

肥満における血圧の食塩感受性亢進と交感神経活動の役割

藤田 恵¹, 河原崎 千晶¹, 藤田 敏郎², 南学 正臣¹, 安東 克之¹

¹東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科,

²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 我々は食塩感受性および肥満高血圧において、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る可能性を示した(Circulation 2009, Hypertension 2007, 2012)。一方、心・腎におけるミネラルコルチコイド受容体(MR)活性化が酸化ストレスを介し臓器障害に関与している可能性も報告した(Hypertension 2008, J Hypertens 2012, Am J Physiol Renal Physiol 2011)。メタボリックシンドロームでは、その病態に MR 活性化や交感神経活動亢進が関与していることが推測されているが、脳内における詳細機序は不明である。

脳内 MR が酸化ストレスを介した中枢性交感神経活動亢進に関与している可能性を、Dahl-食塩感受性ラット(DS)と Zucker 肥満ラットをかけ合わせて作成したメタボリックシンドロームラット Dahl-S.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa)(DF)を用い検討した。DFの脳内におけるMR活性を評価するため、摘出した脳視床下部におけるSgk-1のmRNA発現をリアルタイムRT-PCR法にて検討した。

DFの脳室内にMR拮抗薬 eplerenone、もしくはアルドステロン合成阻害薬(FAD286)を慢性投与し、交感神経活動(ヘキサメソニウム静脈投与に対する血圧低下反応、尿中ノルエピネフリン排泄量)、血圧(無麻酔自由行動下観血的測定およびテイルカフ法)への影響を、人工脳脊髄液投与(vehicle)群と比較検討した。さらに視床下部における酸化ストレス産生量をルシジェニン化学蛍光発光法により測定した。

【成績】 DFの視床下部におけるSgk-1のmRNA発現量はDSに比較し有意に亢進していた。DFの脳室内へのeplerenoneおよびFAD286の慢性投与は、vehicle群に比し血圧(平均血圧: vehicle群 152±2 mmHg, eplerenone群 128±7 mmHg, FAD286群 131±5 mmHg)、交感神経活動を有意に抑制した。さらに、FAD286の脳室内投与による視床下部酸化ストレス産生量の有意な低下も確認できた。

【結論】 メタボリックシンドローム関連高血圧において、脳内MR活性化は酸化ストレスを介した中枢性交感神経亢進に関与している可能性が考えられる。

1. 研究背景および目的

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, 3)。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、いずれも容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。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^{phox}, p47^{phox}, gp91^{phox})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)。その成績はDahl食塩感受性高血圧ラットという先天的な食塩感受性高血圧ラットのみならず、Sprague-Dawleyラットに対し若年時片腎摘出術に加え高食塩食負荷を行うことで後天的

に食塩感受性高血圧を呈した後天的食塩感受性高血圧モデルラットにおいても同様に認められ、その成果を報告した(文献3)。

食塩感受性高血圧ではメタボリックな異常を呈することが知られており(文献4)、一方、肥満においては食塩感受性高血圧を呈することが報告されており(文献5)、食塩感受性高血圧はメタボリックな異常と深く関連することが知られている。メタボリックシンドロームでは血圧の食塩感受性が亢進しているとの臨床研究報告も認められる(文献6,7)。すなわち、食塩感受性高血圧と肥満関連高血圧は類似した病態を有しており、一部共通の病態生理学的機序が存在すると考えられる。実際、高脂肪食を負荷した肥満ラットの大脳皮質において、酸化ストレスが増大していたとの成績が報告されている。また、肥満高血圧で交感神経活動亢進が重要な働きをしていることは、古くから知られ

ていた。そこで我々は、肥満高血圧においても食塩感受性高血圧と同様「脳内酸化ストレスを介した中枢性交感神経活動亢進」のメカニズムが関与している可能性を考え、検討した(文献8)。肥満高血圧モデルとして、45%高脂肪食を負荷した Sprague-Dawley ラットを用いた(文献8)。抗酸化薬 tempol の側脳室内急性投与に対する血圧、腎交感神経活動の低下反応は、肥満ラットにおいてコントロールラットと比較し有意に増大していた(図1)(文献8)。NADPH oxidase 阻害薬である apocynin や diphenyleneiodium の急性側脳室投与に対する血圧・腎交感神経活動の低下反応も同様に肥満ラットで亢進していた(文献8)。さらに、視床下部における酸化ストレスレベル(図2)および NADPH oxidase subunit(p22^{phox}, p47^{phox}, gp91^{phox})の mRNA 発現量(図3)も、肥満高血圧ラットで有意な増大を認めた。以上の成績から、「脳内酸化ストレ

