

## 食塩感受性高血圧における脳卒中発症に対する腎除神経療法の効果 —食塩感受性高血圧での腎除神経術による脳卒中予防効果—

長谷川 雄, 中川 隆志, 光山 勝慶

熊本大学大学院生命科学研究部生体機能薬理学分野

**概要 研究目的** 本態性高血圧には中枢性交感神経活動が関与していると言われており、塩分過剰摂取によりその活動はさらに亢進する。近年腎神経焼灼術の降圧作用が報告されているが、脳卒中発症予防にも効果があるかについては不明である。今回我々は高塩分食を負荷した高血圧ラットを用い、腎除神経療法による脳卒中予防効果とその機序について検討した。

**研究方法** 9週齢の脳卒中易発症高血圧自然発症(spontaneously hypertensive stroke-prone:SHRSP)ラットを、通常塩分食群(0.3% Na)、高塩分食(8% Na) + 偽手術群、高塩分食 + 腎除神経術群、高塩分食 + ヒドララジン投与群(5mg/kg/day)に分け、腎除神経術または偽手術翌日より塩分を負荷し、血圧を計測しつつ脳卒中発症の有無を42日間観察した。次に塩分負荷21日後に脳血流計測後脳を摘出、イムノグロブリンG染色、ジハイドロエチジウム染色を行い、occludin、p67<sup>phox</sup>、Rac1の発現をWestern blot法にて計測した。また血漿レニン活性や腎臓ノルエピネフリン量も測定した。

**研究結果** 高塩分食負荷14日後の血圧は偽手術群と比し腎除神経術群にて有意な降圧作用を認めた。偽手術群においてほぼ全てのラットに脳卒中が出現し生存率は20%だった。腎除神経術群では約40%のラットで脳卒中は発症せず生存率は約60%と有意に改善を認めた。通常塩分食群では脳卒中は発症しなかった。

偽手術群にて脳血流は低下、イムノグロブリンGの血管外漏出は著明に増加しoccludinの発現も低下したが、これらは腎除神経術にて有意に改善されていた。p67<sup>phox</sup>とRac1の発現量は偽手術群で増加し、大脳皮質や視床下部室傍核でのジハイドロエチジウムの染色性も増加していたが、これらは腎除神経術にて有意に減少した。腎除神経術と同程度の降圧作用を認めたヒドララジン投与群では、腎除神経術でみられた保護効果は無かった。血漿レニン活性は他群と比べ腎除神経術にて有意に低下した。

なお、腎臓ノルアドレナリン量は腎除神経術にて10%程度に抑制されていた。

**結論** 高塩分食を負荷したSHRSPラットにおいて腎除神経術は降圧効果を超えた脳卒中予防効果があり、それは脳血管の安定化、中枢性交感神経活動に重要な視床下部室傍核や大脳皮質での酸化ストレス軽減、レニンアンギオテンシン系の抑制と関連していることが示唆された。

### 1. 研究目的

脳卒中は臨床の場において発症後様々な治療が施行されているが、その予後改善には限界があり予防の観点からのアプローチが重要となる。脳卒中の危険因子の一つである本態性高血圧の機序には、中枢性交感神経系からの刺激による末梢交感神経活動の亢進が関与していると考えられている(文献1)。また交感神経の過活動は、

血圧上昇以外にも心肥大や動脈硬化など直接的な心血管障害を引き起こす(文献2)。特に食塩感受性が高い高血圧患者では、塩分摂取自体が交感神経の活動をさらに亢進すると思われる(文献3)。従って塩分過剰摂取により相加される中枢性交感神経活動の亢進と脳卒中は密接な関連性があると考えられる。

近年治療抵抗性高血圧患者に対し、血管内カテーテ

ルによる腎神経焼灼術が血圧を有意に低下させることが報告された(文献 4, 5, 6)。この治療は腎神経(求心性腎神経と遠心性腎交感神経)焼灼によりその活動が抑制されると中枢の交感神経活動が制御され、その結果全身性交感神経活動も抑制されることで降圧効果が得られると考えられており(文献 7)、現在治療抵抗性高血圧患者の降圧療法として臨床試験が進行中である。但し一般的に食塩感受性である治療抵抗性高血圧患者において、腎神経活動抑制が上述の降圧効果だけではなく脳卒中発症予防にも効果があるかについては不明である。

