

食塩感受性高血圧の発症機構と病態解析に関する研究 —酸化ストレスおよびシグナル分子 ASK1 を中心にして—

山本 英一郎¹, 安田 修², 光山 勝慶³, 片岡 恵一郎³

¹熊本大学附属病院循環器内科, ²熊本大学附属病院循環器臨床研究先端医療寄附講座,

³熊本大学大学院生体機能薬理学

概要 背景・目的: 食塩感受性の比較的強い日本人に発症率の高い脳血管疾患や高血圧性心臓病における食塩過剰負荷の意義や、食塩感受性高血圧の機序を解明することは極めて重要である。我々は今まで、高血圧では諸臓器における酸化ストレス(ROS)と ROS 誘導シグナル;ASK1 が活性化され、血管内皮機能異常や心リモデリングなどに関与することを明らかにした。本研究では、食塩感受性高血圧モデルや ASK1 欠損マウスを用いて、食塩過剰負荷による臓器障害および食塩感受性亢進のメカニズム解明を目的とする。

方法: (実験1) 食塩感受性高血圧のモデル動物である Dahl 食塩感受性高血圧ラット(DS ラット)に 7 週齢から食塩負荷を行い、12~16 週齢からの 4 週間、(1)ARB; irbesartan (20 mg/kg/day)、(2)抗酸化剤; tempol (0.1 mmol/kg/day)、(3)血管拡張剤 hydralazine を投与し、その効果を検討した。

(実験2) ASK1 欠損マウスに高食塩負荷を行い野生型マウスと血圧と心血管合併症に関して比較検討した。

結果: (実験1) Irbesartan は DS ラットの心筋虚血と心臓リモデリングを有意に抑制し、その効果は心臓における酸化ストレスの減少、心筋細胞肥大に対する冠毛細血管減少の正常化と血管内皮細胞アポトーシスの抑制を伴っていた。さらに、DS ラットのリモデリング心では ASK1 活性化と血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の低下を認め、それらはいずれも irbesartan 投与にて回復し、Tempol はこれらと同様の効果を示した。マウスから単離培養した血管内皮細胞による *in vitro* 検討では、ROS による ASK1 活性化は細胞アポトーシスを惹起し、VEGF は ASK1 活性化の抑制を介しアポトーシスを減少させることがわかった。

(実験2) 高濃度食塩食を負荷した野生型マウス、ASK-1 KO マウスいずれも同様の飲水量・尿量・Na 排泄量の増加とレニン活性とアルドステロンの抑制がみられたが、食塩負荷による左室線維化、冠動脈リモデリングは WT マウスより ASK-1 KO マウスで有意に抑制されていた。また、ASK-1 KO マウスの心臓では TGF- β 1 や、ROS や NADPH オキシダーゼのサブユニット NOX2 の発現の亢進も抑制されていた。ASK1 欠損マウスでは同様に食塩負荷による血管内皮機能障害や、血管における ROS 産生と NOX2 の発現亢進が抑制されていた。

結論: 食塩感受性高血圧における Ang II による心臓リモデリングに、ROS による VEGF の低下と ASK1 活性化が、内皮細胞アポトーシスと冠毛細血管の相対的減少を介して関与することが明らかになった。さらに ASK1 は、食塩による直接的な心臓炎症と線維化、血管内皮障害の惹起に、ROS の増加を介して関与することが明らかとなった。

1. 研究目的

食塩過剰摂取が脳卒中や心血管病など高血圧合併症のリスクになることは、数々の疫学研究から明らかである。従って、食塩感受性の比較的強い日本人に発症率の高

い脳血管疾患や高血圧性心臓病における食塩過剰負荷の意義や、食塩感受性高血圧の機序を解明することは極めて重要である。

我々は以前より、食塩感受性高血圧モデルであるダー

ル食塩感受性ラット(DS ラット)や高血圧性脳血管病モデルである脳卒中易発症性高血圧ラットに高食塩食を負荷し、食塩過剰摂取による高血圧性血管内皮機能障害や、続発する心リモデリング、脳卒中など心血管合併症のメカニズムを検討してきた。

これらに共通するメカニズムとして、高食塩負荷した上記モデル動物の心臓、腎臓などの諸臓器で superoxide (酸化ストレス Reactive Oxygen Species; ROS)の増加と、酸化ストレス誘導性のシグナル分子(MAP kinase kinase kinase; MAPKKK)である apoptosis signal-regulating kinase (ASK)-1 の活性化がみられた。ASK-1 はもともと酸化ストレスで誘導され、細胞アポトーシスを惹起する細胞内シグナル伝達物質として同定されたが、その後の我々の研究でアポトーシスのみならず様々な細胞応答に関与していることが明らかとなっている。

本研究は、食塩感受性高血圧モデル動物や ASK1 欠損マウスを用いた基礎研究と、食塩感受性高血圧と心不全患者の関連を検討する臨床研究の両側面による、食塩過剰負荷による臓器障害および食塩感受性亢進のメカニズムの解明を目的とする。

2. 研究方法

現在までの我々の研究で、高血圧はじめ様々な病態下では諸臓器における酸化ストレスと、その誘導シグナル分子 ASK1 が活性化されており、これらが血管内皮機能異常、脳血管障害や心肥大などに関与していることが明らかとなっている(図1)。

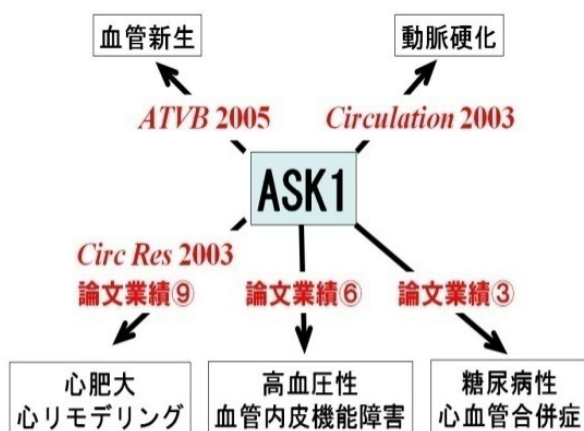


図1. 応募者らのグループが今までに証明した ASK1 の諸病態への関与

また、食塩感受性患者は非感受性患者に比べ重大な合併症を引き起こし易いことから、その発症や臓器障害合併の機序を解明することは臨床的に極めて重要である。

以上の背景のもと、食塩感受性メカニズムとその臓器合併症の発症機序について下記の計画に従って研究をすすめる。

2.1 DS ラットを用いた食塩感受性高血圧の心血管合併症の発症メカニズムについての検討

昨今、慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease; CKD)という概念が心血管病の独立した危険因子として注目されている。CKD では糸球体濾過量の低下から食塩感受性が亢進するが、DS ラットは比較的早期より CKD を発症し食塩感受性が増悪することが知られる。さらに、DS ラットにおける食塩感受性高血圧の発症や、心腎合併症の進展には組織におけるアンジオテンシン II (Ang II) の関与が深いことが多くの基礎・臨床研究で明らかになっている。

