

9429 食塩感受性高血圧発現機序に占める組織内レニン・アンジオテンシン系の役割

助成研究者：吉村 學 (京都府立医科大学 医学部)

共同研究者：西村 真人 (京都府立医科大学 医学部)

(背景と目的) 生体内の血圧上昇因子であるレニン・アンジオテンシン(RA)系は血中のみならず脳・心・血管・腎臓など組織内に存在して、血圧調節、内分泌代謝、水電解質調節、細胞増殖などを制御している。血中RA系は食塩過剰摂取で抑制され、食塩摂取制限で活性化される事が知られている。食塩感受性高血圧症では食塩過剰摂取に基づく血漿レニン活性の抑制は顕著で、この抑制は体液貯留によると考えられている。一方、食塩負荷時の組織内RA系、特に脳内RA系の動態については明らかではない。脳内でも視床下部は水・電解質代謝と内分泌・代謝の中枢が存在し、また、RA含有細胞が豊富に存在する。従って測定対象として視床下部を選び、血漿レニン活性と対比し、視床下部内RA系の高血圧発症に与える役割を検討した。

(方法) 食塩感受性高血圧のモデルとしてDOCA/食塩高血圧ラット(DOCA, 1%食塩水、片腎)を選び、食塩負荷ラット(8%食塩食負荷)、減塩食ラット(0.2%食塩食負荷)、常塩食ラット(2%食塩食)、腎血管性高血圧ラット(両側腎動脈間の大動脈結紮)を用いて、急性期(1-2週)と慢性期(6-8週)に於いて、血漿レニン活性と視床下部内レニンmRNAの発現を比較検討した。

(結果) 血漿レニン活性は食塩過剰負荷にて急・慢性期共に抑制され、減塩負荷にて亢進するのに対し、視床下部内レニン遺伝子発現は食塩負荷の急性期では亢進し、慢性期に於いても抑制されなかった。また、DOCA/食塩負荷にて血圧上昇したDOCA/食塩高血圧ラットでは、急・慢性期共に血漿レニン活性が有意に抑制されるのに対し、視床下部内レニン遺伝子発現は抑制されなかった。腎血管性高血圧ラットでは血漿レニン活性と共に視床下部内レニン遺伝子発現が亢進した。

(結論) 視床下部内レニン遺伝子発現は循環血中レニンの動態と同じくせず、独自の調節系を持つと考えられる。高塩食にて視床下部内RA系が亢進していることから、食塩感受性高血圧症の成因の一つに視床下部内RA系を介する中枢性昇圧機序が関与すると考えられる。

9429 食塩感受性高血圧発現機序に占める組織内レニン・アンジオテンシン系の役割

助成研究者：吉村 學 (京都府立医科大学 医学部)

共同研究者：西村 真人 (京都府立医科大学 医学部)

要旨

高塩食または低塩食負荷時、ならびにDOCA食塩高血圧における脳内視床下部レニン遺伝子発現調節を検討し、食塩摂取と高血圧との関係における視床下部レニンの役割について考察した。常塩食(2%)群に比して、高塩食(8%)群では負荷10日間に著明な視床下部レニン遺伝子発現の亢進を認め、負荷8週目、血漿レニン活性の低値にもかかわらず、視床下部レニン遺伝子発現の抑制を認めなかった。一方、DOCA食塩高血圧ラットでは、術後2週目の高血圧前期ないし6週目の高血圧期の両期において、DOCAまたは食塩の投与により血漿レニン活性の低下をみたが、視床下部レニン遺伝子発現は抑制されていなかった。以上より、視床下部レニン遺伝子発現は循環血液中レニンとその動態を同じくせず、独自の調節機序を有し、食塩負荷による低レニン性高血圧においても視床下部レニンは高血圧発症・維持の中樞生機序の一つとして働いている可能性を示唆する。

