

助成番号 0643

食塩負荷による脳内活性酸素を介した交感神経活動亢進作用に関する検討： 産生源としての NAD(P)H oxidase 及びアンジオテンシン受容体拮抗薬の効果

廣岡 良隆¹, 岸 拓弥², 相良 洋治¹, 野副 純世², 古閑 靖章²¹九州大学病院循環器内科, ²九州大学大学院医学研究院

概要 【背景及び目的】高食塩負荷は自然発症高血圧ラット(SHR)において交感神経活性化及び血圧を上昇させる。頭側延髄腹外側野(RVLM)内の活性酸素種は高血圧ラットで増加している。一方、活性酸素はアンジオテンシン受容体刺激によって産生される。

【方法及び結果】雄性6週齢のSHR及び対照としてWistar-Kyotoラット(WKY)を高食塩負荷(8% NaCl)あるいは通常食塩負荷(0.5% NaCl: RS)を6週間行った。テールカフ法で測定した収縮期血圧はHS-SHR群でRS-SHR群より8週時より有意に増加していた(214 ± 4 mmHg vs 172 ± 4 mmHg, $n = 8$, $P < 0.05$)。尿中ノルエピネフリン排泄量はHS-SHR群でRS-SHR群より12週齢で高値を示した(2.09 ± 0.10 $\mu\text{g/day}$ vs 1.47 ± 0.05 $\mu\text{g/day}$, $n = 5$, $P < 0.05$)。RVLMにおける活性酸素はTBARSレベルを測定することによって評価し、HS-SHR群でRS-SHR群より有意に高かった(9.9 ± 0.5 $\mu\text{mol/g wet wt}$ vs 8.1 ± 0.6 $\mu\text{mol/g wet wt}$, $n = 5$, $P < 0.05$)。血圧調節におけるRVLMの活性酸素の役割を調べるため、tempolを12週齢のSHRの両側RVLMへ微量注入した。両側RVLMへのtempol微量注入によってHS-SHR群でRS-SHR群より大きな降圧反応が認められた。また、静脈内投与したヘキサメソニウムはHS-SHR群でRS-SHR群より降圧反応が大きく、降圧時の血圧レベルは同程度まで低下した。この事はHS-SHR群では交感神経活動亢進が増強していることを示唆する。ウエスタンブロットで評価したRVLMにおけるアンジオテンシン1型受容体の発現レベルはHS-SHR群でRS-SHR群より高かった(5.1 ± 0.5 vs 3.4 ± 0.3 , $n = 6$, $P < 0.05$)。また、NAD(P)H活性も同様であった。

【結論】以上の成績は、HS-SHRはRVLMにおける活性酸素産生が増加しており交感神経系の活性化によって更なる血圧上昇を生じることを示唆する。増加した活性酸素産生は中枢アンジオテンシン系を介したNAD(P)H oxidase活性化によるものと考えられる。

1. 研究目的

超高齢社会を迎えた現代、健康な高齢者社会を築く上で高血圧症患者の管理・治療はますます重視されている。生活習慣の是正のひとつである減塩は食塩摂取量が多い我が国では簡便かつ経済的な治療法である。従って、日本高血圧学会によるガイドライン(JSH2004)においても減塩が強調されている。

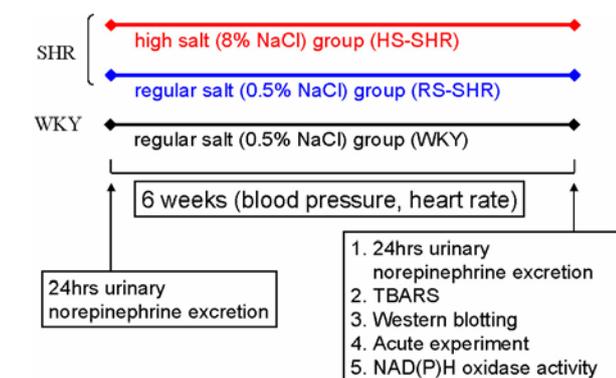
食塩感受性高血圧の機序として、腎臓での水・ナトリウムのハンドリングの異常があるが交感神経活性化が深く関わっている^{1, 2)}。その活性化に脳内レニン-アンジオテンシン系の活性化を示唆する報告がなされている^{1, 2)}。従って、本研究の目的は、心血管中枢である頭側延髄腹外側野(RVLM; rostral ventrolateral medulla)において、食塩負荷により脳内レニン-アンジオテンシン系の活性化によりNAD(P)H oxidaseを介した脳内活性酸素産生が増加し、