我々の予備検討でも、DS ラットの心血管ならびに腎組織では食塩負荷早期から、Ang II が亢進し酸化ストレスが増加しており、さらに CKD が惹起されていることが明らかにされている。しかし、食塩感受性高血圧での CKD ならびに心血管合併症への酸化ストレス関与のメカニズムは未だ不明な点も多いため、我々は DS ラットに各種抗酸化剤や、降圧薬を投薬し、酸化ストレスや、ROS 誘導性のシグナル分子の関与メカニズムを本研究で明らかにする。

具体的には、酸化ストレス産生酵素である NADPH オキシダーゼの阻害薬(apocynin) や酸化ストレス消去剤(tempol)、新たな酸化ストレス産生経路として注目されている eNOS アンカップリングの改善薬(塩酸 sapropterin)とともに、Ang II 受容体ブロッカー(ARB)で臨床で広く使用されている降圧薬である Irbesartan を投薬し、DS ラットにおける心血管合併症ならびに CKD に対する効果を比較検討することで、どの酸化ストレス産生経路が関与が深いのか、さらにはそのメカニズムに関して明らかにする。

同時に、腎組織における酸化ストレス関連因子(NADPH オキシダーゼのサブユニット、eNOS アンカップリングに関与するピオブテリン代謝関連酵素など)の発現を real time RT-PCR や western blot 法を用い mRNA およびタンパクレベルで検討する。

2.2 ASK1 KO マウスを用いた食塩負荷臓器障害のメカニズムについての検討

前述のように、食塩負荷高血圧モデル動物では諸臓器での酸化ストレス増加と、ASK1の活性化がみられた。このことから、シグナル分子 ASK1 の食塩負荷臓器障害への関与が示唆される。本実験ではこの詳細を明らかにするため、ASK1 欠損マウスに高食塩負荷を行い野生型マウスと比較検討する。

我々の予備検討では、野生型マウスに高食塩食(8% NaCl)を負荷すると血圧には変化がみられないものの、心臓や腎臓での酸化ストレス増大と炎症細胞浸潤とともに組織の線維化が惹起された。同時に、これらの組織でのASK1 とその下流分子 p38 のリン酸化の増加、さらに transforming growth factor(TGF)- β の発現亢進がみられた。

一方、ASK1 欠損マウスに高食塩負荷を行っても、組織でのp38リン酸化とTGF- β 発現は抑制され、心腎合併症もみられなかった(図 2)。つまり、食塩過剰による臓器障害への酸化ストレス-ASK1-p38 経路の関与が示唆された。

我々は引き続き、この詳細なメカニズムをマウスから得た組織サンプルを分子生物学的に解析し、明らかにしていく。具体的には、心腎における各種サイトカインの発現やASK1の下流のシグナル分子を real time RT-PCR や western blot 法を用いて mRNA およびタンパクレベルで検討する。さらに、各種抗体を用いて腎組織を免疫化学染色しメサンギウム細胞の増殖や細胞外基質の産生を定量する。

1)、2)の実験により、食塩感受性高血圧と合併臓器障害の発症機序における酸化ストレスとその誘導分子ASK1

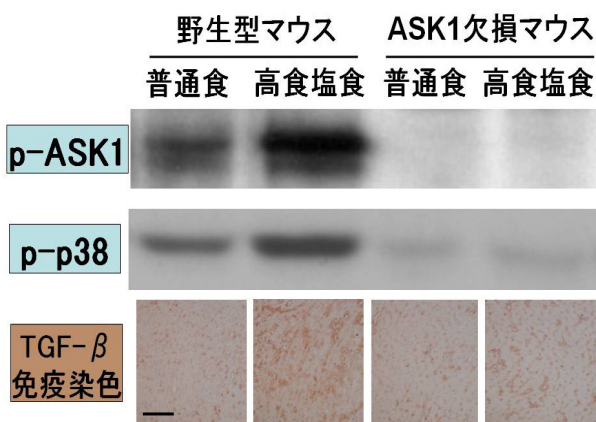


図2. 高食塩負荷マウスでのASK1-p38のリン酸化およびTGF- β の発現

の役割を明らかにし、新たな治療法の開発に寄与したいと考えている。

2.3 食塩感受性高血圧と拡張性心不全に関する臨床研究

近年、心不全症例の約半分は、左室拡張機能のみが障害される心拡張不全によることが明らかとなり、予後不良なことから本邦でも大きな問題に位置づけられている。だが、心拡張不全は心収縮不全と全く異なる病態と理解されているものの、その発症機序は依然不明である。

DS ラットは食塩負荷により高血圧性心肥大を経て、やがて拡張性心不全をきたすことから、食塩感受性高血圧が特異的に心拡張不全を発症しやすい可能性がある。我々はヒト病態においてこれを証明するために、心不全患者における食塩感受性と血圧の日内リズムを、心拡張不全患者と心収縮不全患者とで比較検討する。

具体的には、高血圧性心不全患者の食塩感受性を評価し、24時間血圧計測定にて血圧日内リズムを dipper 型(夜間に血圧が10%以上低下する正常タイプ)と non-dipper 型(夜間に血圧が10%未満しか低下しない夜間降圧減弱タイプ)に分類する。これらを、心拡張不全患者と心収縮不全患者とで比較検討することで(心拡張不全の診断は図 3 参照)、食塩感受性高血圧の日内リズムや、心拡張不全との相関を明らかにする。

また、食塩感受性患者には non-dipper 型高血圧が多く心不全の発症率が高いことが報告されているが、拡張不全が多いのか収縮不全が多いのか、またその疾患背景など明確でない点も多い。我々は患者の疾患背景(インスリ

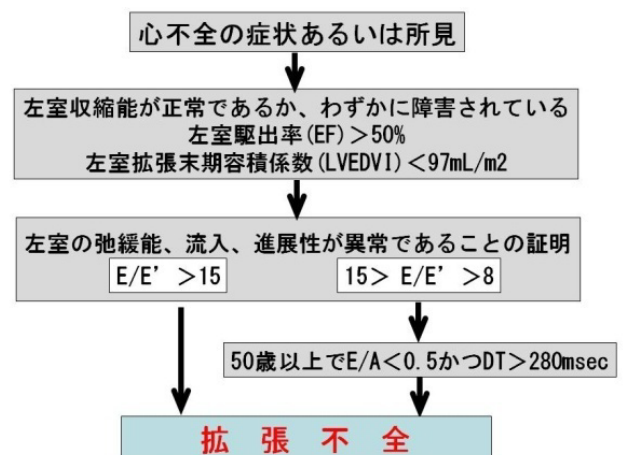


図3. 心エコーによる拡張不全の診断

ン抵抗性や脂質代謝異常)や心血管合併症を評価するとともに、尿中のアルブミン量(糸球体高血圧を反映する)や 8-OHdG 値(酸化ストレスの指標)を測定し食塩感受性高血圧患者の疾患背景を食塩非感受性患者と比較する。

