

助成番号 9949

食塩感受性高血圧の発症における視床下部ペプチドおよびNOの役割

助成研究者：山下 博 (産業医科大学 医学部)
 共同研究者：渋谷 泉 (産業医科大学 医学部)
 上田 陽一 (産業医科大学 医学部)
 芹野 良太 (産業医科大学 医学部)

(目的) 生体の恒常性維持の中枢である視床下部は外界および生体内からの情報を統合処理する部位であるが、体液バランス・循環動態の中枢であり、自律神経系と内分泌系の統合部位である室傍核および視索上核において神経ペプチド(主に下垂体後葉ホルモン)の他に神経型NO合成酵素遺伝子が多く発現していることが報告されている。本態性高血圧症の一モデルと考えられる食塩負荷により高血圧を発症する遺伝的素因をもつ食塩感受性(Dahl S)ラットを用いて、その視床下部における神経型NO合成酵素(nNOS)遺伝子と室傍核および視索上核において産生される神経ペプチド(バゾプレッシン(AVP)、オキシトシン(OXT))遺伝子の発現変化を検討した。

(方法) Dahl Sラットおよび食塩抵抗性(Dahl R)ラットそれぞれに普通食または高ナトリウム食(8%NaCl含有)を与えた。実験開始時、2週後、4週後に収縮期血圧をテールカフ法により測定し、4週後に断頭した。nNOS、AVPおよびOXT遺伝子にそれぞれ相補的な合成オリゴヌクレオチドプローブをRI(35S)標識し*In situ*ハイブリダイゼーション法を行なった。NADPH-ジアホラーゼ染色によりNOS活性も比較検討した。また、断頭後採血した血漿のAVP濃度を測定した。また、降圧薬による加療の影響も検討した。

(結果) 高ナトリウム食負荷Dahl Sラット群のみ収縮期血圧の顕著な上昇を認めた。高血圧症を発症したDahl Sラット群は発症しなかったDahl SおよびDahl Rラット群それぞれに対し視床下部室傍核および視索上核でnNOS遺伝子の発現が増加していた。NADPH-ジアホラーゼ活性も同様の傾向であった。また、ニカルジピンでは血圧の改善と共にnNOS遺伝子発現の増加も減少した。しかし、血圧に対しては同じ結果となったカプトプリル投与群ではさらにnNOS遺伝子の発現が増加していた。高ナトリウム食負荷ラット群では視床下部室傍核および視索上核のAVP遺伝子の発現が増加しており、その増加はDahl Rラット群よりもDahl S群の方が強い傾向にあった。OXT遺伝子も高ナトリウム食負荷ラット群でより強く発現が増加している傾向にあった。血中AVP濃度は高ナトリウム食負荷Dahl Sラット群で有意に増加していた。

(考察) Dahl Sラットの高血圧の病態に視床下部NOと下垂体後葉ホルモンが関与していることが示唆された。また、アンギオテンシン系も視床下部NOへ高血圧の病態とともに関与していることが示唆された。

助成番号 9949

食塩感受性高血圧の発症における視床下部ペプチドおよびNOの役割

助成研究者：山下 博 (産業医科大学 医学部)
共同研究者：澁谷 泉 (産業医科大学 医学部)
上田 陽一 (産業医科大学 医学部)
芹野 良太 (産業医科大学 医学部)

1. 研究目的

生体の恒常性維持の中枢である視床下部は外界および生体内からの情報を統合処理する部位であるが、体液バランス・循環動態の中枢であり、自律神経系と内分泌系の統合部位である室傍核および視索上核において神経型NO合成酵素 (nNOS) が多く発現している。このため、NOの合成調節機序を解明することは、体液調節や自律神経調節に関して新たな知見をもたらすことが期待される。NOは、血管内皮由来弛緩因子の本体であることが1987年に解明されて以来、NOの多彩な生理作用が明らかになりつつあり、特に末梢においては、他の降圧物質や昇圧物質との関係や高血圧を中心に様々な病態への関与が解明されている。生体内では、NOはL-arginineを基質として、NO合成酵素によって産生される。いままでに我々は、脱水 [1]・高張食塩水負荷 [1]・Hypovolemiaモデル [2]・糖尿病モデル [3]・尿崩症モデル [4,5]などの体液状態の変化している病態でのNO合成酵素の遺伝子レベルでの変化を報告してきた。そこで、本態性高血圧症の一モデルと考えられる食塩負荷により高血圧を発症する遺伝的素因をもつラット (Dahl)における視床下部nNOSの遺伝子発現を*In situ* ハイブリダイゼーション法を用いて検討した。NADPH-ジアホラーゼ染色によりNOS活性も比較検討した。さらに、視床下部の室傍核および視索上核において産生される神経ペプチド (バゾプレッシン (AVP)、オキシトシン (OXT)) の遺伝子発現および血中のAVP濃度についても検討した。

