

助成番号 0738

食塩感受性高血圧における降圧薬治療による脳内活性酸素評価法の開発： in vivo ESR 法を用いたアンジオテンシン受容体拮抗薬および併用療法の効果

廣岡 良隆, 野副 純世, 古閑 靖章, 荒木 周一郎, 岸 拓弥

九州大学病院循環器内科

概要 【背景・目的】高血圧の中枢性機序に脳内酸化ストレスが深く関与していることを、我々は報告してきた。しかし、脳内活性酸素の測定方法は、間接的手法や *in vitro* の測定が主体であった。そこで、本研究では、生体計測電子スピン共鳴/スピンプローブ法 (*in vivo* ESR) を用い、高血圧モデル動物である脳卒中易発症性自然発症高血圧ラット (SHRSP)、及び正常血圧コントロールである Wistar-Kyoto ラット (WKY) の脳内酸化ストレスレベルを評価する方法を確立すること、その手法を用いてアンジオテンシン II タイプ 1 (AT1) 受容体拮抗薬であるオルメサルタンによる降圧治療時の SHRSP における脳内酸化ストレスに対する効果を明らかにすることであった。

【方法】 12 週齢の SHRSP に対し、オルメサルタン (10 mg/kg/day) 群 (n=5) 及び、ヒドララジン (20 mg/kg/day) / ヒドロクロロチアジド (4.5 mg/kg/day) 群 (n=5) を用いて 30 日間の降圧治療を行い、その治療前と治療後に *in vivo* ESR 及び尿中ノルエピネフリン排泄量の測定を行った。また、別に設定したオルメサルタン治療群において、脳組織膜分画における NAD(P)H oxidase 活性及び、Western blot 法により AT1 受容体蛋白の発現レベルを比較した。

【結果】 SHRSP の脳における *in vivo* ESR 信号減衰率は WKY と比較すると、SHRSP の脳において有意に高かった。また、SHRSP において増大した *in vivo* ESR 信号減衰率は抗酸化薬である Dimethylthiourea の同時投与により WKY のレベルと差が無い値に減少したことから、この *in vivo* ESR 信号減衰率の増加は活性酸素産生増加によるものであり、この方法が酸化ストレス評価法として有用であることを示した。オルメサルタン群の血圧は降圧の程度は、ヒドララジン/ヒドロクロロチアジド群との差を認めなかった (151 ± 12 mm Hg 対 156 ± 8 mm Hg, NS)。脳内酸化ストレスの指標として用いた *in vivo* ESR 信号減衰率についてはオルメサルタン群においてのみその減少が認められた。心血管調節中枢である延髄において、AT1a レセプター発現は SHRSP において増加した AT1a の発現レベルが、オルメサルタンにより低下していた。

【結論】 本研究の成績は、高血圧における交感神経活性化の機序として重要である脳内酸化ストレスを *in vivo* ESR 法を用いて観察する手法を確立し、産生源として脳内 NAD(P)H oxidase の活性化の重要性であること、本手法を用いてその活性化につながる AT1 受容体ブロッカーであるオルメサルタンの有用性を示唆する。

1. 研究目的

高血圧の中枢性機序に脳内酸化ストレスが深く関与していることを、我々は報告してきた。しかし、脳内活性酸素の測定方法は、間接的手法や *in vitro* の測定が主体であった。そこで、本研究では、生体計測電子スピン共鳴/スピンプローブ法 (*in vivo* ESR) を応用し、非侵襲的に高血圧モデル動物である脳卒中易発症性自然発症高血圧ラッ

ト (SHRSP)、及び週齢の同じ正常血圧コントロールである Wistar-Kyoto ラット (WKY) の脳内酸化ストレスレベルを評価する方法を確立すること、その手法を用いてアンジオテンシン II タイプ 1 (AT1) 受容体拮抗薬であるオルメサルタンによる降圧治療の、SHRSP における脳内酸化ストレスに対する効果を明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 研究方法

12週齢のSHRSPに対し、オルメサルタン(10 mg/kg/day)群(n=5)及び、ヒドララジン(20 mg/kg/day)／ヒドロクロチアジド(4.5 mg/kg/day)群(n=5)を用いて30日間の降圧治療を行い、その治療前と治療後に *in vivo* ESR 及び尿中ノルエピネフリン排泄量の測定を行った。また、別に設定したオルメサルタン治療群において、脳組織膜分画におけるNAD(P)H oxidase 活性及び、Western blot 法によりAT1受容体蛋白の発現レベルを比較した。さらに、実際の高血圧治療において重要な手段である降圧薬の併用療法の効果についても検討を加えた。



図1. 生体 ESR 測定装置と共鳴器

3. 研究結果

低周波数 *In vivo* ESR 測定装置(図1)を用い、また、血液脳関門通過性のニトロキシラジカルである MC-PROXYL をスピンプローブとして用いた(図2)。

生体内のスピンプローブ剤の反応は、生理的な還元反応に加え、生体内で産生が増加した活性酸素種と非酵素的に反応し、フリーラジカルではない還元型のヒドロキシアミンへと変換し、スピンプローブ剤の持っていた ESR シグナルは時間と共に減少する(図3)。