以上より我々は、食塩感受性治療抵抗性高血圧患者において腎除神経療法が脳卒中の発症を予防できる、という仮説を証明するため以下の基礎研究を行った。

## 2. 研究方法

### 2.1 実験動物

9 週齢の脳卒中易発症高血圧自然発症(spontaneously hypertensive stroke-prone: SHRSP)ラットを、通常塩分食群(0.3%Na; n=13)、高塩分食(8%Na) + 偽手術群(n=23)、高塩分食 + 腎除神経術群(n=18)、高塩分食 + ヒドララジン投与群(5 mg/kg/day; n=18)に分け以下の実験を行った。なおヒドララジンは飲水投与とした。

### 2.2 腎除神経術

2%のインフルラン麻酔下に腹臥位にて体位を確保後、皮膚を正中切開し脊柱起立筋の筋膜にも切開を加え後腹膜に侵入し愛護的に周囲を剥離することで腎動脈を確保した。動脈周囲の求心性腎神経・遠心性腎交感神経を焼灼すべく 10%フェノールを動脈周囲に塗布した。同時に可視可能な神経は鋭的に切離した。十分に生理食塩水で洗浄後皮膚を縫合し手術を終了した。偽手術群は腎神経に牽引等の影響を及ぼさないために、皮膚切開と縫合のみで手術を終了した。

### 2.3 予後評価

腎除神経術または偽手術を行った翌日より、通常塩分食(n=5)、高塩分食(偽手術群: n=19, 腎除神経術群: n=13, ヒドララジン群: n=13)を各々の群に負荷した。毎日の神経所見(後肢麻痺, 運動量の低下, 死亡など)を判定し、これらの症状が確認できた場合脳卒中陽性と判断した。この経過を 42 日間にわたって観察した。また手術前、塩分負荷 7 日後、14 日後の血圧を tail cuff 法を用いて無麻

酔下に測定した。

## 2.4 脳卒中予防効果の検討

上記予後評価と同じプロトコルにて、塩分負荷 21 日後に Laser speckle flow imager を用いて脳血流を測定後、深麻酔下に経心的に静脈血を採取、リン酸緩衝生理食塩水にて灌流し脳を摘出した(n=8)。視床下部室傍核を含む Bregma より尾側約 2 mm の部位を中心に凍結切片を作製し、組織学的にイムノグロブリン G(IgG)染色とジハイドロエチジウム染色を行った。また Bregma より吻側の脳(主に大脳皮質)を用い occludin、p67<sup>phox</sup>、Rac1 の発現を Western blot 法にて計測した。さらに血漿レニン活性を IA2 抗体法、腎臓ノルエピネフリン量を ELISA 法にて検討した。

## 2.5 統計学的手法

データは平均±標準誤差または中央値と四分位範囲で表し、 $p < 0.05$  で統計学的有意とした。解析には GraphPad Prism 5 または Statcel 3 を用いた。

## 3. 研究結果

### 3.1 予後評価

#### 3.1.1 脳卒中の発症率と生存率

腎除神経術による周術期死亡はなかった。高塩分食負荷後 10 日目頃から、偽手術群、ヒドララジン群において脳卒中発症とともに生存率が徐々に低下し、35 日目にはほぼ全てのラットに脳卒中を発症した(Fig. 1A, B)。エンドポイントである 42 日目の高塩分食負荷後の生存率は偽手術群で 20%、ヒドララジン群では全てが死亡した。一方腎除神経術群において 28 日目頃から脳卒中が発症したが、最終的に約 40%のラットで脳卒中は発症せず生存率は約 60%と有意に改善を認めた。なお通常塩分食群では脳卒中は発症しなかった。

