

## メタボローム解析技術を応用した食塩過剰摂取による 血管内皮機能障害発症メカニズムの分子薬理学的解明

片岡 智哉<sup>1</sup>, 岸本 大輝<sup>2,3</sup>, 浅野 岳人<sup>4</sup>, 山本 侑佳<sup>4</sup>, 堀田 祐志<sup>4</sup>, 前田 康博<sup>4</sup>,  
金山 博臣<sup>3</sup>, 木村和哲<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大学大学院医学研究科臨床薬理学, <sup>2</sup>徳島赤十字病院泌尿器科,  
<sup>3</sup>徳島大学大学院 医歯薬学研究部泌尿器科学, <sup>4</sup>名古屋市立大学大学院薬学研究科病院薬理学

**概要** 食塩の過剰摂取により, Mineralocorticoid receptor (MR) を介して臓器障害を引き起こすことが報告されており, 心血管障害においても MR が関与しているとの報告がなされている。男性性機能の中でも勃起機能は血管機能との密接な関連性が示されている。そこで本研究では, ラットの男性性機能を指標として食塩の過剰摂取による血管機能障害発症メカニズムを, メタボローム解析技術を応用した分子薬理学的に解明することを目的とした。

本研究では 6 週齢と 8 週齢の雄性 Dahl-S ラットを用い, 0.3%NaCl 食塩食で飼育する Control 群, 高食塩食として 8%NaCl 食で飼育する HS 群, および 8%NaCl 食を負荷した Dahl-S ラットに選択的 MR 阻害薬であるエプレレノン (EPL) を投与する HS+EPL 群の 3 群を作成した。12 週齢の時点で各種の機能評価を行った。

6 週齢の Dahl-S ラットに対して 6 週間食塩を負荷したところ, HS 群で勃起機能の有意な低下が観察された。一方, EPL 投与により, 勃起機能の有意な上昇が観察された。血中のアルギニン代謝物の濃度を UPLC-MS/MS を用いて, メタボローム解析を行ったところ, 食塩負荷により ADMA 濃度および SDMA 濃度が上昇したが, MR を阻害することで改善が見られた。今回, ADMA および SDMA の分解酵素である DDAH の発現量を検討したが, いずれの群でも変化が見られなかった。

8 週齢の Dahl-S ラットに対して 4 週間食塩を負荷したところ, 6 週齢で開始した時と同様に勃起機能の低下が観察され, EPL 投与により有意な改善が観察された。これらのラットの血管内皮機能を評価したところ, 陰茎海綿体においては高食塩の負荷により ACh に対する弛緩反応の有意な低下が観察され, 血管内皮機能の低下が示唆された。一方, MR 阻害薬の投与により ACh に対する反応性が改善し, MR 阻害によるラットの血管内皮機能の改善が示唆された。さらに, 陰茎海綿体における eNOS タンパクについて検討したところ, 食塩負荷により活性型のリン酸化 eNOS 発現量が低下傾向を示し, 食塩の過剰摂取が eNOS を介して血管内皮機能を低下させる可能性が示唆された。また, MR 阻害薬によりリン酸化 eNOS の上昇傾向が観察され, MR を介した経路が eNOS の活性化に影響を及ぼす可能性が示唆された。

一方, 大動脈を用いた検討では, 食塩を負荷しても ACh に対する反応性に変化が見られず, 血管内皮機能に影響は見られなかった。大動脈と陰茎海綿体における反応に差が見られたのは, 大血管系の大動脈に比べ, 末梢血管である陰茎海綿体の方がより早期に血管内皮機能障害が生じたためと考えられる。

### 1. 研究目的

食塩の過剰摂取は高血圧のリスクファクターであることが広く知られている<sup>[1]</sup>。日本人の食塩摂取量は多く, 本邦における高血圧患者は約 4,300 万人と推定される<sup>[2, 3]</sup>。ま

た, 本邦における高血圧に起因する死亡者数は年間約 10 万人であり, 心血管病死亡の約 50%が高血圧に起因するものと推定されている<sup>[4]</sup>。このように本邦において食塩の過剰摂取が高血圧を介して大きな死亡原因となって