はじめに

循環血液中のみならず、脳をはじめとする組織内レニン-アンジオテンシン系(RAS)は、高血圧の発症・維持に深く関与している。脳内RASの存在は、Gantenらにより、初めて生化学的に指摘され[1]、岩井らは、脳内レニンの遺伝子発現がWKYラットに比べてSHRにて明らかに亢進していることを証明し[2]、また、我々も腎血管性高血圧ラットの急性及び慢性期にて、脳内アンジオテンシノゲン遺伝子発現が促進されていることを報告した[3]。しかしながら、循環血液中低レニンを示す、いわゆる低レニン性高血圧モデルにおける脳内RASの動態については、あまり報告をみない。Uenoらは、低レニン性高血圧モデルの代表であるDOCA食塩高血圧イヌでは、循環血液中のレニン活性ならびにアンジオテンシンIIが低値を示すにもかかわらず、髄液中のアンジオテンシンII濃度が抑制されない事を報告し[4]、脳内RASは、循環血液中RASとは異なる調節を受けている可能性を示したが、脳組織内のRASの調節についての報告はない。今回、脳のなかでも水・電

解質中枢の存在する視床下部に焦点をあて、循環血液RASの主たる調節因子の一つである食塩摂取量の変化とDOCA食塩高血圧ラットにおける脳内視床下部のレニン遺伝子発現を検討し、視床下部レニン遺伝子発現が、循環血液中レニンとは異なる機序にて調節されているのか否か、そして低レニン性高血圧の高血圧前期または高血圧期において、脳内視床下部レニン遺伝子発現を調べ、食塩摂取と高血圧との関係における脳内視床下部レニンの役割について考察した。

方法

実験には主に6週令の雄性Wistar系ラット(日本動物,大阪)を使用し、腎血管性高血圧ラットの作成には、6週令の雄性Sprague-Dawleyラット(日本動物,大阪)を使用した。血圧の測定はtail-cuff法を用い(MK-1000,室町機械,東京)、両側腎動脈間大動脈結紮による腎血管性高血圧ラットの血圧測定は、右総頸動脈にカテーテル(PE-50,Cray Adams,CA,USA)を挿入し、測定した(SEN-6104,日本光電,東京)。塩分負荷食として、常塩食(2% NaCl)、高塩食(8% NaCl)、または低塩食(0.2% NaCl)(ハートメカ・サーヴィス,京都)を使用した。なお、血漿レニン活性の測定はRIA法を用いた(ダイナボット,東京)。

実験モデルの作成

- 1) 塩分負荷モデルとして、上記の常塩・高塩・低塩食負荷10日間または8週間。
- 2) DOCA食塩高血圧モデルの作成:片腎摘出後、1%食塩水・蒸留水の別、DOCA 150 mgを含んだシリコンゴムを皮下埋没の有無により、以下の4群に分類した。I:DOCA(-),蒸留水,II:DOCA(+),蒸留水,III:DOCA(-),食塩水,IV:DOCA(+),食塩水。術後2週目の高血圧発症前期、ならびに術後6週目の高血圧期。
- 3) 両側腎動脈間の大動脈を結紮し、術後1週目の腎血管性高血圧急性期[3,5]。

レニン遺伝子発現の解析

断頭屠殺後、腎臓とGlowinskiとIversenの方法[6]にて視床下部を取り出し、guanidine isothiocyanate/cesium chloride法にて総RNAを抽出した。ラットレニンcDNA(pRen44)に存在するNae IとApa Iには含まれるfragmentを欠失したdeleted mutantよりcRNAを作成し、一定量を各サンプルにの総RNAに加え、internal standardとして用いた[2]。なお、予備実験より、脳内視床下部のサンプルには60 fg、腎臓には150 fg(DOCA食塩の実験)または6 pg(塩分負荷及び腎血管性高血圧実験)のdeleted mutant cRNAを用いた。このRNAをreverse transcriptionした後、³²P-dCTPを付加しPCRを施行し、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行いPCR産物を分離し、各産物のradioactivityを測定(NIH image 1.02)、レニンmRNA(R)に対するdeleted-mutated renin RNA(r)の比(R/r)をそのアンプルの相対的レニンmRNA量とした。

成績

1) 低塩・高塩負荷による影響

塩分負荷10日間では、常塩食群に比べて、低塩食群では血漿レニン活性は有意の増加を示したが、脳内視床下部レニン遺伝子発現は有意ではなく、レニン活性の変化をみなかった高塩食群において視床下部レニン遺伝子発現の有意の増加を認めた(図1)。腎臓のレニンmRNA量は、常塩食群(1.32 ± 0.53)に比して、低塩食群にて増加(5.32 ± 0.27 , $p < 0.05$)、高塩食群では有意の変化はなかった(1.03 ± 0.33)。