#### 3.1.2 血圧

高塩分食負荷 14 日後の血圧において、腎除神経群では偽手術群と比し有意に低下、ヒドララジン投与群では腎除神経術群と同等の降圧効果を認めた(Fig. 1C)。

## 3.2 脳卒中予防効果の検討

### 3.2.1 脳血管への影響

脳血流は腎除神経術群で維持されていたが、偽手術群、ヒドララジン群とも有意に低下した(Fig. 2A)。また腎除神経術の血液脳関門の破綻に対する効果を検討すべく

IgG の血管外漏出とタイト結合の構成蛋白である occludin の蛋白量を計測したところ、偽手術群、ヒドララジン群では IgG の血管外漏出の増加と occludin の発現量の低下を認

めたが、その両方で腎除神経術群は改善を認めた (Fig. 2B、2C)。

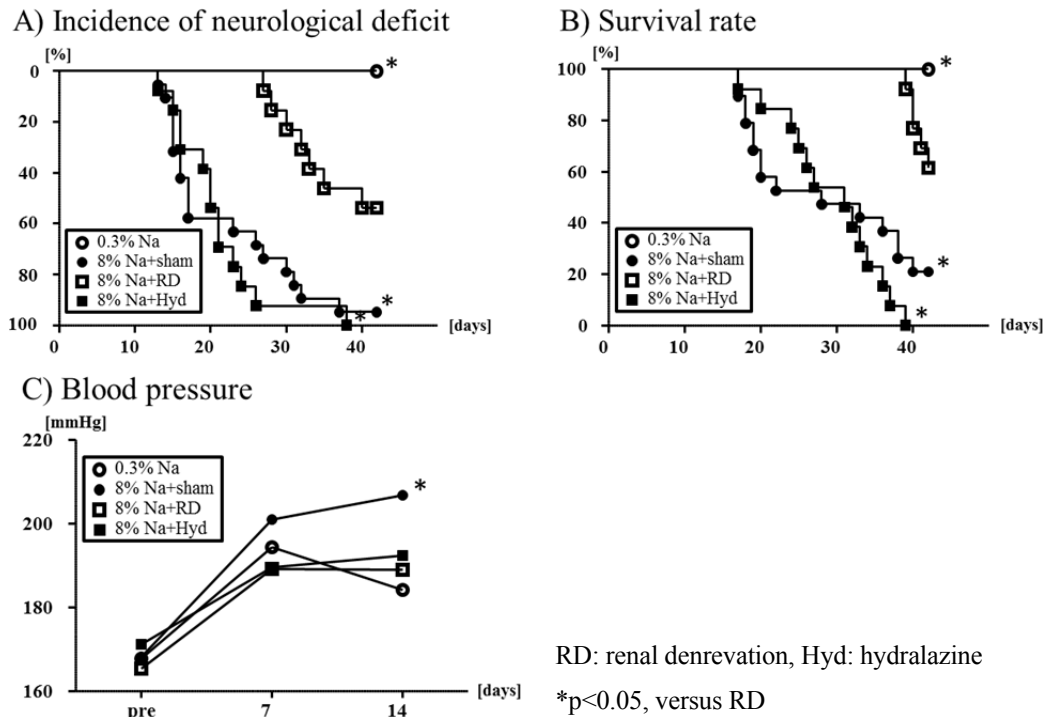


Figure 1. The effect of renal denervation for stroke onset and blood pressure

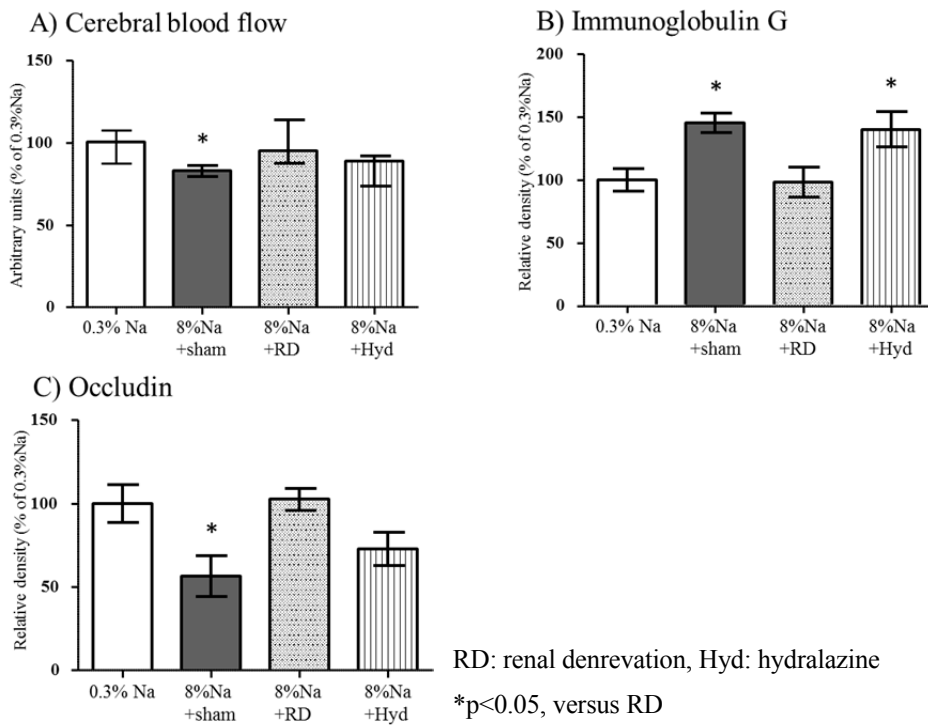
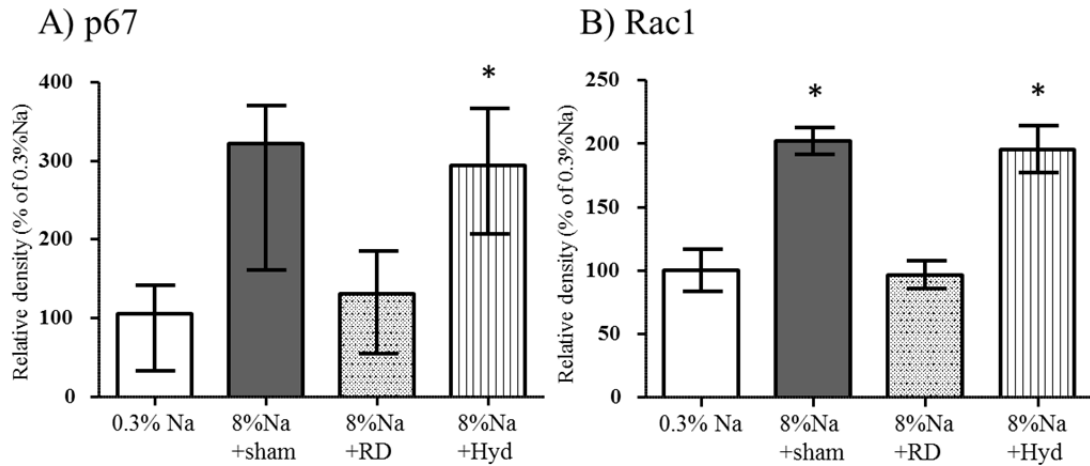


