

## 食塩感受性高血圧における昇圧機序 :脳内アルドステロン・ミネラルコルチコイド受容体の役割

藤田 恵<sup>1</sup>, 河原崎 千晶<sup>1</sup>, 村岡 和彦<sup>1</sup>, 藤田 敏郎<sup>2</sup>, 安東 克之<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科分子循環代謝病学講座

<sup>2</sup> 東京大学先端科学技術研究センター臨床エピジェネティクス講座

**概要** 最近、腎除神経術が難治性高血圧を改善したと報告され、高血圧における交感神経活動の役割が注目されているが、我々は「脳内酸化ストレスを介した中枢性交感神経活動亢進」が食塩感受性高血圧の発症維持に関与している可能性を示してきた。一方、アルドステロン-ミネラルコルチコイド受容体系が酸化ストレス増大を介して心・腎障害を来していることが、我々を含めたいくつかのラボから報告されている。そこで、脳内アルドステロン-ミネラルコルチコイド受容体系が食塩感受性高血圧における脳内酸化ストレスを介した中枢性交感神経活動亢進機序に関与している可能性を考え、Dahl 食塩感受性高血圧ラットに対し検討を加えた。

ミネラルコルチコイド受容体の下流因子である Sgk-1、PAI-1 の視床下部における mRNA 発現量を real-time RT-PCR 法により評価した。高食塩食負荷ラットの脳室内にミネラルコルチコイド受容体拮抗薬であるエプレレノン<sup>®</sup>を慢性投与し、血圧・交感神経活動・脳内酸化ストレスに及ぼす影響を検討した。抗酸化薬 tempol を脳室内に急性投与した際の血圧・腎交感神経活動の反応に関し、エプレレノン群を vehicle 群と比較検討した。さらにルジジェニン化学蛍光発光法で視床下部内酸化ストレス産生量も評価した。

その結果、高食塩食負荷により視床下部における Sgk-1、PAI-1 の mRNA 発現が有意に亢進し、脳内におけるミネラルコルチコイド受容体の活性化が示唆された。脳室内へのエプレレノンの慢性投与は、有意な血圧低下、交感神経抑制効果を示した。Tempol を脳室内に急性投与した際の血圧・腎交感神経活動の低下反応は、エプレレノンの慢性脳室内投与群で有意に抑制され、これは視床下部酸化ストレス産生量の抑制を伴っていた。

以上より、食塩感受性高血圧において、脳内アルドステロン-MR 系を介した酸化ストレス増大による中枢性交感神経活動亢進が血圧上昇に関与している可能性が示唆された。

### 1. 研究背景および目的

高血圧における交感神経活動の役割は古くから検討されてきたが、最近、治療抵抗性高血圧患者においてカテーテル焼灼術による腎除神経により持続的で顕著な降圧効果が得られたと報告され、交感神経活動の役割が注目されている。その交感神経活動の出力を規定するのは中枢である。食塩感受性高血圧では「中枢性交感神経活動亢進」が重要であり、その上流に存在する機序に「脳内酸化ストレス増大」が関与している可能性を我々は既に報告した(文献 1, 2)。すなわち、8% 高食塩食もしくは普通食

で飼育した Dahl 食塩感受性高血圧ラット(Dahl-S)と Dahl 食塩非感受性ラットを対象とし以下の検討を行った。抗酸化薬 tempol (superoxide dismutase 模倣薬)をラットの側脳室に投与した際の、血圧、心拍数、腎交感神経活動の反応を比較検討したところ、いずれも用量依存性に抑制され、その反応の程度は高食塩食負荷 Dahl-S において有意に大きかった(図 1, 2)。さらに、視床下部における酸化ストレス産生量、酸化ストレス産生酵素である NADPH oxidase の subunits (p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, gp91<sup>phox</sup>) の mRNA 発現も高食塩食 Dahl-S ラットで有意に亢進していた(文献 1)。さら

