

## 食塩感受性高血圧の病態解析と合併する心拡張不全に関する臨床研究

山本 英一郎<sup>1</sup>, 小川 久雄<sup>2</sup>, 光山 勝慶<sup>3</sup>, 杉山 正悟<sup>4</sup>, 山室 恵<sup>2</sup>

<sup>1</sup>熊本大学医学部附属病院循環器内科, <sup>2</sup>熊本大学大学院循環器内科学,

<sup>3</sup>熊本大学大学院生体機能薬理学, <sup>4</sup>陣内病院循環器科

**概要 背景・目的:** 食塩感受性高血圧病態や、その合併症であり本邦でも昨今の社会問題である慢性腎臓病 (CKD) や心拡張不全の発症機序を解明することは極めて重要である。我々は以前、食塩感受性高血圧のモデルで心拡張不全を発症するダールラット (DS ラット) における血管内皮機能障害に、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) アンカップリング現象が深く関与することを明らかにした。そこで本研究では、DS ラットなどのモデル動物を用いて、食塩感受性高血圧に合併しやすいとされる CKD や non-dipper 型高血圧を中心に検討する基礎研究と、ヒト心拡張不全患者への eNOS アンカップリングによる血管内皮機能障害の関与や、血中 Na 濃度の予後との関連を検討する臨床研究を行う。

**方法:** (研究1) 食塩過剰負荷 DS ラットに eNOS アンカップリング改善薬として BH4 製剤 (塩酸サプロプロテリン) を投薬し、その効果を腎臓を中心に非投薬群と比較検討した。(研究2) eNOS 遺伝子欠損マウスの高血圧パターンを検討するとともに組織を病理学的に検討した。(研究3) ヒト心拡張不全患者における末梢血管内皮機能を新しい非侵襲的血管内皮機能測定装置: Endo-PAT2000 を用いて測定、eNOS アンカップリングは血中 BH4 濃度を測定しマーカーとした。さらに血中 Na 濃度と心拡張不全患者の予後の相関を検討した。

**結果:** (研究1) DS ラット腎組織では BH4 低下による eNOS アンカップリングが惹起されていることが生化学的に示された (腎 eNOS の dimer 形成阻害、血中・腎組織中・尿中の BH4/BH2 比低下)。さらに、BH4 製剤の投与により DS ラットの CKD は有意に抑制され、食塩感受性高血圧に合併する CKD への eNOS アンカップリングの深い関与が示唆された。(研究2) eNOS 欠損マウスは non-dipper 型の高血圧を呈し、臓器における酸化ストレスの増加とともに、病理学的に腎糸球体の硬化や炎症細胞浸潤を主体とした CKD や、心臓の線維化や炎症細胞浸潤をきたすことを明らかになった。(研究3) 心拡張不全患者では Endo-PAT2000 による末梢血管内皮機能 (RHI 値) が有意に低下しており、RHI 値の低下はその後の心血管イベント発症に有意に相関していた。さらに、心拡張不全患者では、eNOS アンカップリングの指標とされる血中 BH4/BH2 比が有意に低下していた。また、血中 Na 濃度低下も心拡張不全患者の独立した予後予測マーカーとなることがわかった。

**結論:** 食塩感受性高血圧による CKD ならびに non-dipper 型高血圧には、eNOS アンカップリング現象をはじめとした eNOS の機能不全が関与する可能性が示唆される。さらにヒト患者においても、これらに合併する心拡張不全患者への eNOS アンカップリングによる血管内皮機能障害の深い関与が示唆された。

### 1. 研究目的

食塩感受性高血圧が脳卒中や心血管病などの合併症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、食塩感受性の強い日本人にとって、食塩感受性高血圧の病態や、その合併症であり本邦でも昨今の社会問題

である慢性腎臓病 (CKD) や心拡張不全の発症機序を解明することは極めて重要な課題である。

我々は以前より、食塩感受性高血圧のモデル動物であるダール食塩感受性ラット (DS ラット) での血管内皮機能障害や、続発する CKD や心拡張不全のメカニズムを基礎

的に検討してきた。

結果、DS ラットの血管内皮機能障害に、血管内皮型一酸化窒素(NO)合成酵素(eNOS)の補酵素BH4の低下によるeNOS二量体形成不全、いわゆる“eNOS アンカップリング現象”が深く関与しており、eNOS アンカップリングによる酸化ストレス増加を抑制すると、DS ラットのCKDのみならず心拡張不全も改善することが明らかにした。これらの我々の基礎的検討は、食塩感受性高血圧病態やその合併症にeNOS アンカップリングをはじめとしたeNOSの機能不全が関与すること、食塩感受性高血圧が非感受性高血圧にくらべてCKDや心拡張不全を惹起しやすい可能性を示唆している。