塩分負荷8週間では、血漿レニン活性は高塩食群にて低下していたが、視床下部レニン遺伝子発現は高塩食群にて抑制されていなかった(図2)。腎臓のレニンmRNA量は、常塩食群(1.29 ± 0.28)に比して低塩食群(1.48 ± 0.12)では差異なく、高塩食群にて低下していた(0.38 ± 0.31 , $p < 0.05$)。

2) DOCA食塩高血圧

術後2週目の高血圧前期では、コントロール群であるDOCA(-)・蒸留水群に比べて、他の3群ではいずれも血漿レニン活性は有意に低下し、特にDOCA(+)-食塩水群では著明であった。脳内視床下部レニン遺伝子発現は、コントロール群と比べて、DOCA(+)-蒸留水群にて増加し、DOCA(-)-食塩水群及びDOCA(+)-食塩水群では、有意の差異はなかった(図3)。なお、腎臓のレニンmRNA量は、コントロール群に比べてDOCA(+)-食塩水群では著明に低下していた(24.5 ± 3.52 vs. 3.2 ± 0.78 , $p < 0.01$)。

術後6週目の高血圧期では、収縮期血圧はコントロール群(155 ± 6 mmHg)に比べて、DOCA(+)-蒸留水群(190 ± 7 mmHg)及びDOCA(+)-食塩水群(200 ± 9 mmHg)では有意に($p < 0.01$)増加していた。血漿レニン活性は、コントロール群を除く他の3群では低下し、DOCA(+)-食塩水群では著明であったが、脳内視床下部レニン遺伝子発現は各群間にて差異を認めなかった(図4)。腎臓のレニン遺伝子発現は、コントロール群に比較して、DOCA(+)-食塩水群にて著明に低下していた(46.2 ± 8.92 vs. 2.5 ± 0.27 , $p < 0.01$)。

3) 腎血管性高血圧

大動脈結紮術後7日目では、sham手術群に比べて大動脈結紮群では血圧は大動脈結紮群にて有意に増加していた(平均血圧： 92 ± 4 mmHg vs. 154 ± 5 mmHg, $p < 0.01$)。血漿レニン活性は、結紮群にて著明に亢進しており、視床下部レニン遺伝子発現も同様に結紮群にて有意に増加していた(図5)。大動脈結紮群の虚血腎のレニン遺伝子発現は、sham手術群の同側の腎臓に比べて有意に増加していた(1.5 ± 0.34 vs. 9.2 ± 0.62 , $p < 0.01$)。

考察

腎臓以外に血管、脳、副腎等にRASが存在していることはよく知られた事実であるが、

それらの組織内RASが高血圧とどの様に関係しているかはいまだ確定したものはない。脳のRASは、各種高血圧モデルでの検討において、末梢交感神経活動、圧受容体反射の調節等により、血圧調節に深く関与している可能性があり[7]、その動態は高血圧の病態生理学上、重要である。視床下部には、水・電解質代謝の中樞が存在し、アンジオテンシンII変換酵素阻害薬のラットでの降圧効果の一部は脳室周囲器官群でのRASの阻害にあることが報告されており[8]、この部位を含む脳内視床下部のRASの動態の解明は特に重要と思われる。

