

圧負荷による食塩感受性獲得機構における 心臓交感神経求心路を介する機序の解明

廣岡 良隆, 伊藤 浩司, 竹中 理紗

九州大学循環器病未来医療研究センター

概要 高血圧性心疾患は心収縮力が保たれた心不全の基礎疾患として多く、交感神経活性化が深く関わっていることが考えられている。本研究ではその機序として心臓交感神経求心路(CSA)を介する交感神経活性化に着目した。したがって、本研究の目的は、CSA 活性化が心臓の TRPV1 刺激を介して脳内鉱質コルチコイド受容体(MR)／上皮型ナトリウムチャンネル(ENaCs)経路の活性化を生じるか否か、食塩負荷により生じる脳内炎症性変化を介した交感神経活性化につながっているか否かを明らかにすることであった。

実験には大動脈圧バンディングによる圧負荷マウスを用いて行った。CSA 刺激は capsaicin を浸透させた濾紙を心臓前壁に貼付して行った。対照としてエタノールを含ませた濾紙を使用した。Capsaicin 投与群では視床下部 α ENaC および TNF- α の発現が増加しており、脳室内へ投与したNaに対する感受性は亢進していた。一方、MRの活性化は食塩を負荷していない状態では認められなかった。5日間の食塩負荷により血圧、心拍数、尿中ノルエピネフリン排泄量が増加した。Capsaicin による反応は TRPV1 拮抗薬である capsazepine で消失したので TRPV1 を介していると考えられる。また、脳室内へ TNF- α 阻害薬である etanercept を投与すると capsaicin 貼付群では etanercept 脳室内投与による視床下部 TNF- α および α ENaCの発現レベルは有意に低下した。加えて、脳室内 etanercept 投与は食塩負荷による血圧上昇、心拍数増加、尿中ノルエピネフリン排泄量増加反応を抑制した。また、ENaCs 阻害薬である benzamil 脳室内投与によっても同様の反応が認められた。さらに capsaicin 貼付は食塩負荷による視床下部 α ENaC, SGK1, IL-1 β の発現レベルを増加させた。これらの知見は CSA 刺激が視床下部 TNF- α 増加を介した視床下部 α ENaC の発現増加を生じ、食塩感受性を増強することを示唆する。また、圧負荷マウスでは 8 週程度まで心肥大が進行し、それ以上になると心収縮力低下が生じてくること、TRPV1 ノックアウトマウスでは心肥大進行がかなりの程度で抑制されることを見出した。

したがって、TRPV1 を介する CSA 刺激による交感神経活性化は心肥大進行による交感神経活性化に深く関与していることが考えられる。

1. 研究背景および目的

高血圧性心疾患による心不全発症は心収縮機能が保たれた心不全(heart failure with preserved ejection fraction; HFpEF)の基礎疾患として多く、高齢化社会を迎えた現代では今後ますます増加することが推定される^(1,2)。我々は圧負荷心肥大モデルにおいて食塩感受性が生じ交感神経活性化を介して心不全に至る機序の解明を行ってきた⁽³⁻⁷⁾。具体的には、脳内独自の鉱質コルチコイド受容体(mineralocorticoid receptor; MR)やそれとリンクする

上皮型ナトリウムチャンネル(epithelial sodium channels; ENaCs)の活性化の重要性を報告した。また、脈絡叢における MR/ENaCs の活性化がナトリウムを血液から脳内へ移行させ、視床下部に存在する MR 活性化を介した炎症性変化によって交感神経活性化を生じることを明らかにしてきた。

本研究では、Heart-Brain Communication としての心臓交感神経求心路(cardiac sympathetic afferent; CSA)に着目した。この求心路を介した反射経路は、元々は急性心

筋虚血で交感神経活性化を生じることから見出されたものであるが、近年、慢性心不全や高血圧のような長期的な交感神経活性化が関わる病態での重要性が着目されている⁽⁹⁻¹²⁾。この求心神経は transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1 発現神経が中心的な役割を果たす。したがって、本研究では、CSA 活性化が心臓の TRPV1 刺激を介して脳内 MR/ENaCs 経路の活性化を生じるか否か、また、食塩負荷により生じる脳内炎症性変化を介した交感神経活性化が心臓に分布する TRPV1 を感作し CSA 刺激が生じるために交感神経活性化につながっているか否かを明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 研究方法