2. 研究方法

2.1 実験動物

実験には、高ナトリウム食負荷により高血圧を発症する食塩感受性Dahlラット (Dahl S)、高血圧を発症しない食塩抵抗性Dahlラット (Dahl R) および Sprague-Dawleyラット (SD) の六週令雄を用いた。Dahl S、Dahl R、SDをそれぞれ普通食 (0.3%NaCl) と高ナトリウム食 (8%NaCl) の2群 (計6群) に分け4週間飼育した (各群ともn=6-7)。実験開始時、2週後、4週後に収縮期血圧をテールカフ法により測定し、4週後に断頭した。4週間後に脳および血液を採取した。また、降圧薬によるnNOS遺伝子の発現量の変化を見るためにDahl Sを普通食と

高ナトリウム食群の他に後半二週間はニカルジピン (カルシウムチャネルブロッカー) およびカプトプリル (アンギオテンシン変換酵素阻害剤) といった降圧薬で加療する群を作成した。

2. *In situ* ハイブリダイゼーション法によるnNOSmRNA、AVPmRNAおよびOXTmRNAの検出の検出

断頭後、脳を取り出して直ちにドライアイスの上で凍結した。

クリオスタットを用いて12 μ mの凍結切片を作成し、-80 $^{\circ}$ Cに保存した。4%ホルマリン (5分) で固定後、脱イオン、脱水および脱脂を行った。ハイブリダイゼーションbuffer溶液に35SでRI標識したnNOS遺伝子に相補的な合成オリゴヌクレオチドプローブ (45mer, 796-840塩基, 100万cpm/スライド) を加えて、12-18時間インキュベーション (37 $^{\circ}$ C) した。また35SでRI標識したAVPおよびOXTに相補的な合成オリゴヌクレオチドプローブ (AVP:24mer; 1843-1868塩基, OXT:30mer; 912-941塩基 30万 cpm/スライド) を加えて、18時間インキュベーション (37 $^{\circ}$ C) した。洗浄は、1xSSC溶液で15分間x4回 (55 $^{\circ}$ C) および30分間x2回 (室温) を行った。乾燥後、スライドをHyperfilm (アマシャム) に7日 (nNOS) および6-8時間 (AVP、OXT) 露光した。

2. 3NADPHジアホラーゼ組織染色法

ラットを4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流し、脳を取り出し、固定液に一晩4 $^{\circ}$ Cで保存、シュクロース化を一日行った。その後、50 μ mの切片を作り、リン酸緩衝液で洗い、反応液 (Nitro-blue tetrazolium (NBT) 2mg, β -NADPH 10g/0.1M Tris buffer (pH7.6) 10ml) に浸して40 $^{\circ}$ Cで40分間反応させた。反応を止めた後に、リン酸緩衝液で洗い、スライドガラスに貼り付け、自然乾燥後、脱水および封入を行った。

3. 研究結果

血清ナトリウムおよび血漿浸透圧には有意差はなかった (Table 1)。Dahl Sの高ナトリウム食群のみ血圧の増加を認めた (Fig.1)。

nNOS遺伝子の発現量は食塩負荷にて増加傾向を認めたがDahl SおよびDahl Rの高ナトリウム食群間では室傍核および視索上核共に有意差を認め、血圧の上昇したDahl Sの群がより増加していた (Fig.2)。NADPH-ジアホラーゼ活性によるNOS活性の評価も同様の傾向であった (Fig.3)。

AVP遺伝子の発現変化はそれぞれ高ナトリウム食負荷にて2倍前後の増加を示した (Fig.4)。高ナトリウム食負荷された群の間ではやはり高血圧症を発症した群に更なる増加傾向が軽度見られた (Fig.4)。OXT遺伝子の発現変化はそれぞれ高ナトリウム食負荷にて軽度見られたが2-5割の増加であった (Fig.5)。血中のAVP濃度はSD、Dahl Sにて高ナトリウム食負荷にて増加傾向を示したが、高血圧症を発症した群のみにて3.5pmol/lとラットにおける高値を示した (Fig.6)。

実験開始の二週間後からの降圧薬による加療により血圧の上昇が抑制された (Fig.7A,8A)。ニカルジピン投与では血圧の上昇抑制と共にnNOS遺伝子の発現量

の増加も抑制された (Fig.7B,7C)。しかし、カプトプリル投与においては逆に nNOS 遺伝子の発現量の増加が認められた (Fig.8B,8C)。

4. 考察

今回、体液バランス・循環動態の中枢であり、自律神経系と内分泌系の統合部位である室傍核および視索上核において、食塩負荷にて高血圧症を発症する Dahl S ラットの nNOS 遺伝子発現および下垂体後葉ホルモンの遺伝子発現および血中の AVP 濃度が食塩抵抗性の Dahl R ラットに比べ高ナトリウム食負荷にて増加していることを明らかにした。特に抗利尿ホルモンである AVP の方が最近ナトリウム利尿作用がいられている OXT よりも遺伝子発現量の増加が著しく Dahl S により強く認められることは、これらの神経ペプチドが高血圧症に対して何らかの関与があることが示唆された。