さらに、様々な大規模臨床試験や疫学研究により、食塩感受性高血圧患者がnon-dipper型高血圧を呈しやすく、CKDや心不全の合併率が有意に高いことも明らかにされている。しかし、依然として食塩感受性高血圧の分子メカニズム、あるいは実際の臨床病態における役割に関しては明らかとなっていない部分が多いため、本研究では、DS ラットやeNOS 遺伝子欠損マウスを用いて食塩感受性高血圧の病態を検討する基礎研究と、臨床へのトランスレーショナル・リサーチとして高血圧による血管内皮機能障害の関連を実際のヒト心不全患者にて検討するとともに、心拡張不全に関連する因子としての血中Na濃度のインパクトに関する臨床研究をおこない、食塩感受性高血圧や合併する心血管病に対する新たな治療戦略の確立への寄与を目的とする(図1)。

## 2. 研究方法

### 2.1 DS ラットによる慢性腎臓病および食塩感受性高血圧におけるeNOS機能不全の関与に関する検討

昨今、CKDは心血管病の独立した危険因子として注目されているが、CKDでは糸球体濾過量(GFR)の低下から食塩感受性が亢進することが知られる。DS ラットでも食塩負荷早期よりCKDを発症し食塩感受性がさらに増悪することから、食塩感受性亢進へのCKDの強い関与が示唆される。しかし、糖尿病性腎症に対する関与の基礎的検討はあるが<sup>1)</sup>、食塩感受性高血圧におけるCKDへのeNOSアンカップリング関与を検討した報告は全くなく、本研究で我々は、eNOSアンカップリングによるCKD発症の分子メカニズム、さらにこれらによる食塩感受性増悪への関与

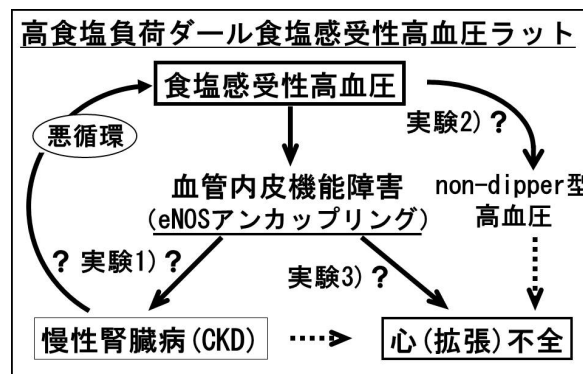


図1. 応募者が基礎研究で明らかにした研究成果(実線矢印)と今回の研究課題(?で示す)

機序の詳細を明らかにしたいと考えている。

具体的には、DS ラットにeNOS アンカップリング改善薬としてBH4製剤(塩酸sapropterin)を投薬し、その効果を検討する。さらに、DS ラットの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ビオプ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とともに、腎組織切片を免疫化学染色で病理学的に評価し、その分子メカニズムとともに明らかにする。

### 2.2 eNOS 遺伝子欠損マウスによるNOのnon-dipper型高血圧への関与に関する検討

前述のように、食塩感受性高血圧はCKDを合併し、non-dipper型高血圧(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)を呈しやすいことが明らかにされている。さらに、non-dipper型高血圧は高血圧の中でも独立して、心血管事故の発症が有意に高いことから、その発症機序の解明は非常に重要である。

我々は以前、eNOS 遺伝子(KO)欠損マウスが高血圧を呈し、腎糸球体の硬化や炎症細胞浸潤を主体としたCKDをきたすことを報告しており、さらにNO阻害薬が血圧日内変化を障害する報告もあり<sup>2)</sup>、NOの調節障害・機能不全がnon-dipper型高血圧(血圧日内リズムの障害)に強く関与することが示唆される。

そこで我々は本研究で、eNOSの活性化と血圧日内リズムの関係を、様々な生理機能の日内変動を制御する時計遺伝子とよばれる一連の分子に着目し検討する。これらにより、食塩感受性高血圧での血圧日内変動の障害である

non-dipper 型高血圧における eNOS 活性の重要性を明らかにする。

### 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社会問題となっている。現在では、拡張不全は収縮不全と異なる病態とされているが<sup>3)</sup>、その発症機序や治療法は不明である。