実験には以前の報告にあるように大動脈の腎動脈分岐上部においてバンディングを施行し心臓に圧負荷をかけるマウスを用いて実験を行った。

2. 1 CSA 刺激による血行動態変化

外因性 CSA のアゴニストとして capsaicin を拮抗薬として capsazepine を用いた。薬剤を浸透させたフィルター紙(濾紙)を心臓前壁に貼付することによって CSA 刺激 (2.5 mM, 2 μ l) や阻害を行った。対照としてエタノール (50%, 2 μ l) を含ませたフィルターを貼付した。食塩負荷による影響は術後 3 日から 7 日の 5 日間の高食塩食負荷 (8%) を行い、通常食塩負荷群と比較検討した。また、脳室内に正常 Na (0.15 M) あるいは高 Na (0.2 M) を含んだ人工脳脊髄液をマイクロシリンジポンプで 1 μ l/min で 10 分間注入してナトリウム感受性を調べた。

2. 2 脳内 MR/ENaCs 系発現, 炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-17 発現の変化および TNF- α 阻害薬脳室内投与による効果

CSA 刺激が食塩負荷による交感神経活性化を増強する機序として脳内 MR/ENaCs 系活性化, 炎症性サイトカイン発現の関与を検討するためにこれらの発現レベルを Western blot 法で観察した。また、炎症性サイトカインを阻害する一つ的手段として TNF- α 阻害薬である etanercept を脳室内投与し、血行動態や交感神経活性, 心機能の変化を観察した。

2. 3 圧負荷マウスにおける検討

圧負荷マウスにおいて TRPV1 刺激が変化しているか

否かについて TRPV1 ノックアウトマウスを用いて検討した。

3. 研究結果

3. 1 CSA 刺激による血行動態変化

心外膜表面に capsaicin フィルターを貼付するとただちに血圧上昇が認められた (図 1)。一方、対照 (エタノール貼付) 群では血圧変化は認められなかった (図 1)。

Capsazepine 投与は capsaicin に対する反応を完全に抑制した (図 1B)。Capsaicin に対する反応は約 30 分間持続した。Capsaicin 貼付フィルターを除去し、生理食塩水で洗浄し、1 時間後に capsaicin 貼付を行い、再現性を確認した (図 1B)。

血圧記録は挿入した PE50 tube を通じて覚醒後 3 日まで観察し、対照群と差が無いことを確認した (図 1A)。3 日の時点での心エコーによる心室内腔径や心収縮力には違いは認められなかった。

3. 2 脳内 MR/ENaCs 系発現, 炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF- α), IL-1, IL-6, IL-17 発現の変化および TNF- α 阻害薬脳室内投与による効果

視床下部の MR および血清糖質コルチコイド誘発性キナーゼ 1 (serum glucocorticoid-induced kinase 1; SGK1) の発現は capsaicin 貼付群と対照であるエタノール貼付群との間で差は無かった (図 2)。視床下部 α ENaC および TNF- α の発現は capsaicin 群で増加していた (図 2)。他の ENaCs や IL-1 β の発現は両群間で差は無かった。resiniferatoxin 貼付群では視床下部 α ENaC および TNF- α の発現は低下傾向であった (P=0.06 および P=0.07, 図 2)。

Capsaicin 貼付群では脳室内へ投与した Na に対する感受性は亢進していた (図 3B)。Capsaicin 貼付群では etanercept 脳室内投与あるいは腹腔内投与によって視床下部 TNF- α および α ENaC の発現レベルは有意に低下した (図 3C)。

3. 3 食塩負荷の効果

5 日間の食塩負荷によって、脳室内 etanercept 投与は食塩負荷による血圧上昇, 心拍数増加, 尿中ノルエピネフリン排泄量増加反応を抑制した (図 4A, B)。また、benzamil 脳室内投与によって同様の反応が認められた