Figure 2. The effects of renal denervation on cerebral vessels

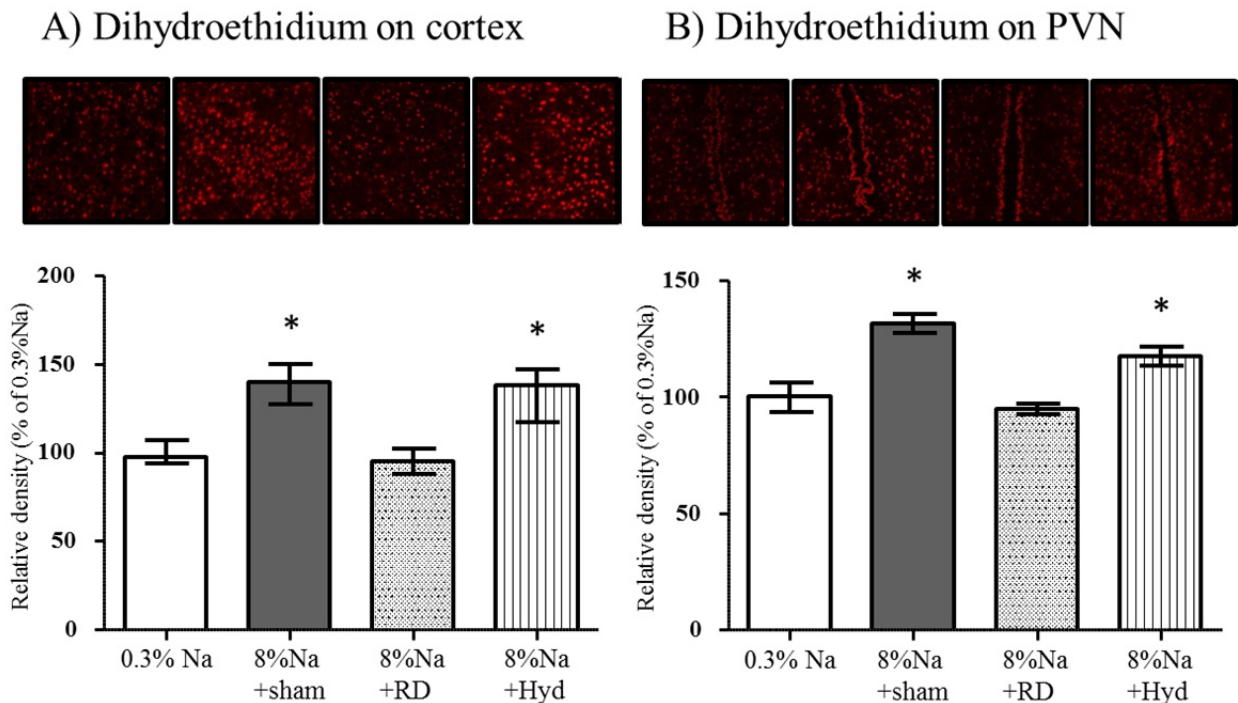
### 3. 2. 2 脳内酸化ストレス

NADPH オキシダーゼ (NOX) のアイソフォームの一つ NOX2 の活性に重要な p67<sup>phox</sup> と Rac1 の発現量は、偽手術群、ヒドララジン投与群とも通常塩分食と比し顕著な上昇を認めましたが、腎除神経術によりそれらは抑制された (Fig.

3A, 3B)。また大脳皮質、視床下部室傍核でのスーパーオキシドの指標であるジハイドロエチジウムの染色性において、偽手術群、ヒドララジン群で通常塩分食と比べ数倍の上昇を認めましたが、いずれの発現も腎除神経術にて有意に低下した (Fig. 4A, 4B)。