いることが考えられる。しかし近年、食塩の過剰摂取が血圧とは別に心臓や血管に障害を引き起こすことが報告されている。フィンランドでの心血管疾患による死亡率の調査結果では、血圧の影響を補正しても、食塩を過剰摂取することにより冠動脈疾患や心血管疾患による死亡危険度及び総死亡危険度が上昇することが示唆された<sup>[5, 6]</sup>。多くの疫学研究やそのメタアナリシスにおいても食塩過剰摂取は心血管疾患リスクを増加することが報告されている<sup>[7-9]</sup>。1966年から2008年の間に行われた13個の前向き研究のメタアナリシスでは、1日の食塩摂取量が5g増加することで心血管疾患の発生危険度が1.17倍(95%信頼区間: 1.02 - 1.34;  $P = 0.02$ )になることが示唆された<sup>[7]</sup>。また、6ヵ月以上の長期の経過観察が行われた4つの介入試験を集めたメタアナリシスや介入試験終了後の長期経過観察研究においても食塩過剰摂取は心血管病リスクを増加することが示されている<sup>[8, 9]</sup>。これらのことから、食塩の過剰摂取自体も心血管疾患などの障害を引き起こすと考えられる。

心血管障害においては鉱質コルチコイド受容体(mineralocorticoid receptor; MR)が関与しているとの報告がなされている。核内受容体であるMRはgenomic作用とnon-genomic作用を有している。Genomic作用ではアルドステロンが細胞質に存在するMRに結合しアルドステロン-MR複合体が核へ移行することで、遺伝子発現を調節し特定のタンパク質の翻訳を調節する<sup>[10, 11]</sup>。腎臓においてMRにアルドステロンが結合することでgenomic作用によりEpithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC)の翻訳が促進され、Na<sup>+</sup>の再吸収促進により血圧が上昇する<sup>[11]</sup>。食事由来の食塩量によって血清アルドステロン量が調整され、腎臓のMRを介して血圧の恒常性が維持されている。しかし近年、食塩を過剰摂取することで、食塩とアルドステロン-MRの間のフィードバック制御の異常が引き起こされ、MRの異常活性化が生じることが報告されている<sup>[5, 12-15]</sup>。このMRの活性化により、高血圧や血管内皮機能障害、心血管障害、腎障害が生じると考えられている。原発性アルドステロン症を対象にした研究では、高食塩の摂取が高血圧や臓器障害の悪化を引き起こし、これらに対しMR阻害薬が改善効果を示したと報告されている<sup>[16, 17]</sup>。さらに、心不全患者に対してMR阻害薬の効果を検討したrandomized aldactone evaluation study (RALES)およびeplerenone

post-acute myocardial infarction heart failure efficacy and survival study (EPHESUS)において、MR阻害薬が心不全に対して有効であったことからMRの活性化は心血管系に悪影響を及ぼすことが示唆された<sup>[18, 19]</sup>。また、血管におけるMRの活性化は酸化ストレス、炎症を惹起し、血管収縮の亢進や動脈硬化を促進させると考えられている<sup>[20]</sup>。

一方、男性性機能の中でも勃起機能は血管機能との密接な関連性が示されている。性的刺激が加わることで、陰茎海綿体への血液流入が増加し、同時に陰茎海綿体からの血液流出が制限されることで陰茎海綿体に血液が貯留し膨張することで勃起が生じる。この生理現象は、陰茎海綿体平滑筋の弛緩によって引き起こされ、陰茎海綿体平滑筋の弛緩には、NO(nitric oxide)/cGMP(cyclic guanosine monophosphate)系が大きく関与している<sup>[21]</sup>。NOがNO作動性神経及び内皮細胞から産生され、平滑筋細胞内のsGC(soluble guanylate cyclase)を活性化させる。sGCはGTP(guanosine triphosphate)からcGMPを産生し、細胞内cGMP濃度の上昇によりCa<sup>2+</sup>濃度が減少し、陰茎海綿体平滑筋が弛緩する。NOは、生体内でNOS(nitric oxide synthase)の作用によりL-アルギニンから産生され、NO作動性神経ではnNOS(neuronal NOS)、内皮細胞においてはeNOS(endothelial NOS)が発現している。また、コリン作動性神経より遊離されるAch(acetylcholine)が内皮細胞上のムスカリン受容体に作用し、eNOSが活性化されNOを産生することが知られている<sup>[22]</sup>。一方、NOの産生量やバイオアベイラビリティが低下することで陰茎海綿体が十分に弛緩できず、勃起障害(erection dysfunction; ED)を発症する<sup>[23, 24]</sup>。ヒト陰茎海綿体組織においてMRの発現が確認されており、食塩の過剰摂取によりMRの活性化を介してEDが生じることが予想される<sup>[25]</sup>。