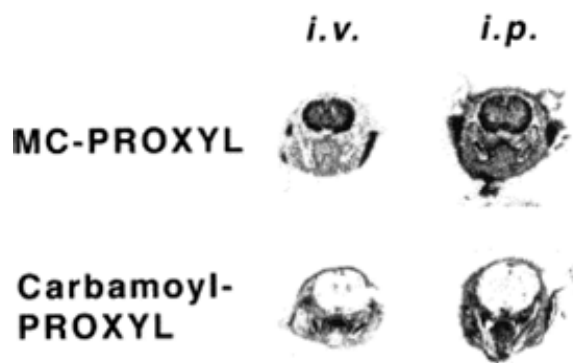


図2. スピンプローブの脳内移行

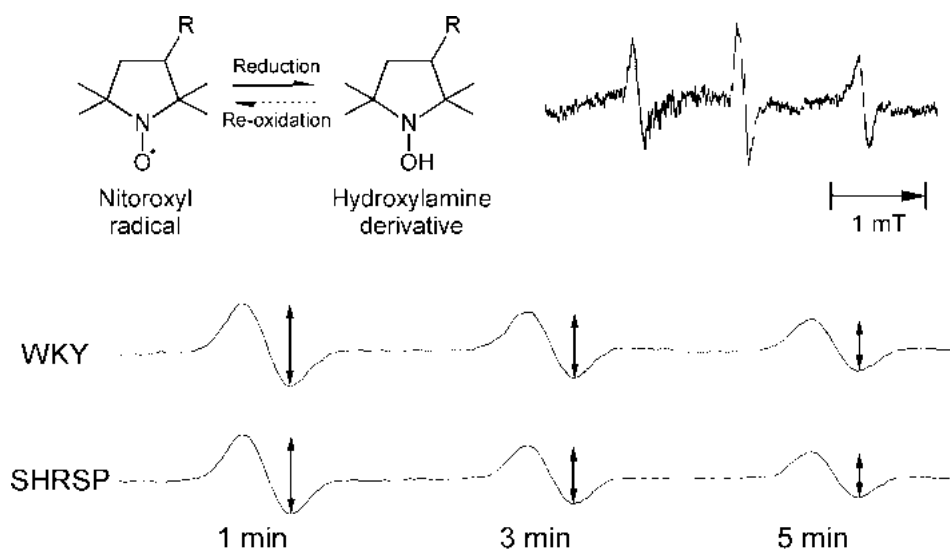


図3. スピンプローブの細胞内反応と ESR スペクトル

まず12週齢のSHRSPの脳におけるin vivo ESR信号減衰率を正常血圧コントロールであるWKYのそれと比較したところ、SHRSPの脳において有意に高かった(図4)。

また、SHRSPにおいて増大したin vivo ESR信号減衰率は抗酸化薬であるDimethylthioureaの同時投与によりWKYのレベルと差が無い値に減少したことから、このin vivo ESR信号減衰率の増大が、活性酸素産生増加によるものであることが示唆され、この方法の酸化ストレス評価法

として有用であることを確認した(図5)。

次にオルメサルタンによる降圧治療を行い、その治療前後での脳内酸化ストレス及び交感神経活動をそれぞれ、in vivo ESR及び尿中ノルエピネフリン排泄量により評価した(図6)。対照薬にはヒドララジン/ヒドロクロロチアジドを用いた。