今まで我々は、体液バランス・循環動態の中枢であり、自律神経系と内分泌系の統合部位である室傍核および視索上核において、脱水・高張食塩水負荷・Hypovolemia モデル・糖尿病モデルなどの体液状態の変化している病態での nNOS の遺伝子レベルでの変化を報告してきた [1-5]。今回、体液中のナトリウムや浸透圧は保たれているが、食塩負荷というストレスにて高血圧症を発症する Dahl S ラットは食塩抵抗性の Dahl R ラットに比べ nNOS 遺伝子発現量が増加していることは自律神経系と内分泌系の統合部位である室傍核および視索上核において NO は高血圧状態に対して何らかの関与があることが示唆された。

また、降圧薬の種類によりこの食塩感受性にて血圧が上昇する Dahl S ラットの室傍核および視索上核での nNOS 遺伝子発現量が変化していた。これは、RT-PCR 法による他の高血圧症モデルラット [6-9] での nNOS 遺伝子発現量の変化を検討すると、ミネラルコルチコイド中枢投与やレニン-アンギオテンシン系が賦活している腎血管性高血圧症モデルでは減少しており、腎不全モデルや自然発症高血圧ラットでは、本研究のモデルラットと同様に増加していた。これらのことから、nNOS 遺伝子発現量は血圧の変化とは別にアンギオテンシン系を介している可能性があり、今後中枢神経系においても病態的に、また中枢から自律神経を介し調節されている血管、心臓や腎臓などの合併症の重症度により降圧薬の選択を考えていく可能性への知見を与えると思われる。

5. 文献

1. Ueta, Y. Levy, A. Chowdrey, H. S. & Lightman, S. L. (1995) Water deprivation in the rat induces nitric oxide synthase (NOS) gene expression in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Neurosci Res.* 23:317-319
2. Ueta, Y. Levy, A. Lightman, S. L. Hara, Y. Serino, R. Nomura, M. Shibuya, I. Hattori, Y. & Yamashita, H. (1998) Hypovolemia upregulates the expression of neuronal nitric oxide synthase gene in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats. *Brain Res.* 790:25-32
3. Serino, R. Ueta, Y. Tokunaga, M. Hara, Y. Nomura, M. Kabashima, N. Shibuya, I. Hattori, Y. Yamashita, H. (1998) Upregulation of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 41:640-648
4. Anai, H. Ueta, Y. Serino, R. Nomura, M. Kabashima, N. Shibuya, I. Takasugi, M. Nakashima, Y. & Yamashita, H. (1997) Upregulation of the expression of vasopressin gene in the paraventricular and supraoptic nuclei of the lithium-induced diabetes insipidus rat. *Brain Res.* 772: 161-166
5. Yamamoto, Y. Ueta, Y. Nomura, M. Serino, R. kabashima, N. Shibuya, I. & Yamashita, H. (1997) Upregulation of neuronal NOS mRNA in the PVN and SON of inherited diabetes insipidus rats. *NeuroReport* 8(18)
6. Plochocka-Zulinska, D. & Krukoff, T. L. (1997) Increased gene expression of neuronal nitric oxide synthase in brain of adult spontaneously hypertensive rats. *Mol Brain Res.* 48:291-297
7. Ye, S. Nosrati, S. & Campese, V. M. (1997) Nitric oxide (NO) modulates the neurogenic control of blood pressure in rats with chronic renal failure (CRF). *J Clin Invest.* 99:540-548
8. Krukoff, T. L. Gehlen, F. Ganten, D. & Wagner, J. (1995) Gene expression of brain nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in hypothalamus and medulla of two-kidney, one clip hypertensive rats. *Hypertension* 26:171-176
9. Takeda, Y. Miyamori, I. Yoneda, T. Furukawa, K. Inaba, S. Takeda, R. & Mabuchi, H. (1997) Brain nitric oxide synthase messenger RNA in central mineralocorticoid hypertension. *Hypertension* 30:953-956

Table 1

Plasma sodium and osmolality in Sprague-Dawley (SD), Dahl salt-sensitive (Dahl S) and Dahl salt-resistant (Dahl R) rats at 4 weeks after being given either a normal or a high salt diet.

	SD/normal	SD/high sal	Dahl S/normal	Dahl S/high salt	Dahl R/normal	Dahl R/high salt
Na (mEq/l)	142 ± 0.3	143 ± 0.5	141 ± 0.8	141 ± 0.5	141 ± 0.2	143 ± 0.3
Osmolality (mOsm/kg H ₂ O)	298 ± 0.9	299 ± 0.6	299 ± 1.6	301 ± 1.0	298 ± 0.7	301 ± 1.1

Values are the mean ± S.E.M.; n= 6 rats per group.