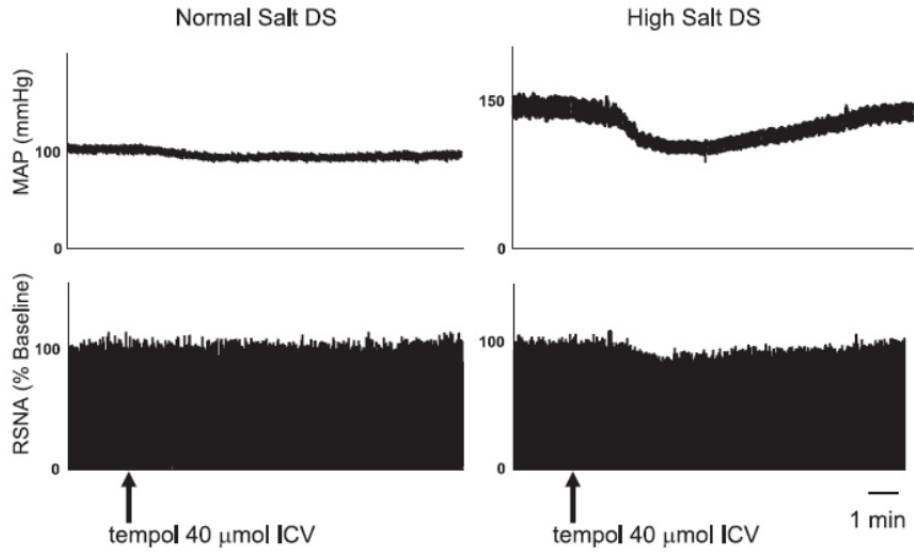


図 1. Dahl-S ラットにおける抗酸化剤 tempol 側脳室投与に対する血圧 (MAP)、腎交感神経活動 (RSNA) の反応

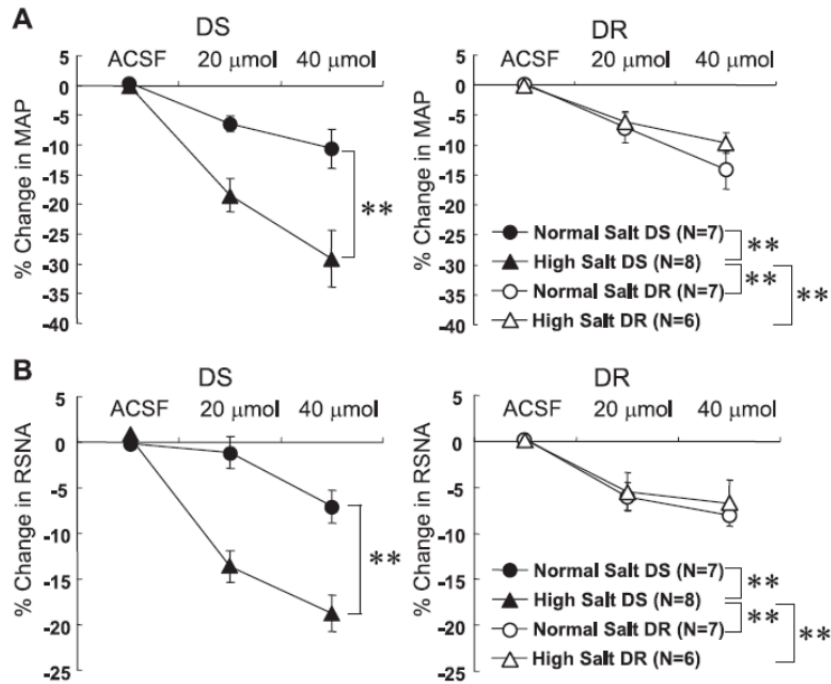


図 2. Dahl-S ラット (左: DS)、Dahl-R ラット (右: DR) における tempol 側脳室投与時の血圧 (図 A)、腎交感神経活動 (図 B) 反応の比較。\*\*:  $p < 0.01$ 。

に最近、食塩過剰状態を伴う慢性腎臓病合併高血圧においても同様の成績を得 (文献 3)、脳室内に tempol を慢性的に投与し脳内抗酸化治療を施すことにより降圧に加え尿蛋白改善効果も認められた (図 3)。すなわち、食塩感受性高血圧では高血圧のみならず腎障害 (臓器障害) においても「脳内酸化ストレス増大を介した中枢性交感神