今回の検討においては、食塩摂取量の差異、及びDOCA食塩高血圧ラットにおいて、腎臓のレニン遺伝子発現は血漿レニン活性と同方向に変化したが、脳内視床下部レニン遺伝子発現は、血漿レニン活性及び腎臓のレニン遺伝子発現の動きとは一致しなかった。脳幹部のレニンmRNAの変化が血漿レニン活性と同方向に動くとの報告をあわせ考えると、脳内でもレニンの遺伝子発現には部位特異性があり、視床下部のレニン遺伝子発現には、腎臓のレニンmRNAの調節機序以外の視床下部独自の調節機序の存在の可能性が示唆される。即ち、食塩負荷またはDOCA等のステロイドホルモンの投与は、視床下部において、腎臓とは逆に、レニンの遺伝子発現を亢進させるように作用すると考えられる。血漿レニン活性が有意の低下をみない高塩負荷初期には、食塩による脳内視床下部レニン遺伝子発現促進の機序が優位に働き、その結果常塩食群に比べて視床下部レニン遺伝子発現が増加するが、血漿レニン活性が低下する高塩負荷後期には、腎臓におけるレニン遺伝子発現のdown regulationの機序との拮抗により、常塩食群と同程度のレニン遺伝子発現となることが予想される。DOCA食塩ラットでは、高血圧前期の2週目において既にDOCAまたは食塩水負荷ラットの血漿レニン活性が低値を呈していたために、DOCAまたは食塩負荷によるレニン遺伝子のup regulationの機序がdown regulationの機序と相殺され、視床下部レニン遺伝子発現がコントロール群と比べて差異がなくなったと予想される。大動脈結紮による腎血管性高血圧ラットでは、元来血漿レニン活性が高く、虚血腎でのレニン遺伝子発現は亢進しており、またこの腎血管性高血圧では循環血液中の糖質コルチコイドの増加が報告されており[9]、この2つの機序で視床下部レニン遺伝子発現もup regulationされたものと考えられる。

レニン遺伝子の5'上流領域には、グルココルチコイド応答性領域が存在することから[10]、DOCA投与による視床下部レニンmRNAのup regulationは、ここを介するものと考えられる。一方、食塩負荷による脳内レニンmRNAのup regulationの機序は不明である。おそらく、高塩負荷による髄液Na濃度の上昇を介すると予想されるが、実際にレニン遺伝子発現の調節部位にたどり着くまでに数段階を経るものと思われ、今後の課題である。

実際、このような発現調節を受けていると思われる脳内視床下部レニンは、高血圧と関係があるのであろうか？ 今回の実験成績からは、脳内視床下部レニンの遺伝子発現の亢進が直ちに血圧上昇へとつながることはないと思われる。しかしながら、食塩負荷にて、腎

臓とは異なり、脳内視床下部レニン遺伝子発現の抑制を認めないこと、そして、食塩負荷にて、脳内アンジオテンシンII受容体の遺伝子発現が亢進する事[11]などから、食塩摂取により、少なくとも脳内視床下部RASは抑制されず、逆に亢進している可能性が示唆される。この状態のみでは血圧上昇に至らなくても、DOCA処置やストレスなどの他の昇圧因子が加われば、血圧上昇へとつながる可能性がある。以上より、食塩摂取の過剰は、脳内視床下部RASの相対的亢進を生じ、高血圧の易発症因子として作用する可能性を示唆する。

おわりに

脳内視床下部レニンの遺伝子発現は、必ずしも循環血液中レニンをその動態を同じくせず、腎臓における調節以外に独自の調節を受けている。高塩摂取にて脳内視床下部RASが相対的に亢進する可能性があり、食塩負荷による低レニン性高血圧モデルにおいても、脳内視床下部レニンは高血圧発症・維持の中枢性機序の一つとして働いている可能性を示唆する。

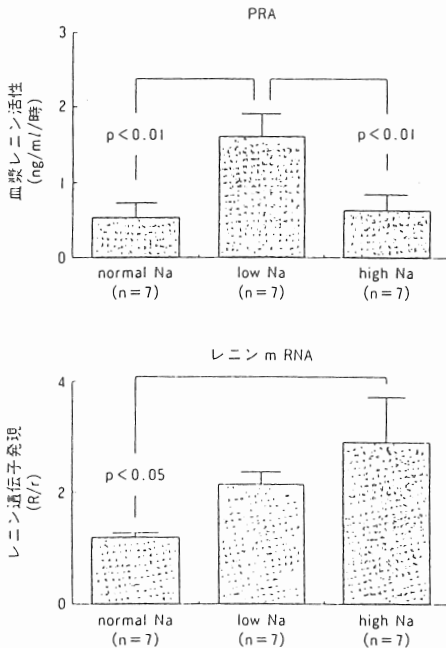


図1. 食塩摂取量の差異(10日間)における血漿レニン活性(PRA)と脳内視床下部レニン遺伝子発現(レニン mRNA)