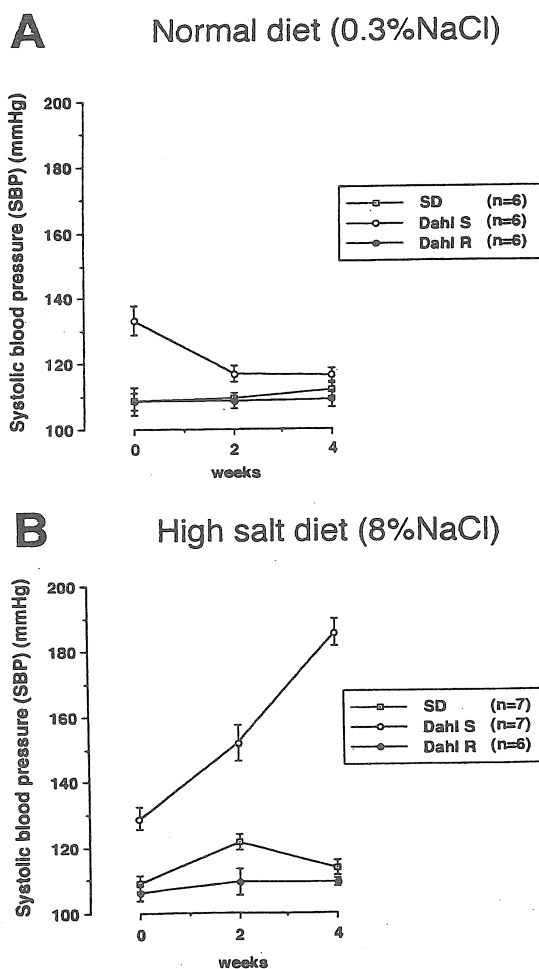


Figure 1. The changes of systolic blood pressure in Sprague-Dawley, Dahl salt-sensitive and Dahl salt-resistant rats at 0, 2 and 4 weeks after being given either a normal diet (A) or a high salt diet (B).

SD; Sprague-Dawley rats, Dahl S; Dahl salt-sensitive rats, Dahl R; Dahl salt-resistant rats
 Values represent mean ± S.E.M.

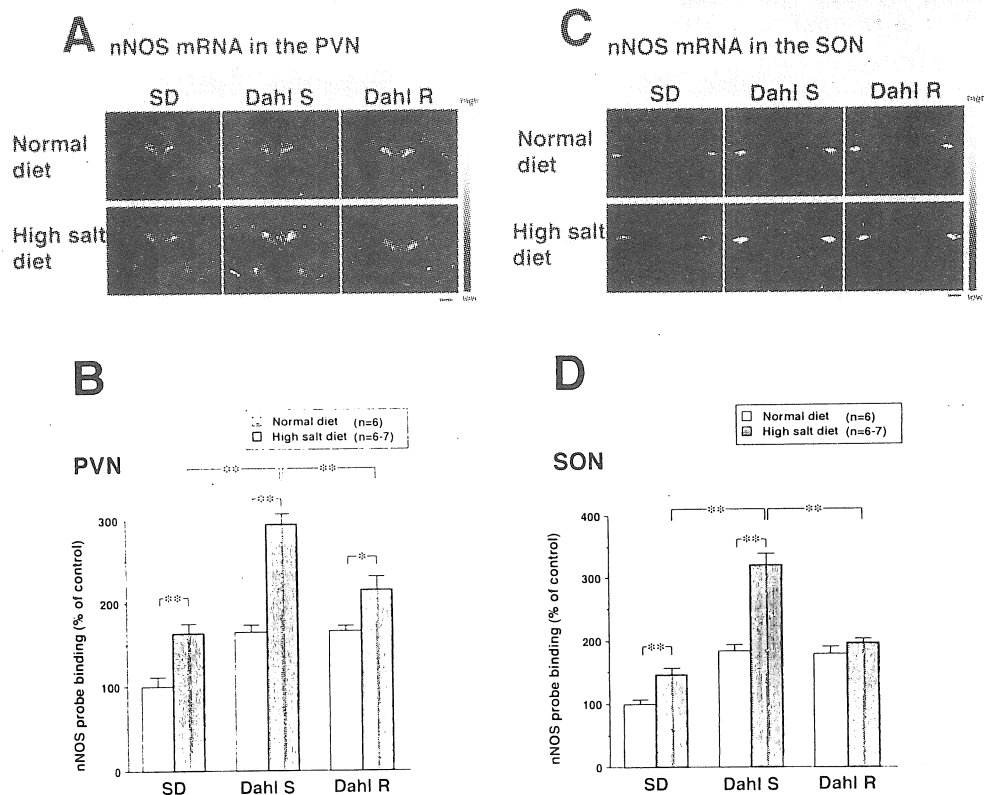


Figure 2. Representative computer-generated images of autoradiograms of tissue hybridized to a ^{35}S -labelled oligodeoxynucleotide probe complementary to neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA in the paraventricular nucleus (PVN) (A) and the supraoptic nucleus (SON) (C) of Sprague-Dawley (SD), Dahl salt-sensitive (Dahl S) and Dahl salt-resistant (Dahl R) rats at 4 weeks after being given either a normal or a high salt diet. 'White' is the most intense signal and 'black' is the least intense signal. Scale bar is 1 mm in length. The effects of a high salt diet on nNOS transcript prevalence in the PVN (B) and the SON (D) of SD, Dahl S, and Dahl R rats at 4 weeks after being given either a normal or a high salt diet. The levels of control was obtained from SD rats given a normal diet. Values represent mean \pm S.E.M.. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (one-way fractional ANOVA followed by Bonferroni-type)