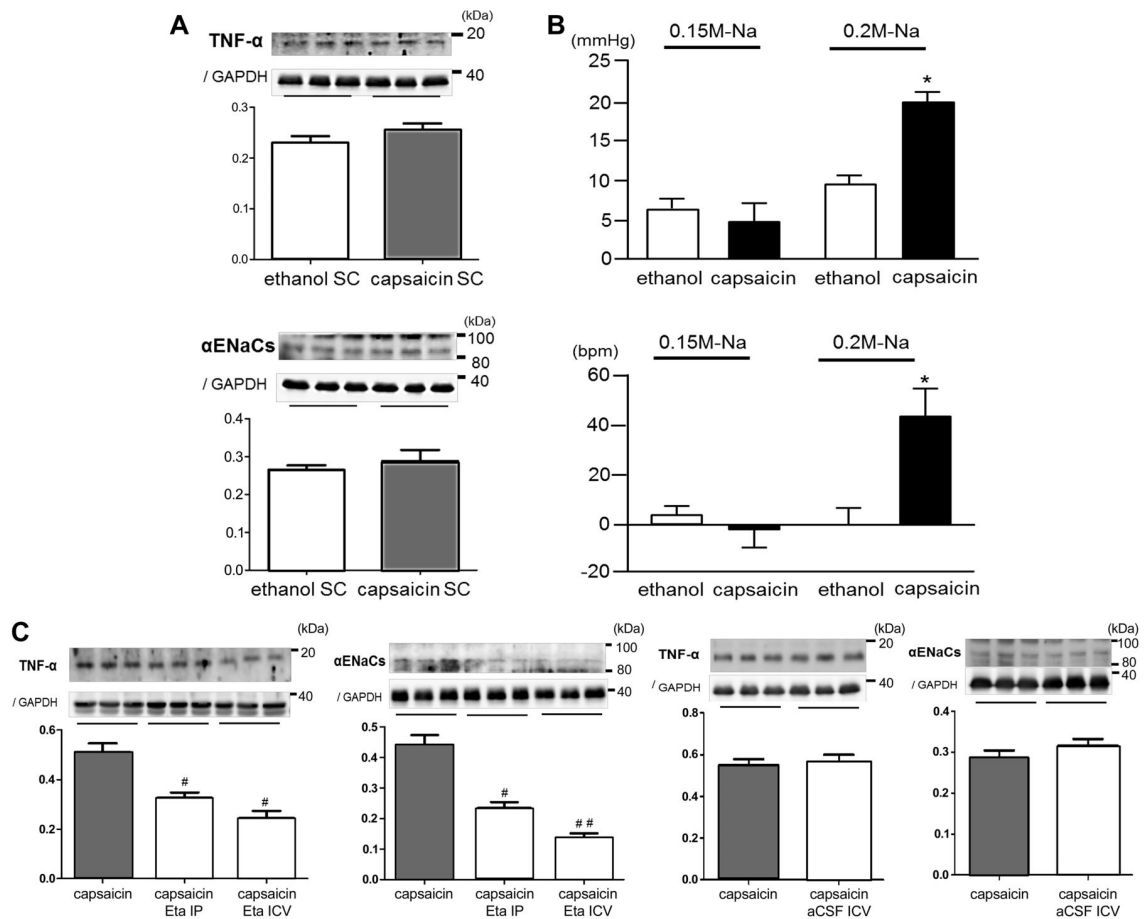


Figure 3. 全身に作用させたカプサイシン (capsaicin SC), TNF- α 阻害薬である etanercept による治療の効果および脳内における Na⁺感受性