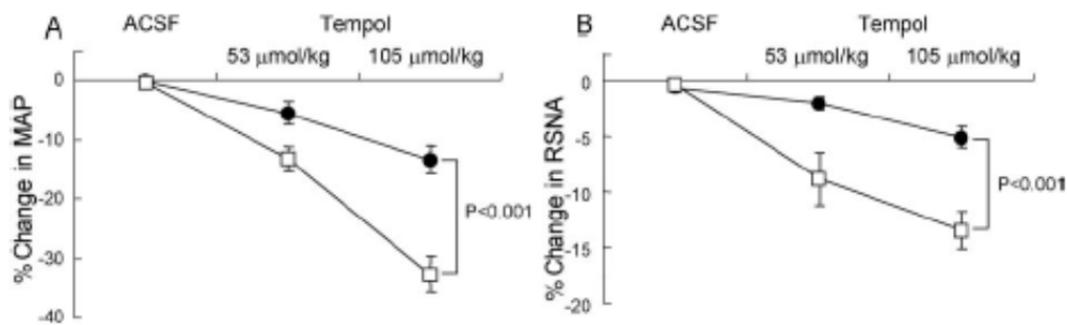


図1. 肥満高血圧ラット(HF)、対照ラット(LF)における tempol 側脳室投与時の血圧(図A)、腎交感神経活動(図B)反応の比較

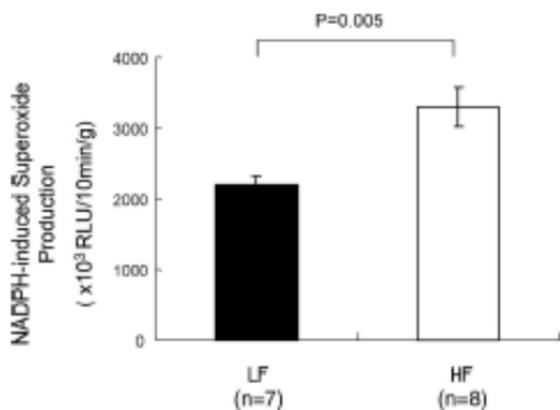


図2. 肥満高血圧ラット(HF)、対照ラット(LF)における脳視床下部活性酸素種産生(NADPH oxidase 活性)の比較

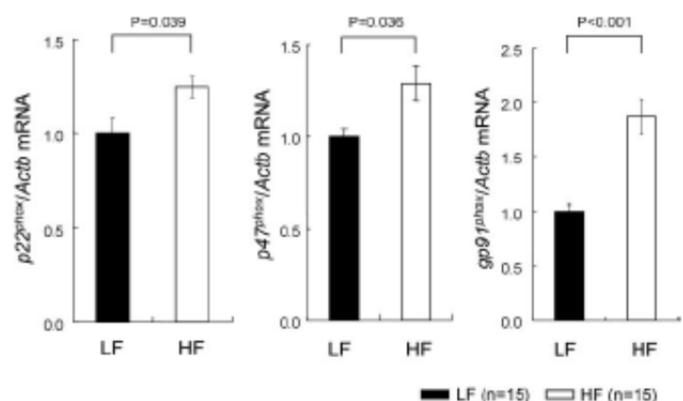


図3. 肥満高血圧ラット(HF)、対照ラット(LF)における脳視床下部 NADPH oxidase subunits (p22^{phox}, p47^{phox}, gp91^{phox}) mRNA 発現量の比較

スを紹介した中枢性交感神経活動亢進」は、食塩感受性高血圧と肥満高血圧の共通した病態生理学的基盤に関与している可能性が示され、すなわち、肥満における食塩感受性亢進は、「脳内酸化ストレスを介した中枢性交感神経活動亢進」によりもたらされていると考えられた(文献 8, 9)。

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 10)。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 11, 12)。さらに、アルドス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 13, 14)。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 15, 16, 17, 18)。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

Dahl-食塩感受性ラット(DS)とZucker肥満ラットを合わせて作成したメタボリックシンドロームラットDahl-S. Z-Lepr(fa)/Lepr(fa)(DF)を用いた(文献 19)。DFの脳室