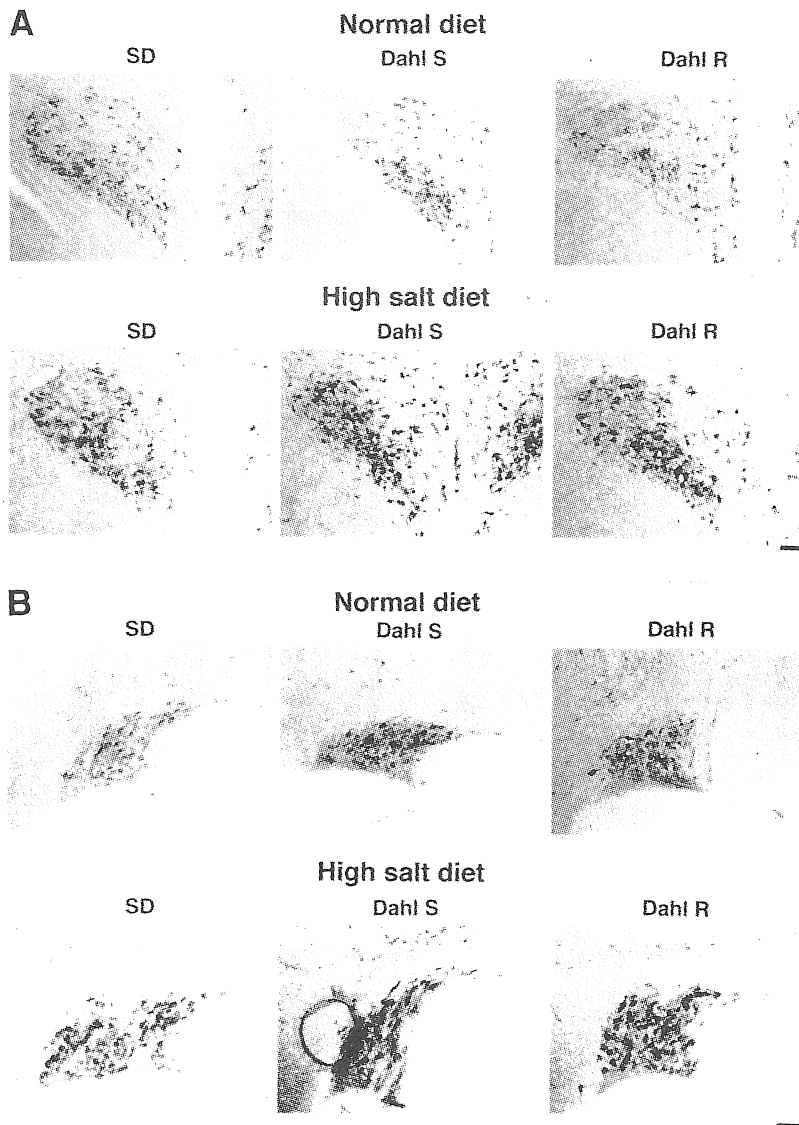


Figure 3 . Representative NADPH-diaphorase staining in the paraventricular nucleus (PVN) (A) and the supraoptic nucleus (SON) (B) in Sprague-Dawley (SD), Dahl salt-sensitive (S) and Dahl salt-resistant (R) rats at 4 weeks after being given either a normal or a high salt diet. Scale bars are 100 μ m in length.