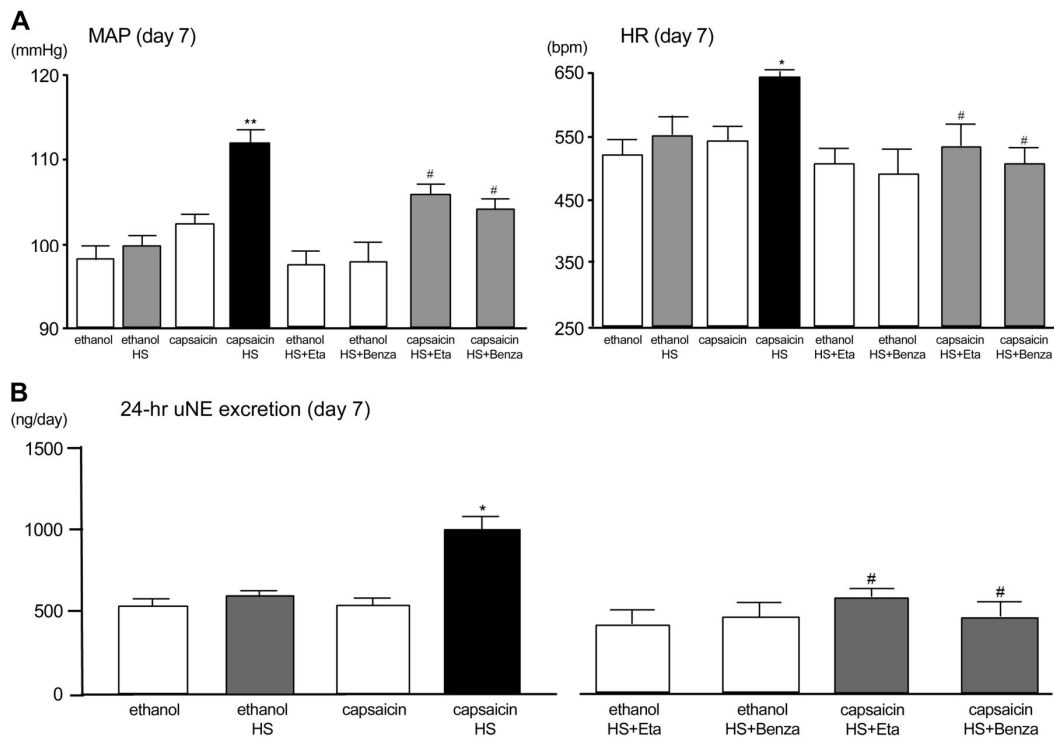


Figure 4. 食塩負荷後の血圧 (AP), 心拍数 (HR), および尿中ノルエピネフリン排泄量 (uNE)

(図 4A, B)。さらに, capsaicin 貼付は食塩負荷による視床下部 α ENaC, SGK1, IL-1 β の発現レベルを増加させた (図 5)。

3. 4 圧負荷マウスにおける検討

圧負荷マウスでは心肥大を生じるが, 8 週間の観察で

心肥大が安定し収縮力が保たれていることを観察した。より長期では心収縮力が低下してくるため, この時期で今後の評価を行うことを決めることができた。TRPV1 ノックアウトマウスではこの肥大形成がかなりの程度で抑制されることを観察した (図 6)。