経亢進」が重要であることを示した (文献 4)。

一方、食塩感受性ラットでは、脳内アルドステロン-ミネラルコルチコイド受容体 (MR) 系が交感神経亢進ならびに血圧上昇に関与していると言われている (文献 5)。アルドステロン合成酵素が脳内に存在しアルドステロンが合成される可能性も報告されている (文献 6, 7)。さらに、アルドス

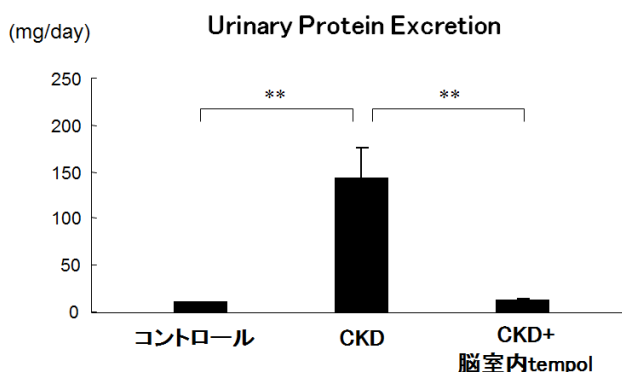


図 3. 慢性腎臓病 (CKD) ラットにおける脳室内への tempol 慢性投与の尿蛋白排泄量抑制効果。\*\*:  $p < 0.01$ 。

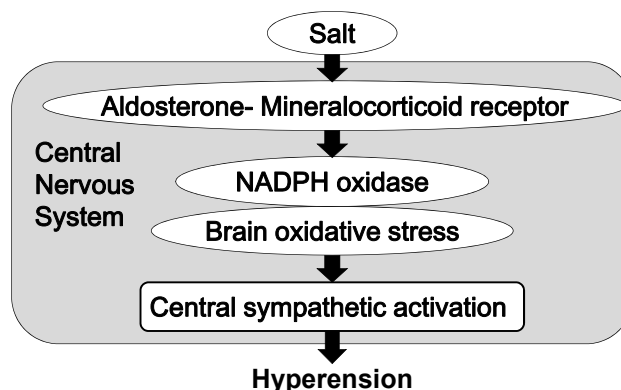


図 4. 仮説: 食塩感受性において「脳内酸化ストレスを介した中枢性交感神経活動亢進」が重要であり、その上流に脳内アルドステロン-ミネラルコルチコイド受容体が存在する。

テロンが脳内で酸化ストレス産生に寄与している可能性も報告された(文献 8, 9)。我々は以前、アルドステロン-MR系が酸化ストレス上昇を介した心・腎障害に関与していることを報告している(文献 10, 11, 12, 13)。そこで、脳内においてアルドステロン-MR系が酸化ストレスを介して交感神経活動を亢進させている可能性を考え、この仮説(図 4)を検証することを目的とした。

## 2. 研究方法

### 2.1 対象動物

食塩感受性高血圧モデルとして、Dahl-Sを用いた。5週齢から4週間8%高食塩食を負荷した。高食塩食負荷と同時に脳室内に慢性的にMR拮抗薬 eplerenone (0.075  $\mu\text{g/hr}$ )を投与した群、高食塩食負荷と同時に慢性的に人工脳脊髄液を投与した群(Vehicle群)を作成し、比較検討した。

### 2.2 視床下部におけるMR活性の検討

Quantitative real-time RT-PCR法により、MR下流因子(Sgk1, PAI-1)の視床下部におけるmRNA発現量を正常食負荷群と高食塩食負荷群とで比較検討した。

### 2.3 血圧測定

無麻酔・自由行動下で観血的に血圧測定を行った(文献 1, 2, 3)。

### 2.4 交感神経活動測定

無麻酔・自由行動下にて神経節遮断薬ヘキサメソニウムの静脈投与に対する降圧の程度を比較検討した。

### 2.5 Tempol 急性脳室内投与に対する血圧・腎交感神経活動の反応測定

ウレタン麻酔下・人工呼吸下に、動静脈、側脳室にカテーテルを導入し、背側アプローチで腎神経を剥離、電極に留置した。側脳室内に、人工脳脊髄液もしくは抗酸化剤 tempol (low dose: 20  $\mu\text{mol}$ , high dose: 40  $\mu\text{mol}$ )を急性に(10分間で)投与した際の、血圧・心拍数・腎交感神経活動(RSNA)を記録し、その変化率を算出、エプレレノン投与群と vehicle 投与群で比較検討した。