陰茎海綿体内の血流により勃起が生じることから、EDと心血管疾患は密接な関係にあることが知られている。心血管イベントに対するEDの相対リスクを調べたメタアナリシス<sup>[26]</sup>では、5つの前向きコホート研究と2つの後ろ向きコホート研究が抽出され対象人数は45,558名であり、ED患者の非ED患者に対する心血管イベントの補正相対リスクは1.47(95%信頼区間: 1.29-1.66,  $P < 0.001$ )であった。また、心血管疾患の発現の2-3年前にEDが自覚されることが多いと報告されている<sup>[27-31]</sup>。さらに、EDと心血管疾患はリスクファクターを共有しており<sup>[32]</sup>、大血管系よりも陰茎海

綿体のような微小血管系において早期に内皮機能障害が生じると考えられている。そのため、ED は心血管疾患の重要なマーカーとなりうると考えられており、ED 診療ガイドラインにおいて記載されている<sup>[33]</sup>。

そこで本研究では、ラットの男性性機能を指標として食塩の過剰摂取による血管機能障害発症メカニズムを、メタボローム解析技術を応用した分子薬理的に解明することを目的とした。

## 2. 研究方法

### 2.1 使用動物

6週齢もしくは8週齢の雄性 Dahl salt-sensitive (Dahl-S) ラット (Japan SLC, Inc.) を用いた。Dahl-S ラットは食塩を負荷することで高血圧を発症するモデルラットとして知られている<sup>[13]</sup>。このラットを24時間いつでも自由に餌と水は摂取可能とし、12時間ごとの明暗サイクル下で温度および湿度をコントロールした部屋で飼育した。本研究は、本学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

### 2.2 実験プロトコール

Dahl-S ラットを用いて Control 群、高食塩食 (HS) 群、高食塩食および MR 阻害薬投与 (HS+EPL) 群の3群を作成した。Control 群は通常の食塩食として 0.3% の NaCl を含む飼料での飼育を行った。HS 群では高食塩食として 8% の NaCl を含む飼料での飼育を行った。HS+EPL 群は高

食塩量飼料での飼育を行い、選択的 MR 阻害薬 Eplerenone (ファイザー) を 50 mg/kg もしくは 75 mg/kg で1日1回経口投与した。6週齢で開始したものは6週間、8週齢で開始したものは4週間の観察期間終了後、勃起機能評価または内皮機能評価を行った。

### 2.3 血圧測定

ラットの収縮期血圧を tail-cuff 方式のラット・マウス非観血式自動血圧測定装置 (Softron BP-98-A-L 型) を用いて測定した。ラットを付属の保温器 (Softron THC-31) 内で 37°C に維持し、30分以上安定させた後、収縮期血圧を測定した。1個体につき5回測定し、最高値および最低値を省いた3回の値を評価に用いた。

### 2.4 陰茎海綿体内圧測定による勃起機能評価

勃起機能の評価は図1に示すように、海綿体神経の電気刺激下での ICP の変動を測定することで行った。ラットにガス麻酔システム (Small Animals Apparatus NS-1, 矢沢科学) でイソフルラン (Wako) 吸入による麻酔を掛けた。吸入麻酔はイソフルラン濃度を 4% で導入し、1.5% で維持した。左頸動脈を同定し、PE-50 チューブ (Imamura Co. Ltd) を挿管した。チューブは圧トランスデューサーに繋ぎ平均動脈血圧 (mean arterial pressure; MAP) を測定した。次に左側陰茎脚を露出させた後、PE-50 チューブにコネクした 23G 注射針 (TERUMO) の針を穿刺し、アロンアルファで固定した。PE-50 チューブは圧トランスデューサ