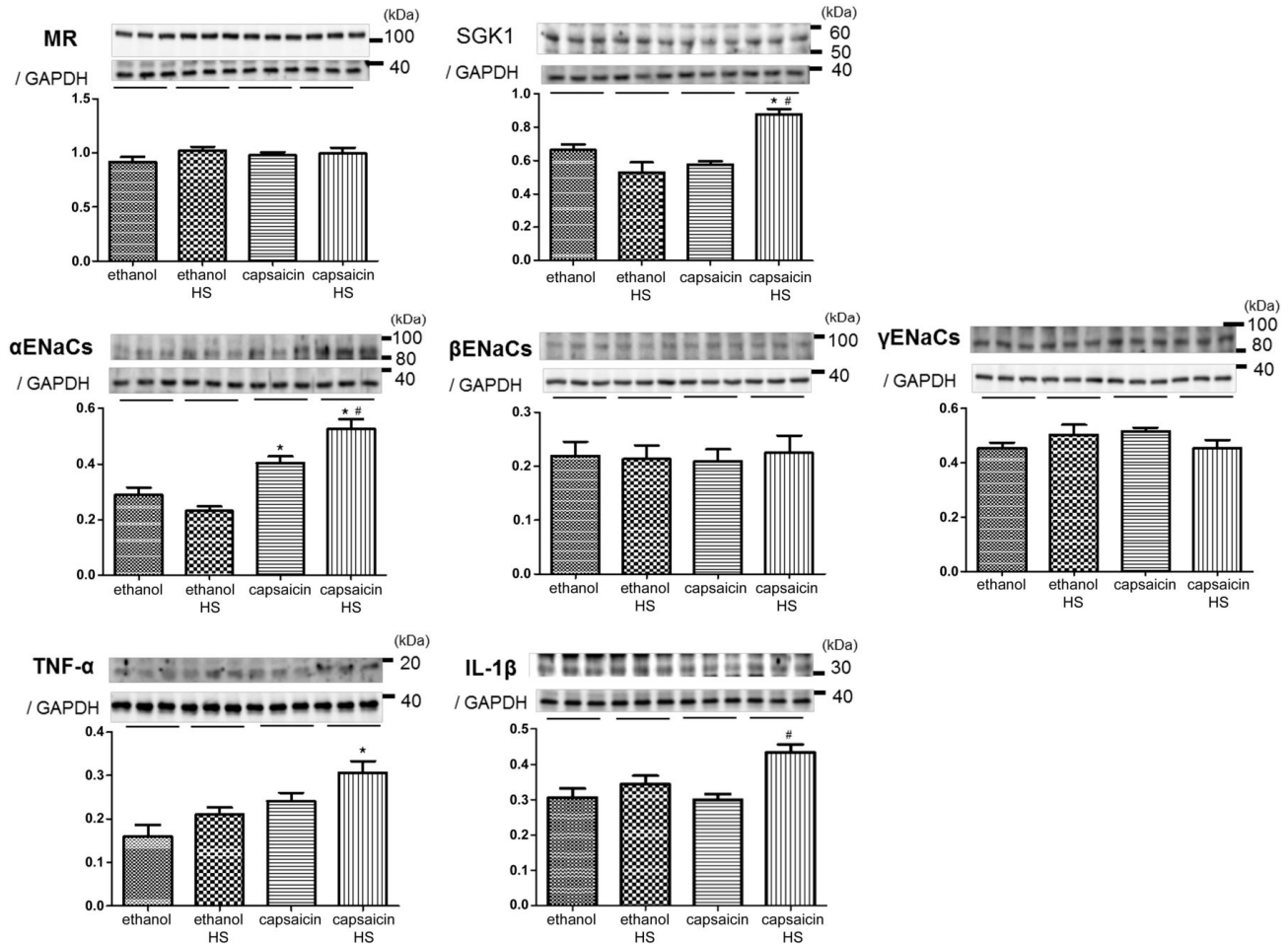


Figure 5. エタノール, カプサイシン投与マウスにおける食塩負荷の視床下部蛋白発現に対する効果

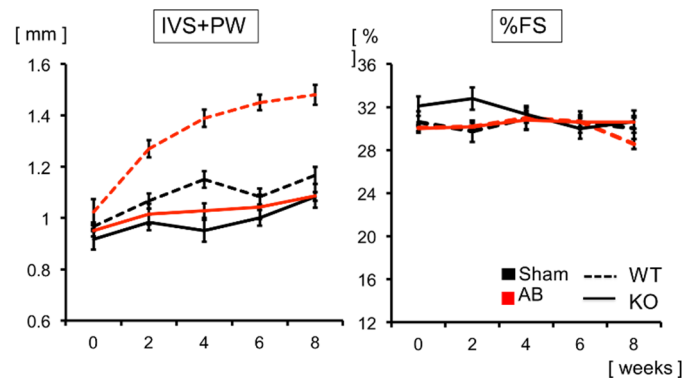


Figure 6. 圧負荷 (aortic banding; AB) による心肥大進行過程. TRPV1 ノックアウトマウス (KO) との比較
 IVS; intraventricular septum, PW; posterior wall, FS; fractional shortening