オルメサルタン群の血圧は十分に低下し、ヒドララジン/ヒドロクロロチアジド群との差を認めなかった(151±12

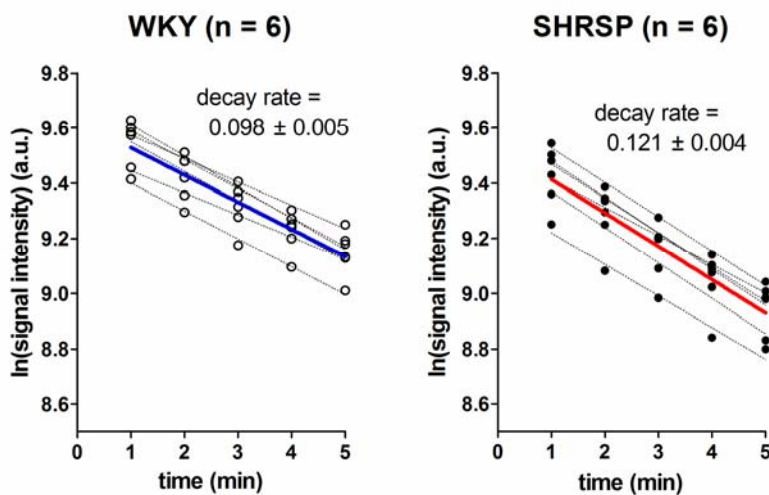


図4. ESR スペクトル強度の減衰

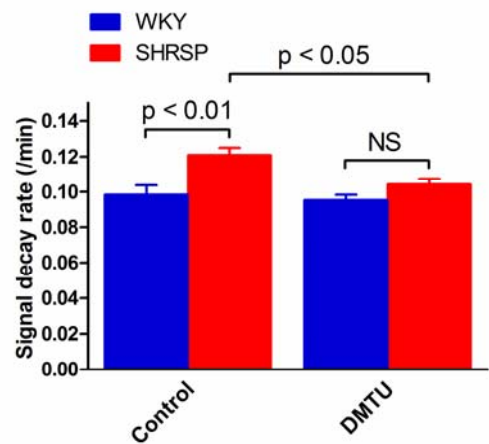


図5. ESR 信号減衰率の比較

● 対象

- > 12週齢雄性SHRSP

● 群分け

- > 対照群 (n = 5)
 - 無治療
- > オルメサルタン群 (n = 5)
 - オルメサルタンメドキシミル: 10 mg/kg b.w., 1日1回経口投与, 30日間.
- > ヒドララジン/ヒドロクロロチアジド群 (n = 5)
 - ヒドララジン: 20 mg/kg b.w./day / ヒドロクロロチアジド: 4.5 mg/kg b.w./day 飲水投与.

● 評価

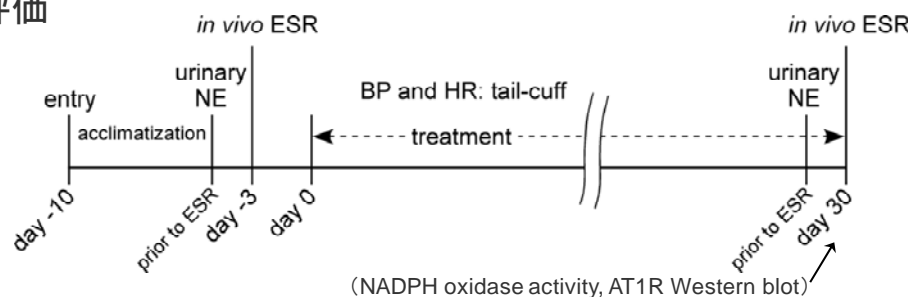


図6. 治療プロトコル

mm Hg 対 156 ± 8 mm Hg, NS)。心拍数はヒドララジン/ヒドロクロチアジド群において、無治療 SHRSP 群に比し、有意に高い値が経過中認められたが、オルメサルタン群においては心拍数上昇反応は認められなかった(図7)。

尿中ノルエピネフリン排泄は、一日当たりの交感神経活動を反映しており、ヒドララジン/ヒドロクロチアジド群において無治療対照群に比し、増加していた。それに対しオルメサルタン群では増加を認めなかった(図8)。脳内酸化ストレスの指標として用いた in vivo ESR 信号減

衰率についてはオルメサルタン群においてのみその減少が認められた(図9)。

脳内活性酸素産生源の検討を行うため、別の治療群において、脳内4部位において、脳組織膜分画を用い、NADPH オキシダーゼ活性を測定した。その結果、脳内の各部位において、SHRSP の脳の酸化ストレスレベルはWKYのそれと比較し増加しており、オルメサルタン治療によりWKYのそれと同等のレベルまで減少することが確かめられた(図10)。