交感神経活動亢進を介した血圧上昇につながるか否か、を明らかにすることであった。また、もしそうであればアンジオテンシン受容体拮抗薬の有用性についても検討することを目的とした。

2. 研究方法

雄性SHR(6週齢)及び対照として正常血圧ラット(WKY; 6週齢)に対して、8%あるいは0.5%食塩食を投与し、6週間観察した。血圧はテールカフ法を用いて測定した。交感神経活動の指標として尿中ノルエピネフリン排泄量を測定した。血圧上昇に対する交感神経系の関与がどの程度かを調べる目的でhexamethoniumを静注しその降圧反応の程度を比較検討した。RVLMにおける活性酸素産生の指標としてThiobarbituric-reactive substances(TBARS)のレベルを測定した。また、スーパーオキシド消

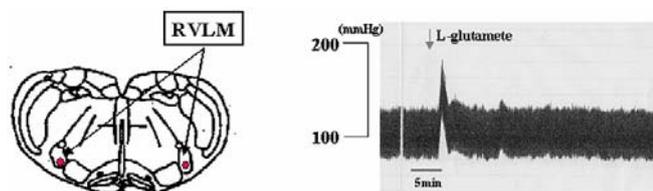
去剤である tempol (10 pmol, 100 pmol, 1 nmol) を両側 RVLM へ微量注入し降圧反応の程度を比較検討した。RVLM におけるレニン-アンジオテンシン系の活性化については RVLM 組織の AT1 受容体発現レベルを Western blot 法を用いて評価した。さらに、NAD(P)H oxidase 活性を測定した。



Acute experiment

- ・両側RVLMへSOD様物質tempolの微量投与(10pmol, 100pmol, 1nmol)。
- ・Hexamethonium(40mg/kg)の静脈内投与。

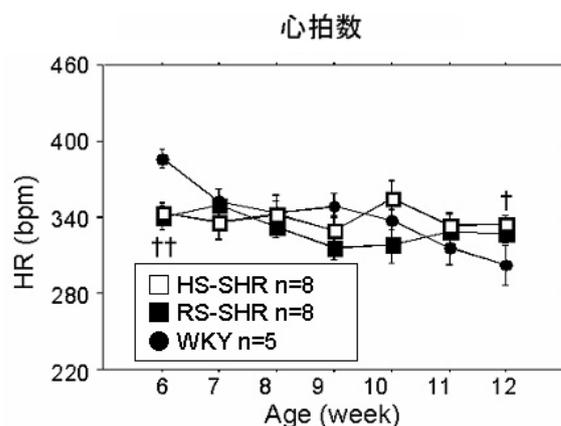
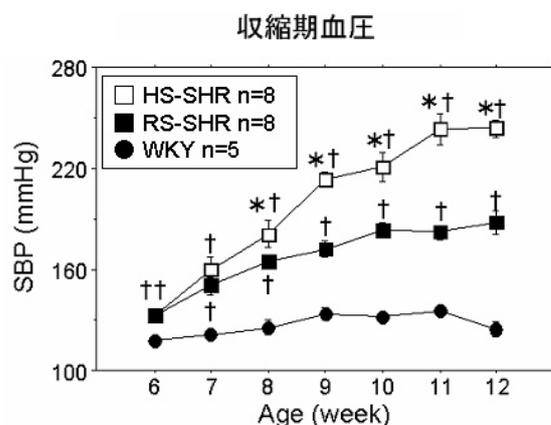
<RVLMの部位とglutamate微量投与による昇圧反応による部位同定>