内にMR拮抗薬eplerenone、もしくはアルドステロン選択的合成阻害薬(FAD286)(文献20)を慢性投与し、交感神経活動、血圧への影響を、人工脳脊髄液投与(vehicle)群と比較検討した。

2.2 視床下部におけるMR活性の検討

DFの脳内におけるMR活性を評価するため、摘出した脳視床下部におけるSgk-1のmRNA発現をQuantitative real-time RT-PCR法により検討した(図5)。

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)(図6)。

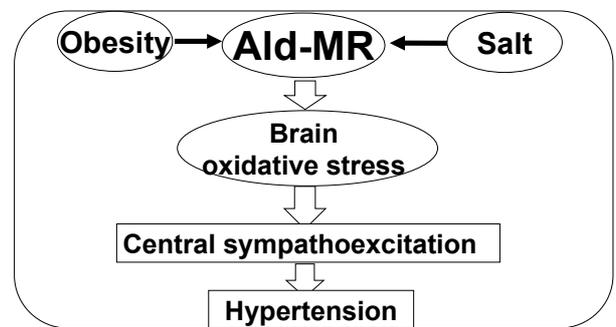


図4. 仮説: 肥満における食塩感受性高血圧の機序は「脳内酸化ストレスを介した中枢性交感神経活動亢進」が重要であり、その上流に脳内アルドステロン(Ald)-ミネラルコルチコイド受容体(MR)が存在する。

Sgk-1/Actb mRNA

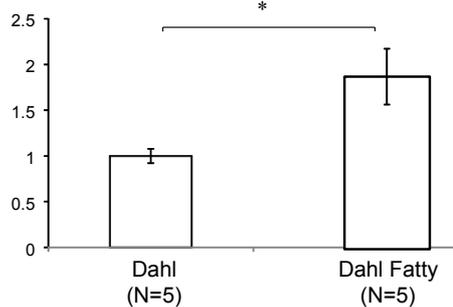


図5. 脳視床下部におけるミネラルコルチコイド受容体(MR)活性: MRの下流因子であるSgk-1の視床下部におけるmRNA発現量をreal-time RTPCRで検討したところ、Dahl rat群に比較しDahl fatty rat群で有意に増大しており、MR活性亢進が示唆された。*: P<0.05。

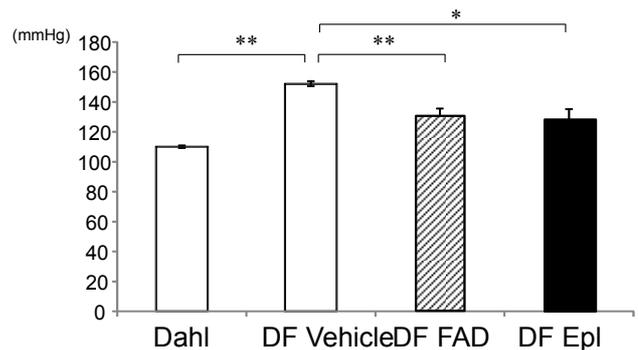


図6. MR blocker (eplerenone)もしくはアルドステロン合成阻害薬(FAD286)慢性脳室内投与の血圧に対する効果: Dahl fatty rat(DF)において、eplerenoneの慢性脳室内投与(DF Epl)はvehicle群(DF Vehicle)に比較し有意な血圧低下効果を示した。一方、アルドステロン合成阻害薬FAD286の慢性脳室内投与(DF FAD)も同様に有意な血圧低下効果を示した。MAP(mean arterial pressure; 平均血圧). **: P<0.01, *: P<0.05。

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(文献 1, 2, 3) (図 7)。また、メタボリックケージを用い 1 日分蓄尿し、尿中ノルエピネフリン排泄量を測定した(文献 8, 9)。

2. 5 視床下部酸化ストレス評価

摘出した視床下部をKrebs液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。今年度の研究ではFAD投与の検討のみ実施できた。

2. 6 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。DF群と他群との間の比較にはDunnet testを用いた。それらはJMP 9.0.0(SAS Institute, Cary, NC)コンピュータソフトウェアを用いて行った(文献 3)。