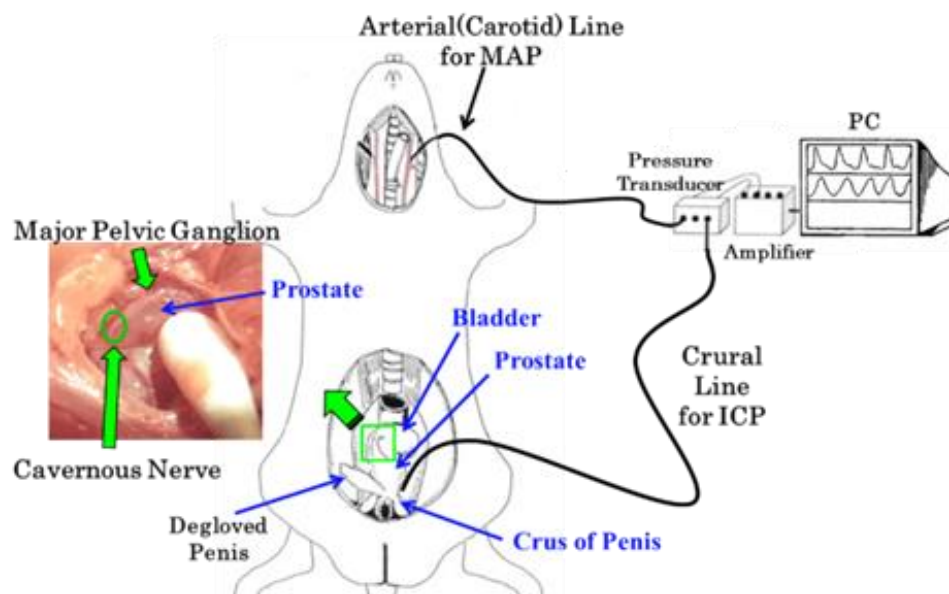


図1. ICP測定法による勃起機能評価の概略

一に繋ぎ、ICP を測定した。チューブ内はいずれも 50 U/ml のヘパリン生理食塩水で満たした。測定には Power-lab 2/26 (ADINSTRUMENTS) を用いた。前立腺の側面に位置する海綿体神経を同定し、海綿体神経を双極型鉤電極(ユニークメディカル)を用いて 1 分間電気刺激を行い、ICP の変動を測定した。刺激は Electronic Stimulator (NIHON KOHDEN) と Isolator SS-202J (NIHON KOHDEN) を用いて 5 V, 1 - 16 Hz, pulse width 5 msec の条件で行った。動脈血圧、ICP は LabChart7 (ADINSTRUMENTS) を用いて記録、解析を行った。ICP の値は動脈血圧にも左右されるため、刺激で生じた最大 ICP の値をそのときの平均動脈血圧 (MAP) の値で除した ICP/MAP にて評価した。

## 2.5 等尺性張力測定による内皮機能評価

吸入麻酔薬イソフルラン (Wako) を高濃度で過麻酔の処置をして安楽死させた直後、大動脈を摘出し、4°C に冷やした Krebs 溶液中で周囲に付着した脂肪組織を取り除き、長さ 2mm 程度に切断しリング標本を作製した。このリング標本をイメージマグナス装置 (IWASHIYA KISHIMOTO MEDICAL INSTRUMENTS) の 2 本のワイヤーに掛け固定した。ワイヤーのうちの 1 本は圧トランスデューサーに接続した。Organ bath 中は Krebs 溶液 (NaCl: 119 mM, KCl: 4.6 mM, CaCl<sub>2</sub>: 1.5 mM, MgCl<sub>2</sub>: 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub>: 15 mM, D-glucose: 11 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.2 mM) 5 mL で満たした。Krebs 液を一定温度に保つために、恒温槽で 37°C に温めた水を organ bath の外側に灌流させた。Organ bath 中には 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 混合ガスを通気させた。大動脈標本に 0.6 g の基礎張力を負荷した後、張力が定常状態に達するまで 1 時間以上安定化させた。80 mM high K<sup>+</sup> Krebs 溶液 (NaCl: 36.7 mM, KCl: 80 mM, CaCl<sub>2</sub>: 2.2 mM, MgCl<sub>2</sub>: 1.2 mM, NaHCO<sub>3</sub>: 25 mM, D-glucose: 14 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.2 mM) を用いて収縮力を確認した後、phenylephrine 10<sup>-6</sup> M で前収縮させ、プラトーに達した時点で sodium nitroprusside (SNP) 及び acetylcholine (ACh) を 10<sup>-10</sup> - 10<sup>-4</sup> M 累積投与し、弛緩反応を測定した。大動脈の張力は圧トランスデューサーを介して、Power lab 4/26 (ADInstruments) データ収録システムで収録し Lab Chart で解析した。