3. 研究結果

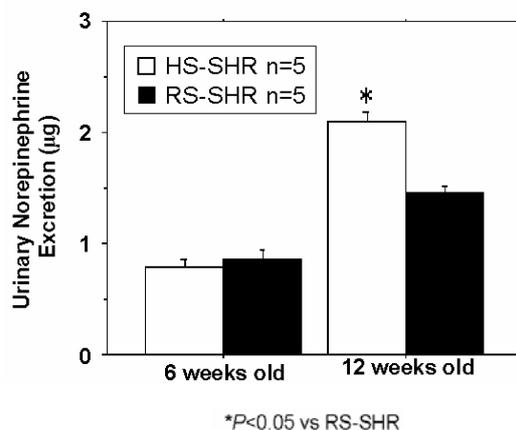
収縮期血圧は高食塩負荷 SHR 群で通常食塩負荷 SHR 群に比べ 8 週齢より有意に高くなった (214 ± 4 mmHg vs 172 ± 4 mmHg, $P < 0.05$, $n = 8$)。しかし、WKY ではそのような変化は認められなかった。12 週齢で測定した尿中ノルエピネフリン排泄量は、高食塩負荷 SHR 群で通常食塩負荷 SHR 群より有意に高値を示した (2.09 ± 0.10 $\mu\text{g/day}$ vs 1.47 ± 0.05 $\mu\text{g/day}$, $P < 0.05$, $n = 5$)。6 週齢時尿中ノルエピネフリン排泄量 (0.79 ± 0.07 $\mu\text{g/day}$ vs 0.86 ± 0.09 $\mu\text{g/day}$, $n = 5$) の値から比べると各々の群で血圧上昇に伴い交感神経系の充進が生じたことが示された。静脈内投与した hexamethonium による降圧反応は高食塩負荷 SHR 群で通常食塩負荷 SHR 群より大きく (変化量 -108 ± 10 mmHg vs -63 ± 6 mmHg, $P < 0.05$, $n = 7$)、降圧時に

同程度の血圧レベルまで血圧は下降した (79 ± 4 mmHg vs 73 ± 3 mmHg, NS, $n = 7$)。



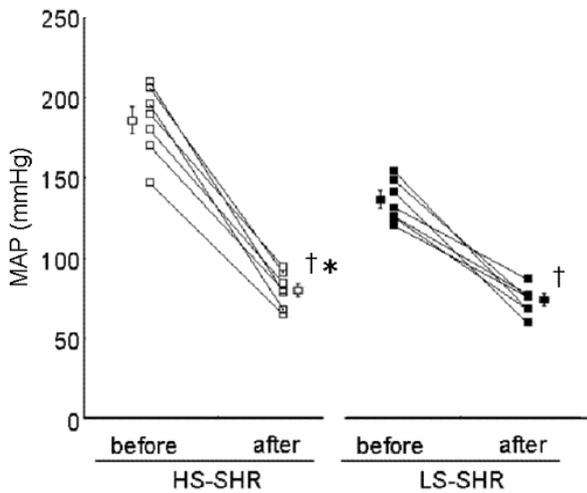
* $P < 0.05$ HS-SHR vs RS-SHR, † $P < 0.05$ vs WKY