4. 考察

本研究では, Capsaicin による CSA 刺激が視床下部 α ENaC 発現をアップレギュレートし, 脳室内に投与した高濃度 Na に対する血圧, 心拍数に対する反応を増強すること, 食塩負荷に対する血圧, 心拍数, 尿中ノルエピネフリン排泄量を増加させることを示している。これらの反応は視床下部 TNF- α 発現レベルの増加によって惹起されると考えられる。TNF- α 阻害や ENaCs 阻害によってこれらの反応は減弱した。また, CSA 刺激によって見られた反応は MR の活性化は介していないと考えられる。TRPV1 がいないマウスでは圧負荷による心肥大形成がかなり抑制されることと合わせ, 心臓・脳のコミュニケーションとして心臓の TRPV1 受容体が脳内視床下部 α ENaC 発現増加を介した食塩感受性増強に重要な役割を果たしていることが示唆される。

CSA 活性が増加していることは心不全の重要な特徴である⁽⁹⁻¹¹⁾。心臓からの情報を脳の視床下部へ伝え心臓へ交感神経出力増強によって心機能悪化へ通じる。心不全では食塩感受性が増強していること, 視床下部における炎症性サイトカインを増加させ ENaCs の活性化が生じることも報告してきた⁽³⁻⁶⁾。本研究では CSA 刺激が食塩感受性増強を伴い視床下部 α ENaC を増加させることを示した。ENaC の活性化は血中から脳内への Na 移行や視床下部での Na 濃度上昇から神経細胞興奮性増強へつながることが考えられる。Leenen らは視床下部 ENaCs の変化から内因性ウアバインの変化, そして AT1R 活性化を介して交感神経出力が増強することを示している⁽¹³⁾。また, MR の活性化による変化でないことも興味深い知見である。なぜなら, ENaCs 活性化との関連で MR 活性化が重要であるという報告がなされているからである。ただし, 本研究においても capsaicin に食塩負荷を行うと MR 活性化の指標である SGK1 の発現が増加し, α ENaC 発現はさらなる増加を示していた。したがって, CSA 刺激に食塩増加という環境要因が加わることによって MR の活性化の影響が生じることが示唆される。

本研究における Capsaicin の効果が TRPV1 に作用して生じたことは capsazepine で各反応が抑制できたことから明らかである。また, この反射の経路の重要性は TRPV1 ノックアウトマウスにおける実験で圧負荷による心肥大がかなり抑制されることから強く示唆される。脳と心臓を結びつ

ける要素としては神経性・体液性・細胞性因子がある。食塩感受性増加による交感神経活性化におけるこの仕組みの重要性がわかれば, 何が心臓から脳へ情報を伝え食塩感受性を獲得するののかに関わる機序の解明につながることを期待される。さらに, 臓器間情報連関が着目されている中で Heart-Brain Communication を明確に示すこととなり, この経路を介した HFpEF における食塩感受性の重要性と心臓 TRPV1 を標的とした新規治療法の開発につながることを期待される。

5. 今後の課題

ENaCs の活性化を抑制するため banzamil 脳室内投与によって実験を行ったが, 実際に Na が変化して神経活動興奮性を変えたかについては確認できていない。この詳細な機序解明には実験方法の観点から難しい点がある。また, TRPV1 刺激を介した交感神経活性化が脳内でどのような機序を介して圧負荷心肥大とリンクしているか, 動脈圧受容器反射との関連はどうかなどこれからの重要な課題であると考えられる。