また、陰茎も同様に摘出し、陰茎背静脈と尿道海綿体を取り除き、白膜を剥離し陰茎海綿体のみを用いた。

Organ bath に Krebs 液を 10 ml 注入し、陰茎海綿体の一端をセルフインで、他端を圧トランスデューサーの先端に固定した。同時に、organ bath 内の Krebs 液を一定温度に保つために、恒温槽で 37°C に温めた水を organ bath の外側に灌流させた。Organ bath 内には 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 混合ガスを通気させた。陰茎海綿体標本に 0.6 g の基礎張力を負荷した後、張力が定常状態に達するまで 1 時間以上安定化させた。80 mM high K<sup>+</sup> Krebs 溶液を用いて収縮力を確認した後、noradrenaline 10<sup>-6</sup> M で前収縮させ、プラトーに達した時点で SNP および ACh を 10<sup>-10</sup> - 10<sup>-4</sup> M で累積投与し、弛緩反応を測定した。陰茎海綿体の張力は圧トランスデューサーを介して、Power lab 4/26 データ収録システムで収録し Lab Chart で解析した。

## 2.6 血中アルギニン代謝産物の測定

ラットの血清サンプルおよび検量線溶液 100 µL に重水素で標識した内部標準物質を添加し、0.025% TFA in ACN 600 µL を加え VOLTEX 後、氷上で 15 分間静置した。Methanol 500 µL を加え VOLTEX 後、3,000 g で 10 分間遠心分離し、上清 1,000 µL を分取した。得られた上清を 40°C で窒素乾固し、0.025% TFA in (H<sub>2</sub>O:ACN:MeOH=1:2:2) 100 µL で溶解し、測定用サンプルとしてバイアルにつめた。測定には 5 µL を ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (Acquity UPLC®-MS/MS; Waters) に注入した。UPLC は ACQUITY UPLC Pump (Waters) を使用し、カラムは ACQUITY UPLC® BEH HILIC 1.7 µm (2.1 × 100 mm, Waters) を使用した。MS/MS は Quattro Premier XE (Waters) を ESI positive モードで使用した。移動相は A 液 (0.08% IPCC -水) と B 液 (1%ギ酸-アセトニトリル) を用い、流速 0.3 mL/min とした。グラジエント条件は表 1 に示した。MS/MS の検出は MRM モードで行い、source temperature は 120 °C, cone 電圧は 30 V, collision energy は 17-25 eV とした。各物質の分析条件は表 2 に示した。解析には MassLynx V4.1 (Waters) を用いた。

## 2.7 Real-time PCR 法による測定

摘出したラット大動脈および陰茎海綿体から TriPure Isolation Reagent (Sigma-Aldrich) を用いて添付プロトコールに従い total RNA を抽出した。

得られた total RNA 1 µg から、TaKaRa PCR Thermal Cycler PERSONAL (TaKaRa) を用いて逆転写反応を行っ

表 1. UPLC-MS/MS における移動相の条件

Time (min)	Flow (ml/min)	% A	% B
Initial	0.3	2.0	98.0
1.00	0.3	2.0	98.0
3.00	0.3	25.0	75.0
4.00	0.3	25.0	75.0
4.01	0.3	2.0	98.0

表 2. UPLC-MS/MS における測定物質のイオン化条件

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)
ADMA	202.86	45.80	17
SDMA	202.86	172.00	13
L-NMMA	189.00	70.00	22
L-arginine	174.77	69.70	15
L-citrulline	176.00	159.00	10
D <sub>6</sub> -ADMA	208.86	51.80	17
D <sub>6</sub> -SDMA	208.86	175.00	13
D <sub>3</sub> -L-NMMA	191.80	70.00	22
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> <sup>15</sup> N <sub>4</sub> L-arginine	184.78	74.8	15

た。逆転写反応の条件は 42°C で 20 分間、続けて 99°C で 5 分間行った。得られた cDNA に MiliQ 水を加えて 5 倍希釈し、-20°C で保存した。

各プライマーを用いて、CFX Connect™ Real-Time System (BIO RAD) により real-time PCR を行った。反応は 50°C 2 min, 95°C 10 min の後、95°C 15 sec, 60°C 1 min (40 cycles) の条件で行った。解析は  $\Delta\Delta$ Ct 法を用いて  $\beta$ -actin との比で比較した。

## 2. 8 Western Blotting 法による測定

Phosphatase Inhibitor Cocktail (ナカライタスク) を 1:100 で混合した PRO-PREP™ (iNtRON Biotechnology) を用いて陰茎海綿体のタンパク抽出を行った。陰茎海綿体を PRO-PREP™ 中でホモジナイズし、その後 30 分氷上で静置した。その後、遠心分離し上清を回収しタンパク濃度を BCA Protein Assay Reagent (Pierce Biotechnology) を用いて測定した。回収したサンプルは Laemmli Sample Buffer (Bio Rad) で等量混合し、99°C で 3 分間インキュベートした。