### 2.6 視床下部酸化ストレス評価

摘出した視床下部を Krebs 液の中に入れインキュベート後、ルシジェニン化学蛍光発光法による superoxide 産生量の測定を行った。NADPHを基質として添加しNADPH依存性の産生量を検討した。

### 2.7 統計

データは平均±標準誤差で表した。二群の比較に関しては unpaired t-testを用いた。Tempolの急性脳室内投与実験に関しては JMP (SAS Institute, Cary, NC) コンピュータソフトウェアを用い mixed modelにより解析した。P<0.05を統計学的有意とした。

## 3. 研究結果

### 3.1 視床下部におけるMR活性

MRの下流因子であるSgk-1、PAI-1の視床下部におけるmRNA発現量を real-time RT-PCRで検討したところ、普通食群(N=5)に比較し高食塩食群(N=5)で有意に増

大しており、高食塩負荷 Dahl-S の脳内における MR 活性亢進が示唆された(図 5)。

### 3. 2 MR blocker 脳室内投与の血圧に対する効果

上記の検討で、脳内における MR 活性亢進が確かめられたので、高食塩食負荷 Dahl-S の脳室内に慢性的に MR blocker である eplerenone を投与し、血圧に対する影響を検討した。無麻酔無拘束下の観血的血圧測定による平均血圧は、eplerenone 群(N=3)で vehicle 群に比較し有意に低下していた(図 6)。

### 3. 3 MR blocker 脳室内投与の交感神経活動に対する効果

神経節遮断薬ヘキサメソニウムの静脈投与に対する血圧低下反応は、vehicle 群(N=3)に比較し eplerenone 群(N=3)で有意に抑制されており、MR blocker 脳室内投与は交感神経抑制効果を示した(図 7)。

### 3. 4 Tempol 急性脳室内投与に対する血圧・腎交感神経活動の反応(脳内酸化ストレスの関与を検討する実験)

抗酸化薬 tempol の脳室内急性投与により、vehicle 群(N=3)では著明な血圧低下、腎交感神経活動抑制が認められるが、その反応が eplerenone 群(N=4)では有意に抑制された(図 8)。すなわち、脳内 MR が脳酸化ストレス増大を介した中枢性交感神経活動亢進に寄与している可能性が示唆された。

### 3. 5 MR blocker 脳室内投与の視床下部酸化ストレス産生量に対する効果

脳視床下部における酸化ストレス産生量は、vehicle 群(N=5)に比較し eplerenone 群(N=6)で有意に抑制された(図 9)。

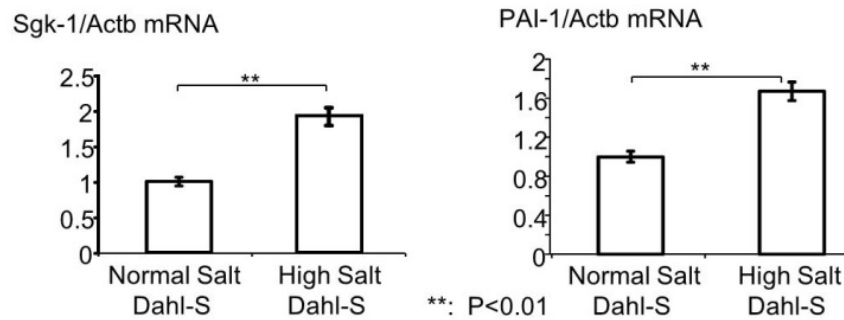


図 5. 脳視床下部におけるミネラルコルチコイド受容体(MR)活性: MR の下流因子である Sgk-1、PAI-1 の視床下部における mRNA 発現量を real-time RT-PCR で検討したところ、高食塩食群で有意に増大しており、MR 活性亢進が示唆された。