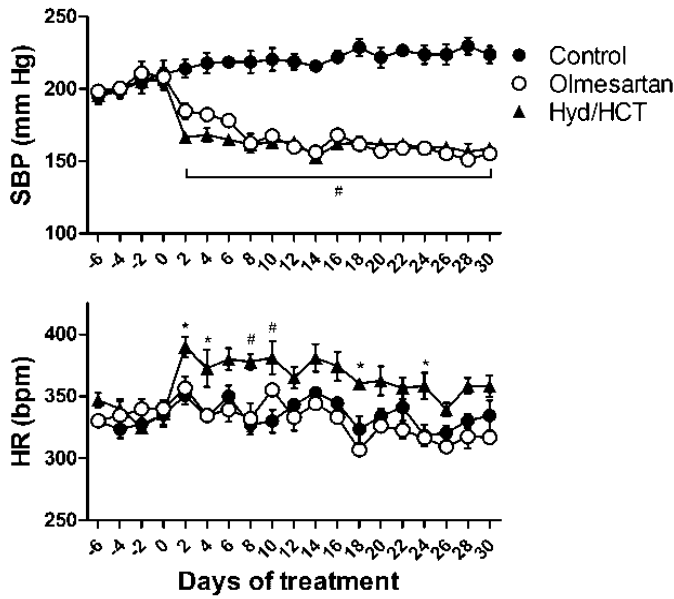


図7. 血圧、心拍数の変化

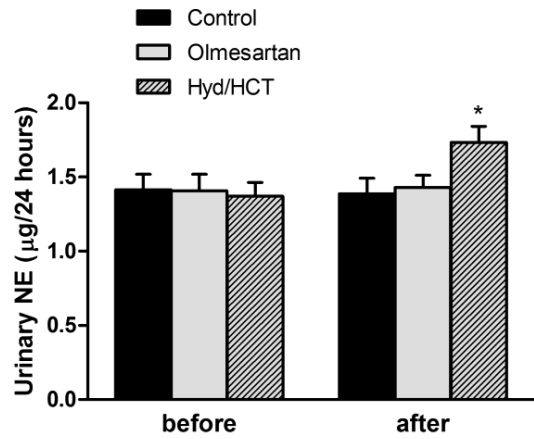


図8. 尿中ノルエピネフリン排泄量

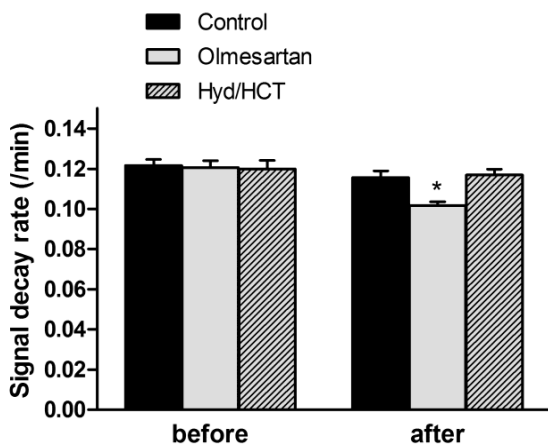


図9. In vivo ESR 信号減衰率

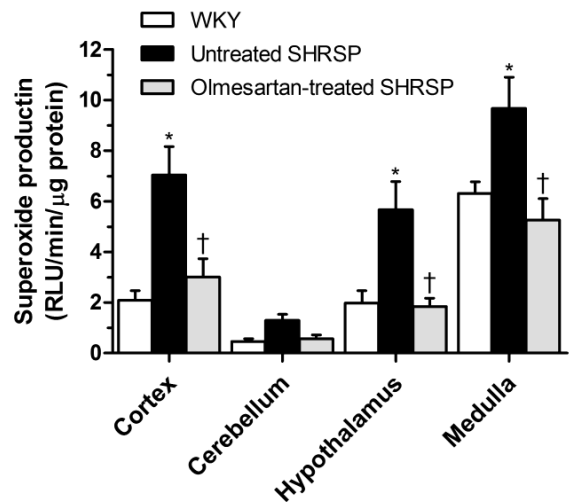


図10. 脳組織膜分画 NADPH オキシダーゼ活性

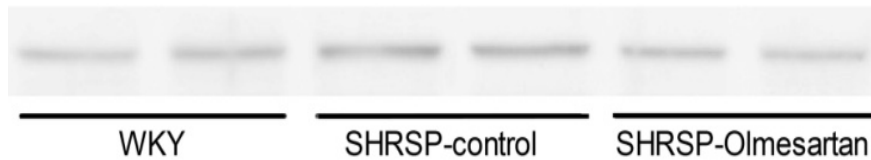


図 11. 脳組織(延髄)の AT1a レセプター蛋白発現

さらに、心血管調節中枢である延髄において、活性酸素産生を促進する要因としての AT1a レセプター発現を Western blotting を用いて調べたところ、SHRSP において増加した AT1a の発現レベルが、オルメサルタンにより低下することを確認した(図 11)。

さらに、本研究では降圧薬の 2 剤併用により、脳内酸化ストレスレベルに与える影響についても検討を加えた。まず、降圧薬の 2 剤併用効果について、オルメサルタン単独治療 10 mg/kg/day により得られた降圧の程度に匹敵する降圧レベルを得ることを目標にして用量設定を行った。オルメサルタンと長時間作用型カルシウム拮抗薬であるアゼルニジピンの併用において、オルメサルタン 3.75 mg/kg/day 及び、アゼルニジピン 3.0 mg/kg/day と両薬剤とも少量の投与により、十分な降圧が得られた。脳組織の酸化ストレスレベルは、脳の 4 部位における膜分画 NADPH オキシダーゼ活性を用いたが、オルメサルタンとの併用薬として用いた利尿薬であるヒドロクロチアジド及びアゼルニジピンのいずれの併用においても、オルメサルタン単独 10 mg/kg/day 投与の場合と同様に NADPH オキシダーゼ活性を低下させることが示唆された(図 12)。

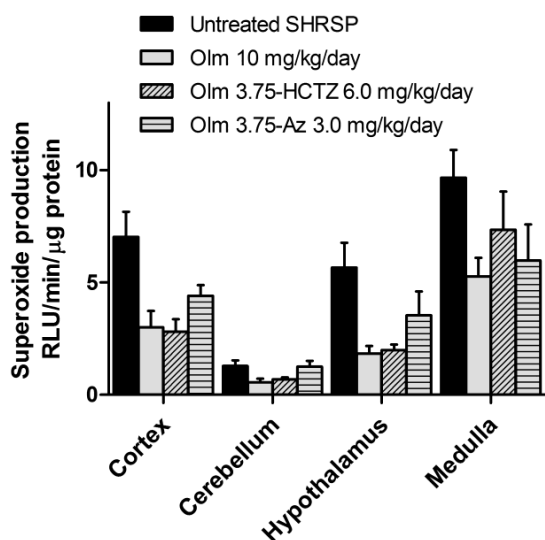


図 12. 降圧薬の併用効果(NADPH オキシダーゼ活性)