これらの研究により、食塩感受性高血圧が、①実際に特異的に心拡張不全をもたらしやすいのか、②その疾患背景に酸化ストレスの増大がみられ、さらにインスリン抵抗性や脂質代謝異常、CKD などの合併症が多いのか、臨床興味深いこれらの疑問点を明らかにしたい。

3. 研究結果

3. 1 DS ラットを用いた心血管合併症および CKD 発症メカニズムについての検討

我々や他のグループにより、DSラットに7週齢から高食塩食を負荷すると、速やかに食塩感受性の高血圧をきたし、12週齢で高血圧性心肥大を呈し、その後16週齢には著明な心拡張不全をきたすことが明らかにされている。そのため今回の実験では、7週齢から高食塩食を負荷したDSラットに、血管内皮機能障害やCKD、さらには著明な左室肥大を呈した12週齢から4週間(1)ARBであるirbesartan(20 mg/kg/day)、(2)抗酸化剤;tempol(0.1 mmol/kg/day)、(3)血管拡張剤hydralazine(3 mg/kg/day)をそれぞれ経口投与した。

結果、図4のようにすべての薬剤投与群はいずれも有

意な降圧効果をえられたが降圧程度には有意差はなかった。

しかし、同程度の降圧効果ながら、hydralazine にくらべて、irbesartanとtempol投与群では心重量および心エコーによる左室肥大は有意に抑制されており、左室肥大のマーカーである血中BNP値も有意に低下していた。また、解剖した心組織を病理染色すると、有意に心臓での炎症(マクロファージの侵潤)や左室間質の線維化が抑制され、病理学的にも心臓リモデリングがARBと抗酸化剤で抑制されることがわかった(図5)。さらに、心臓におけるROS産生をsuperoxide特異的プローブであるジハイドロエチジウ

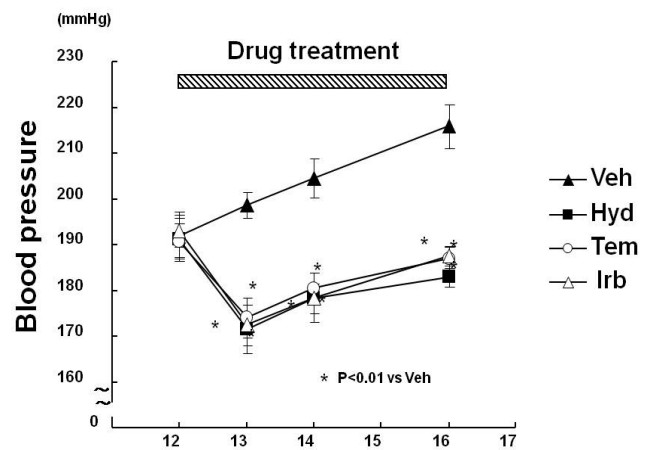


図4. 食塩負荷DSラットの血圧変化

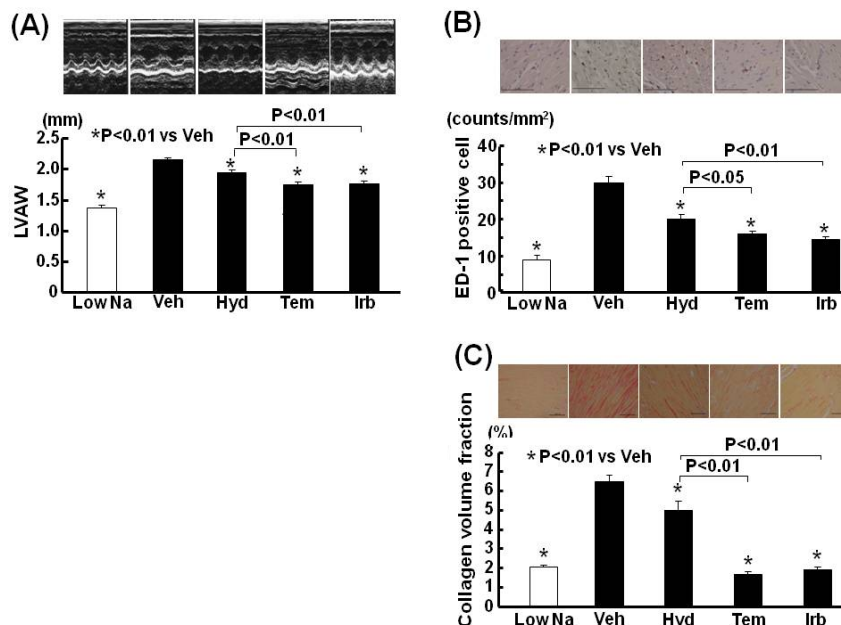


図5. ARB および抗酸化剤のDSラット心臓リモデリングに対する効果

ム(DHE)染色で定量、心臓における虚血をピモニダゾール染色で定量したところ、**図6**のように hydralazine では抑制できなかったものの、irbesartan と tempol は有意に両者を抑制することがわかった。

左室肥大および心臓リモデリングでは、心筋細胞の肥大に対する Capillary vessels(冠毛細血管)減少による相対的心筋虚血が起こっていることが最近明らかにされているため、われわれは本実験系においても同様の現象が起こり**図6**の心筋虚血ならびに心臓における ROS 増加が起こっているのではないかと仮説し検討を行った。結果、**図7**のように血管内皮細胞の特異的染色マーカーである

CD31 で心臓組織を免疫染色すると、DSラットでは有意に Capillary vessels の相対的減少が起こっており、さらにその機序には血管内皮細胞のアポトーシスの増加が関与していることが、TUNEL 染色(アポトーシス特異的染色)との二重染色によって明らかになった。さらに興味深いことに、Hydralazine では抑制できなかったものの、irbesartan と tempol は有意に血管内皮細胞のアポトーシスを抑制することにより、Capillary vessels の相対的減少を防ぎ心臓リモデリングを予防していることが示唆された。