6. 文献など

- 1) Goyal P, Almarzooq ZI, Horn EM, Karas MG, Sobol I, Swaminathan RV, Feldman DN, Minutello RM, Singh HS, Bergman GW, Wong SC, Kim LK. Characteristics of hospitalizations for heart failure with preserved ejection fraction. *Am J Med* 129: 635e15-636e26, 2016.
- 2) Tshichihashi-Makaya M, Hamaguchi S, Kinugawa S, Yokota T, Goto D, Yokoshiki H, Kato N, Takeshita A, Tsutsui H and for the JCARE-CARD Investigators. *Circ J* 73: 1893-1900, 2009.
- 3) Ito K, Hirooka Y, Sunagawa K. Acquisition of brain Na sensitivity contributes to salt-induced sympathoexcitation and cardiac dysfunction in mice with pressure overload. *Circ Res* 104: 1004-1011, 2009.
- 4) Ito K, Hirooka Y, Sunagawa K. 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: 1449-1458, 2010.
- 5) Nakagaki T, Hirooka Y, Matsukawa R, Nishihara M, Nakano M, Ito K, Hoka S, Sunagawa K. Activation of mineralocorticoid receptors in the rostral ventrolateral medulla is involved in hypertensive mechanisms in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 35: 470-476, 2012.
 - 6) Nakano M, Hirooka Y, Matsukawa R, Ito K, Sunagawa K. 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.
 - 7) Ito K, Hirooka Y, Nakano M, Honda N, Matsukawa R, Sunagawa K. Role of hypothalamic angiotensin type 1 receptors in pressure overload-induced mineralocorticoid receptor activation and salt-induced sympathoexcitation. *Hypertens Res* 36: 513-519, 2013.
 - 8) Ito K, Hirooka Y, Sunagawa K. Corticosterone-activated mineralocorticoid receptor contributes to salt-induced sympathoexcitation in pressure overload mice. *Clin Exp Hypertens* 2014.
 - 9) Gao L, Schultz HD, Patel KP, Zucker IH, Wang W. Augmented input from cardiac sympathetic afferents inhibits baroreflex in rats with heart failure. *Hypertension* 45: 1173-1181, 2012.
 - 10) Wang HJ, Wang H, Cornish KG, Rozanski GJ, Zucker IH. Cardiac sympathetic afferent denervation attenuates cardiac remodeling and improves cardiovascular dysfunction in rats with heart failure. *Hypertension* 64: 745-755, 2014.
 - 11) Wang W, Schultz HD, Ma R. Cardiac sympathetic afferent sensitivity is enhanced in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: H812-H817, 1999.
 - 12) Xu B, Chen WW, Fan ZD, Han Y, Xiong XQ, Gao XY, Zhu GQ. Response of neurons in paraventricular nucleus to activation of cardiac afferents and acute myocardial ischemia in rats. *Exp Physiol* 96: 295-304, 2011.
 - 13) Leenen FH. The central role of the brain aldosterone-“ouabain” pathway in salt-sensitive hypertension. *Biochem Biophys Acta* 1802: 1132-1139, 2010.

Elucidation of the Mechanism Involved in Acquisition of Salt Sensitivity in Pressure Overload via Cardiac Sympathetic Afferents

Yoshitaka Hirooka, Koji Ito, Risa Takenaka

Kyushu University

Summary

Hypertensive heart disease is the major cause of heart failure with preserved ejection fraction and reveals elevated sympathetic activity. We featured the role of cardiac sympathetic afferent (CSA) reflex. Therefore, the aim of the present study was to determine whether CSA stimulation could elicit activation of hypothalamic mineralocorticoid (MR)/epithelial Na channels (ENaCs) and inflammatory changes associated with sympathoexcitation evoked by salt loading. Mice with aortic banding were used in the experiments. Epicardial application of capsaicin was performed for CSA stimulation. As a control, epicardial application of ethanol was used. Capsaicin treatment increased expression levels of α ENaC and TNF- α in the hypothalamus. In contrast, MR and SGK1 expression levels did not change. We found that capsaicin treatment augmented increased in arterial pressure, heart rate, urinary norepinephrine excretion after high salt intake for 5 days. Responses to capsaicin were mediated by TRPV1 because a TRPV1 channel antagonist, capsazepine abolished them. In addition, intracerebroventricular (ICV) treatment with etanercept attenuated capsaicin-induced expression levels of α ENaC and TNF- α in the hypothalamus. Also, ICV treatment with etanercept attenuated increases in arterial pressure, heart rate, and urinary norepinephrine excretion. Furthermore, ICV benzamil elicited similar responses. Moreover, capsaicin treatment increased expression levels of α ENaC, SGK1, and IL-1 β in the hypothalamus. These findings indicate that CSA stimulation leads to an upregulation of hypothalamic α ENaC mediated via an increase in TNF- α and results in increased salt sensitivity. We also found that cardiac hypertrophy progressed during 8 weeks after aortic banding, thereafter cardiac function deteriorated. In TRPV1 knockout mice, progression of cardiac hypertrophy was markedly attenuated during the time course, suggesting that CSA stimulation via TRPV1 is responsible for sympathetic activation with progression of cardiac hypertrophy.