さらに、食塩感受性高血圧に心不全発症が多いことや、心不全患者の血管内皮機能が低下していることは既知であるが、詳細に関しては明確でない点が多い。前述のように、DS ラットは高食塩負荷早期に血管内皮機能障害をきたし CKD 発症を経て、やがて心拡張不全をきたすことから、食塩感受性高血圧による血管内皮機能障害が心拡張不全を特異的に惹起する可能性が示唆される。

我々は本研究で、心拡張不全患者における血管内皮機能を新しい測定装置を用いて客観的・非侵襲的に測定し、実際の臨床病態における食塩感受性高血圧と血管内皮機能の相関を心拡張不全患者において検討する。

具体的には、対象患者の血管内皮機能検査を生理的血管内皮機能測定装置: Endo-PAT2000 (Itamar Medical, Casarea, Israel)を用いて客観的・定量的に測定し、予後との相関を明らかにする。RH-PAT は適正な治療がなされて心不全が落ち着いたのち、空腹時早朝の朝の内服薬を服用する前に行う。フォローアップは、退院後毎月外来でフォローし、エンドポイント発症まで前向きに追跡した。エ

ンドポイントは、心血管死、心筋梗塞、不安定狭心症、脳卒中、心不全増悪による入院、冠血行再建術施行と定義している。

さらに、血中塩分濃度の指標として Na 濃度が心拡張不全において、どのような意義をもつのか、臨床上興味深いこれらの疑問点を明らかにし、急務とされる心拡張不全の新たな治療戦略の確立に寄与したいと考えている。

### 3. 研究結果

#### 3.1 DS ラットによる慢性腎臓病および食塩感受性高血圧における eNOS 機能不全の関与に関する検討

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段階から eNOS アンカッピング改善薬として BH4 製剤(塩酸 sapropterin)を投薬し、その効果を検討した。

我々の予備検討では、**図 2**のように腎臓組織ホモジネートにおいて低温 SDS-PAGE 法で eNOS 形成をみると、有意に DS ラット腎において eNOS の二量体形成が抑制されていた。さらに、血中 BH4 濃度のみならず腎臓組織ホモジネート・尿中 BH4 濃度も、いずれも有意に BH4/BH2 比が低下しており、つまり DS ラットにおいては腎臓組織そのもので eNOS アンカッピングが惹起されていることが示唆さ

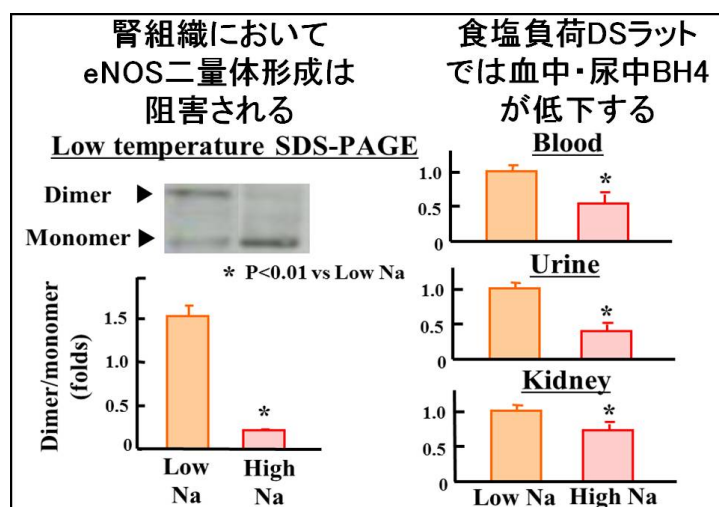


図 2. DS ラット腎臓での eNOS アンカッピング

れた。

さらに投薬実験の結果、同程度の降圧効果ながら、hydralazineにくらべて、塩酸sapropterin投与群では、アルブミン尿の低減のみならず、病理学的にも腎糸球体硬化の改善、糸球体への炎症細胞(マクロファージ)の浸潤の抑制、さらには、腎臓における酸化ストレス(ROS: Reactive Oxygen Species)産生をsuperoxide特異的プローブであるジハイドロエチジウム(DHE)染色で定量したところ、hydralazineでは抑制できなかったものの、BH4投与は有意に腎内のROS産生を抑制することがわかった。