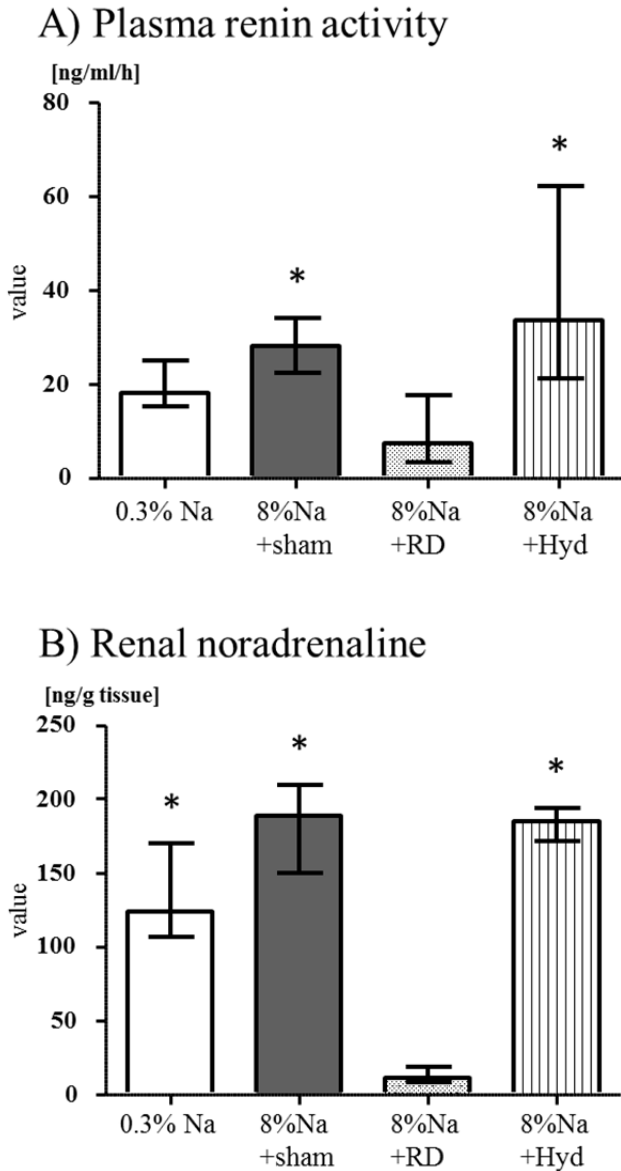
**Figure 3.** The effects of renal denervation for NADPH oxidase. RD: renal denervation, Hyd: hydralazine. \*p<0.05, versus RD



**Figure 4.** The effects of renal denervation for superoxide levels. PVN: paraventricular nucleus, RD: renal denervation, Hyd: hydralazine. \*p<0.05, versus RD

### 3. 2. 3 腎ノルアドレナリン量と血漿レニン活性

血漿レニン活性は腎除神経術にて有意に低下した (Fig. 5A)。なお腎除神経術の達成を評価すべく計測した腎臓ノルアドレナリン量は、腎除神経術にて 10%程度に抑制されていた (Fig. 5B)。



**Figure 5.** The effects of renal denervation for renin activity and renal noradrenaline

RD: renal denervation, Hyd: hydralazine

\*p<0.05, versus RD

### 4. 考 察

交感神経の研究は電気生理学的検討を中心に以前より盛んに行われており、脳内のアラームシステムとして即時的反応に関わるものと広く知られている。一方で本態性高血圧には中枢性交感神経活動が重要であることが注目され、中枢性交感神経活動と腎交感神経活動の密接な関係も報告されている (文献 8)。近年腎除神経術による治療抵抗性高血圧患者に対する良好な降圧効果が報告されているが、この機序として腎除神経術により中枢性交感神経過活動が抑制されることで血圧が低下すると考えられている (文献 7)。今回我々は高塩分食負荷をした SHRSP ラットにおいて、腎除神経術を施行することにより血圧を下げると同時に脳卒中を予防することを明らかにした。この理由として腎除神経術は高血圧と高塩分食負荷との相加的な影響による脳血流の低下や血液脳関門の破綻を軽減すること、大脳皮質や視床下部室傍核の酸化ストレスを抑えること、レニン-アンジオテンシン系の活性化も抑制すること等が考えられた。これらの効果は腎除神経術群と同等の降圧作用があるヒドラジン群では認めなかったことから、腎除神経術による脳卒中予防は降圧効果を超えたものであることが示唆された。

血管収縮物質であるノルアドレナリンを神経伝達物質としている交感神経系の脳内分布は、視床下部室傍核背側内側小細胞部を上位中枢とし上頸部交感神経節から脳軟膜動脈に分布する外因系と、橋青班核から脳幹部を上行し脳実質内の小血管や毛細血管に分布する内因系に分類される。上述のように高血圧のバックグラウンドを持った SHRSP ラットでは高塩分食を負荷されることで中枢性交感神経の上位中枢の活動が上昇し、外因系、内因系の交感神経系とも過活動となり、脳血管が収縮し脳血流低下とともに血液脳関門の破綻が生じることで脳卒中が発症すると考えられる。視床下部ではストレスにより短時間でノルアドレナリンが上昇する他 (文献 8)、ストレスに反応する脳下垂体ホルモンの産生等も行われているため、ストレスセンサーとしての役割があると考えられる。今回ジハイドロエチジウム染色の結果より視床下部室傍核での酸化ストレスが軽減していたことから、腎除神経術は高血圧 + 高塩分による視床下部障害を軽減し、外因性と内因性の両方の中枢性交感神経過活動を抑制し、脳軟膜動脈の血管収縮を抑え、脳血流を維持するとともに、毛細血管相を