さらにその分子学的機序の検討を明らかにするため、我々は以前より研究を行っており、食塩負荷によるDSラッ

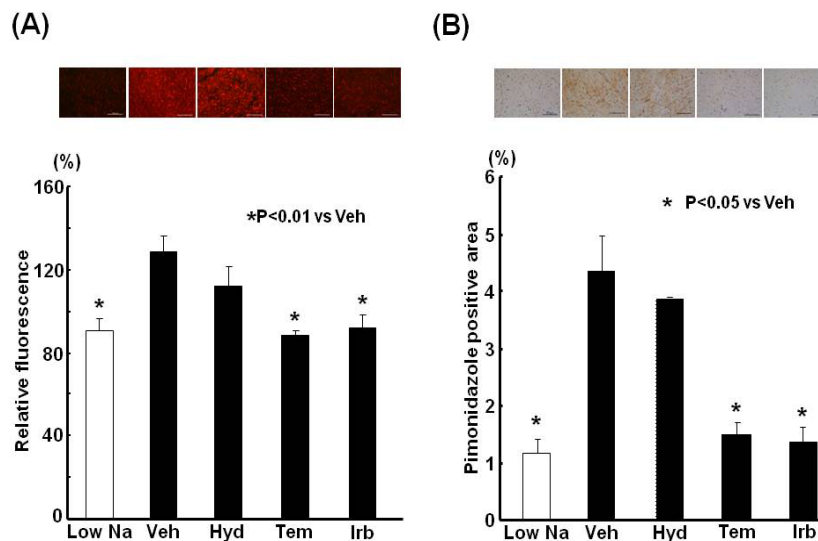


図6. ARB および抗酸化剤の DS ラット心臓における ROS および虚血に対する効果

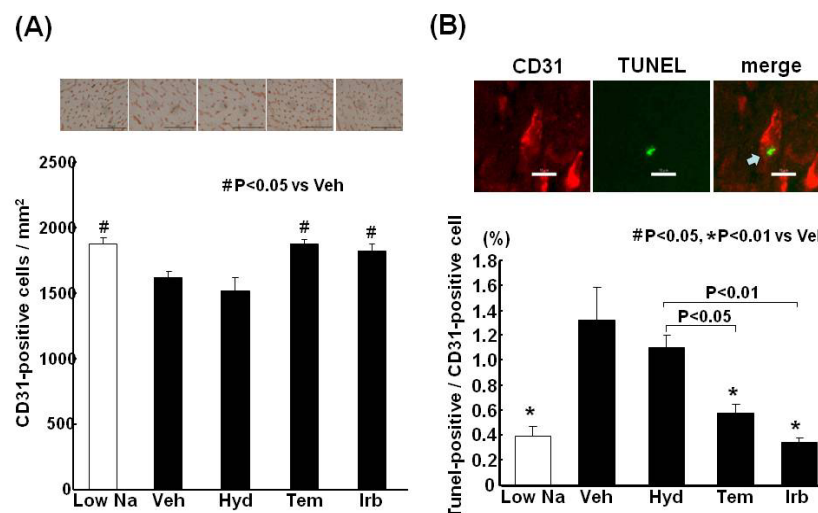


図7. DS ラット心臓における Capillary density および血管内皮細胞 apoptosis

トでの臓器障害に深く関与することを明らかにしている ROS 誘導性のシグナル分子 (MAPKKK) である ASK-1 に着目して検討を行っている。我々は以前の研究で食塩負荷 DS ラットの心臓・血管・腎臓組織において ASK1 の活性化 (リン酸化の亢進) が惹起されており、それらが ARB により有意に抑制されることから、組織における Ang II が ROS の増加と ASK1 活性化を介して食塩負荷による臓器障害に深く関与することを見出しているが、本研究においても同様に心臓組織における ASK-1 リン酸化の亢進を確認するとともに、今回新たに血管内皮細胞に発現し血管新生において中心的な役割を担うタンパクである血管内皮細胞増殖因子; VEGF (vascular endothelial growth factor) が低下していることを見出している (図 8)。

さらに、この現象が並行現象なのか、あるいは直接的に関与しているのかを検討するために、野生型 (WT) マウスおよび ASK-1 の遺伝子欠損 (ASK1^{-/-}) マウスの大動脈から単離培養した血管内皮細胞を用いて、*in vitro* 実験にて検討を行った。具体的には、単離培養したそれぞれの血管内皮細胞に、ROS を惹起するために過酸化水素 (H₂O₂) を添加し、細胞アポトーシスを誘導した。結果、caspase-3 の蛍光免疫染色で定量した血管内皮細胞アポトーシスは ASK1 欠損マウスにおいては有意に減少していることが明らかになり (図 9-A)、さらに VEGF にて前処置した血管内皮細胞においてもアポトーシス細胞は有意に減少していることがわかった (図 9-B)。さらに、H₂O₂ 添加した血管内皮細胞での ASK1 リン酸化の経時的変化をウェスタンブ

ロットにて検出したところ、野生型マウスの細胞では添加後 5 分をピークに ASK-1 リン酸化の亢進がみられるのに対し、VEGF にてあらかじめ前処置しておく、ASK-1 リン酸化が有意に抑制されることを見出している (図 9-C)。また同様に、VEGF 前処置は血管内皮細胞における ROS 増加も有意に抑制することを、蛍光染色を用いて明らかにしている (図 9-D)。

さらに、食塩負荷 DS ラットの諸臓器における酸化ストレス亢進のメカニズムに ROS 産生の新しい経路として注目される eNOS アンカップリングの関与を検討するため、eNOS アンカップリングの主因として知られる eNOS 補酵素; tetrahydrobiopterin (BH4) の血中および尿中濃度を定量した。結果、図 10 のごとく DS ラットでは血中・尿中ともに BH4 濃度の低下を認め、いずれも ARB (Irbesartan) 投与にて改善することを見出している。これは以前の我々の DS ラット血管でのデータ (血管 BH4 の低下) を支持するものである。

3. 2 ASK1 KO マウスを用いた食塩負荷臓器障害のメカニズムについての検討

上記実験にて、食塩感受性高血圧による臓器障害に共通する基盤として、諸臓器における ASK-1 の亢進が関与する可能性が強く示唆された。そこで、ASK-1 遺伝子欠損マウス (ASK-1 KO マウス) を用いて食塩負荷による直接的臓器障害効果のメカニズムの検討を行った。具体的には、野生型 (WT) マウスと ASK-1 KO マウスに対して 8% の高濃度食塩食を負荷し、その効果を比較検討した。

