

## 圧負荷心肥大における食塩感受性亢進を介した交感神経系活性化による 心不全発症・進展の新規脳内分子機構の解明及び治療戦略の開発

廣岡 良隆<sup>1</sup>, 岸 拓弥<sup>2</sup>, 伊藤 浩司<sup>3</sup>, 西原 正章<sup>4</sup>, 中野 正紹<sup>4</sup>

<sup>1</sup>九州大学病院循環器内科, <sup>2</sup>九州大学大学院医学研究院先端心血管治療学講座,

<sup>3</sup>九州大学病院救命救急センター, <sup>4</sup>九州大学大学院医学研究院循環器内科

**概要** 【目的】 圧負荷モデルでは食塩負荷により交感神経活性が増強する。ミネラルコルチコイド受容体と上皮型 Na チャンネル (ENaCs) は Na 移行経路に関与するが不明な点が多い。本研究では圧負荷モデルにおいて脳内ミネラルコルチコイド受容体 (MR)・ENaC 経路の食塩感受性交感神経活性化に対する関与を検討した。

【方法及び結果】 大動脈を腎動脈上部で狭窄を作成しマウスの圧負荷モデルを作成した。大動脈バンディング 4 週間後 (AB-4)、左室壁厚は増加したが fractional shortening の %変化 (%FS) は変化しなかった。このマウスに 5 日間高食塩 (8%) 負荷を行うと交感神経活性化が認められた。Sham 手術群 (Sham-4) では高食塩負荷を行っても交感神経活性化は認められなかった。脳内 MR、 $\alpha$ ENaC、アンジオテンシン II 1 型受容体 (AT1R) 発現レベルは Sham-4 群より AB-4 群で増加していた。交感神経活性とこれらの発現レベルの増加は選択的 MR 阻害薬であるエプレレノンの脳室内投与によって抑制された。別プロトコールとして AB-4 マウスに対してさらに 4 週間高食塩負荷を行った群 (AB-H) を作成した。つまり、バンディング 4 週間を経た後、そこから 4 週間の高食塩負荷を行った。そうすると、%FS は低下し、交感神経活性の増加を認めた。Sham 群に同様に高食塩負荷を行ってもこれらの変化は生じなかった。脳内 MR や AT1R 発現は Sham 群より AB-H 群で増加していた。脳室内にエプレレノンを投与すると AB-H 群の交感神経活性化および %FS 低下は減弱し、脳内 AT1R 発現も減少した。エプレレノンを経口投与すると交感神経抑制および %FS 低下抑制効果は脳室内投与より小さかった。しかし、左室肥大に対する効果は経口投与の方が大きかった。

【結論】 以上の成績は、脳内 MR を介した脳内 ENaCs と AT1R 活性化が交感神経活性化を惹起する食塩感受性獲得に関与していることを示唆する。したがって、高食塩負荷は圧負荷モデルにおける交感神経活性化と左室機能不全を増強する。

### 1. 研究背景及び目的

高血圧は人類最大の危険因子であり、世界で 10 億人、日本で 4,500 万人と推定されている<sup>1,2)</sup>。特にわが国では食塩摂取量が多いことから問題視されており、日本高血圧学会の 2009 年ガイドラインでも減塩が重視されている<sup>1,2)</sup>。食塩過剰摂取は高血圧から高血圧性心肥大・心不全に至る過程を促進する。これを克服するためにはその発症機構の分子機序を明らかにする必要がある。従来、食塩感受性は腎臓によって規定されると考えられてきたが、最近 10 年間の世界の研究成果により中枢神経系による

交感神経系の活性化が高血圧の発症・進展・臓器障害に重要な役割を果たすことが解ってきた<sup>3-6)</sup>。特にヒト高血圧患者における交感神経活性化の重要性は従来レニン・アンジオテンシン系のみが論じられてきたが心不全発症や進展・予後を規定する上で非常に注目されている<sup>7,8)</sup>。我々は平成 17 年度～平成 19 年度に財団より助成を受け、食塩感受性高血圧における脳内活性酸素及び交感神経系活性化の重要性について研究し成果を納めた<sup>9-11)</sup>。すなわち、食塩感受性高血圧では脳内活性酸素増加による交感神経活性化が血圧上昇を来すこと、その機序として