24時間尿中ノルエピネフリン排泄量



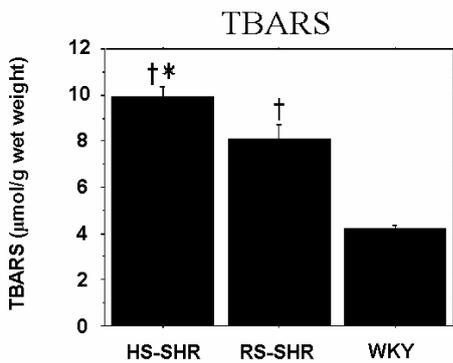
* $P < 0.05$ vs RS-SHR

Hexamethonium 静脈内投与による平均血圧の反応



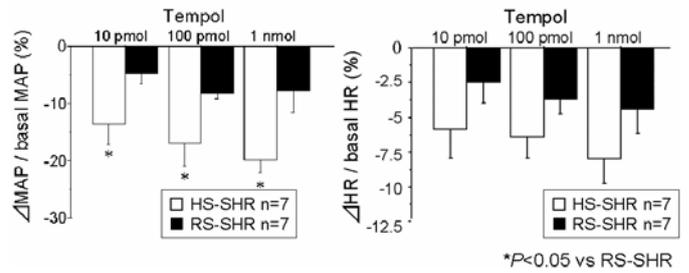
*Significant differences in responses to the hexamethonium iv between HS-SHR and RS-SHR ($P < 0.05$)
 † Significant responses to the hexamethonium iv ($P < 0.05$). n=7 for each

RVLM における TBARS レベルは高食塩負荷 SHR 群で通常食塩負荷 SHR 群に比べ有意に増加していた ($9.9 \pm 0.5 \mu\text{mol/g wet wt}$ vs $8.1 \pm 0.6 \mu\text{mol/g wet wt}$, $P < 0.05$, $n = 5$)。これらの値は WKY における値より明らかに大きかった。両側 RVLM への tempol 微量注入によって、高食塩負荷 SHR 群で通常食塩負荷 SHR 群より降圧反応の程度が大きかった (前値 $200 \pm 3 \text{ mmHg}$ vs $155 \pm 3 \text{ mmHg}$, $P < 0.05$, $n = 7$, 変化率 $\Delta\text{mean BP}/\text{basal mean BP}$: tempol; 10 pmol $-13.5 \pm 3.6\%$ vs $-4.7 \pm 1.9\%$, 100 pmol $-17.0 \pm 3.9\%$ vs $-8.1 \pm 1.0\%$, 1 nmol $-19.8 \pm 2.4\%$ vs $-7.8 \pm 3.8\%$, $P < 0.05$, $n = 7$)。



Lipid peroxidation indicated by TBARS levels in RVLM tissues from each group of SHR and WKY ($n = 5$ for each). † $P < 0.05$ vs WKY, * $P < 0.05$ vs RS-SHR

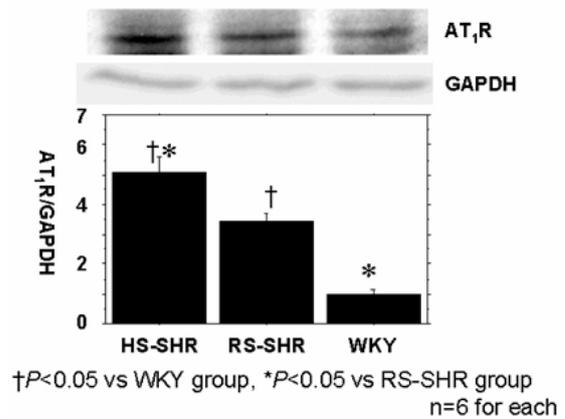
両側RVLMへのTempol微量投与による平均血圧及び心拍数の反応



* $P < 0.05$ vs RS-SHR

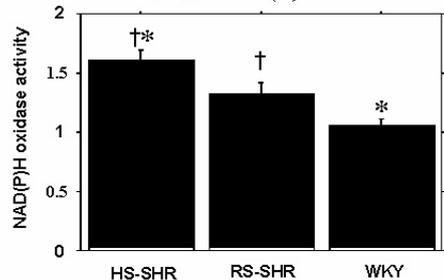
Western blot 法で評価した AT₁ 受容体発現レベルは高食塩負荷 SHR 群で通常食塩負荷 SHR 群より有意に増強していた (5.1 ± 0.5 vs 3.4 ± 0.3 , $P < 0.05$, $n = 6$)。また、SHR 群では WKY に比べ明らかに発現は増強していた。また、NAD(P)H oxidase 活性も同様の結果であった (HS-SHR vs RS-SHR; 1.53 ± 0.10 vs 1.25 ± 0.10 , $P < 0.05$, $n = 9$, HS-SHR vs WKY; 1.53 ± 0.10 vs 1.00 ± 0.05 , $P < 0.05$, $n = 9$, RS-SHR vs WKY; 1.25 ± 0.10 vs 1.00 ± 0.05 , $P < 0.05$, $n = 9$)。