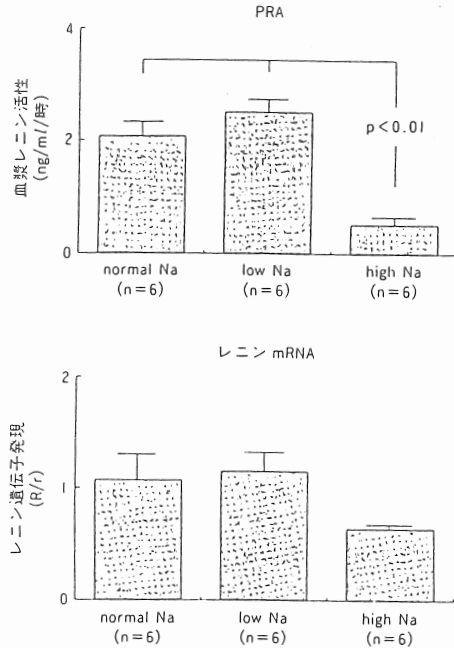


図2. 食塩摂取量の差異(8週間)における血漿レニン活性(PRA)と脳内視床下部レニン遺伝子発現(レニン mRNA)

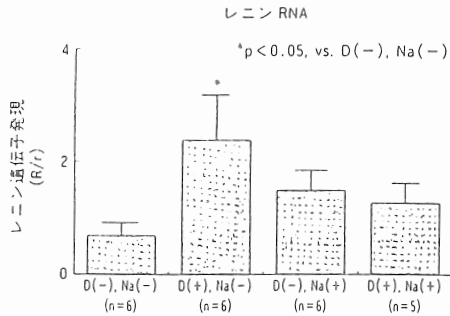
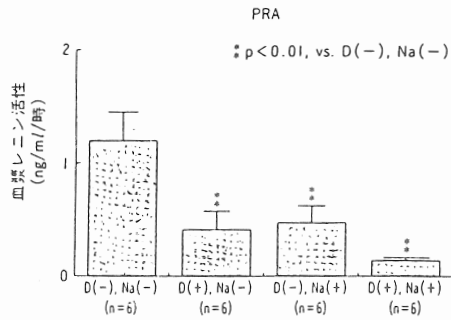


図3. DOCA食塩高血圧術後2週目(高血圧前期)の血漿レニン活性(PRA)と脳内視床下部レニン遺伝子発現(レニンmRNA)
D: DOCA, Na: 1%食塩水

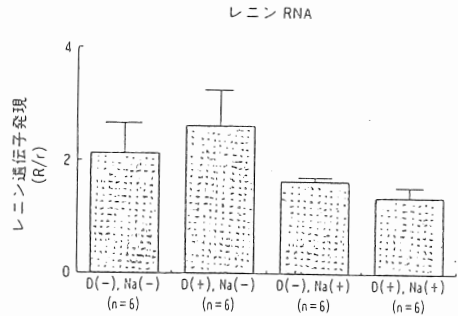
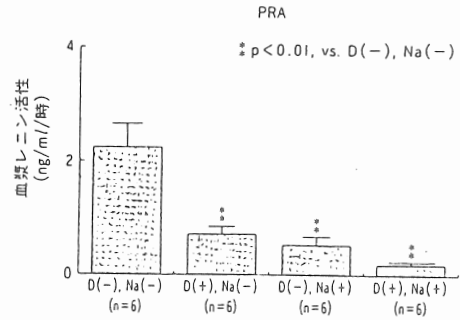


図4. DOCA食塩高血圧術後6週目(高血圧期)の血漿レニン活性(PRA)と脳内視床下部レニン遺伝子発現(レニンmRNA)
D: DOCA, Na: 1%食塩水

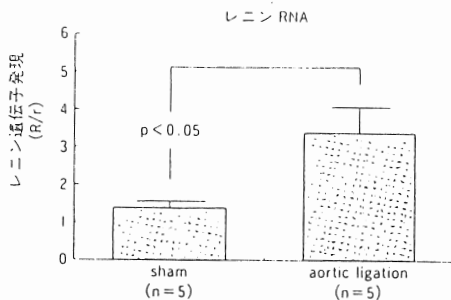
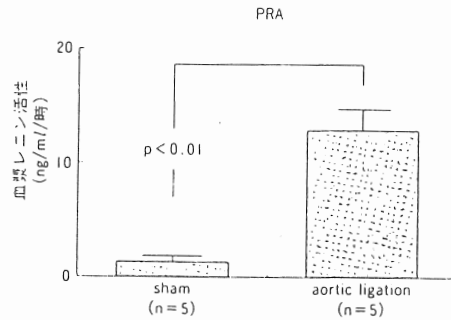