脳内アンジオテンシン系の活性化が重要であることを明らかにした<sup>9)</sup>。さらに、生体計測電子スピン共鳴法を用いて経口投与したアンジオテンシン受容体拮抗薬が脳内酸化ストレスを減らすことを見いだした<sup>10)</sup>。しかし、如何にして経口摂取した食塩が脳内に作用してアンジオテンシン系を活性化するか、下流の分子メカニズムは何か、についてはわかっていない。また、高齢化社会を迎え高血圧性心肥大を基礎疾患とした心不全患者は増大している。最近、圧負荷モデルに食塩負荷を行うと、食塩感受性が生じ、亢進すること、心機能低下を来すことを見いだした<sup>12)</sup>。したがって、本研究の目的は、圧負荷心肥大モデルを用いて食塩負荷が如何なる機序によって交感神経活性化を生じるか、心不全発症に至るか、についての分子機構を明らかにすることであった。特に、ナトリウムの脳内への移行を促進する脳内上皮型 Na チャンネル (epithelial Na channels: ENaCs) の活性化とカップルしその上流にあるミネラルコルチコイド受容体 (MR) の役割について検討した<sup>13,14)</sup>。さらに、もしその活性化が認められれば脳内アンジオテンシン系、Rho-kinase 系の活性化について検討し、Na 感受性獲得分子機構を明らかにし、将来の新たな治療戦略へ結びつけることを目指して研究を行った。

## 2. 研究方法

実験には、脳内 Na 感受性獲得機構を明らかにするため、圧負荷心肥大モデルとして腎動脈直上で大動脈のバ

ンディングを行ったマウスを用いた。既にこのモデルではバンディング後 4 週間経ってから食塩負荷を行うと交感神経系活性化が生じ心機能低下、心不全が生じることを観察している<sup>12)</sup>。また、少なくとも我々のバンディングの程度では血漿レニン活性およびアンジオテンシン II 濃度の上昇は生じなかった。また、既知の報告にもあるように脳室内へ高食塩負荷を行うと交感神経系の活性化が生じることも観察している。バンディングから食塩負荷を行うに当たった時間経過を含めたプロトコルを示す (Fig. 1)。

### 2. 1 高食塩負荷による脳内への Na 移行の増大による食塩感受性獲得機構を介した交感神経活性化の機序解明(上流機序としての MR-ENaC 活性化)

上記のマウスモデルを用いてバンディング後 4 週間 (AB-4) を経てから高食塩負荷群 (AB-H) と通常食塩負荷群 (AB-R) に分け、血圧・心拍数、心エコー図法を用いて心機能を観察した。交感神経活動の指標としては尿中ノルエピネフリン排泄量を測定した。血液中の Na が脳内へ取り込まれる機構としては ENaCs の活性化が重要であることが考えられる。したがって、ENaCs の発現の違いや ENaC 阻害薬を脳室内へ投与して上記のパラメーターの変化について検討した。ENaCs 活性化にはミネラルコルチコイド受容体 (MR) 活性化が上流にあることが示唆されている。したがって、選択的 MR 受容体阻害薬であるエプレレノンを経口あるいは脳室内投与の効果を検討した。