RVLMにおけるAT₁受容体の発現



† $P < 0.05$ vs WKY group, * $P < 0.05$ vs RS-SHR group
 n=6 for each

RVLMにおけるNAD(P)H oxidaseの活性



† $P < 0.05$ vs WKY group, * $P < 0.05$ vs RS-SHR group
 n=9 for each

4. 考 察

本研究の主要な成績は、高食塩負荷によって遺伝的素因により高血圧を発症する SHR で交感神経系の活性化による更なる血圧上昇を生じ、その機序として RVLM における活性酸素産生増加が関与していることを強く示唆するものである。さらに、RVLM における活性酸素産生増加は同部位における AT1 受容体を介した NAD(P)H oxidase 活性化の増加によるものと考えられた。

高食塩負荷 SHR 群における血圧上昇は通常食塩負荷 SHR 群より大きく、交感神経系の亢進が主要な役割を果たすことはヘキサメソニウム投与実験の結果から支持される。この機序として脳内、特に交感神経活動を規定する脳幹部に存在する RVLM の活性酸素産生増加が関与していることは、TBARS レベルの測定及び tempol の RVLM への微量注入実験結果が支持する。

本研究では、RVLM 内活性酸素産生増加の産生源として AT1 受容体刺激を介した NAD(P)H oxidase の活性化が考えられた。活性酸素の産生源としては NAD(P)H oxidase、xanthine oxidase、アンカップルド一酸化窒素合成酵素、ミトコンドリアなど多数ある³⁻⁶⁾。現在、アンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)が降圧薬として頻用されるようになり、ARB の多面性が注目されている。そのひとつが抗酸化作用である。AT1 受容体刺激は NAD(P)H oxidase の活性化によりスーパーオキシドを産生する。NAD(P)H oxidase の活性化にはそのコンポーネントのひとつである低分子量 G 蛋白である Rac1 の活性化が必要である⁷⁾。本研究の結果に示したように、高食塩負荷によって Rac1 の活性化が生じていることから NAD(P)H oxidase の活性化によってスーパーオキシド産生増加、酸化ストレスの増大、交感神経活性化の増強、血圧レベル増加につながっていることが示唆される。

食塩感受性高血圧における交感神経系活性化の関与の重要性は多くの報告がある。通常、食塩負荷ではレニン-アンジオテンシン系は抑制されるのが正常な生理反応である。しかし、食塩感受性高血圧ではこの反応に異常をきたしているという¹⁾。これに対しては異論もある。しかし、組織レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系が活性化されるのは確かなようである。ただし、この機序については不明である。我々は食塩感受性高血圧に関して脳内機序以外の関与についても考慮しなければならない。特に、腎臓はその関与が示唆されている。Campese らのグループの報告では、腎不全高血圧モデルでは食塩負荷

と交感神経活動亢進による血圧上昇機序が示唆されている⁸⁾。いずれにせよ交感神経活性化の重要性が関与している点は共通している。また、フェノールを腎臓に塗ったモデルでは酸化ストレスの増加が関与しているという。さらに、アンジオテンシン II による交感神経刺激作用は活性酸素産生を介していることを示唆する報告もしており、本研究の脳内活性酸素産生増加と AT1 受容体発現増加が認められたことと関係があるかも知れない。以前より彼らのグループは腎不全高血圧モデルにおける交感神経活性化に脳内一酸化窒素(NO)の役割を報告してきた。我々も脳内 NO が交感神経活動を抑制することをいくつか報告しており^{3, 4, 7, 9)}、活性酸素と NO はお互いに密接に関連することから¹⁰⁾、今後の検討が待たれる。食塩負荷が交感神経を活性化する機序は血中ナトリウムのわずかな上昇からこれまたわずかな浸透圧の上昇が生じ、それが浸透圧受容体を介して交感神経系を活性化すると考えられている^{11, 12)}。また、脳内機序の重要性が数多く報告されており、特に脳脊髄液中 Na 濃度の上昇から脳内アンジオテンシン系の活性化が生じると考えられている^{13, 14)}。これには脳内ウワバイン様物質、Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ (FMRamide)-gated Na⁺ channel の活性化が仲介していると Leenen らのグループは述べている^{13, 14)}。一方、Weiss らは前視床下部核から RVLM への脱抑制反応が関与していることを報告している²⁾。いずれにせよ、RVLM は鍵となる部位である。本研究では、同部位での活性酸素産生増加が重要であることを提唱するものである。高食塩負荷が如何にして RVLM 内の活性酸素産生を SHR で増加させるのか、WKY ではどうして生じないのかは不明である。少なくとも RVLM の AT1 受容体発現レベルの増加が生じているので脳内アンジオテンシン系の活性化は食塩感受性における重要な役割を担っていると考えられる。ACE 活性も増加しているという報告もある。