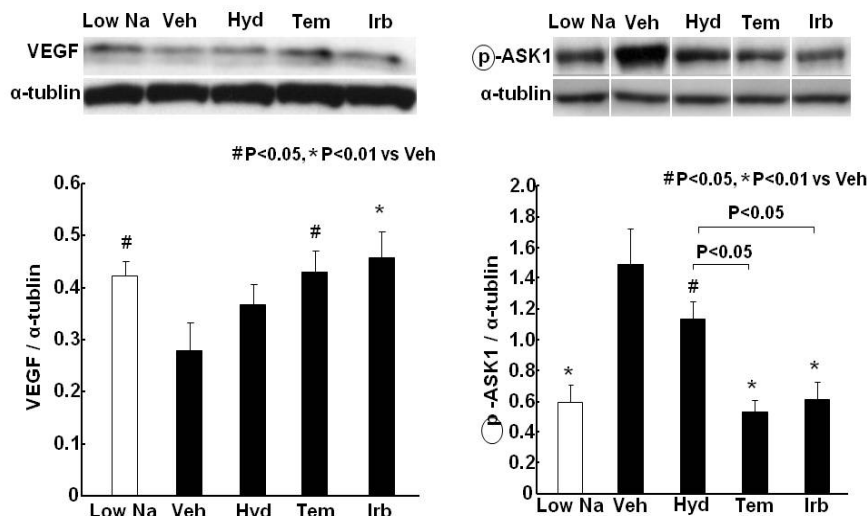


図 8. DS ラット心臓における VEGF およびリン酸化 ASK-1 の発現

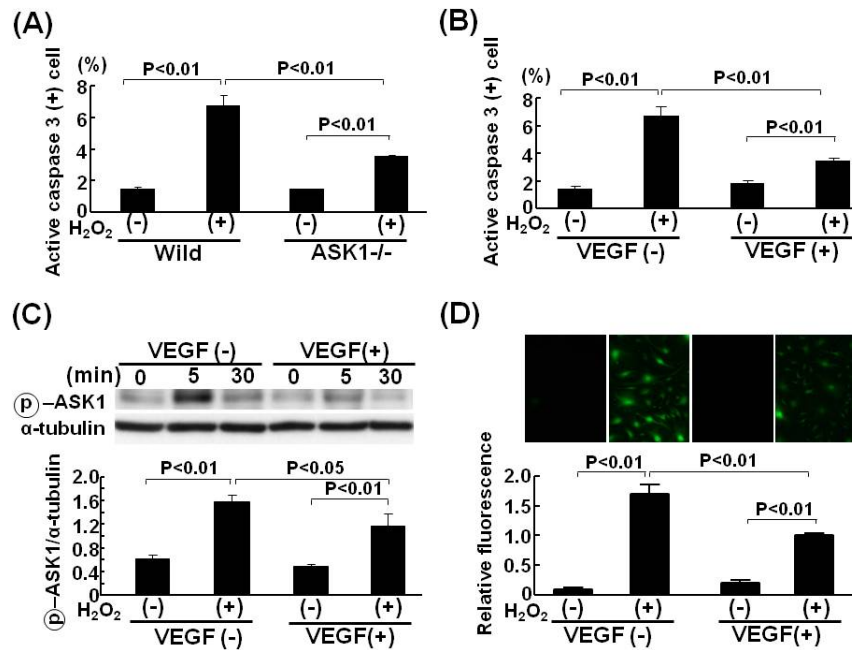


図 9.

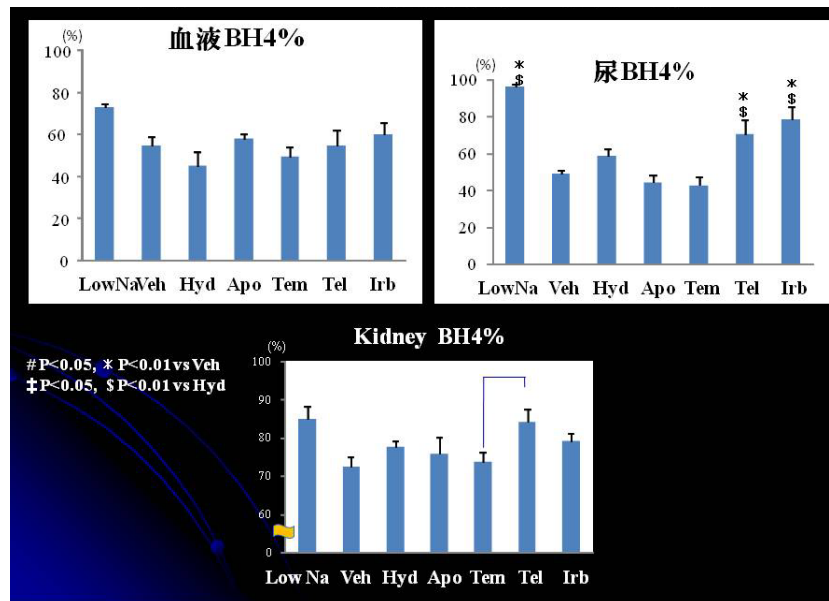


図 10. BH4 濃度(血液・尿)

興味深いことに、食塩負荷にて WT マウス、ASK-1 KO マウスいずれも有意な血圧上昇や左室肥大(心重量測定にて評価)は見られないにも関わらず、WT マウスで有意に起こっていた心臓における病理変化(左室間質線維化、冠動脈リモデリング)や、線維化に関わる分子: TGF-β1 の発現亢進は、ASK-1 KO マウスで有意に抑制されていた(図 11)。

さらに、心臓における炎症を CD45 および CD68 の免疫染色による炎症細胞浸潤にて評価すると、WT マウスにて有意に増加していた左室への炎症細胞浸潤は、ASK-1 KO マウスでは増加しておらず(図 12)、心臓における ROS の増加を DHE プローベを用いて superoxide の蛍光染色で評価すると、こちらも ASK-1 KO マウスでは食塩負荷による ROS 増加は有意に抑制されていた(図 13 左)。