タンパク質 25  $\mu$ g 当量のサンプルを用いて 7.5%

SDS-PAGE gel で泳動し PVDF 膜 (Immobilin) に転写した。転写後の PVDF 膜は、5% skim milk または 5% BSA in 1xTBST (tris-buffered saline tween-20) にて室温で 1 時間ブロッキング処理した。1xTBST にて洗浄後、polyclonal anti-eNOS in 3% BSA, 1xTBST (1:1,000), polyclonal anti-phospho-eNOS (Ser1177) in 3% BSA, 1xTBST (1:1,000), polyclonal anti-Sgk-1 in 3% BSA, 1xTBST (1:1,000) もしくは mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin in 5% skim milk, 1xTBST (1:5,000) にて 4°C で一晩インキュベートした。1xTBST にて洗浄後、anti-rabbit IgG conjugated with horseradish peroxidase in 1xTBST (1:10,000) または anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase in 1xTBST (1:5,000) にて室温で 1 時間インキュベートした。その後、再び 1xTBST にて洗浄し ImmunoStar® LD (Wako) にて発色しバンドを ImageJ 1.43u にて解析した。

## 2. 9 統計処理

測定結果はすべて平均値  $\pm$  標準誤差で表記した。統計解析には ANOVA で解析し Bonferroni-type multiple t-test を用い、危険率 5% 未満を有意と判定した。

### 3. 結果

#### 3.1 6週齢のラットを用いた検討

##### 3.1.1 体重, 収縮期血圧の推移

観察期間終了時における各群の体重および収縮期血圧の測定結果を表3に示した。体重は通常食群と比較して8%食塩食群で最も大きな減少がみられた。これらの体重減少の程度はEPおよびの投与により抑えられた。収縮期血圧は、8%食塩食投与により有意に上昇した。EPを投与しても血圧の低下は観察されなかった。

##### 3.1.2 ICP測定による勃起機能評価

ICP測定の結果を図2に示した。HS群ではControl群に比べ、ICP/MAPが有意に低下した。これに対し、EPLを投与群では、50 mg/kgでは有意な上昇は見られなかったが、75 mg/kgでは有意に上昇した。

##### 3.1.3 血中アルギニン代謝産物濃度の測定

血中アルギニン代謝産物の濃度を図3に示した。ADMA濃度はHS群で有意に上昇し、EPL投与により低

下傾向を示した。SDMA濃度はHS群で有意に上昇し、EPL75mg/kg投与により有意に低下した。一方、L-NMMA濃度はいずれの群でも変化が見られなかった。また、アルギニン濃度も各群間で変化は見られなかったが、シトルリン濃度はHS群で有意に上昇し、EPL投与により有意に低下した。

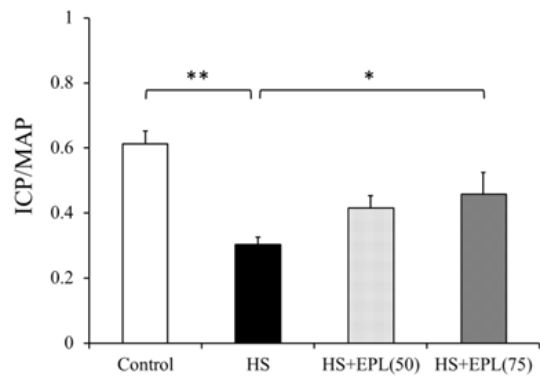


図2. 勃起機能評価

表3. 観察期間終了時の体重および収縮期血圧

	体重(g)	収縮期血圧(mmHg)
Control 群	376.4 ± 7.3	126.2 ± 3.3
HS 群	317.5 ± 10.5**	225.8 ± 3.1**
HS+EPL(50) 群	327.2 ± 5.5**	218.3 ± 8.3**
HS+EPL(75) 群	354.5 ± 6.7**	212.5 ± 6.7**