### 3.2 eNOS 遺伝子欠損マウスによる NO の non-dipper 型高血圧への関与に関する検討

前述のように、食塩感受性高血圧はCKDを合併し、non-dipper型高血圧を呈しやすいことが明らかにされている。

Non-dipper型高血圧は高血圧の中でも独立して心血管事故の発症が有意に高いことから、その発症機序の解明は非常に重要である。

我々は以前、eNOS遺伝子(KO)欠損マウスが高血圧を呈し、腎糸球体の硬化や炎症細胞浸潤を主体としたCKDをきたすことを報告しているが、今回の検討により、eNOS KOマウスの高血圧のcircadianリズムがnon-dipper型であることを明らかにしている。

また以前、NO阻害薬を投薬したマウスの血圧日内変化が障害される報告もあり<sup>2)</sup>、あわせてNOの調節障害・機能不全がnon-dipper型高血圧(血圧日内リズムの障害)に強く関与することが示唆される。

我々は今後も本研究で、eNOSの活性化と血圧日内リズムの関係を、様々な生理機能の日内変動を制御する時計遺伝子とよばれる一連の分子に着目し検討していく。具体的には、WTマウスとeNOS KOマウスそれぞれに高食塩負荷をおこない、その血圧変動をテレメトリー自動血圧計にて正確に測定するとともに、諸臓器におけるeNOS活性の日内変動の有無を比較検討する。これにより、食塩感受性高血圧での血圧日内変動の障害であるnon-dipper型高血圧における末梢臓器でのeNOS活性の重要性を明らかにできる。

さらに、上記検討で野生型マウスにおけるeNOS活性化の日内変動が明らかになれば、eNOSが活性化される時相にあわせて、eNOS KOマウスにNOドナーを投与し、

血圧の日内変化障害(non-dipper型高血圧)が改善するか検討する。

また、上記マウスの組織サンプルを生化学的に解析し、そのメカニズムを特に時計遺伝子関連分子を中心に解析する。いわゆる“時計遺伝子関連分子”は、BMAL1とCLOCKと呼ばれる転写因子がPERやCRYといった時計遺伝子の発現を正に調整し、これにより生成される蛋白がBMAL1とCLOCK転写活性を負に制御するというコアロープを形成しているが、これらの食塩感受性高血圧に伴う血圧日内変動障害における病態生理学的役割は全く不明なことから、上記時計遺伝子関連分子の転写活性、蛋白発現レベルを生化学的手法にて測定・定量する。

これにより、前述のコアロープのうちeNOSがどのような機序で時計遺伝子の調整を介して血圧の日内変動の制御をしているのか明らかにできる。

### 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

心エコーにて診断した心拡張不全の定義に合致した患者において(図3)、血管内皮機能検査を生理的血管内皮機能測定装置:Endo-PAT2000を用いて測定した。まず、合計321名の心拡張不全患者と173名の非心不全の対象患者の疾患背景を比較検討した。結果、心拡張不全患者では有意にbody mass index(BMI)と心拍数が高いことがわかった。また、心拡張不全患者では有意にeGFRが低く腎機能が低下しており、血中のBNP値と高感度CRP値が高いことがわかった。また、拡張能の指標であるE/e'値が高く、左房径が大きく、左室(LV)mass index(LVMI)が有意に高値であることが示された。

さらに、Endo-PAT2000にて測定したRHI値は、心拡張不全患者において対象患者よりも有意に低く(心拡張不全患者;0.53±0.20 vs. 対象患者;0.64±0.20; p<0.001)、心拡張不全患者では有意に末梢血管の内皮機能障害が惹起されていることが示唆された(図4)。多変量解析では、BMI(オッズ比1.08, 95% CI 1.02-1.15; P=0.01)、eGFR(オッズ比0.98, 95% CI 0.97-0.99; P=0.002)、心拍数(オッズ比1.01, 95% CI 1.00-1.03; P=0.04)とRHI(オッズ比0.77, 95% CI 0.70-0.85; P<0.001)が、対象患者にくらべ心拡張不全の存在に独立し関連していた。また、BMI、eGFR、とHTとDMの比率で補正を加えたのちも、RHIは有意に心拡張不全の存在に関連していた。