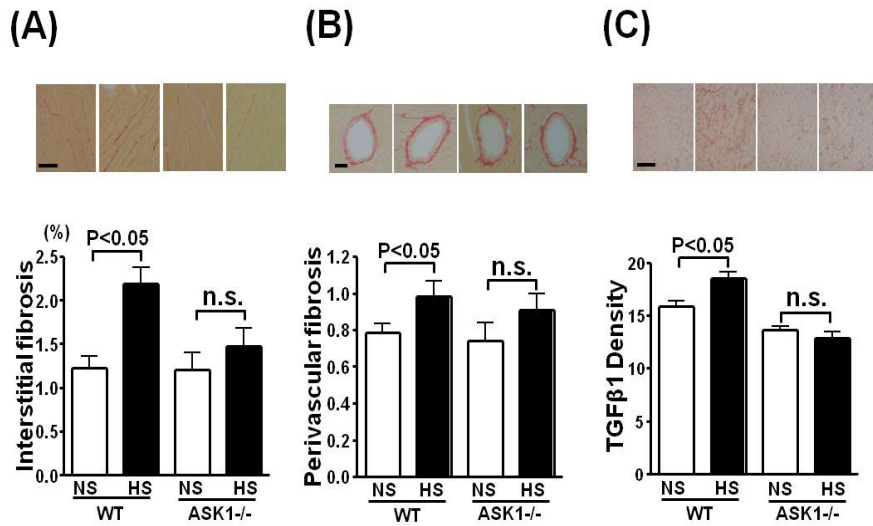


図 11. 食塩負荷による心リモデリングに対する影響 –WT マウス vs ASK1 KO マウス–

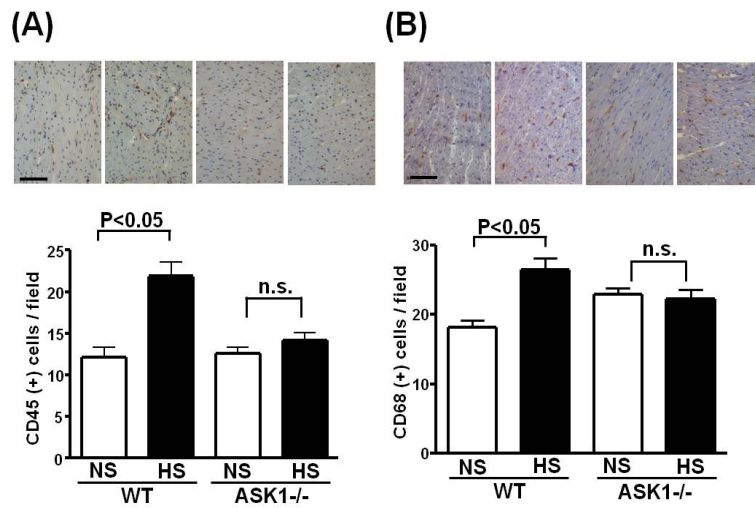


図 12. 食塩負荷による心臓炎症に対する影響 –WT マウス vs ASK1 KO マウス–

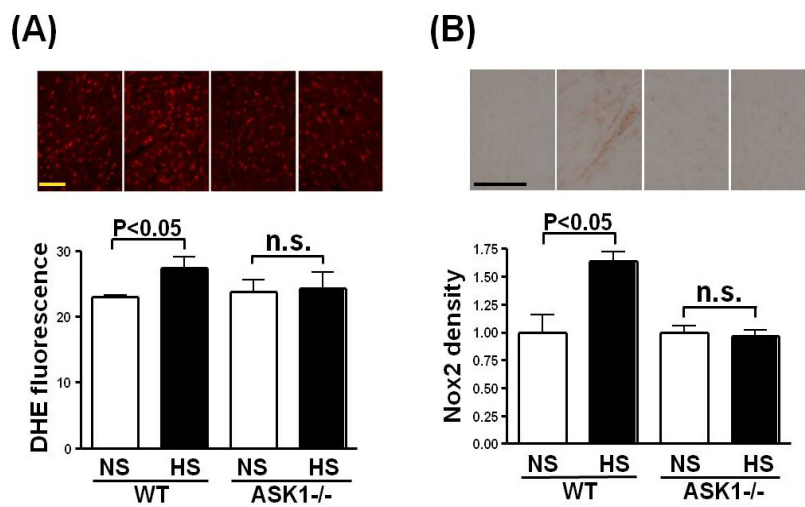


図 13. 食塩負荷による心臓 ROS 産生に対する影響 –WT マウス vs ASK1 KO マウス–

ROS 抑制の機序に関しては、ROS 産生の主要経路である ROS 産生酵素 NADPH オキシダーゼのサブユニットの一つである NOX2 の免疫染色により、ASK1 KO マウスでは心組織における NOX2 の発現が抑制されることでもたらされることが示唆された(図 13 右)。同様の NADPH オキシダーゼのサブユニットの一つである p22phox の免疫染色による発現には、WT マウス、ASK-1 KO マウスで全く差がみられなかったことから、この変化は NOX2 特異的と判断される。さらに、同マウスで酸化ストレス消去酵素である superoxide dismutase(SOD)のアイソフォームをウェスタンブロットで検出したが、Cu/Zn SOD、マンガン(Mn)SOD、extra-cellular(ec)SODいずれも WT マウスと ASK-1 KO マウスで有意差を認めなかった。

我々は以前からの DS ラットを用いた検討で、食塩感受性高血圧では諸臓器の障害(心肥大・心拡張不全、CKD)などに先んじて血管内皮機能障害が惹起されていることを見出しており、血管内皮機能障害が上記合併症の増悪因子になる可能性を報告している。このため、本実験系においても血管内皮機能障害の程度を、摘出大動脈に対するアセチルコリンによる弛緩反応を測定することで評価している。

結果、図 14 のように血管内皮機能は食塩負荷 WT マウスでは有意に傷害されているが、ASK-1 KO マウスでは全く傷害がみられていないことを見出している。血管内皮機

能障害は CKD 発症にも深く関与していることが知られており、同所見は ASK-1 KO マウスでの CKD 発症抑制の機序にも関与する結果といえる。

また、食塩負荷により、心臓および血管においても ASK-1 のリン酸化とその下流にある MAP kinase である p38 MAPK のリン酸化は有意に亢進するが(図 15)、血管においても心臓と同様に DHE 染色にて定量した ROS の増加と、免疫染色で定量した Nox2 の発現は亢進しており、これらの現象はいずれも ASK-1 KO マウスでは有意に抑制されていた(図 16)。さらに、superoxide は組織の NO と反応して細胞傷害性の強い peroxynitrite(ONOO-)となるが、そのマーカーであるニトロチロシンの免疫染色を同マウスの血管にて行ったところ、ROS の所見と同様に、血管におけるニトロチロシンの発現は食塩負荷によって有意に亢進し、ASK1 KO マウスでは有意に抑制されていた(図 17)。しかしながら、血管における NO の産生酵素である eNOS のタンパク発現およびリン酸化、ならびに SOD の上記3つのアイソフォームいずれもウェスタンブロットにて定量したが、いずれも WT マウスと ASK-1 KO マウスで有意差を認めなかった。

つまり、ASK1 による ROS 増加の機序は、SOD 発現や NO 産生による ROS 消去系の亢進ではなく、NOX2 サブユニットを介した NADPH オキシダーゼ活性の亢進による superoxide 増加を少なくとも一部に介していることが示唆さ