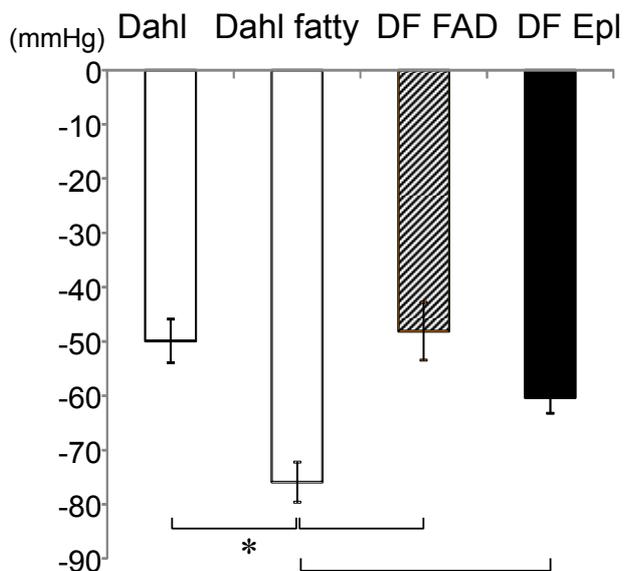


図7. MR blocker (eplerenone) もしくはアルドステロン合成阻害薬 (FAD286) 慢性脳室内投与の交感神経活動に対する効果:ヘキサメソニウム静脈投与に対する血圧低下反応はeplerenone群 (DF Epl)、FAD286群 (DF FAD) で有意に抑制されていた。
** : P<0.01, * : P<0.05。

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 の視床下部における mRNA 発現量を real-time RTPCR で検討したところ、Dahl rat 群(N=5)に比較し DF 群(N=5)で有意に増大しており DF 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、DF 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(N=4)に比較し有意に低下していた(図 6)(平均血圧:vehicle 群 152±2 mmHg, eplerenone 群 128±7 mmHg, FAD286 群 131±5 mmHg)。

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=4)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)。Eplerenone 脳室内投与は、尿中ノルエピネフリン排泄量も有意に抑制した(data not shown)。

3. 4 アルドステロン合成阻害薬 FAD286 脳室内投与の血圧・交感神経活動に対する効果

MR の代表的リガンドであるアルドステロンの選択的合成阻害薬FAD286を eplerenone と同様に慢性的に脳室内投与し、血圧(図 6)、交感神経活動(図 7)に対する効果を判定した。

3. 5 アルドステロン合成阻害薬FAD286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=4)に比較し FAD 群(N=4)で有意に抑制された(Data not shown)。

4. 考察

今回の研究結果は、次の 3 点にまとめられる。1)DF の視床下部における MR 活性はDahl rat に比較し有意に増大していた。2)DF の脳室内に MR blocker である eplerenone を慢性投与することで、血圧、交感神経活動の

有意な抑制効果が認められた。3)MRの代表的なリガンドであるアルドステロンの選択的合成阻害薬FAD286の慢性脳室内投与でも同様に降圧および交感神経抑制効果が認められ、加えて脳内酸化ストレスの有意な抑制も確認できた。

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10, 11, 21, 22, 23)、食塩感受性高血圧モデルとしてDahl食塩感受性高血圧ラットについて我々も検討し、前年度の当財団の助成研究で報告した。今回は、そのDahl食塩感受性高血圧ラットとZucker肥満ラットをかけあわせて作成された肥満高血圧ラットを用いた検討を行い、肥満の要素を加えても同様に、脳内酸化ストレスを介した中枢性交感神経亢進の上流に脳内アルドステロン-MR系の亢進が存在する可能性を示すことができた。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13, 14)、食塩感受性高血圧や肥満高血圧においては示されていない。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、食塩感受性および肥満関連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10, 11)、今後も慎重に研究を進めていく必要があり、我々は、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)発現量の検討を予定している。

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8, 24, 25,)。我々は、食塩感受性高血圧のみならず(文献1)、肥満高血圧(文献8)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。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。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。メタボリックシンドロームにおいては「食塩感受性亢進」キーファクターとなっており(文献6, 24)、メタボリックシンドロームに伴う高血圧を管理する上で、そのマネジメントが重要であり、その詳細機序解明が急務である。今回の我々の知見から、「脳内アルドステロン-MR-酸化ストレスを介した中枢性交感神経活動亢進」をターゲットとした降圧を目指すことが新しい治療戦略となりうる可能性がある。