主座とする血液脳関門の破綻を軽減すると思われる。

活性酸素種は生体内でその産生系、消去系にて厳密に制御されているが、脳卒中の際はその機構が破綻し細胞障害性にはたらく(文献 9)。以前より脳卒中における活性酸素種の産生系で NOX が注目されており、食細胞 NOX の酵素本体である NOX2 は主に血管内皮細胞に発現すると言われていたが、近年神経細胞やマイクログリアにも発現することが報告されている(文献 10)。NOX2 の活性化に必要なサブユニットのうち、今回高塩分食にて p67<sup>phox</sup> と Rac1 の発現量は増加していたが、腎除神経術はその増加を抑えた。さらにスーパーオキシドのマーカであるジハイドロエチジウム染色性も低下したことより、腎除神経術にて視床下部や大脳皮質での神経細胞などの酸化ストレスが軽減され脳卒中発症抑制に寄与したと思われる。

食塩感受性高血圧の場合は、Na 貯留による血圧上昇を感知することで通常レニン活性は低下していると考えられるが、今回我々の結果では通常塩分食と高塩分食ではレニン活性に差はなかった。両群間で塩分負荷 14 日後には 20 mmHg 前後の血圧差があったものの、高塩分食群では食塩負荷 21 日後 60% に脳卒中が出現していた。過度の侵襲を避けるためにそれ以上の血圧測定を行わなかったが、全身状態不良のため食餌摂取低下、血圧上昇の鈍化が高塩分食群に生じていた可能性も考えられる。遠心性交感神経活動において RA 系の過活動は中枢性交感神経活動の亢進を惹起するが、今回腎除神経術群ではレニン活性が十分に抑制されており、これも脳卒中予防効果に寄与しているものと思われる。

今回の研究で、腎除神経術は高塩分食を负荷した SHRSP ラットにおいて降圧効果を超えた脳卒中予防効果を持ち、それは脳血管の安定化、視床下部室傍核や大脳皮質での酸化ストレス軽減、RA 系の抑制と関連している可能性があることが示唆された。実際臨床で行われている腎神経焼灼術では、通常のカテーテル治療と同等の合併症以外自律神経症状等の有害性は報告されていない。そのため降圧治療に難渋し脳卒中の際は重篤な状態に陥りやすい治療抵抗性高血圧患者の新しい脳卒中予防の一助になる可能性があり、またメカニズムを応用した新たな治療薬も期待できる。既にヒトにも行われている腎除神経術を利用・応用することは、今後ヒトの臨床に貢献す

ると期待される。

## 5. 今後の課題

今回腎除神経術による脳卒中の予防効果が明らかとなったが、この研究にはいくつかのリミテーションがある。まず、第一に今回メカニズムの検討までは行っていない。脳血管の安定化、脳卒中発症と視床下部室傍核や大脳皮質での酸化ストレス低下、RA 系の抑制との関連を今回指摘したが、どういう機序でそれらが脳卒中予防に関わっているかを今後検討したい。次に腎除神経術による全身性への影響についてである。中枢性交感神経系が抑制されることにより、特に動脈硬化や心肥大など心血管系に恩恵がある可能性がある。最後に臨床では大きな有害事象は報告されていないが、除神経後の腎動脈狭窄や腎機能障害、中枢性交感神経活動の抑制による神経症状や即時反応への影響、視床下部で産生されるホルモンの変化等も検討する必要があると思われる。