以上の成績は、高食塩負荷によって脳内、特に心血管中枢である RVLM の AT1 受容体を介して NAD(P)H oxidase 活性化による活性酸素産生増加から交感神経活動の亢進が生じ、SHR における血圧上昇増強反応が生じていることを示唆する。

5. 今後の課題

本研究期間では、アンジオテンシン受容体拮抗薬の RVLM 内への直接投与により降圧反応を検討するまでには至らなかった。今後、検討する予定である。なお、他の

施設からの報告では、SHR において RVLM 内への ARB の投与により降圧反応が認められたとされている。一方、WKY ではそのような変化は認められなかった。従って、高食塩負荷群と通常食塩負荷群で違いが認められればより興味深い。また、ARB であるカンデサルタンの経口投与が脳内活性酸素を抑制したとする成績も報告されており¹⁵⁾、臨床で使用している ARB の効果に本研究における機序が如何に関与しているかは今後の検討課題である。さらに、食塩感受性モデルとして SHR を本研究では用いたが、他のモデルすなわち、Dahl 食塩感受性ラットや deoxycorticosterone acetate 食塩高血圧モデルラットなどでも交感神経系の活性化、特に脳内機序の重要性が示唆されている。今後の検討が必要である。

文献等

1. Brooks VL, Haywood JR, Johnson AK. Translation of salt retention to central activation of the sympathetic nervous system in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 426-432, 2005.
2. Carlson SH, Roysomutti S, Peng N, Wyss M. The role of the central nervous system in NaCl-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 14: 155S-162S, 2001.
3. Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 109: 2357-2362, 2004.
4. Kimura Y, Hirooka Y, Sagara Y, Ito K, Kishi T, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa K. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress. *Circ Res* 96: 252-260, 2005.
5. Zhou M-S, Adam AG, Jaimes EA, Raj L. In salt-sensitive hypertension, increased superoxide production is linked to functional upregulation of angiotensin II. *Hypertension* 42: 945-951, 2003.
6. Tandai-Hiruma M, Horiuchi J, Sakamoto H, Kemuriyama T, Hirakawa H, Nishida Y. Brain neuronal nitric oxide synthase neuron-mediated sympathoinhibition is enhanced in hypertensive Dahl rats. *J Hypertens* 23: 825-834, 2005.
7. Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, Sagara Y, Kishi T, Engelhardt JF, Sunagawa K. Inhibition of Rac1-derived reactive oxygen species in nucleus tractus solitarius decreases blood pressure and heart rate in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 50, 2007 (in press).
8. Ye S, Zhong H, Campese VM. Oxidative stress mediates the stimulation of sympathetic nerve activity in the phenol renal injury model of hypertension. *Hypertension* 48: 309-315, 2006.
9. Hirooka Y, Kimura Y, Nozoe M, Sagara Y, Ito K, Sunagawa K. Amlodipine-induced reduction of oxidative stress in the brain is associated with sympatho-inhibitory effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 29: 49-56, 2006.
10. Fujita M, Kuwaki T, Ando K, Fujita T. Sympatho-inhibitory action of endogenous adrenomedullin through inhibition of oxidative stress in the brain. *Hypertension* 45: 1165-1172, 2005.
11. O'Donoghue TL, Qi Y, Brooks VL. Central action of increased osmolality to support blood pressure in deoxycorticosterone acetate-salt rats. *Hypertension* 48: 658-663, 2006.
12. Toney GM, Chen QH, Cato MJ, Stocker SD. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand* 177: 43-55, 2003.
13. Huang BS, Leenen FHH. Brain amiloride-sensitive Phe-Met-Arg-Phe-NH₂-gated Na⁺ channels and Na⁺-induced sympathoexcitation and hypertension. *Hypertension* 39: 557-561, 2002.
14. Huang BS, Cheung WJ, Tan J, White RA, Leenen FHH. Activation of brain renin-angiotensin-aldosterone system by central sodium in Wistar rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1109-H1117, 2006.
15. Kim-Mitsuyama S, Yamamoto E, Tanaka T, Zhan Y, Izumi Y, Izumiya Y, Irooi T, Wanibuchi H, Iwao H. Critical role of angiotensin II in excess salt-induced brain oxidative stress of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 36: 1077-1082, 2005.