4. 考 察

本研究の成績は、in vivo ESR 法を用いることによって脳内酸化ストレスを評価することが可能であること、アンジオテン受容体拮抗薬であるオルメサルタンの慢性治療によって反射性交感神経活動を伴わない降圧効果が認められ、in vivo ESR 法により評価した脳内酸化ストレスの低下と関連していることを示唆する。

我々は、従来の研究により延髄血管運動中枢における活性酸素の産生が SHRSP において増加しており、MnSOD の遺伝子導入法を用い、高血圧の神経性機序に脳内の領域の酸化ストレスが深くかかわっていることを示した¹⁾。レニン及びアンジオテンシノジェンのトランスジェニックマウスを用いて自然発症頭蓋内出血モデルを作成し、NADPH オキシダーゼ活性亢進による活性酸素産生が高血圧性頭蓋内出血の病態に関与しているという報告もある²⁾。これらの成績は治療ターゲットとしての脳内酸化ストレスの重要性を示唆している。ニトロキシラジカルの基本的生化学反応として、細胞内に取り込まれた後の還元反応が主要な過程である³⁾。in vivo ESR 法はスピントラップ剤を用いることにより酸化ストレスを評価する方法として開発された⁴⁾。ニトロキシラジカルが in vivo において酸化ストレスに対して鋭敏に反応し、そのことにより、ニトロキシラジカルは anti-oxidant activity を有している^{5) 6)}。ニトロキシラジカルの反応には様々なものがあり、レドックス状態の変化を in vivo ESR で捉えられ、この手法の有用性が示唆されている⁷⁾。我々の実験と同じ 300 MHz ESR システムを用い、ラット上腹部を対象に実験を行い、NADPH オキシダーゼによる活性酸素産生増加を in vivo ESR の手法により観察した報告もなされている⁸⁾。脳においては、MC-PROXYL の脳内分布を autoradiography を用いて示した報告があるため^{9) 10)}、我々は MC-PROXYL をスピンプローブとして用いた。また、脳研究領域において、MC-PROXYL を用いた酸化ストレスの評価法が有望であることが示唆されている^{11) 12)}。

高血圧の中枢性機序におけるレニン-アンジオテンシン系活性化による活性酸素産生増加の役割についてはこれまでに示唆されている¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾。脳内レニン-アンジオテンシン系の各コンポーネントについての分布領域と生理的役割について、脳室周囲の CVO 及び、循環制御中枢に分布していることが示されている¹⁷⁾。脳内分布は不均一であり、このことは、我々の用いた *in vivo* ESR/spin probe 法が脳内領域の区別において限界があることを示唆する。アンジオテンシン II と食塩負荷による作用機序が、ある種の高血圧の成因である可能性を示し、SFO-PVN-RVLM 系におけるニューロンネットワークの慢性的な変化が関与している¹⁸⁾。低レニン性高血圧モデルである Dahl salt sensitive ラットにおいて、高用量の AT1 阻害薬を末梢投与したところ、高血圧の発症が完全に抑制され、Angiotensin II *icv* に対する反応が減弱したことから脳内レニン-アンジオテンシン系に作用していることが示唆されている¹⁹⁾。また、覚醒 Wistar rats を用い、経口投与された Candesartan が、*i.c.v.* Ang II による飲水、血圧上昇、バソプレッシン放出反応を dose and time-dependent に抑制することを示されている²⁰⁾。さらに Telmisartan の *iv* 及び経口投与により、*i.c.v.* Ang II に対する反応が抑制されること、CSF 中の Telmisartan 濃度の測定から、Telmisartan は BBB を通過し、脳へ作用することが示唆されている²¹⁾。一方、血液-脳関門通過性の異なる二つの ARB (losartan と embusartan) の急性効果と慢性効果で比較し、慢性投与においては両薬剤の効果に差がなかったことから、脳組織アンジオテンシン系に二つのコンパートメントがあることも示唆されている²²⁾。Saavedra ら²³⁾²⁴⁾は、脳内レニンアンジオテンシン系におけるアンジオテンシン II 受容体存在部位を二つに分類した。血液-脳関門の内側と、CVO 及び脳内微小血管内皮細胞に存在するもの、すなわち循環血中アンジオテンシン II の受容体である。両システムは密接に統合されていると述べている。また、彼らは脳内微小血管を分離し、レニン-アンジオテンシン系の各コンポーネントについて Microarray 法を用いて調べ、angiotensinogen、ACE、(pro)renin receptor、AT1 receptor が血管内皮細胞に存在することを示した。このことから血管内皮細胞が脳内の Angiotensin II を産生する能力を有することが示唆されるとした。また、SHR の脳微小血管内皮細胞における (pro)renin receptor、及び AT1 receptor の expression は