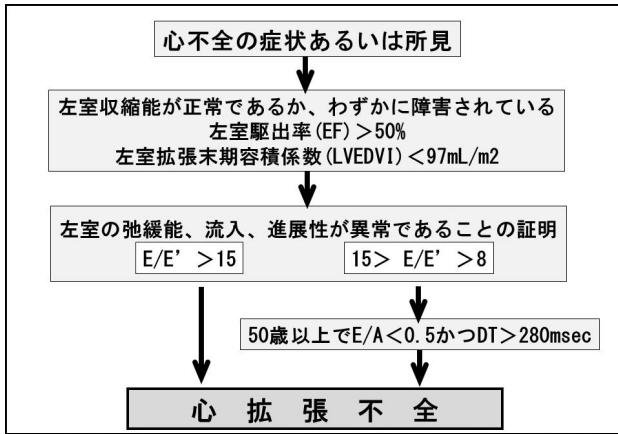


図 3. 心エコーによる心拡張不全の診断

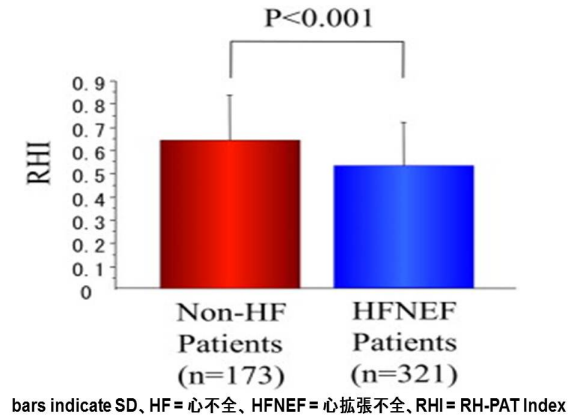


図 4. 非心不全患者と心拡張不全患者の RHI 値の比較

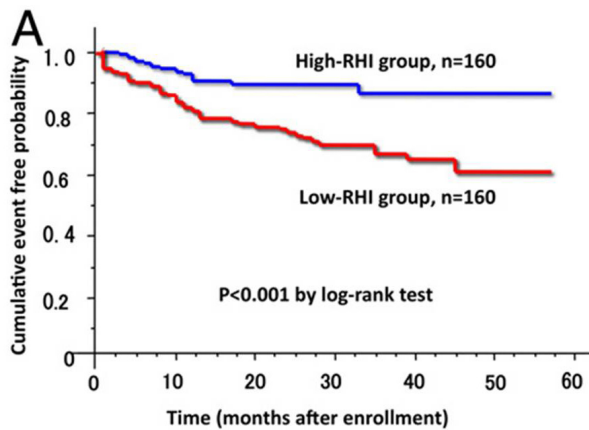


図 5(A). Kaplan-Meier 曲線 (High RHI vs. Low-RHI)

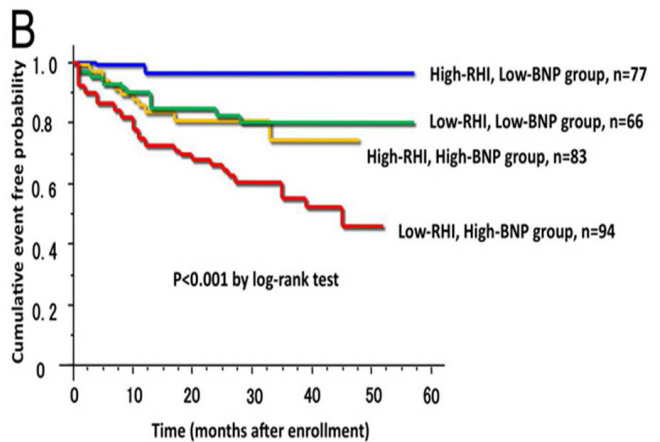


図 5(B). Kaplan-Meier 曲線 (High or Low-RHI + High or Low BNP)

また、RHI 値が低値の群 (median 以下、カットオフ値: 0.49) は RHI 高値群に比べて有意に心血管イベントが多いことがわかった ( $n=45$  vs.  $n=14$ ,  $P<0.001$ )。Kaplan-Meier 解析でも、図 5(A) のように RHI 低値群は RHI 高値群に比べて有意に心血管イベント発症率が高いことが示された (log-rank test:  $P=0.001$ )。

また、図 5(B) のように RHI と BNP 値のコンビネーションで 4 つのサブグループに分けると、有意に心血管イベントが異なることが分かった (log-rank test:  $P<0.001$ )。BNP が低値、高値両群いずれにおいても、RHI 低値群は高値群よりも有意に心血管イベントの発症が多かった (log-rank test:  $P=0.01$ ,  $P=0.02$ )。