No. 0643

Activation of the Sympathetic Nervous System via Reactive Oxygen Species in the Brain Induced by Salt Loading: Role of NAD(P)H Oxidase and Effects of Angiotensin Receptor Blockers.

Yoshitaka Hirooka, Takuya Kishi, Yoji Sagara, Masatsugu Nozoe, Yasuaki Koga

Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Hospital

Summary

A high salt diet (HS) causes sympathetic hyperactivity and increases resting blood pressure (BP) in spontaneously hypertensive rats (SHR). Reactive oxygen species (ROS) in the rostral ventrolateral medulla (RVLM) are increased in hypertensive rats and AT₁ receptor stimulation activates ROS generation. We examined whether HS increases ROS in the RVLM of SHR and, if so, whether this increase in ROS generation is caused by central angiotensin II activation via NAD(P)H oxidase. Male 6-week-old SHR and Wistar-Kyoto rats (WKY) were fed an HS (8% NaCl) or regular salt diet (0.5% NaCl: RS) for 6 weeks. BP was measured by the tail-cuff method. At 12 weeks of age, systolic BP was significantly higher in HS-SHR than in RS-SHR from 8 weeks of age on (214 ± 4 mmHg vs 172 ± 4 mmHg, $n = 8$, $P < 0.05$). Urinary norepinephrine excretion was significantly higher in HS-SHR than in RS-SHR at 12 weeks of age (2.09 ± 0.10 $\mu\text{g/day}$ vs 1.47 ± 0.05 $\mu\text{g/day}$, $n = 5$, $P < 0.05$). ROS levels in the RVLM were evaluated by measuring the levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs). TBARs levels were significantly higher in the RVLM of HS-SHR than RS-SHR (9.9 ± 0.5 $\mu\text{mol/g wet wt}$ vs 8.1 ± 0.6 $\mu\text{mol/g wet wt}$, $n = 5$, $P < 0.05$). To confirm the role of ROS in the RVLM in BP regulation, tempol was microinjected bilaterally into the RVLM of 12-week-old SHR. Microinjection of tempol into the RVLM induced a significantly greater BP depression in HS-SHR than in RS-SHR. Intravenous hexamethonium induced a significantly greater decrease in BP in HS-SHR than in RS-SHR, indicating enhanced sympathetic outflow in HS-SHR. Angiotensin II type1 receptor (AT₁R) expression in the RVLM was measured by Western blotting and NAD(P)H-dependent superoxide production in the RVLM was measured by lucigenin luminescence. AT₁R expression in the RVLM was significantly higher in HS-SHR than in RS-SHR (5.1 ± 0.5 vs 3.4 ± 0.3 , $n = 6$, $P < 0.05$). NAD(P)H-dependent superoxide production was higher in the RVLM from HS-SHR than in that from RS-SHR. These results suggest that SHR on an HS diet have significantly increased ROS generation in the RVLM resulting in further BP elevation by activation of the sympathetic nervous system. Increased ROS generation is probably due to NAD(P)H oxidase activation via central angiotensin system.