha1^{+/-}$ マウスは正常血圧であるが，$\alpha2^{+/-}$ マウスは軽度な高血圧状態であることを観察した（Fig. 3）．[6] また，それを裏付ける結果として，$\alpha2^{+/-}$ マウスの摘出腸間膜動脈（生理的な灌流圧下）において，血管トーヌスが増大していることを確認した．[9] さらに，$\alpha2^{+/-}$ マウスでは食塩負荷による昇圧反応が亢進していた（Fig. 3）．一方，血管平滑筋特異的な α2 高発現マウス（$\alpha2^{SM/Tg}$）では血圧の低下が観察された（Fig. 3）．[10] ウアバイン拮抗薬 rostafuroxin は野生型マウス腸間膜動脈のウアバイン誘発血管トーヌスの亢進を抑制したが，$\alpha2^{+/-}$ マウス腸間膜動脈の血管トーヌスの亢進には影響を及ぼさなかった．また，rostafuroxin はげっ歯類のウアバイン誘発高血圧及びヒトの本態性高血圧（有効率：約 30%）に対して有効であった．[6]

また，Lingrel らのグループは α2Na$^+$ ポンプのウワバイン結合部位を低感受性に変えた変異体のノックインマウス（$\alpha2^{R/R}$）を作製した．[8] $\alpha2^{R/R}$ マウスでは，野生型マウスと異なって ACTH 投与による

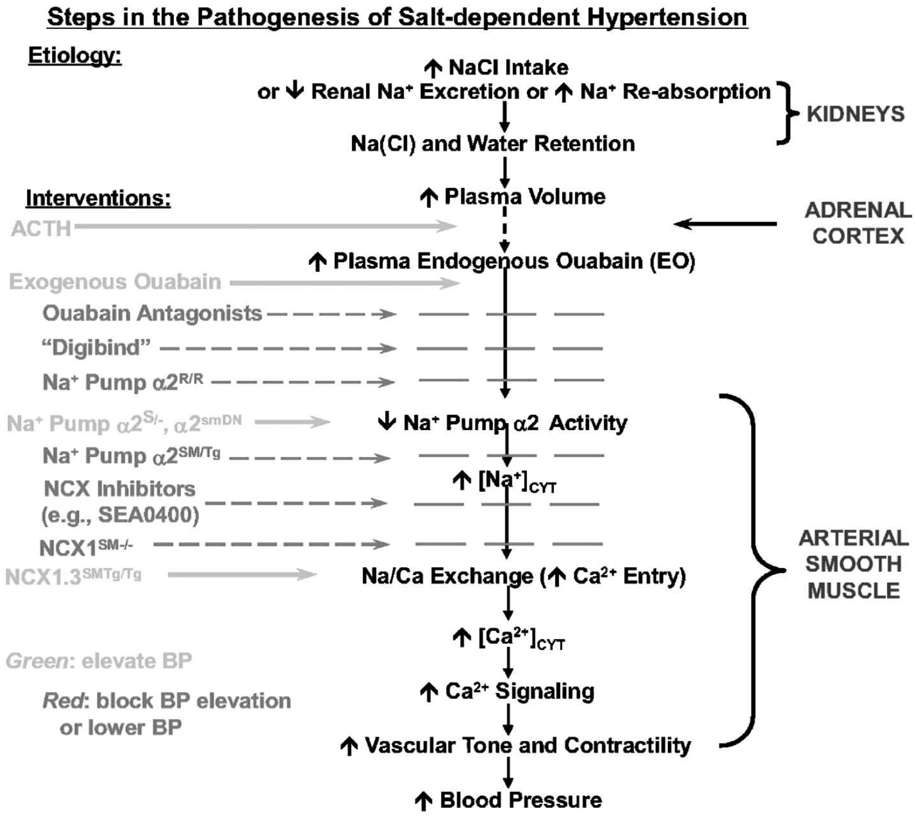

Fig. 2. Proposed Sequence of Steps in the Pathogenesis of Salt-dependent Hypertension
The “interventions” listed at the left, indicate some of the pharmacological and genetic manipulations. (Reprinted with permission).[3]