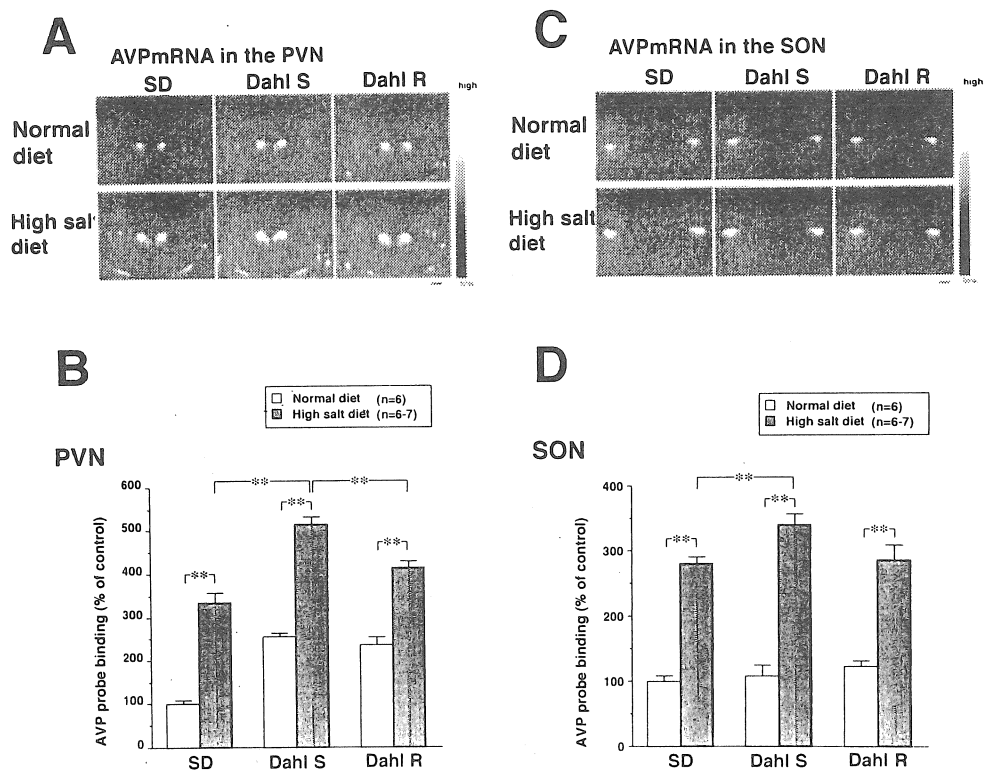


Figure 4. Representative computer-generated images of autoradiograms of tissue hybridized to a ^{35}S -labelled oligodeoxynucleotide probe complementary to arginine vasopressin (AVP) mRNA in the paraventricular nucleus (PVN) (A) and the supraoptic nucleus (SON) (C) in Sprague-Dawley (SD), Dahl salt-sensitive (Dahl S) and Dahl salt-resistant (Dahl R) rats at 4 weeks after being given either a normal or a high salt diet. 'White' is the most intense signal and 'black' is the least intense signal. Scale bar is 1 mm in length. The effects of a high salt diet on AVP transcript prevalence in the PVN (B) and the SON (D) of SD, Dahl S, and Dahl R rats at 4 weeks after being given either a normal or a high salt diet. The levels of control was obtained from SD rats given a normal diet. Values represent mean \pm S.E.M.. ** $P < 0.01$ (one-way fractional ANOVA followed by Bonferroni-type)