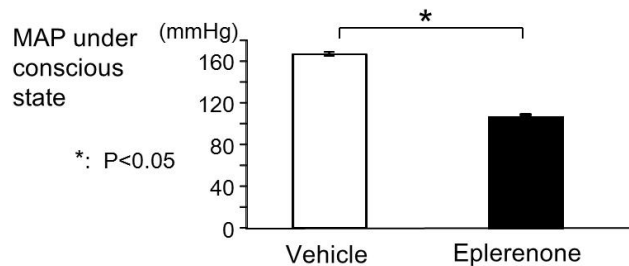


図 6. MR blocker(eplerenone)慢性脳室内投与の血圧に対する効果: 高食塩負荷 Dahl-S において、eplerenone の慢性脳室内投与は vehicle 群に比較し有意な血圧低下効果を示した。MAP(mean arterial pressure; 平均血圧)

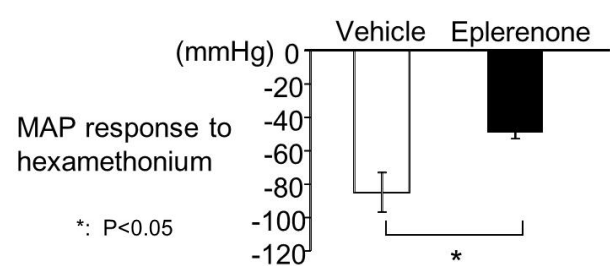


図 7. MR blocker(eplerenone)慢性脳室内投与の交感神経活動に対する効果: ヘキサメソニウム静脈投与に対する血圧低下反応は eplerenone 群で有意に抑制されていた。

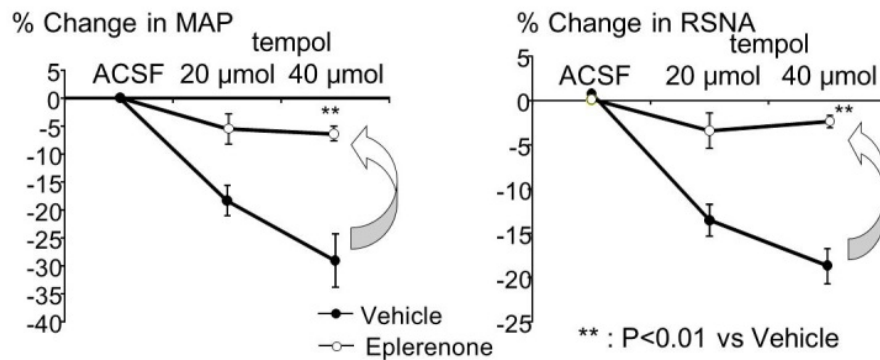


図 8. Tempol 急性脳室内投与に対する血圧・腎交感神経活動の反応: Tempol 脳室内急性投与により vehicle 群では用量依存性に血圧および腎交感神経活動の低下反応が認められるが、eplerenone 群ではその反応が有意に抑制された。ACSF(人工脳脊髄液)、RSNA(腎交感神経活動)。

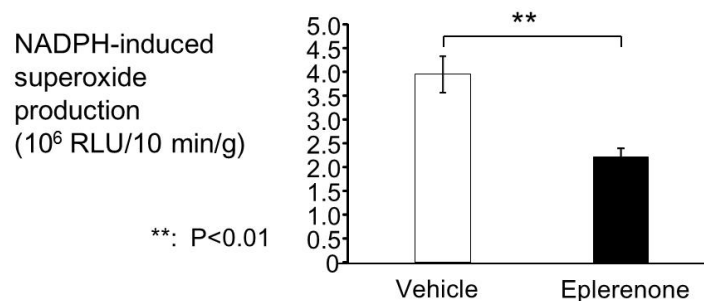


図 9. MR blocker(eplerenone)脳室内投与の視床下部酸化ストレス産生量に対する効果: ルシジェニン化学蛍光発光法による視床下部 superoxide 測定値は、vehicle 群に比較し eplerenone 群で有意に抑制されていた。

#### 4. 考察

今回の研究結果は、次の3点にまとめられる。1) Dahl-S の視床下部における MR 活性は、高食塩食負荷により有意に増大した。2) 高食塩食負荷 Dahl-S の脳室内に MR blocker である eplerenone を慢性投与することで、血圧、交感神経活動、脳内酸化ストレスの有意な抑制効果が認められた。3) Tempol の脳室内急性投与により脳内酸化ストレスを消去した際の血圧・腎交感神経活動の低下反応が、eplerenone を脳室内に慢性的に投与することで抑制された。これらの結果から、食塩感受性高血圧の病態において、脳内 MR 活性化が、脳内酸化ストレスを介した中枢性交感神経活動亢進に寄与している可能性が示唆された。脳内アルドステロン-MR 系が交感神経亢進、血圧上昇に関与している可能性を示す報告は既に存在し(文献 5, 6, 14, 15, 16)、今回の結果はこれらに合致するものである。特に、食塩感受性高血圧については、Huang らが、