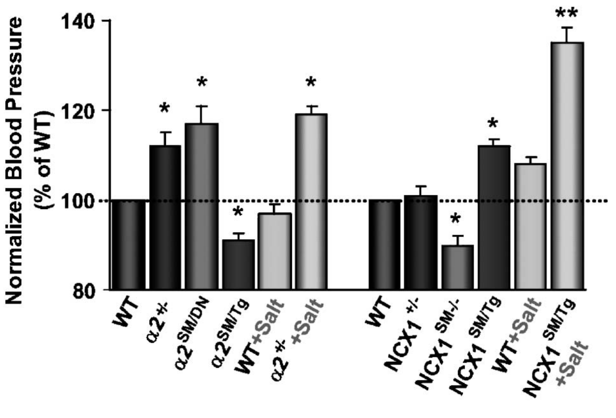

Fig. 3. Relative Blood Pressures of Mice with Genetically Engineered $\alpha 2$ Na^{+} Pumps and NCX1

The data, from several sources, are normalized to the blood pressures of the respective control wild type mice. $*p<0.05$, $**p<0.01$ *vs.* wild type or respective genotypes on a normal salt diet. (Reprinted with permission).[3)]

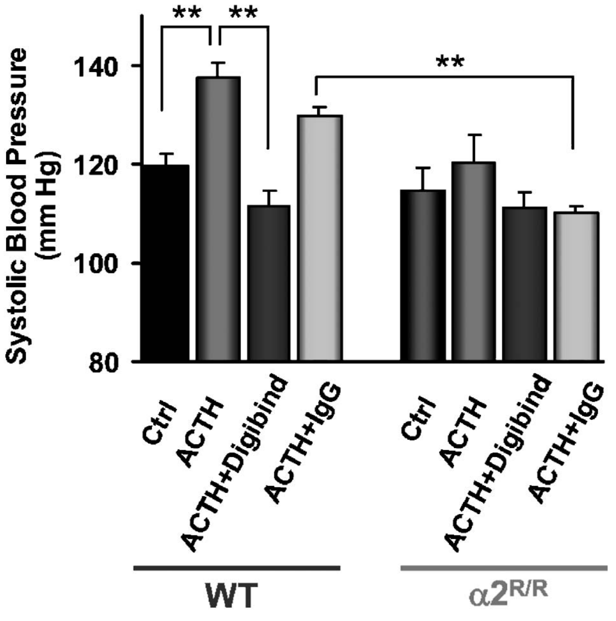

Fig. 4. Effects of ACTH on Blood Pressure in Mice with High (normal) and Low Ouabain Affinity $\alpha 2$ Na^{+} pumps

$**p<0.01$ for the pairings indicated. (Reprinted with permission).[3)]

高血圧が誘発されなかった（Fig. 4）．また，野生型マウスの ACTH 誘発高血圧及びウアバイン誘発高血圧は Digibind（ウアバインの中和抗体）の投与により抑制された（Fig. 4）．これらの結果は，$\alpha 2Na^{+}$ ポンプのウワバイン結合部位が血圧調節に重要な役割を果たすことを示すとともに，内因性ウアバインの昇圧因子としての生理的意義を実証するものである．

培養血管平滑筋細胞において，低濃度ウアバイン（ナノモルオーダー）による Na^{+} ポンプ阻害は細胞内 Na^{+} 濃度（“bulk cytosol”）をほとんど変化させることなく，細胞内 Ca^{2+} シグナルを増大させた．[6)] また，$\alpha 2^{+/-}$ マウスの培養細胞では細胞内 Na^{+} 濃度（“bulk cytosol”）のわずかな増加にもかかわらず，細胞内 Ca^{2+} シグナルは大きく増強された．これらの知見は，PLasmERosom（Fig. 1）における $\alpha 2Na^{+}$ ポンプと NCX1 の機能連関を支持している．さらに，最近の薬理学的・遺伝子工学的な研究成果から，動脈平滑筋細胞の Ca^{2+} 調節における NCX1 の役割，また血管トーヌスや血圧制御における NCX1 の役割が明らかになりつつある．血管平滑筋特異的な NCX1 高発現マウス（$NCX1^{SM/Tg}$）は安静時に軽度な血圧上昇（約 12% 上昇）を示し，さらに高食塩食を 4 週間負荷することにより，血圧が約 37% 上昇した（Fig. 3）．[7)] また，この高食塩負荷時の高血圧は特異的 NCX 阻害薬 SEA0400 により抑制された．一方，血管平滑筋の NCX1 発現量が約半分に減少した NCX1 ヘテロ欠損マウス（$NCX1^{+/-}$）を用いて，DOCA 食塩高血圧モデルの作製を試みたところ，野生型マウスの場合とは異なり，血圧上昇が誘発されなかった．[4)] さらに，SEA0400 は正常血圧ラット，高血圧自然発症ラット（SHR），脳卒中易発症性 SHR, Dahl 食塩非感受性ラット，2 腎 1 クリップ型腎性高血圧ラットなどの血圧には影響を与えなかったが，DOCA 食塩高血圧ラット，食塩負荷した Dahl 食塩感受性ラット，食塩負荷した SHR においては著明な降圧作用を示した．[7)] また，SEA0400 は ACTH 誘発高血圧及びウアバイン誘発高血圧に対して効果を示すとともに，野生型マウス腸間膜動脈のウアバイン誘発血管トーヌスの亢進（細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加）を抑制した（Fig. 5）．[7)] これらの結果は，食塩感受性高血圧の発症における NCX1 の役割を支持している．