## 6. 文献

- 1) Esler M. The 2009 Carl Ludwig Lecture: Pathophysiology of the human sympathetic nervous system in cardiovascular diseases: the transition from mechanisms to medical management. *J Appl Physiol* (1985). 2010; 108:2 27-37.
- 2) Mark AL. Sympathetic neural contribution to salt-induced hypertension in Dahl rats. *Hypertension*. 1991; 17(1 Suppl): I86-90.
- 3) Stocker SD, Monahan KD, Browning KN. Neurogenic and sympathoexcitatory actions of NaCl in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2013; 15: 538-46.
- 4) Krum H, Schlaich M, Whitbourn R, Sobotka PA, Sadowski J, Bartus K, Kapelak B, Walton A, Sievert H, Thambar S, Abraham WT, Esler M. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study. *Lancet*. 2009 Apr 11; 373(9671): 1275-81.
- 5) Esler MD, Krum H, Sobotka PA, Schlaich MP, Schmieder RE, Böhm M. Renal sympathetic denervation in patients with treatment-resistant

- hypertension (The Symplicity HTN-2 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2010; 376 (9756): 1903-9.
- 6) Esler MD, Krum H, Schlaich M, Schmieder RE, Böhm M, Sobotka PA; Symplicity HTN-2 Investigators. Renal sympathetic denervation for treatment of drug-resistant hypertension: one-year results from the Symplicity HTN-2 randomized, controlled trial. *Circulation*. 2012; 126(25): 2976-82.
- 7) Krum H, Schlaich M, Sobotka P. Renal sympathetic nerve ablation for treatment-resistant hypertension. *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 76: 495-503.
- 8) Ye S, Zhong H, Duong VN, Campese VM. Losartan reduces central and peripheral sympathetic nerve activity in a rat model of neurogenic hypertension. *Hypertension*. 2002; 39: 1101-6.
- 9) Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001; 21: 2-14.
- 10) Sorce S, Krause KH. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11: 2481-504.

# The Efficacy of Renal Denervation for the Stroke Onset in Salt-Sensitive Hypertension

## — Renal Denervation Prevents Stroke Onset in Salt-Sensitive Hypertension —

Yu Hasegawa, Takashi Nakagawa, Shokei Kim-Mitsuyama

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

### Summary

**Background and purpose:** Although renal denervation (RD) is reported to reduce the blood pressure in treatment-resistant hypertensive patients, the beneficial effect of RD for stroke onset is undetermined. In the current study, we hypothesized that RD prevents stroke onset in salt-loaded hypertensive rats.

**Methods:** Seventy-two spontaneously hypertensive stroke-prone (SHRSP) rats were assigned to normal salt diet (0.3% Na) and high salt diet (8% Na) with sham-operation, RD, or hydralazine (5mg/kg/day). Firstly, neurological symptom including paralytic gait, reduced motor activity, and sudden death was monitored every day for 42 days and the rats were regarded as stroke sign-positive if they showed one or more of these signs. Blood pressure among the groups was checked for 14 days using tail cuff methods. Next, to address the effect of RD, the animals were measured cerebral blood flow (CBF) and then their brain were evaluated Immunoglobulin G (IgG) and dihydroethidium staining at 21 days after salt-loaded. Western blotting for occluding, p67<sup>phox</sup>, Rac1 were also conducted at the same time point. In addition, we assessed the plasma renin activity and renal noradrenalin levels of the rats.

**Results:** RD significantly reduced not only stroke onset and mortality but also blood pressure compared with the sham group. There was no stroke onset in normal salt diet group. RD preserved CBF and occluding expression, and decreased the density of IgG staining. Also, RD reduced the density of dihydroethidium on hypothalamic paraventricular nucleus and cortex, p67<sup>phox</sup> and Rac1 expressions. Although blood pressure was significantly decreased in the hydralazine group, there were no beneficial effects in that group. Plasma renin activity and renal noradrenalin levels in RD group were lower than in the sham group.

**Conclusions:** RD could prevent stroke onset in salt-loaded hypertensive rats beyond the blood pressure lowering. The effects might be associated with stabilization of cerebral vessels, reduction of oxidative stress in hypothalamic paraventricular nucleus and cortex, and inhibition of renin-angiotensin system.