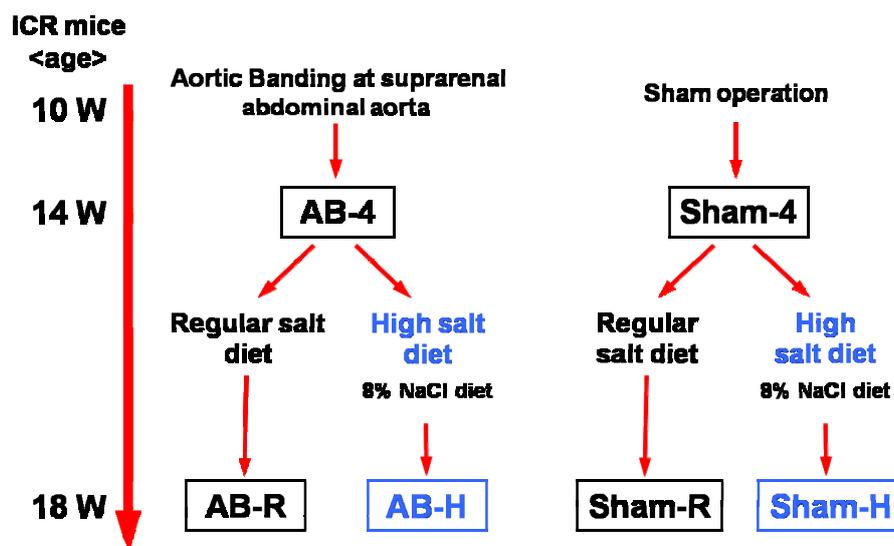


Fig. 1. Experimental protocol

## 2. 2 脳内食塩負荷に対する食塩感受性の検討

バンディングモデル群および sham 手術群を用いて経口では通常食塩負荷を行い、脳室内へ高食塩負荷を行い、上記パラメーターの変化を観察した。すなわち、脳内で食塩に対する感受性が増強するか否かについて検討した。

## 2. 3 脳内における食塩感受性増強の下流の分子機構としての脳内アンジオテンシン系・Rho/Rho-kinase 系の活性化の検討

食塩負荷群と通常食塩負荷群において脳内 AT1 受容体発現や Rho-kinase 活性化が生じているかについて生化学的に解析した。また、アンジオテンシン受容体拮抗薬や Rho-kinase 阻害薬の脳室内投与により食塩感受性が正常化するか否かについて検討した。また、AT1 受容体ノックアウトマウスを使用しての検討を行った。

## 3. 研究結果

### 3. 1 高食塩負荷による脳内への Na 移行の増大による食塩感受性獲得機構を介した交感神経活性化の機序解明(上流機序としての MR-ENaC 活性化)

まず、大動脈バンディング 4 週間後を経た AB-4 群は Sham 手術群(Sham-4)と比べて高食塩負荷(8%)を 5 日間行くと、交感神経活性が心収縮機能として % fractional shortening (%FS) の変化が生じていないにもかかわらず亢進していた(Fig. 2)。この時点で圧負荷に伴う左室壁厚増

加は生じていた。脳内 MR、 $\alpha$ ENaC、アンジオテンシン II 1型受容体(AT1R)発現レベルは AB-4 群で Sham-4 群と比べ増加していた。Rho-kinase 活性化の指標であるリン酸化モエシン蛋白発現も増加していた。交感神経活性およびこれらの蛋白発現は選択的 MR 阻害薬であるエプレレノンの脳室内投与によって抑制された。 $\alpha$ ENaC と交感神経活性の抑制効果を Fig. 3 に示す。

AB-4 マウスに 4 週間高食塩負荷を行った群では %FS の低下と交感神経活性増加が生じた。エプレレノンを脳室内投与するとこれらのパラメーターは改善した(Fig. 4)。さらに、エプレレノン脳室内投与により脳内 AT1 受容体発現が減少した。

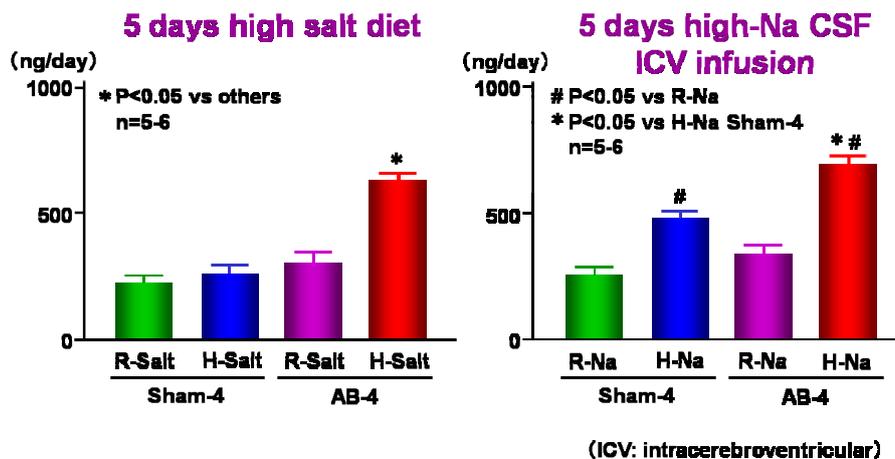
エプレレノンを経口投与すると脳室内投与した場合より交感神経活性と %FS に対する効果は小さかった。しかし、経口投与した場合の方が、左室肥大に対する抑制効果は大きかった。