一方，血管平滑筋特異的な NCX1 欠損マウス（$NCX1^{SM-/-}$）は安静時に軽度の血圧低下を示し，さらにその摘出腸間膜動脈（生理的な灌流圧下）では血管トーヌスの基礎レベルが低値であった．[5)] 実際，野生型マウスに SEA0400 を投与すると，血圧は軽度に低下し（5–10 mmHg），腸間膜動脈の血管トーヌスは約 10% 減少した．[7)] このように，NCX1 は安静時においても血管トーヌスや血圧の調節に一部関与すると考えられた．また，SEA0400 は

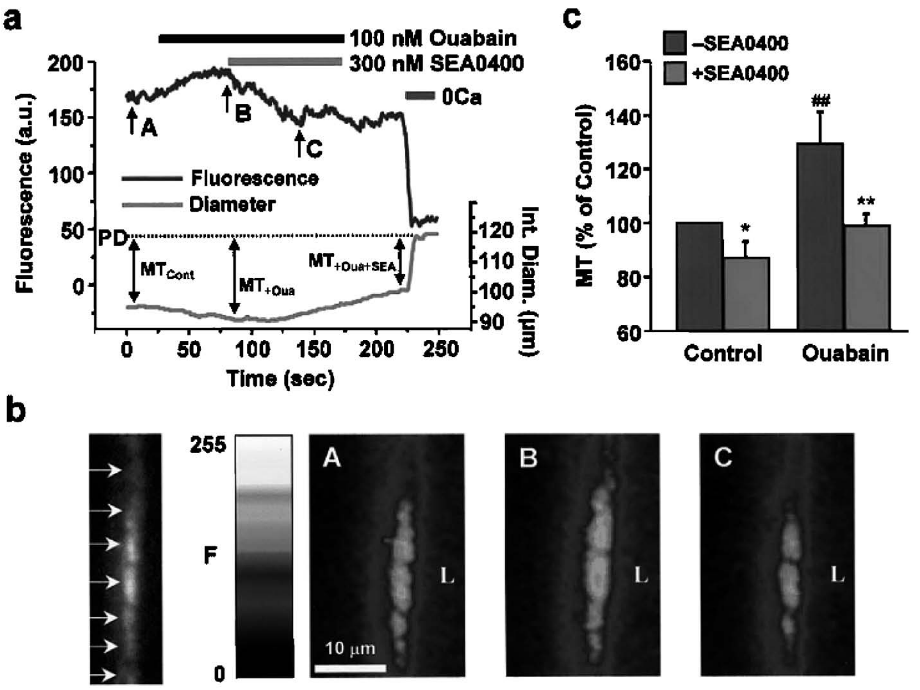

Fig. 5. Effects of Low-dose of Ouabain and SEA0400 on Cytosolic Ca^{2+} Level and Myogenic Tone (MT) in Pressurized Mouse Small Mesenteric Arteries

(a) Simultaneous recording of fluorescence and internal diameter (Int. diam.) changes in a fluo-4-loaded artery (pressurized to 70 mmHg) by laser confocal microscopy. Periods of exposure to ouabain, SEA0400 and Ca^{2+}-free medium (0Ca) indicated by colored bars. (b) Fluorescent image on the left shows individual myocytes loaded with fluo-4. Pseudocolor images (A–C) indicate the relative $[Ca^{2+}]_i$ at the times shown in a. (c) Summary of the effects of ouabain and SEA0400 on myogenic tone. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$ *vs*. pretreatment values. $^{\#\#}p<0.01$ *vs*. control values. (Reprinted with permission).[7]