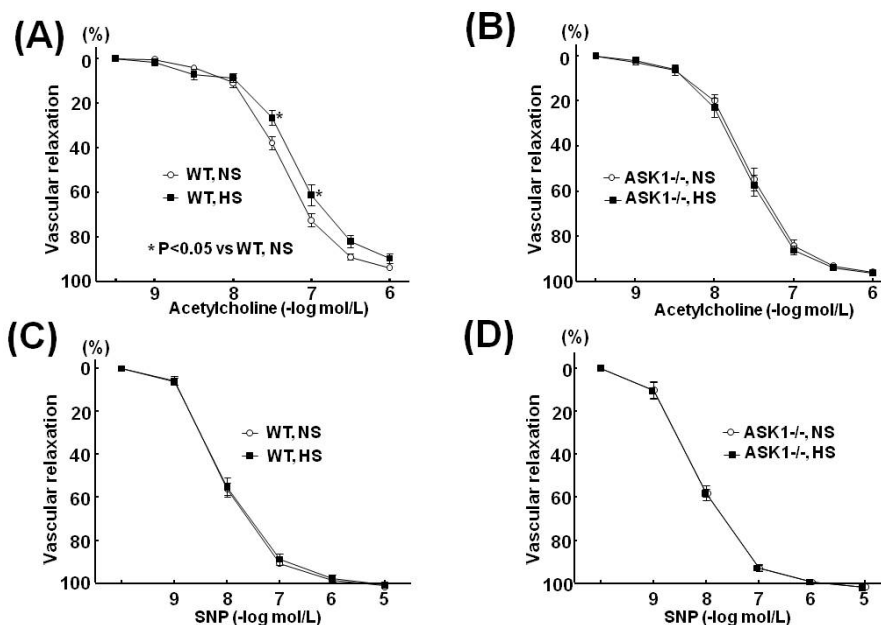


図 14. 食塩負荷による血管内皮機能に対する影響

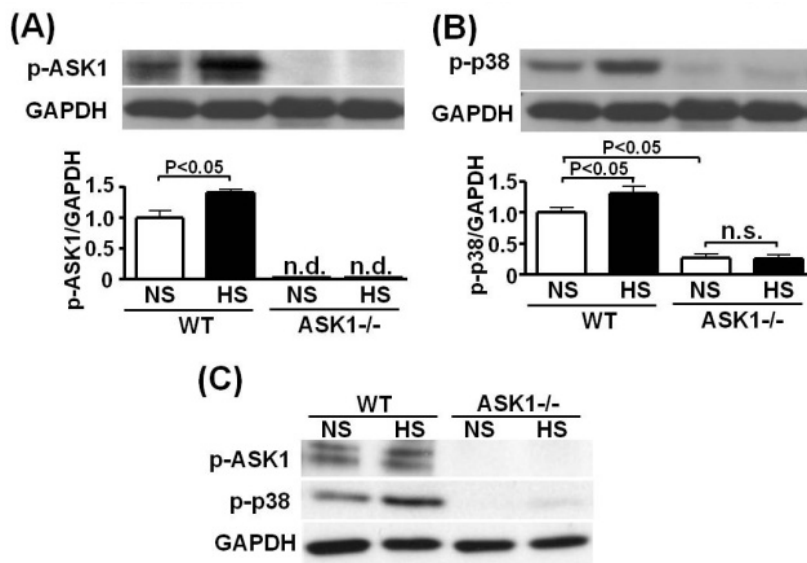


図 15. 食塩負荷による心臓・血管における ASK1 活性化

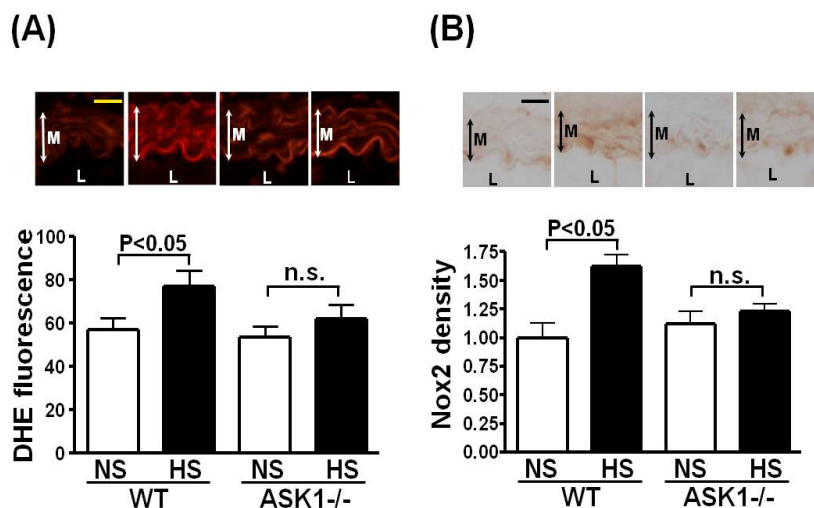


図 16. 食塩負荷による血管 ROS に対する影響

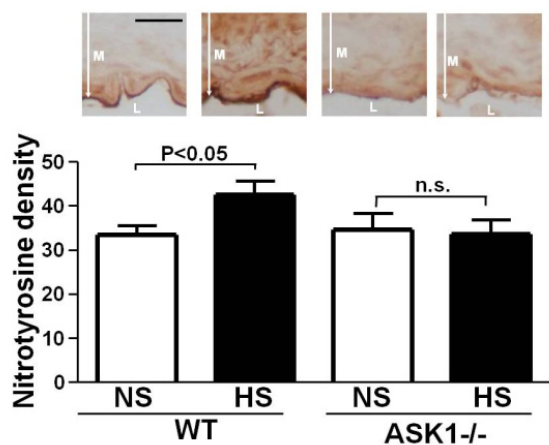


図 17. 食塩負荷による血管 ONOO⁻ に対する影響

れた。

3. 3 食塩感受性高血圧と拡張性心不全に関する臨床研究

現在、上記の心エコーにて診断した心拡張不全の定義に合致したなかで高血圧を合併する患者を対象に、24 時間血圧計にて高血圧のパターンを分類し、さらに酸化ストレスのマーカーである 8OHdG を測定し、その相関を検討している。

4. 考察ならびに今後の課題

今回の基礎的検討で、食塩感受性高血圧により特異的

に惹起される心臓リモデリングにおいて、心臓炎症・線維化、ならびに ROS が惹起されており、それぞれ ARB で有意に抑制されていることから、同病態には Ang II が関与することが明らかにされた。この知見は、以前われわれが明らかにした所見を支持するものであるが、今回の検討 1 においては、あらたに心筋虚血が関与していることが示唆された。