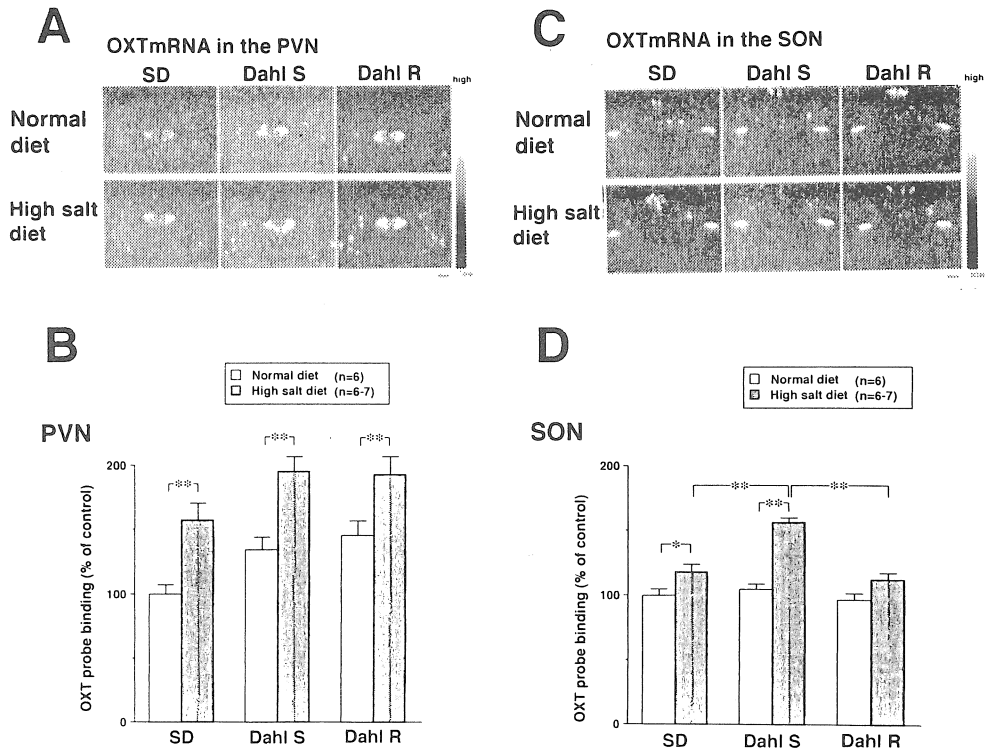


Figure 5. Representative computer-generated images of autoradiograms of tissue hybridized to a ³⁵S-labelled oligodeoxynucleotide probe complementary to oxytocin (OXT) mRNA in the paraventricular nucleus (PVN) (A) and the supraoptic nucleus (SON) (C) of Sprague-Dawley (SD), Dahl salt-sensitive (Dahl S) and Dahl salt-resistant (Dahl R) rats at 4 weeks after being given either a normal or a high salt diet. ‘White’ is the most intense signal and ‘black’ is the least intense signal. Scale bar is 1 mm in length. The effects of a high salt diet on OXT transcript prevalence in the PVN (B) and the SON (D) of SD, Dahl S, and Dahl R rats at 4 weeks after being given either a normal or a high salt diet. The levels of control was obtained from SD rats given a normal diet. Values represent mean ± S.E.M.. ***P*<0.01, **P*<0.05 (one-way fractional ANOVA followed by Bonferroni-type)

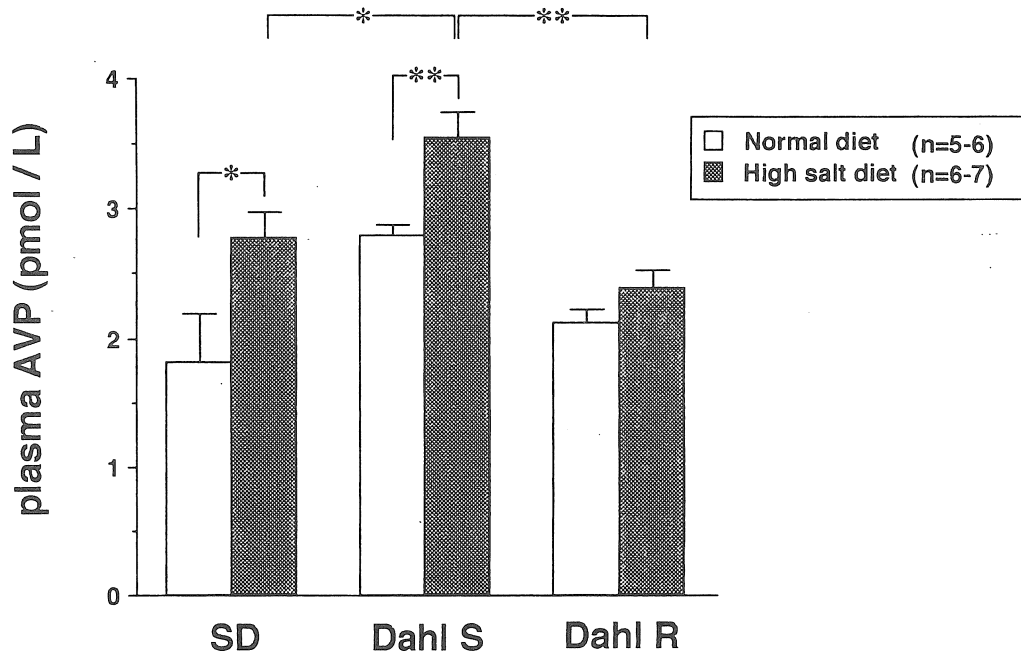


Figure 6. The plasma concentration of arginine vasopressin (AVP) in Sprague-Dawley, Dahl salt-sensitive and Dahl salt-resistant rats at 4 weeks after being given either a normal or a high salt diet.

SD; Sprague-Dawley rats, Dahl S; Dahl salt-sensitive rats, Dahl R; Dahl salt-resistant rats
Values represent mean \pm S.E.M.. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (one-way fractional ANOVA followed by Bonferroni-type)