また、アルドステロン合成酵素阻害薬である FAD286 を脳室内投与するとエプレレノンと同様の効果を得た。

### 3. 2 脳内食塩負荷に対する食塩感受性増強

Na 濃度(0.2 mol/L)が高い人工脳脊髄液を脳室内に微量注入すると AB-4 マウスでは Sham-4 マウスに比べて昇圧反応が大きかった。

ENaCs 阻害薬であるベンザミルを脳室内に投与すると食塩負荷による交感神経活性亢進および心機能低下を改善することは血液中から脳内への Na 取り込みを抑制す



**Sympathetic activity : evaluated by 24hr-urinary norepinephrine excretion**

Fig. 2. Effects of 4 weeks aortic banding on high salt-induced sympathetic excitation

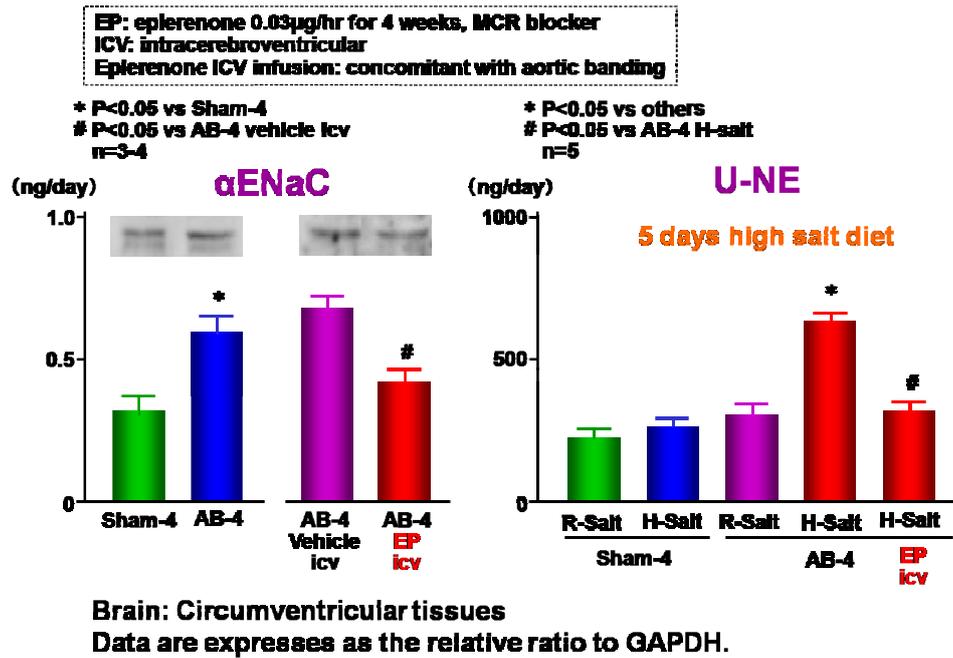


Fig. 3. Effects of ICV infusion of eplerenone on  $\alpha$ ENaC expression and Na-induced sympathetic activation

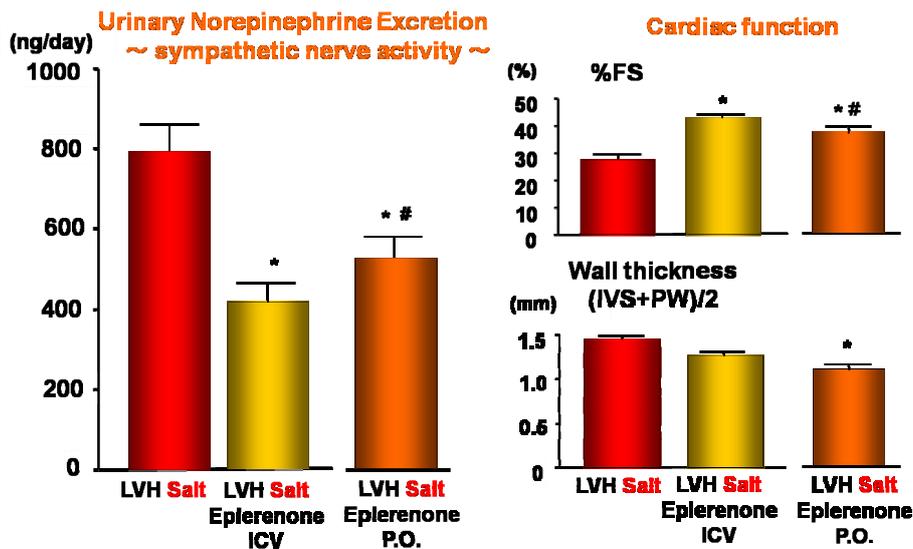


Fig. 4. Effects of oral administration of eplerenone useful to prevent heart failure in mice with LVH