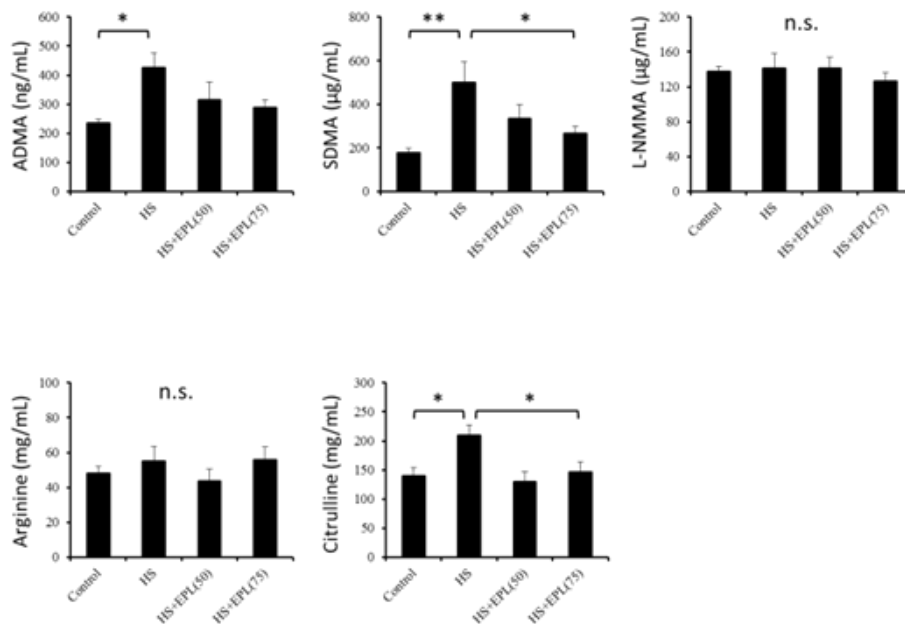


図3. 血中アルギニン代謝産物の濃度

### 3. 1. 4 Real-time PCR 法による評価

陰茎海綿体におけるMR, DDAH1, DDAH2 の mRNA の発現量を図 4 に示した。MR は HS 群で有意に上昇し、EPL を投与しても変化は見られなかった。DDAH1 および DDAH2 はいずれの群でも発現量に変化は見られなかった。

### 3. 2 8 週齢のラットを用いた検討

#### 3. 2. 1 収縮期血圧の推移

各群の収縮期血圧の変化を表 4 に示した。食塩負荷を

行った HS 群, HS+EPL 群では Control 群と比較して有意に上昇した。HS+EPL 群では HS 群と比較して低下が見られたが, Control 群と同程度までは改善しなかった。

#### 3. 1. 2 ICP 測定による勃起機能評価

ICP 測定の結果を図 5 に示した。HS 群では Control 群と比較して ICP/MAP が有意に低下した。また, EPL を投与した HS+EPL 群では HS 群と比較して ICP/MAP が有意に上昇した。

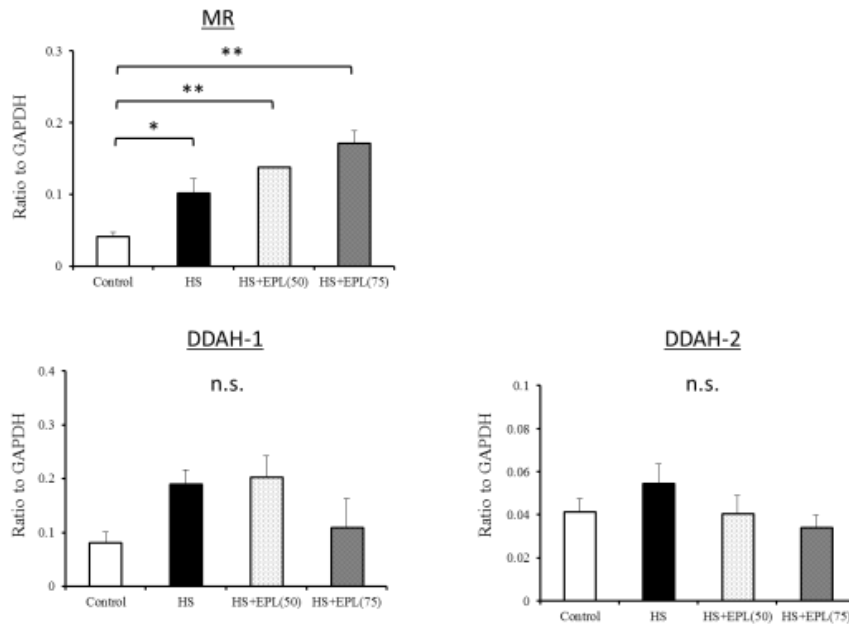


図 4. mRNA 量の測定

表 4. 観察期間終了時の体重および収縮期血圧

	体重(g)	収縮期血圧(mmHg)
Control 群	348.6 ± 2.4	124.1 ± 3.3
HS 群	339.7 ± 2.3	170.4 ± 5.7**
HS+EPL(75) 群	327.8 ± 3.6	161.1 ± 6.5**#