左室リモデリングおよび左室肥大に、心筋細胞肥大に対する冠毛細血管の相対的減少による心筋虚血が関与することが最近明らかにされたが(参考文献①)、われわれは食塩感受性高血圧のモデル動物である DS ラットにおいても同様の現象がおこっていることを初めて証明した。さらに、以前の検討で Ang II により ASK-1 という ROS 誘導性の MAPKKK が DS ラットの血管では亢進しており、血管での ROS の増加や血管内皮機能障害に寄与していることを証明しているが、今回の検討では *in vitro* での検討も加えることで ROS による血管内皮細胞のアポトーシスに ASK-1 が直接的に関与しており、さらに血管内皮細胞増殖因子; VEGF が ASK-1 の down-regulation を介して血管内皮細胞アポトーシスと ROS の増加を抑制することを明らかにした。これにて、DS ラットにおける VEGF の減少が ASK-1 を介する細胞内 ROS 産生と細胞アポトーシスを介して、心筋細胞肥大に対する冠毛細血管の相対的減少をきたすことが証明できる。ASK-1 と血管新生に関しては、われわれのグループが ASK-1 KO マウスの下肢虚血モデルを用いて以前報告しているが(参考文献②)、今回の検討は同様の現象が食塩感受性高血圧による臓器障害においても惹起されており、心臓リモデリングに深く関与していることを示しており、ASK-1 が様々な心血管病態に広く普遍的に関与していることを示すものである。また、CKD には腎臓における血管内皮機能障害や ROS の増加が深くかかわっていることはよく知られているが、本研究結果は腎臓における血管内皮機能障害や ROS 増加にも、ASK-1 活性化や VEGF の産生低下が関わっていることを強く示唆するものである。CKD は食塩感受性高血圧により早期に惹起され増悪因子になるため、これらシグナル分子に対する介入が早期からの食塩感受性高血圧治療に寄与できる可能性がある。

心血管疾患における ROS に対する様々な大規模な介入試験(ビタミン C やビタミン E による)は、いずれも有意な

抑制効果をしめしておらず、実臨床での ROS 抑制の難しさを物語っているが、ROS 誘導性のシグナル分子に対する介入は、より効果的・実的な心血管病抑制のみならず、その上流である食塩感受性高血圧や生活習慣病の改善効果も期待できる可能性がある。今後も ASK-1 を中心とした食塩感受性高血圧の発症機序、ならびに臓器障害進展の分子学的メカニズムを検討していく予定である。また、基礎実験 2 においては、より ASK-1 に焦点をあて食塩過剰負荷による心血管合併症の発症・進展機序を、ASK-1 KO マウスを用いて検討している。結果、食塩過剰負荷により直接的に心血管障害がおこり、さらに ASK-1 が関与するという新しい知見を見出している。同結果において興味深いことは、①食塩過剰負荷をあたえてもマウスの飲水増加と尿中 Na 排泄は有意に増加するものの血圧は全く上昇せず、臓器における ASK-1 活性化のみでは高血圧は惹起されないこと、さらに、②正常血圧にも関わらず食塩過剰負荷によって、心血管組織における ROS の増加や ASK-1 の活性化、さらにその下流のシグナル分子の変化がみられることである。同時に我々は、ASK-1 KO マウスでは食塩過剰負荷による血中レニン、アルドステロンなどの血中 NaCl バランス調節ホルモンの抑制は、野生型マウスのそれと変化がないことを見出している。つまり、ASK-1 は、少なくとも食塩負荷モデルにおいてはレニン・アンジオテンシン系の抑制には関与していないことが示唆される。しかしながら、今回の実験は比較的短期に惹起されるとされる ROS の増加とシグナル分子の変動をみたものであり、より長期の経過で起こる高血圧の発症や心肥大の誘発は、さらに食塩負荷の期間を長期にすれば惹起されえたかもしれない。このため、今後も同モデルの中・長期間の負荷にて CKD の発症時期、血圧の変化などを検討していく必要がある。

また、実験 3 の臨床研究において、ROS と、食塩感受性高血圧や CKD、心臓リモデリングなどの合併症の関係を実際のヒト病態において明らかにする必要がある。

参考文献等

1. Sano M, Minamino T, Komuro I, *et al.* p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 22(446): 444-8, 2007
2. Izumi Y, Kim-Mitsuyama S, *et al.* Important role of

apoptosis signal-regulating kinase 1 in ischemia-induced
angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(9):

1877-83, 2005

The Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension and High-Salt-Induced Cardiovascular Injury - The Crucial Role of Reactive Oxygen Species and Apoptosis Signal-Regulating Kinase-1 -

Eiichiro Yamamoto¹, Osamu Yasuda², Shokei Kim-Mitsuyama³, Keiichiro Kataoka³

¹Department of Cardiovascular Medicine, Kumamoto University Hospital,

²Department of Cardiovascular Clinical and Translational Research, Kumamoto University Hospital,

³Department of Pharmacology and Molecular Therapeutics, Kumamoto University Graduate School of Medical Sciences

Summary

Objectives: High-salt diet (HSD) is closely associated with the increase in cardiovascular events. However, the mechanism of high-salt-induced cardiovascular injury is unknown. The present study was undertaken to examine whether apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1 is involved in salt-sensitive hypertension and salt-induced cardiovascular injury.

Methods: (Experiment I) DS rats were orally given irbesartan (ARB), tempol (SOD mimetic), or hydralazine. (Experiment II) Wild type (WT) and ASK1^{-/-} mice were fed a HSD for 10 weeks and the effects of HSD on cardiovascular injury were compared.

Results: (Experiment I) Irbesartan significantly ameliorated cardiac ischemia and prevented the development of cardiac remodeling in DS rats. This beneficial effect of irbesartan was associated with the attenuation of reactive oxygen species (ROS), the normalization of myocardial capillary density, and the inhibition of capillary endothelial apoptosis. Moreover, DS rats with cardiac hypertrophy and remodeling displayed the decreased myocardial VEGF expression and the increased cardiac ASK1 activation, and irbesartan significantly reversed them. Tempol mimicked all the above mentioned effects of irbesartan, indicating the critical role of ROS. We also investigated the role of VEGF and ASK1 in ROS-induced endothelial apoptosis, using cultured endothelial cells from WT and ASK1^{-/-} mice. ROS-induced ASK1 activation caused endothelial apoptosis and VEGF prevented endothelial apoptosis by inhibiting ASK1 activation.

(Experiment II) HSD in WT and ASK1^{-/-} mice similarly increased food intake, water intake, urine volume, and urinary sodium excretion, and comparably decreased plasma rennin activity (PRA) and aldosterone. Thus, ASK1 appears to play a minor role in the increase in natriuresis and the decrease in PRA and aldosterone caused by HSD. HSD enhanced the cardiovascular phospho-ASK1 in WT mice. HSD in WT mice enhanced cardiac TGF- β 1, interstitial fibrosis, coronary perivascular fibrosis, and inflammatory cell infiltration, and these changes were associated with the increase in cardiac ROS and Nox2. ASK1 deficiency abolished the above mentioned parameters. HSD also caused the impairment of vascular endothelial dysfunction and increased vascular ROS and Nox2 in WT mice, while it did not cause vascular injury in ASK1^{-/-} mice.

Conclusions: We obtained the first evidence that ROS-induced cardiac VEGF down regulation and ASK1 activation, through enhancement of endothelial apoptosis, contributed to the decrease in myocardial capillary density, which was responsible for Ang II-induced cardiac injury. Furthermore, ASK1 is implicated in cardiac inflammation and fibrosis and endothelial dysfunction caused by HSD, through the enhancement of ROS.