upregulate されており、脳のレニン-アンジオテンシン系を overdrive していると推察している。また、Candesartan の末梢投与 (*sc*) により SHR の血圧および脳循環自動調節が正常化することも示されている²⁵⁾。アンジオテンシン II による脳微小循環障害は、AT1 レセプターを介した血管内皮細胞の酸化ストレスが関与している可能性も示唆されている²⁶⁾。すなわち、脳の酸化ストレスに脳血管が関与している可能性も考えられる²⁷⁾。また、血管の shear stress の変化が血管内皮における ROS シグナリングに影響を与えるが²⁸⁾、shear stress の変化が脳内酸化ストレスに関与しているかどうかについての研究はほとんどない。また、脳内の血管と神経細胞そのものより直接的な連携という面について、NO の役割に関する研究は僅かしかない。eNOS の過剰発現が神経細胞活動を抑制することが示唆されており²⁹⁾、今後の研究として重要な点と考えられる。AT1 受容体拮抗薬による脳内 AT1 受容体の downregulation については、レセプター蛋白レベル³⁰⁾ 及び mRNA レベル³¹⁾³²⁾ で示されている。AT2 レセプターの役割についても現在未解明の点は多い。最近、AT2 の overexpression により夜間血圧が下がることが報告された³³⁾。また、尿中 NE 測定により sympathoinhibitory effect を示した。AT2 レセプターは ARB による治療により upregulate されるとする報告もあり、ARB の交感神経抑制効果に関与している可能性を示唆するものであるが圧倒的に AT1 受容体の重要性が確立しているためどの程度 AT2 受容体発現の変化が関与しているかについては疑問である。SFO の重要性については、SFO 焼灼モデル³⁴⁾ や、Cre/LoxP システムを用いた SFO 障害モデル³⁵⁾ での研究で示されている。他方、AP の傷害モデルでアンジオテンシン II の 10 日間投与による昇圧が、抑制されることを示した論文もある³⁶⁾ が、異なる結果の論文もある³⁷⁾。血液-脳関門が高血圧動物で脆弱であることを示す論文もある³⁸⁾³⁹⁾。脳幹部 AT1 受容体の関連では、雌性 SHR において、estrogen depletion により upregulation を示し、高血圧に関与する⁴⁰⁾。また、雌性 mice においては、雄性 mice に比し Ang II に対する血圧上昇及び脳循環調節の変化が減弱しており、ovariectomy によりそれが消失する⁴¹⁾。脳内レニン-アンジオテンシン系の性差については、特に閉経以降の女性の高血圧治療に示唆を与える報告である。

長時間作用型カルシウム拮抗薬は、ARB 以外の現在

最も広く用いられている降圧薬であり、交感神経抑制的に作用することは ARB と共通である⁴²⁾。酸化ストレスに与える影響を評価することは有意義であり、今後の課題である。脳内レニン-アンジオテンシン系が血圧の制御だけでなく、感覚情報処理、学習や記憶、情動反応などに関与していることが明らかになり、生命現象の根本に関わる重要なシステムであることが改めて認識された⁴³⁾。近年、脳内レニン-アンジオテンシン系について新たな知見が得られつつあり⁴⁴⁾、今後さらに発展する研究分野であると考えられる。

以上、本研究の成績は、高血圧における交感神経活性化の機序として重要である脳内酸化ストレスを *in vivo* ESR 法を用いて観察する手法を確立し、産生源として脳内 NAD(P)H oxidase の活性化の重要性であること、本手法を用いてその活性化につながる AT1 受容体ブロッカーであるオルメサルタン[®]の有用性が示唆された。現在、画像化を検討しており、また解像度をあげる工夫をしている。併用療法の評価はまだ不十分であるが現時点での成績では効果が認められている。更なる検討により臨床への応用までつなげることができるようになることが期待される。