ることによって脳内でのNaの作用が生じにくくしていることを示唆する。脳内Na投与実験の結果は脳内でのNa感受性も亢進していることを示唆するものである。

### 3.3 脳内における食塩感受性増強の下流の分子機構としての脳内アンジオテンシン系・Rho/Rho-kinase系の活性化

AB-H群にAT1R拮抗薬であるテルミサルタンを脳室内投与すると交感神経活性亢進の抑制と心機能悪化を抑

制した。ただし、AB-4にAT1R拮抗薬を脳室内投与してもMR/ $\alpha$ ENaC発現は低下しない。これはAT1R活性化がMR活性化の下流にあることを示唆する。また、Rho-kinase阻害薬であるY-27632を脳室内投与しても同様の結果を得た。AT1ノックアウトマウスを用いた研究では、現時点では圧負荷モデルによる食塩感受性が生じないようである。

#### 4. 考 察

本研究の重要な知見は以下の通りである。大動脈バンディング 4 週間後、圧負荷マウスでは%FS 低下は認められず、すなわち、収縮機能が保たれた状態で左室肥大を生じた。このマウスは脳内 MR-ENaCs を介した AT1R 活性化により高食塩負荷による交感神経活性亢進を生じた。脳室内あるいは経口 MR 拮抗薬投与は食塩負荷によって惹起される交感神経活性化と左室機能低下を改善した。これらの知見は MR 拮抗薬が高血圧性心疾患のような圧負荷を有する患者で食塩摂取過剰がもたらす交感神経活性化あるいは反応増加に対する有用な治療戦略である可能性を示唆する。

脳内 MR、 $\alpha$ ENaC、AT1R 発現増加が本研究で使用した圧負荷モデルで認められたことは重要な知見である。いわゆる食塩感受性高血圧モデル動物ではこれらの活性化が交感神経系活性化につながることは報告されている<sup>13)</sup>。しかし、遺伝的素因のないマウスで圧負荷を行いある期間待つことによって(本研究の場合 4 週間)、脳内 MR、 $\alpha$ ENaC、AT1R 発現増加し、食塩負荷による交感神経活性化が生じることを世界で最初に観察した。本モデルの場合、食塩感受性を獲得したということは食塩負荷による交感神経活性が増加したということを意味する。バンディングによる圧負荷を行っており血圧値そのものは心機能悪化により最終的には高食塩負荷群と通常食塩負荷群で差はなかった。しかし、経過中に血圧上昇の程度が高い可能性があり、心機能悪化に影響したことは推察される。それにも関わらず脳内投与した MR 阻害薬が有効であったことは注目に値する。

脳内 MR 活性化は AT1R 活性化が生じるがそこからどのようにして交感神経活性化が生じるかは明らかではない。我々の従来の研究成果と合わせ考えると酸化ストレス増大が関与している可能性が考えられる。また、脳内ウバイン様物質の役割も示唆されている<sup>1,5)</sup>。ただし、この物質の同定がまだ明らかではないようである。

我々の知見は脳内でアルドステロン産生が生じている可能性を示唆する。脳内 MR 発現および活性化が増加していることは確かであると考えられる<sup>15)</sup>。しかし、脳内局所でアルドステロンが産生されるかどうかについて議論がある<sup>16)</sup>。FAD286 というアルドステロン合成酵素阻害薬を用いた実験結果からは脳内でアルドステロンが産生されて

いると考えられる。しかし、これは脳内局所でその遺伝子発現を抑制して確認すること、実際の局所でのアルドステロンを測定する必要があり、今後の重要な検討課題である。MR の活性化はコルチゾールやコルチコステロンによっても生じる<sup>17)</sup>。また、MR 活性化がアルドステロンに依存しない経路により生じる可能性も示唆されている<sup>18)</sup>。