さらに、前述の診断基準をみたした心拡張不全患者 19 名を対象に、心不全の安定した早朝内服前に採血を行い、HPLC 法を用いて血中の BH4 値と、その酸化物である

BH2 値を測定した。

結果、年齢と性別をマッチさせた対照群と比較しても、BH4 値は心不全群で有意に低下しており (対象 vs. 心拡張不全患者;  $15.6 \pm 3.0$  vs.  $5.5 \pm 0.9$ ,  $P=0.05$ )、酸化物 BH2 は逆に有意に上昇していた (対象 vs. 心拡張不全患者;  $48.1 \pm 3.3$  vs.  $61.1 \pm 4.1$ ,  $P=0.03$ ) (図 6(A))。このため eNOS アンカップリングの指標となる BH4 の相対的低下を示す BH4/BH2 比の低下は図 6(B) のように有意であった (対象 vs. 心拡張不全患者;  $0.93 \pm 0.09$  vs.  $0.49 \pm 0.04$ ,  $P=0.001$ )。研究 1 に示したように、心拡張不全患者の末梢血管内皮機能障害が高度に低下していることとあわせると、われわれの DS ラットを用いた基礎研究の結果と同様に、心拡張不全患者の血管内皮機能障害に eNOS アンカップリングが深く関与している可能性が示唆された。

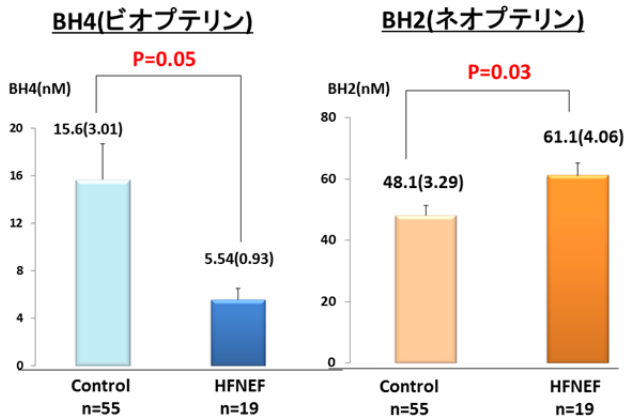


図 6(A). 血中 BH4 & BH2

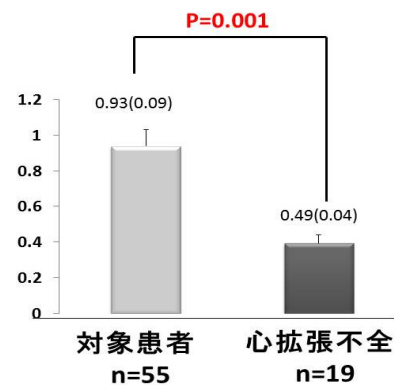


図 6(B). BH4/BH2 ratio

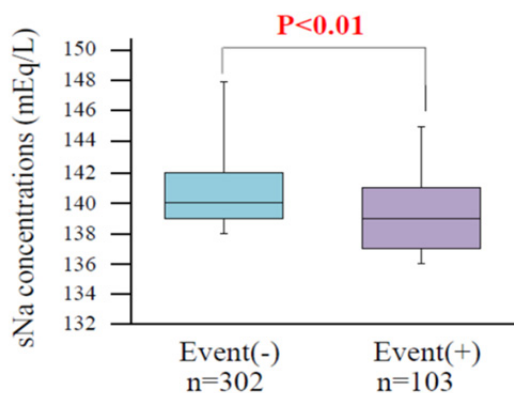


図 7(A). イベントの有無による血清 Na 値

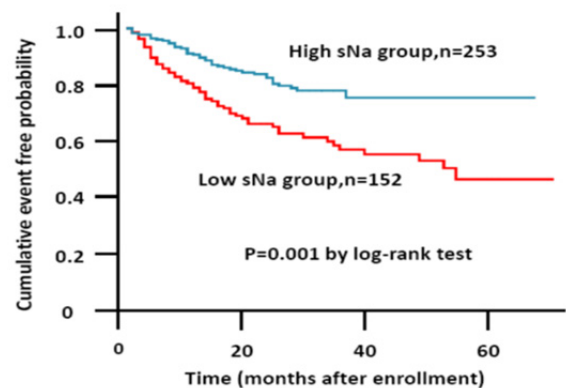


図 7(B). Kaplan-Meier 解析

さらに、血中塩分濃度の指標として血清 Na 濃度が心拡張不全において、どのような意義をもつのか、やはり心拡張不全患者を対象に退院前の血清 Na 値と予後（その後の心血管イベント発症）との相関を検討した。