文献等

1. 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* 2004; 109:2357-2362.
2. Wakisaka Y, Miller JD, Chu Y, Baumbach GL, Wilson S, Faraci FM *et al.* Oxidative stress through activation of NAD(P)H oxidase in hypertensive mice with spontaneous intracranial hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008 Feb 27 [Epub ahead of print]
3. Swartz HM, Sentjurs M, Morse PD 2nd. Cellular metabolism of water-soluble nitroxides: effect on rate of reduction of cell/nitroxide ratio, oxygen concentrations and permeability of nitroxides. *Biochim Biophys Acta.* 1986; 888: 82-90.
4. Utsumi H, Muto E, Masuda S, Hamada A. *In vivo* ESR measurement of free radicals in whole mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 172: 1342-48.
5. Miura Y, Hamada A, Utsumi H. *In vivo* ESR studies of antioxidant activity on free radical reaction in living mice under oxidative stress. *Free Radic Res.* 1995; 22: 209-14.
6. Miura Y, Utsumi H, Hamada A. Antioxidant activity of nitroxide radicals in lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Archiv Biochem Biophys.* 1993; 300: 148-156.
7. Matsumoto K, Endo K, Utsumi H. *In vivo* electron spin resonance assessment of decay constant of nitroxyl radical in selenium-deficient rat. *Biol Pharm Bull.* 2000; 23: 641-4.
8. Sonta T, Inoguchi T, Tsubouchi H, Sekiguchi N, Kobayashi K, Matsumoto S, Utsumi H, Nawata H. Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37: 115-23.
9. Miura Y, Anzai K, Takahashi S, Ozawa T. A novel lipophilic spin probe for the measurement of radiation damage in mouse brain using *in vivo* electron spin resonance (ESR). *FEBS Lett.* 1997; 419: 99-102.
10. Anzai K, Saito K, Takeshita K, Takahashi S, Miyazaki H, Shoji H *et al.* Assessment of ESR-CT imaging by comparison with autoradiography for the distribution of a blood-brain-barrier permeable spin probe, MC-PROXYL, to rodent brain. *Magn Reson Imaging.* 2003; 21: 765-772.
11. Lee MC, Shoji H, Miyazaki H, Yoshino F, Hori N, Toyoda M *et al.* Assessment of oxidative stress in the spontaneously hypertensive rat brain using electron spin resonance (ESR) imaging and *in vivo* L-band ESR. *Hypertens Res.* 2004; 27: 485-492.
12. Hyodo F, Chuang KH, Goloshevsky AG, Sulima A, Griffiths GL, Mitchell JB *et al.* Brain redox imaging using blood-brain barrier-permeable nitroxide MRI contrast agent. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008; doi: 10.1038/jcbfm.2008.5
13. Zimmerman MC, Lazartigues E, Sharma RV, Davisson RL. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res.* 2004; 95: 210-216.
14. Chan SHH, Hsu KS, Huang CC, Wang LL, Ou CC, Chan YH. NADPH oxidase-derived superoxide anion

- mediates angiotensin II-induced pressor effect via activation of p38 mitogen-activated protein kinase in the rostral ventrolateral medulla. *Circ Res.* 2005; 97: 772-780.
15. Ito S, Komatsu K, Tsukamoto K, Kanmatsuse K, Sved AF. Ventrolateral medulla AT1 receptors support blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension.* 2002; 40: 552-559.
16. Allen AM, Dosanjh JK, Erac M, Dassanayake S, Hannan RD, Thomas WG. Expression of constitutively active angiotensin receptors in the rostral ventrolateral medulla increases blood pressure. *Hypertension.* 2006; 47: 1054-1061.
17. McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM et al. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35: 901-918.
18. Osborn JW, Fink GD, Sved AF, Toney GM, Raizada MK. Circulating angiotensin II and dietary salt: converging signals for neurogenic hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2007; 9(3):228-35.
19. Leenen FH, Yuan B. Prevention of hypertension by irbesartan in Dahl S rats relates to central angiotensin II type 1 receptor blockade. *Hypertension.* 2001; 37: 981-984.
20. Gohlke P, Von Kügelgen S, Jürgensen T, Kox T, Rascher W, Culman J et al. Effects of orally applied candesartan cilexetil on central responses to angiotensin II in conscious rats. *J Hypertens.* 2002; 20:909-918.
21. Gohlke P, Weiss S, Jansen A, Wiene W, Stangier J, Rascher W et al. AT1 receptor antagonist telmisartan administered peripherally inhibits central responses to angiotensin II in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 298: 62-70.
22. Zhang J, Leenen FH. Peripheral administration of AT1 receptor blockers and pressor responses to central angiotensin II and sodium. *Can J Physiol Pharmacol.* 2001; 79: 861-867.
23. Saavedra JM. Brain angiotensin II: new development, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cell Mol Neurobiol.* 2005; 25: 485-512.
24. Zhou J, Pavel J, Macova M, Yu ZX, Imboden H, Ge L et al. AT1 receptor blockade regulates the local angiotensin II system in cerebral microvessels from spontaneously hypertensive rats. *Stroke.* 2006; 37: 1271-1276.
25. Nishimura Y, Ito T, Saavedra JM. Angiotensin II AT(1) blockade normalizes cerebrovascular autoregulation and reduces cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke.* 2000; 31: 2478-2486.
26. Girouard H, Park L, Anrather J, Zhou P, Iadecola C. Angiotensin II attenuates endothelium-dependent responses in the cerebral microcirculation through nox-2-derived radicals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 826-832.
27. Paravicini TM, Chrissobolis S, Drummond GR, Sobey CG. Increased NADPH-oxidase activity and Nox4 expression during chronic hypertension is associated with enhanced cerebral vasodilatation to NADPH in vivo. *Stroke.* 2004; 35: 584-589.
28. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2006; 71: 247-258.
29. Kishi T, Hirooka Y, Ito K, Sakai K, Shimokawa H, Takeshita A. Cardiovascular effects of overexpression of endothelial nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2002; 39: 264-268.
30. Nishimura Y, Xu T, Jöhren O, Häuser W, Saavedra JM. The angiotensin AT1 receptor antagonist CV-11947 regulates cerebral blood flow and brain angiotensin AT1 receptor expression. *Basic Res Cardiol.* 1998; 93: 63-68.
31. Raizada MK, Sumners C, Lu D. Angiotensin II type 1 receptor mRNA levels in the brains of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Neurochem.* 1993; 60: 1949-1952.
32. Lu Q, Zhu YZ, Wong PT. Neuroprotective effects of candesartan against cerebral ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Neuroreport.* 2005; 16: 1963-1967.
33. Gao L, Wang W, Wang W, Li H, Sumners C, Zucker IH. Effects of angiotensin type 2 receptor overexpression in the rostral ventrolateral medulla on blood pressure and