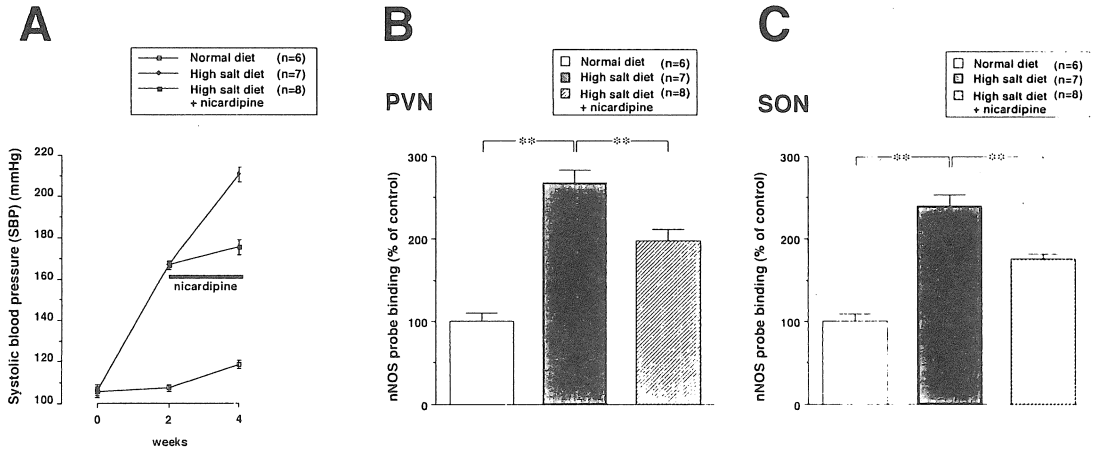


Figure 7. Effects of treatment with nicardipine on the systolic blood pressure (A) in Dahl salt-sensitive (S) rats given a high salt diet and nNOS transcript prevalence in the paraventricular nucleus (PVN) (B) and the supraoptic nucleus (SON) (C) of Dahl S rats at 4 weeks after being given a high salt diet. Nicardipine was added to the drinking water (0.03% nicardipine) for 2 weeks beginning at 2 weeks after the high salt diet began to be given in Dahl S rats. Values represent mean \pm S.E.M.. ** $P < 0.01$ (one-way fractional ANOVA followed by Bonferroni-type adjustment for multiple comparisons)

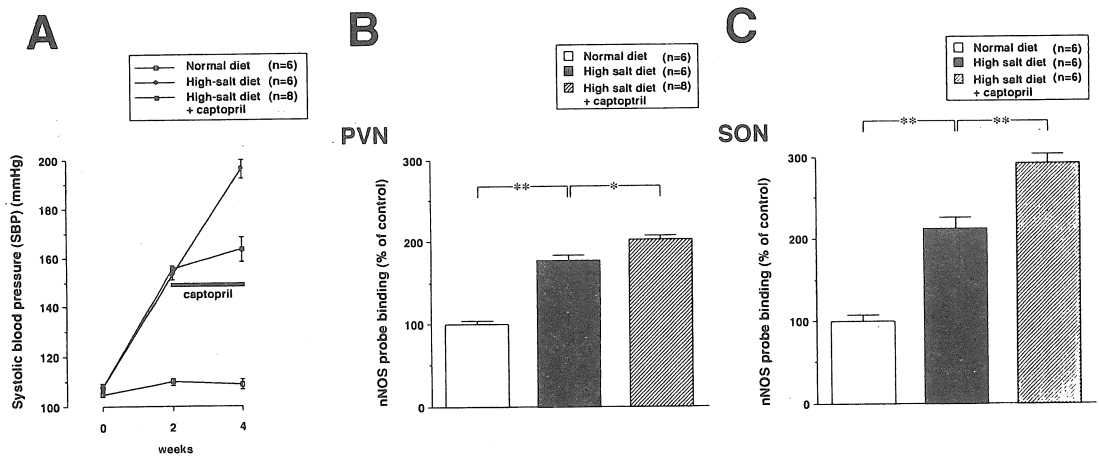


Figure 8. Effects of treatment with captopril on the systolic blood pressure (A) in Dahl salt-sensitive (S) rats given high salt diet and nNOS transcript prevalence in the paraventricular nucleus (PVN) (B) and the supraoptic nucleus (SON) (C) in Dahl S rats at 4 weeks after being given a high salt diet. Captopril was added to the drinking water (0.3% captopril) for 2 weeks beginning at 2 weeks after the high salt diet began to be given in Dahl S rats. Values represent mean \pm S.E.M.. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (one-way fractional ANOVA followed by Bonferroni-type adjustment for multiple comparisons)

Salt-loading Increased the Levels of Neuronal Nitric Oxide Synthase and Vasopressin gene in Salt-sensitive Dahl Rat

Hiroshi Yamashita, Izumi Shibuya, Yoichi Ueta and Ryota Serino

Department of Physiology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan.

summary

Dahl salt-sensitive (S) rats given a high salt diet developed hypertension. The concentrations of plasma arginine vasopressin (AVP) in hypertensive Dahl S rats were significantly increased in comparison with those in Sprague-Dawley (SD) rats and Dahl salt-resistant (R) rats on a high salt diet. AVP mRNA in the paraventricular (PVN) and the supraoptic nuclei (SON) of SD, Dahl S and Dahl R rats on a high salt diet was significantly increased in comparison with those on a normal diet. The levels of AVP mRNA in the PVN of hypertensive Dahl S rats were significantly increased in comparison with levels in SD and Dahl R rats on a high salt diet. The levels of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and NADPH-diaphorase activity in the PVN and SON of hypertensive Dahl S rats were greater than those in Dahl R rats on a high salt diet. The development of hypertension was suppressed by treatment with nicardipine and captopril. The nNOS mRNA in the PVN and SON of Dahl S rats given a high salt diet was not upregulated by treatment with nicardipine, while the nNOS mRNA in salt-loaded Dahl S rats was greater upregulated by treatment with captopril to a greater than without the antihypertensive drug. These results suggest that the synthesis of NO, as well as AVP in the PVN and SON, is markedly upregulated by salt loading in hypertensive Dahl S rats and the upregulation of expression may be influenced by the hypertensive state.