結果、その後心血管イベントを発症した群においては有意に血清 Na 濃度が低いことが明らかになり ( $P < 0.01$ )、退院前の血清 Na 値は心拡張不全患者において独立した予後予測マーカーになることが明らかになった (図 7(A))。

さらに血清 Na 値 (sNa) を 140 mEq/L を基準に、高値群 (sNa  $\geq$  140 mEq/L) と低値群 (sNa < 140 mEq/L) に分類すると、Kaplan-Meier 解析でも、右図のように血清 Na 濃度低値群 (sNa < 140 mEq/L) は高値群に比べて有意に心血管イベント発症率が高かった (log-rank test:  $P = 0.001$ ) (図 7(B))。

#### 4. 考察ならびに今後の課題

今回の臨床的検討で、まず心拡張不全患者では末梢

の血管内皮機能が障害されており、さらに同患者での予後にも有意に相関することが明らかになり、RHI にて評価した末梢血管内皮機能障害と BNP および E/e' が心拡張不全患者における心血管イベント発症の独立した予測因子であった。

心不全における血管内皮機能障害の関与は、これまで主に心収縮不全心不全で明らかにされてきたが、最近、とくに食塩感受性高血圧に合併しやすいとされる心拡張不全患者では運動時の血管拡張反応が低下しており、これがストレス負荷時の心拍出予備能や、心血管予備能を低下させていることが報告された。しかし、今まで末梢血管内皮機能と心拡張不全患者の予後との相関を検討した報告は皆無のため、本研究で我々はまずこれらの相関を検討した。結果、前述のように RHI 値 (末梢血管内皮機能) のみならず BNP および E/e' が心血管イベント発症の独立した予測因子であり、これらを加えたモデルは、心拡張不全患者のリスク再層別化を改善させ有用であることが示さ



れた。

心拡張不全の正確なメカニズムは依然明らかになっていないため、心拡張不全患者への効果的な治療法が確立されていない現状がある。心拡張不全はしばしば急性増悪し再入院を余儀なくされるため、良好な予後を与えるためにハイリスクの患者を層別化することや、至適な薬物治療を明らかにすることが重要である。本研究における心拡張不全患者での RHI 測定による診断能は、末梢血管内皮機能障害が心拡張不全の病態を促進し、増悪因子になっていることもうかがわせる。

このため心拡張不全において血管内皮機能障害をターゲットとした治療戦略が新たな治療法の確立に寄与できる可能性を考え、次に心拡張不全において血管内皮機能障害の発症機序の検討を臨床研究と基礎研究にて行っている。

つまり、臨床病態においても eNOS アンカップリングによる血管内皮機能障害が病態に関与しているのか検討するため、「eNOS アンカップリング」の原因であるビオプテリン代謝異常のマーカーとして血中 BH4/BH2 濃度を HPLC 法を用いて測定している。以前の報告では、血中 BH4/BH2 濃度と、血管内皮機能を反映する反応性充血時の FMD の低下が有意に相関するという報告があるが<sup>4)</sup>、より簡便かつ客観的に血管内皮機能を非侵襲的に測定できる Endo-PAT2000 を用いた検討はこれまで皆無であった。

本研究では、心拡張不全患者において予想通り、血中における BH4 の低下と、その酸化物である BH2 の増加がみられ、「eNOS アンカップリング」の指標たる BH4/BH2 比が有意に低下していることが明らかになった。この結果は、我々が以前行った心拡張不全モデルである DS ラットによる検討の結果と合致するもので、心拡張不全において血管内皮機能障害の発症機序に eNOS アンカップリングが深く関与する可能性を強く示唆するものである。

実際、これまでの報告では、喫煙患者や糖尿病患者の血管内皮機能を BH4 製剤の単回静脈内注射が改善させたとの報告がある。しかし、慢性的な同薬剤の投与が何らかの病態に効いたとの報告は全くなく、我々の DS ラットによる今回の基礎研究(研究 1)の結果が示唆するように、BH4 製剤である塩酸サブプロテリンの投薬が血管内皮機能障害のみならず慢性腎臓病(CKD)をも改善させること