- urine excretion in normal rats. *Hypertension*. 2008; 51 [part 2]: 521-527.
34. Collister JP, Hendel MD. Chronic effects of angiotensin II and AT1 receptor antagonists in subfornical organ-lesioned rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005; 32: 462-6.
35. Sinnayah P, Lazartigues E, Sakai K, Sharma RV, Sigmund CD, Davisson RL. Genetic ablation of angiotensinogen in the subfornical organ of the brain prevents the central angiotensinergic pressor response. *Circ Res*. 2006; 99: 1125-1131.
36. Fink GD, Bruner CA, Mangiapane ML. Area postrema is critical for angiotensin-induced hypertension in rats. *Hypertension*. 1987; 9: 355-361.
37. Nahey DB and Collister JP. ANG II-induced hypertension and the role of the area postrema during normal and increased dietary salt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292: 694-700.
38. Tang JP, Rakhit A, Douglas FL, Melethil S. Effect of chronic hypertension on the blood-brain barrier permeability of libenzapril. *Pharm Res*. 1992; 9: 236-243.
39. Al-Sarraf H, Philip L. Effect of hypertension on the integrity of blood brain and blood CSF barriers, cerebral blood flow and CSF secretion in the rat. *Brain Res*. 2003; 975: 179-188.
40. Ito K, Hirooka Y, Kimura Y, Sagara Y, Sunagawa K. Ovariectomy augments hypertension through Rho-kinase activation in the brain stem in female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2006; 48: 651-657.
41. Girouard H, Lessard A, Capone C, Milner TA, Iadecola C. The neurovascular dysfunction induced by angiotensin II in the mouse neocortex is sexually dimorphic. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 294: H156-H163.
42. Kimura Y, Hirooka Y, Sagara Y, Sunagawa K. Long-acting calcium channel blocker, Azelnidipine, increases endothelial nitric oxide synthase in the brain and inhibits sympathetic nerve activity. *Clin Exp Hypertens*. 2007; 29: 13-21.
43. Bohlen O, Albrecht D. The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res*. 2006; 326: 599-616.
44. Phillips MI, de Oliveira EM. Brain renin angiotensin in disease. *J Mol Med*. 2008 Apr 2. [Epub ahead of print]

No. 0738

Development of Evaluation Method for Brain Reactive Oxygen Species by Antihypertensive Treatment in Salt-Sensitive Hypertension: Effect of Angiotensin Receptor Blocker or Combination Therapy Using *in vivo* ESR Method

Yoshitaka Hirooka, Masatsugu Nozoe, Yasuaki Koga, Shuichirou Araki, Takuya Kishi

Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Hospital

Summary

We demonstrated that oxidative stress is involved in the neural mechanisms of hypertension. Recent studies suggest that angiotensin type 1 (AT1) receptor stimulation increases reactive oxygen species (ROS) generation. It is difficult, however, to evaluate oxidative stress in the brain *in vivo*. The aim of this study was to apply the *in vivo* electron spin resonance (ESR)/spin probe technique to measure ROS generation in the brains of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP) and to examine the effects of anti-hypertensive treatment with the AT1 receptor blocker olmesartan (Olm) on the ROS generation. Two groups of 12-week-old SHRSP were treated with either Olm (10 mg/kg/day) or hydralazine (Hyd, 20 mg/kg/day)/hydrochlorothiazide (HCT, 4.5 mg/kg/day) for 30 days (n=5 for each). Systolic blood pressure decreased after each treatment (151 ± 8 mmHg [Olm] and 156 ± 13 mmHg [Hyd/HCT], NS), although heart rate and urinary norepinephrine excretion increased only in Hyd/HCT-treated rats. A blood-brain barrier-permeable nitroxyl radical, methylcarbonyl-PROXYL (MC-P), was used as the spin probe for the low frequency ESR system. The ESR signal intensities of accumulated MC-P in the brain were measured sequentially and plotted as a function of time for the signal decay. The ESR signal decay rates in the SHRSP brains were significantly increased compared with those in age-matched normotensive Wistar-Kyoto rats (0.121 ± 0.010 /min vs. 0.098 ± 0.011 /min, $P < 0.01$, n=6 for each). Dimethylthiourea, a potent hydroxyl radical scavenger, or apocynin, an NAD(P)H oxidase inhibitor, attenuated the increased ESR signal decay rate in the SHRSP brains. Olm attenuated the increased signal decay rate (0.120 ± 0.008 /min and 0.102 ± 0.004 /min, $P < 0.01$, before and after treatment), but Hyd/HCT did not. These results suggest that the AT1 blocker Olm has a beyond blood pressure-lowering anti-oxidative effect in the brains of SHRSP as measured using an *in vivo* ESR method.