$\alpha2^{+/-}$ マウスにおける血管トーヌスの亢進を抑制した．これは，NCX1 が $\alpha2Na^{+}$ ポンプの下流で機能していることを示唆している（Fig. 2）．

5. おわりに

従来から，食塩負荷した動物及びヒトにおいて，血中の内因性ウアバインが増加することが多数報告されている.[3] そこで，高食塩摂取時には内因性ウアバインの分泌が亢進し，$\alpha2Na^{+}$ ポンプに対する阻害作用により，動脈平滑筋細胞 “PLasmERosome” の Na^{+} 濃度が増加し，NCX1 を介した Ca^{2+} 流入が引き起こされるものと考えられる．この一連の過程により，動脈平滑筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加し，特に末梢動脈における血管トーヌスが高まり，高血圧を発症すると考えられる（Fig. 2）．これまで，Na^{+}/Ca^{2+} 交換体の生理的役割は，Ca^{2+} シグナリングを終結させることであると考えられてきた．すなわち，Ca^{2+} 汲み出し輸送（Ca^{2+} 流出モード）が NCX の主な機能であると考えられてきた．ところが，筆者らの研究により，食塩感受性高血圧の発症において，動脈平滑筋細胞の NCX1 を介する Ca^{2+} 流入（Ca^{2+} 流入出モード）が血管トーヌス亢進に重要な役割を果たすことが明らかになってきた．さらに，最近筆者らは，交感神経性の血管収縮機構に NCX1 を介する Ca^{2+} 流入が関与することを見い出している（未発表データ）．

食塩感受性高血圧患者では，食塩制限や利尿薬投与により血圧低下を示す例が多い．古くから，利尿薬を高血圧患者に長期投与すると末梢血管抵抗が低下することが知られている．この説明として，利尿薬には体液量減少作用以外の直接的な血管拡張作用があるのではないかと推察されてきた．現在，直接的な証拠はないが，食塩制限や利尿薬投与が体内の Na^{+} 貯留を改善し，内因性ウアバインの分泌を低下させることにより，動脈平滑筋における NCX1 を介する Ca^{2+} 流入を間接的に抑制し，末梢血管抵抗を低下させている可能性が考えられる．今後，$\alpha2Na^{+}$ ポンプ及び NCX1 を標的とした食塩感受性高血圧の新たな治療薬の創薬に期待したい．

REFERENCES

1) Davis M. J., Hill M. A., *Physiol. Rev.*, **79**, 387–423 (1999).

2) Welsh D. G., Morielli A. D., Nelson M. T., Brayden J. E., *Circ. Res.*, **90**, 248–250 (2002).
3) Schubert R., Kalentchuk V. U., Krien U., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **283**, H2288–H2295 (2002).
4) Iwamoto T., Watanabe Y., Kita S., Blaustein M. P., *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets*, **7**, 188–198 (2007).
5) Hamlyn J. M., Blaustein M. P., Bova S., DuCharme D. W., Harris D. W., Mandel F., Mathews W. R., Ludens J. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6259–6263 (1991).
6) Blaustein M. P., Zhang J., Chen L., Song H., Raina H., Kinsey S. P., Izuka M., Iwamoto T., Kotlikoff M. I., Lingrel J. B., Philipson K. D., Wier W. G., Hamlyn J. M., *Hypertension*, **53**, 291–298 (2009).
7) Iwamoto T., Kita S., Zhang J., Blaustein M. P., Arai Y., Yoshida S., Wakimoto K., Komuro I., Katsuragi T., *Nat. Med.*, **10**, 1193–1199 (2004).
8) Dostanic-Larson I., Van Huysse J. W., Lorenz J. N., Lingrel J. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15845–15850 (2005).
9) Zhang J., Lee M. Y., Cavalli M., Chen L., Berra-Romani R., Balke C. W., Bianchi G., Ferrari P., Hamlyn J. M., Iwamoto T., Lingrel J. B., Matteson D. R., Wier W. G., Blaustein M. P., *J. Physiol.*, **569**, 243–256 (2005).
10) Pritchard T. J., Parvatiyar M., Bullard D. P., Lynch R. M. Lorenz J. N., Paul R. J., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **293**, H1172–H1182 (2007).