引き続き生じる AT1R 活性化は Rho/Rho-kinase 活性化を生じる。我々は脳内でこの経路の活性化は交感神経活性化を生じることを報告した<sup>19,20)</sup>。今回、圧負荷モデルでもこの経路の活性化が生じていること、交感神経活性化を生じていることを示した。

さらに Na の動きに関して ENaCs のみならず他の経路も考慮しなければならない。我々は本研究では Na-K-ATPase については検討していない。しかし、cyp2C2-EET 経路の活性化が减弱しており Na を脳脊髄液からくみ出す機構が障害されている可能性を示唆する成績を得ている。

以上の成績は、日常頻繁に遭遇する高血圧患者の心不全発症・進展に食塩感受性亢進が関与しているかについて分子機構を含めた科学的なエビデンスを提供する一助となると考えられる。減塩の重要性のみならず新たな食塩感受性を抑制する創薬につながる可能性がある。また、食塩を絡めた脳・心・腎連関の重要性を新たな概念として提唱することにつながる<sup>21,22)</sup>。

#### 5. 今後の課題

本研究の結果からは、まだ圧負荷からどのような機序で食塩感受性獲得が生じるかについては明確にはわからない。つまり、脳内 MR 活性化が生じるトリガーが何か、を探る必要がある。また、Na の血液中から脳内への動きを測定する必要がある。また、ENaCs は脈絡叢の血管側のみならず脳脊髄液側にも存在する。ENaCs は上皮細胞を介して脳組織への移行にも関与する。確かにベンザミル脳室内投与により交感神経抑制作用が認められるが実際の Na の動きがどのようになっているかを正確に捉えたわけではない。さらに、脳内のどの部位が重要かについても未解決である。圧負荷を受けた心臓からどのようにして食塩感受性が生じ交感神経活性化を生じるか、心不全発症を如何にして抑制するかは、今後の重要な研究テーマでありさらなる展開が期待される。

## 参考文献

1. Adrogue HJ, Madias NE. Sodium and potassium in the pathogenesis of hypertension. *N Engl J Med* 356: 1966-1978, 2007.
2. The Japanese Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension (JSH2009). *Hypertens Res* 32: 3-107, 2009.
3. 古閑靖章, 廣岡 良隆. 高血圧と食塩感受性: 交感神経活動亢進の重要性と中枢性機序. 循環制御 28: 203-209, 2007.
4. Brooks VL, Haywood JP, Lohnson AK. Translation of salt retention to central activation of the sympathetic nervous system in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 426-432, 2005.
5. Huang BS, Amin S, Leenen FHH. The central role of the brain in salt-sensitive hypertension. *Curr Opin Cardiol* 21: 295-304, 2006.
6. Osborn JW, Fink GD, Sved AF, Toney GM, Raizada MK. Circulating angiotensin II and dietary salt: converging signals for neurogenic hypertension. *Curr Hypertens Rep* 9: 228-235, 2007.
7. Grassi G. Assessment of sympathetic cardiovascular drive in human hypertension: achievements and perspectives. *Hypertension* 54: 690-697, 2009.
8. Grassi G. Sympathetic neural activity in human hypertension and related diseases. *Am J Hypertens* 23: 1052-1060, 2010.
9. Koga Y, Hirooka Y, Araki S, Nozoe M, Kishi T, Sunagawa K. High salt intake enhances blood pressure increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 31: 2075-2083, 2008.
10. Araki S, Hirooka Y, Kishi T, Yasukawa K, Utsumi H, Sunagawa K. Olmesartan reduces oxidative stress in the brain of stroke-prone spontaneously hypertensive rats assessed by an in vivo ESR method. *Hypertens Res* 32: 1091-1096, 2009.
11. Hirooka Y. Oxidative stress in the cardiovascular center has a pivotal role in the sympathetic activation in hypertension. *Hypertens Res* 34: 407-412, 2011.
12. Ito K, Hirooka Y, Sunagawa K. Acquisition of brain Na sensitivity contributes to salt-induced sympathoexcitation and cardiac dysfunction in mice with pressure overload. *Circ Res* 104: 1004-1011, 2009.
13. Gomez-Sanchez EP. Central mineralocorticoid receptors and cardiovascular disease. *Neuroendocrinol* 90: 245-250, 2009.
14. Huang BS, Leene FHH. Mineralocorticoid actions in the brain and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 13: 214-220, 2011.
15. Ito K, Hirooka Y, Sunagawa K. Blockade of mineralocorticoid receptors improves salt-induced left-ventricular systolic dysfunction through attenuation of enhanced sympathetic drive in mice with pressure overload. *J Hypertens* 28: 1449-1458, 2010.
16. Funder JW. Trilostane, FAD286, and the role of aldosterone in the central regulation of blood pressure: focus on "Role of central nervous system aldosterone synthase and mineralocorticoid receptors in salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R992-R993, 2009.
17. Funder JW. Aldosterone and mineralocorticoid receptors in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 52: 393-400, 2010.
18. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, Kawarazaki W, Kurihara H, Tanaka H, Miyoshi J, Takai Y, Fujita T. Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med* 12: 1370-1376, 2008.
19. Ito K, Hirooka Y, Sakai K, Kishi T, Kaibuchi K, Shimokawa H, Takeshita A. Rho/Rho-kinase pathway in the brain stem contributes to blood pressure regulation via sympathetic nervous system: possible involvement in neural mechanisms of hypertension. *Circ Res* 92: 1337-1343, 2003.
20. Sagara Y, Hirooka Y, Nozoe M, Ito K, Kimura Y, Sunagawa K. Pressor response induced by central angiotensin II is mediated by activation of Rho/Rho-kinase pathway via AT1 receptors. *J Hypertens*