図5. 両側腎動脈間大動脈結紮後7日目の血漿レニン活性(PRA)と脳内視床下部レニン遺伝子発現(レニンmRNA)
sham: 偽手術群,
aortic ligation: 大動脈結紮群

文献

- 1)Ganten D, Marquez-Julio A, Granger P, et al: Renin in dog brain: Am J Physiol 221:1733-1737, 1971.
- 2)Iwai N, Inagami T: Quantitative analysis of renin gene expression in extrarenal tissues by polymerase chain reaction method: J Hypertens 107:717-724, 1992.
- 3)Nishimura M, Milsted A, Block CH, et al: Tissue renin-angiotensin systems in renal hypertension: Hypertension 20:158-167, 1992.
- 4)Ueno Y, Mohara O, Brosnihan KB, et al: Characteristics of hormonal and neurogenic mechanisms of deoxycorticosterone-induced hypertension: Hypertension 11 [Suppl I]:I-172-I-177, 1988.
- 5)Carreterp OA, Kuk P, Piwonska S, et al: Role fo the renin-angiotensin system in the pathogenesis of severe hypertension in rats: Circ Res XXIX:654-663, 1971.
- 6)Glowinski J, Iversen LL: Regional studies of catecholamines in the rat brain: J Neurochem 13:655-699, 1966.
- 7)Reid IA: Actions of angiotensin II on the brain: mechanisms and physiologic role: Am J Physiol 246:F533-F543, 1984.
- 8)Sakaguchi K, Chai SY, Jackson BJ, et al: Inhibition of tissue angiotensin converting enzyme-quantitation by autoradiography: Hypertension 11:230-238, 1988.
- 9)Chatelain RE, Bumpus FM, Dibello PM, et al: Glucocorticoid hypersecretion and hypertensive vascular disease in experimental malignant hypertension in rats: Clinical Science 63:105s-108s, 1982
- 10)Griendling KK, Murphy TJ, Alexander RW: Molecular biology of the renin -angiotensin system: Circulation 87:1816-1828, 1993.
- 11)Sandberg K, Ji H, Catt KJ: Regulation of angiotensin II receptors in rat brain during dietary sodium changes: Hypertension 23[Suppl I]:I-137 -I-141, 1944.

Role of hypothalamic renin ·angiotensin system on the pathogenesis of salt sensitive hypertension

Manabu Yoshimura and Masato Nishimura

Department of Clinical Laboratory and Medicine
Kyoto Prefectural University of Medicine

The effect of high or low salt loading on hypothalamic renin·angiotensin system was investigated using rats feeding with high or low salt diet and rats with DOCA / salt treatment. Plasma renin activity (PRA) was suppressed at the acute and chronic phase of high salt diet and DOCA / salt treatment. Reversely plasma renin activity was enhanced at the low salt diet of both acute and chronic phase periods. On the contrary, the expression of renin mRNA in hypothalamus was enhanced at acute phase of high salt loading and was not suppressed at chronic phase of high salt loading as compared with those of regular salt intake group. Similar phenomena were observed in DOCA / salt hypertensive rats. By the treatment of DOCA and high salt diet, blood pressure increased up to hypertension level. The expression of renin mRNA in hypothalamus was not suppressed by the treatment of DOCA and salt, although plasma renin activity was suppressed by DOCA / salt treatment. These results suggest that the expression of renin mRNA in hypothalamus was independently different from the circulatory renin ·angiotensin system in blood and kidneys. As the expression of hypothalamic renin ·angiotensin system was correlated with the elevation of blood pressure, the hypothalamic renin ·angiotensin system play an important role for the pathogenesis of hypertension.