6. 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) Ogihara T, *et al.* High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 40; 83-89, 2002.
- 5) Dobrian AD, *et al.* Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 285; 619-628, 2003.
- 6) 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, 2009.
- 7) Uzu T, *et al.* Enhanced sodium sensitivity and disturbed circadian rhythm of blood pressure in essential hypertension. *J Hypertens* 14; 1627-1632, 2006.
- 8) Nagae A, *et al.* Sympathoexcitation by oxidative stress in the brain mediates arterial pressure elevation in

- obesity-induced hypertension. *Circulation* 119: 978-986, 2009.
- 9) Fujita M, *et al.* The role of CNS in salt-sensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep* 15; 390-394, 2013.
 - 10) 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.
 - 11) Gomez-Sanchez EP, *et al.* Aldosterone synthesis in the brain contributes to Dahl salt-sensitive rat hypertension. *Exp Physiol.*, 95; 120-130, 2010.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) Huang BS, *et al.* Regulation of hypothalamic renin-angiotensin system and oxidative stress by aldosterone. *Exp Physiol.*, 96:1028-1038, 2011.
 - 15) Matsui H, *et al.* Salt excess causes left ventricular diastolic dysfunction in rats with metabolic disorder. *Hypertension*, 52; 287-294, 2008.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) Murase T, *et al.* Effects of estrogen on cardiovascular injury in ovariectomized female DahlS.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats as a new animal model of metabolic syndrome. *Hypertension* 59; 694-704, 2012.
 - 20) Rigel DF, *et al.* Pharmacodynamic and pharmacokinetic characterization of the aldosterone synthase inhibitor FAD286 in two rodent models of hyperaldosteronism: Comparison with the 11beta-hydroxylase inhibitor metyrapone. *J Pharmacol Exp Ther* 334; 232, 2010.
 - 21) Huang BS, *et al.* Mineralocorticoid actions in the brain and hypertension. *Curr Hypertens Rep.*, 13; 214-220, 2011.
 - 22) 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.
 - 23) Nakano M, *et al.* Mineralocorticoid receptors/epithelial Na⁺ channels in the choroid plexus are involved in hypertensive mechanisms in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.*, 36: 277-284, 2013.
 - 24) 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.
 - 25) Nagae A, *et al.* Effect of high fat loading in Dahl salt-sensitive rats. *Clin Exp Hypertens.*, 31: 451-461, 2009.

The Role of Salt-Sensitivity and Sympathetic Nerve Activity in Obesity

Megumi Fujita¹, Chiaki Kawarasaki¹, Toshiro Fujita², Masaomi Nangaku¹, Katsuyuki Ando¹

1. Department of Nephrology and Endocrinology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

2. Division of Clinical Epigenetics, The University of Tokyo

Summary

Metabolic syndrome, a highly predisposing condition for cardiovascular disease caused by visceral obesity, requires appropriate management. However, the detailed mechanisms have not been fully elucidated. High salt intake increases blood pressure to a greater degree in patients with metabolic syndrome than in those without it. We have shown previously that sympathoexcitation by brain oxidative stress mediates arterial pressure elevation in salt-sensitive and obesity-induced hypertension. We have also shown that aldosterone-mineralocorticoid receptor (MR) activation mediates oxidative stress-induced cardiac and renal dysfunction. Then, we hypothesized that brain aldosterone-MR activation could mediate arterial pressure elevation through brain oxidative stress-induced sympathoexcitation in metabolic syndrome-related hypertension. We used Dahl-S.Z-Lepr(fa)/Lepr(fa) rats (DF) derived from a cross between Dahl salt-sensitive and Zucker rats as the salt-sensitive metabolic syndrome model. Sgk-1 mRNA expression in the isolated hypothalamus, evaluated by real-time quantitative RT-PCR was significantly higher in DF than in Dahl salt-sensitive rats, which suggested that MR activity in the brain was upregulated in DF. Then, we examined effects of chronic intracerebroventricular eplerenone, mineralocorticoid receptor blocker or FAD 286, an aldosterone synthase inhibitor, on sympathetic nerve activity, arterial pressure, and the hypothalamic oxidative stress level. In DF, chronic intracerebroventricular eplerenone significantly reduced sympathetic nerve activity and arterial pressure. Chronic intracerebroventricular FAD 286 also significantly reduced sympathetic nerve activity and arterial pressure as well as hypothalamic oxidative stress level. In conclusion, brain aldosterone-mineralocorticoid receptor activation can be a possible pathogenic background of arterial pressure elevation through brain oxidative stress-induced sympathoexcitation in metabolic syndrome.