- 25: 399-406, 2007.
21. Leenen FHH. Brain mechanisms contributing to sympathetic hyperactivity and heart failure. *Circ Res* 101: 221-223, 2007.
22. Hirooka Y. Brain perivascular macrophages and central sympathetic activation after myocardial infarction: heart and brain interaction. *Hypertension* 55: 610-611, 2010.

## Novel Brain Molecular Mechanism Involved in Activation of the Sympathetic Nervous System through Acquisition of Salt-Sensitivity in Heart Failure with Pressure Overload and Therapeutic Approach

Yoshitaka Hirooka<sup>1</sup>, Takuya Kishi<sup>2</sup>, Koji Ito<sup>3</sup>, Masaaki Nishihara<sup>4</sup>, Masatsugu Nakano<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiovascular Medicine Kyushu University Hospital, <sup>2</sup>Department of Advanced Therapeutics for Cardiovascular Diseases Kyushu University Graduate School of Medical Science, <sup>3</sup>Emergency & Critical Care Center Kyushu University Hospital, <sup>4</sup>Department of Cardiovascular Medicine Kyushu University Graduate School of Medical Sciences

### Summary

**Background and Aim:** In a pressure overload model, sympathetic activity is augmented in response to high salt intake. Mineralocorticoid receptors (MR) and epithelial Na channels (ENaCs) are thought to contribute to Na-processing, but the underlying mechanism is unknown. Therefore, we investigated the contribution of the brain MR-ENaC pathway to salt-induced sympathetic activation in a pressure overload model.

**Methods and Results:** Aortic banding was performed to produce a mouse pressure overload model. Four weeks after aortic banding (AB-4), left ventricular (LV) wall thickness was increased without a change in percentage fractional shortening (%FS). Sympathetic activity increased in response to a 5-day high-salt diet in AB-4, but not in Sham-4. Brain MR,  $\alpha$ ENaC, and angiotensin II type 1 receptor (AT1R) expression levels were greater in AB-4 than in Sham-4. The increase in sympathetic activity and in the expression of these proteins was blocked by intracerebroventricular (ICV) infusion of eplerenone, a MR blocker. In another protocol, AB-4 mice were fed a high-salt diet (AB-H) for 4 additional weeks, %FS was decreased and sympathetic activity was increased in AB-H compared with Sham. Expression of MR and AT1R in the brain was higher in AB-H attenuated salt-induced sympathoexcitation and the decreased %FS, ICV infusion of eplerenone in AB-H attenuated salt-induced sympathoexcitation and the decreased %FS. ICV infusion of eplerenone also decreased brain AT1R expression. Oral administration of eplerenone had smaller effects on sympathetic activity and %FS than ICV infusion, although oral administration had greater effects on LV hypertrophy than ICV infusion.

**Conclusions:** These findings indicate that activation of brain ENaC and AT1R through MR contributes to the acquisition of Na sensitivity to induce sympathoexcitation. Therefore, high salt intake accelerates sympathetic activation and LV systolic dysfunction in a pressure overload model.