が明らかになったため、eNOS アンカップリングに対する介入が食塩感受性高血圧における CKD 抑制のみならず、non-dipper 型高血圧を表現型とする異常 circadian リズムの改善や、ひいてはこれらその相関や関連は明らかになっているが治療法が全く確立されていない心拡張不全という病態への新たな治療法の確立に寄与でき、現在小児の先天性代謝疾患である高フェニルアラニン血症にのみ疾患適応となっている塩酸サブプロテリン製剤が eNOS アンカップリングが関与する循環器疾患にも適応が拡大することが期待できるかもしれない。

心血管疾患における酸化ストレス(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、新たな ROS 産生源たる eNOS アンカップリング関連酵素に介入もしくは補充をおこなうことで、より効果的・実地的な心拡張不全治療のみならず、その上流にある食塩感受性高血圧や糖尿病、生活習慣病など早期より eNOS アンカップリングが病態に関与するとされる疾患の改善なども期待できる可能性がある。

## 謝 辞

本研究遂行におきまして、研究費の助成を頂きましたノルト・サイエンス研究財団に心より感謝いたします。

## 文 献

- 1) Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, *et al.*, NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 288(6): F1144-52.
- 2) Kunieda T, Minamino T, Miura K, *et al.*, Reduced nitric oxide causes age-associated impairment of circadian rhythmicity. *Circ Res.* 2008; 102(5): 607-14.
- 3) Kass DA. Ventricular arterial stiffening: integrating the pathophysiology. *Hypertension.* 2005; 46(1): 185-93.
- 4) Takeda M, Yamashita T, Shinohara M, *et al.*, Plasma tetrahydrobiopterin/dihydrobiopterin ratio: a possible marker of endothelial dysfunction. *Circ J.* 2009; 73(5): 955-62.

## The Mechanism of Salt-Sensitive Hypertension and Its' Induced Cardiac Diastolic Dysfunction

Eiichiro Yamamoto

Department of Cardiovascular Medicine, Kumamoto University Hospital, Kumamoto, Japan

### Summary

**Objectives:** High salt-sensitivity 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 uncoupled of endothelial nitric oxide synthesis (eNOS) is involved in salt-sensitive hypertension and salt-induced cardiovascular injury (chronic kidney disease: CKD and cardiac diastolic heart failure: DHF).

**Methods:** (Experiment I) High-salt (HS) diet DS rats were orally given sapropterin (BH4) or hydralazine and were examined focusing on CKD. (Experiment II) Wild type (WT) and eNOS<sup>-/-</sup> mice were compared on blood pressure rhythm and cardio-renal injuries. (Experiment III) We evaluated cardiac function by echocardiography, noninvasively assesses peripheral endothelial function as the reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry index (RHI), and followed cardiovascular events. Moreover, we examined blood BH4/BH2 ratio, as the marker of eNOS uncoupling, in DHF patients.

**Results:** (Experiment I) DS rats exhibited severe albuminuria and renal eNOS uncoupling, assessed by eNOS dimer disruption and decrease of BH4/BH2 in renal tissue. BH4 significantly ameliorated albuminuria and prevented the development of renal remodeling (glomerular sclerosis and macrophage infiltration) in DS rats. This beneficial effect was associated with the attenuation of reactive oxygen species (ROS) by restoring eNOS uncoupling.

(Experiment II) Blood pressure of eNOS<sup>-/-</sup> mice was significantly higher than that of WT, and eNOS<sup>-/-</sup> mice exhibited a nondipper-type hypertension. Moreover, eNOS<sup>-/-</sup> mice had the prominent glomerulosclerosis, the increased glomerular macrophage infiltration, and higher superoxide levels in glomerular tissues compared with WT.

(Experiment III) RHI in DHF patients were significantly lower than that in control patients, being accompanied by the significant decrease of blood BH4/BH2 ratio in DHF patients. Kaplan-Meier analysis demonstrated a significantly higher probability of cardiovascular events in the low RHI than in the high RHI. Multivariate Cox hazard analysis identified RHI and BNP as independent predictors of cardiovascular events.

**Conclusions:** These studied suggested that high salt sensitivity-induced CKD and nondipper-type hypertension are closely associated with eNOS dysfunction, so called "eNOS uncoupling". Furthermore, eNOS uncoupling-induced endothelial dysfunction independently correlated with future cardiovascular events, adding incremental clinical significance for risk stratification in patients with DHF.