Dahl-S を使い、脳室内に MR blocker の spironolactone、もしくはアルドステロン合成阻害薬の FAD286 を投与すると降圧効果が認められることを報告している(文献 5)。アルドステロンが脳内において酸化ストレス産生に関与している可能性については、正常ラットにおいて報告されているが(文献 8, 9)、食塩感受性高血圧においては明確には示されていない。今回の研究により、脳内アルドステロン-MR 系と脳内酸化ストレス、交感神経活動の関係を系統的に示すことは、食塩感受性高血圧における交感神経活動の役割について、詳細なメカニズムを解明することにつながる。

#### 5. 今後の課題

MR 活性の脳内における亢進は確かめられたが、そのリガンドについてはアルドステロンおよびコルチコステロンの両者が関与している可能性がある。海外からは、脳内に

におけるコルチコステロンではなくアルドステロンが重要だとする報告があるが(文献 5, 6)、今後も慎重に研究を進めていく必要があり、我々は現在、視床下部におけるアルドステロン、コルチコステロン濃度の測定、アルドステロン合成酵素(CYP11B2)、コルチコステロン合成酵素(CYP11B1)発現量の検討を進めているところである。

食塩感受性高血圧は、肥満に伴う高血圧と、その病態に交感神経亢進や酸化ストレス増大をはじめとして類似点が多いことが知られている(文献 17, 18, 19)。我々は、食塩感受性高血圧のみならず(文献 1)、肥満高血圧においても「脳内酸化ストレスを介した中枢性交感神経活動亢進」が重要である可能性を報告した(文献 20)。食塩感受性高血圧と関連する食塩過剰状態に伴う慢性腎臓病合併高血圧モデルにおいても同様の所見が得られた(文献 3)ことも、我々の仮説の普遍性を示唆している。すなわち、脳内 MR 亢進が肥満高血圧においても交感神経亢進に関与している可能性が考えられ、今後検討すべきである。さらに、食塩感受性/肥満高血圧は、心血管合併症を効率に生じるメタボリックシンドロームとも深く関連している。将来、中枢をターゲットとした抗酸化を介した交感神経抑制効果が、降圧のみならず臓器保護においても新しい治療戦略となりうる可能性がある。

## 文 献

1. Fujita M, *et al.* Sympathoexcitation by oxidative stress in the brain mediates arterial pressure elevation in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*, 50: 360-367, 2007.
2. Fujita M, *et al.* Sympatho-inhibitory action of endogenous adrenomedullin through inhibition of oxidative stress in the brain. *Hypertension*, 45: 1165-1172, 2005.
3. Fujita M, *et al.* Sympathoexcitation by brain oxidative stress mediates arterial pressure elevation in salt-induced chronic kidney disease. *Hypertension*, 59: 105-112, 2012.
4. Fujita M, *et al.* The role of CNS in salt-sensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2013 *in press*.
5. Huang BS, *et al.* Role of central nervous system aldosterone synthase and mineralocorticoid receptors in salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.*, 296: 994-1000, 2009.
6. Gomez-Sanchez EP, *et al.* Aldosterone synthesis in the brain contributes to Dahl salt-sensitive rat hypertension. *Exp Physiol.*, 95: 120-130, 2010.
7. Ye P, *et al.* Effects of ACTH, dexamethasone, and adrenalectomy on 11beta-hydroxylase (CYP11B1) and aldosterone synthase (CYP11B2) gene expression in the rat central nervous system. *J Endocrinol.*, 196: 305-311, 2008.
8. Zhang ZH, *et al.* Aldosterone acts centrally to increase brain renin-angiotensin system activity and oxidative stress in normal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 294: 1067-1074, 2008.
9. Huang BS, *et al.* Regulation of hypothalamic renin-angiotensin system and oxidative stress by aldosterone. *Exp Physiol.*, 96: 1028-1038, 2011.
10. Matsui H, *et al.* Salt excess causes left ventricular diastolic dysfunction in rats with metabolic disorder. *Hypertension*, 52: 287-294, 2008.
11. Kawarazaki H, *et al.* Mineralocorticoid receptor-Rac1 activation and oxidative stress play major roles in salt-induced hypertension and kidney injury in prepubertal rats. *J Hypertens.*, 30: 1977-1985, 2012.
12. Kawarazaki H, *et al.* Mineralocorticoid receptor activation: a major contributor to salt-induced renal injury and hypertension in young rats. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 300: 1402-1409, 2011.
13. Kawarazaki H, *et al.* Mineralocorticoid receptor activation contributes to salt-induced hypertension and renal injury in prepubertal Dahl salt-sensitive rats. *Nephrol Dial Transplant* 25: 2879-2889, 2010.
14. Huang BS, *et al.* Mineralocorticoid actions in the brain and hypertension. *Curr Hypertens Rep.*, 13: 214-220, 2011.
15. Ito K, *et al.* 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: 1449-1459, 2010.
16. Nakano M, *et al.* Mineralocorticoid receptors/epithelial

- Na<sup>+</sup> channels in the choroid plexus are involved in hypertensive mechanisms in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.*, 36: 277-284, 2013.
17. Rocchini AP, *et al.* The effect of weight loss on the sensitivity of blood pressure to sodium in obese adolescents. *N Engl J Med.*, 321: 580-585, 1989.
18. Chen J, *et al.* Metabolic syndrome and salt sensitivity of blood pressure in non-diabetic people in China: a dietary intervention study. *Lancet*, 373: 829-835, 2009.
19. Nagae A, *et al.* Effect of high fat loading in Dahl salt-sensitive rats. *Clin Exp Hypertens.*, 31: 451-461, 2009.
20. Nagae A, *et al.* Sympathoexcitation by oxidative stress in the brain mediates arterial pressure elevation in obesity-induced hypertension. *Circulation*, 119: 978-986, 2009.

## Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension: the Role of Brain Aldosterone and Mineralocorticoid Receptor

Megumi Fujita<sup>1</sup>, Chiaki Kawarasaki<sup>1</sup>, Kazuhiko Muraoka<sup>1</sup>, Toshiro Fujita<sup>2</sup>, Katsuyuki Ando<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Nephrology and Endocrinology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

<sup>2</sup>Division of Clinical Epigenetics, The University of Tokyo

### Summary

We have shown previously that sympathoexcitation by brain oxidative stress mediates arterial pressure elevation in salt-sensitive hypertension. We have also shown that aldosterone-mineralocorticoid receptor activation mediates oxidative stress-induced cardiac and renal dysfunction. Then, we hypothesized that brain aldosterone-mineralocorticoid receptor activation could mediate arterial pressure elevation through brain oxidative stress-induced sympathoexcitation. We used high-salt (8%)-loaded Dahl-salt-sensitive rats (Dahl-S) as the salt-sensitive hypertension model. Sgk-1 and PAI-1 mRNA expression in the isolated hypothalamus was evaluated by real-time quantitative RT-PCR. We examined effects of chronic intracerebroventricular eplerenone, mineralocorticoid receptor blocker on sympathetic nerve activity, arterial pressure, the responses of renal sympathetic nerve activity and arterial pressure to acute intracerebroventricular administration of tempol, an antioxidant, and the hypothalamic oxidative stress level. Salt loading significantly enhanced mRNA expression of Sgk-1 and PAI-1 in the hypothalamus, which suggested mineralocorticoid receptor activation. In salt-loaded Dahl-S, chronic intracerebroventricular eplerenone significantly reduced sympathetic nerve activity and arterial pressure, compared with vehicle-treated group. Reductions in renal sympathetic nerve activity and arterial pressure values elicited by acute intracerebroventricular tempol, and hypothalamic oxidative stress level were significantly suppressed in chronic intracerebroventricular eplerenone-treated group. In conclusion, brain aldosterone-mineralocorticoid receptor activation can be a possible pathogenic background of arterial pressure elevation through brain oxidative stress-induced sympathoexcitation in salt-sensitive hypertension.