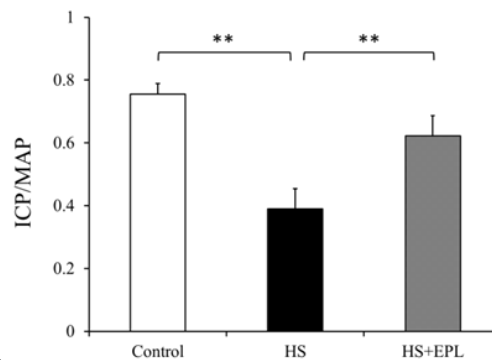


図 5. ICP 測定結果

### 3. 1. 3 大動脈の内皮機能評価

大動脈の内皮機能を等尺性張力測定により評価した。SNP による弛緩反応の結果を図 6B に示した。 $\alpha_1$  agonist で前収縮させた後に SNP ( $10^{-10}$  -  $10^{-4}$  M) を累積投与したところ、濃度依存的な弛緩反応が見られた。Control 群と HS 群の間で有意な差は見られなかった。次に ACh による弛緩反応の測定結果を図 6A に示した。 $\alpha_1$  agonist で前収縮させた後に ACh ( $10^{-10}$  -  $10^{-4}$  M) を累積投与したところ、濃度依存的な弛緩反応が見られた。Control 群と HS 群の間で有意な差は見られなかった。

### 3. 1. 4 陰茎海綿体の内皮機能評価

陰茎海綿体の内皮機能を等尺性張力測定により評価した。SNP による弛緩反応の結果を図 7B に示した。 $\alpha_1$  agonist で前収縮させた後に SNP ( $10^{-10}$  -  $10^{-4}$  M) を累積投

与したところ、濃度依存的な弛緩反応が見られた。3 群間で有意差は見られなかった。ACh による弛緩反応の測定結果を図 7A に示した。 $\alpha_1$  agonist で前収縮させた後に ACh ( $10^{-10}$  -  $10^{-4}$  M) を累積投与したところ、濃度依存的な弛緩反応が見られた。HS 群で弛緩反応は有意に低下し、EPL 投与により有意に上昇した。

### 3. 1. 5 陰茎海綿体におけるタンパク質発現量

Western blotting により得られた各群の代表的なバンドを図 8A に示した。Total eNOS のバンドは 3 群間で大きな差は見られないが、phospho-eNOS (Ser1177) のバンドにおいては HS 群で減少が見られた。eNOS の活性を評価するために解析には phospho-eNOS/total-eNOS の比を用い、図 8B に示した。HS 群で低下傾向を示し、HS+EPL 群で上昇傾向を示した。

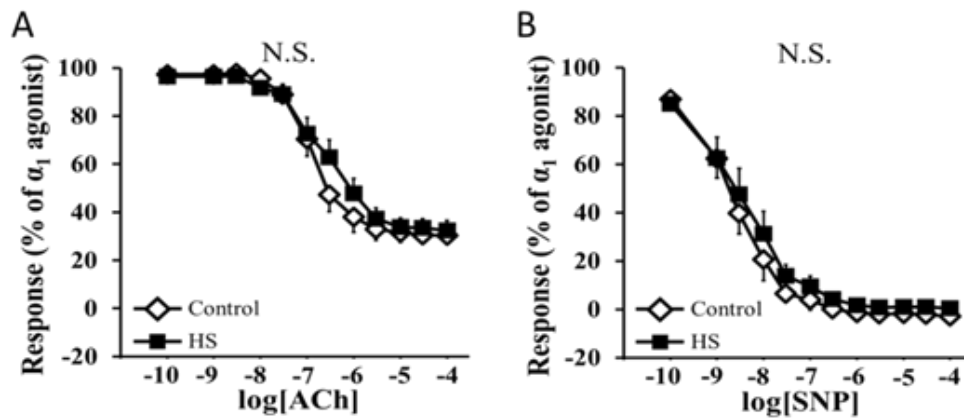


図 6. 大動脈の弛緩反応

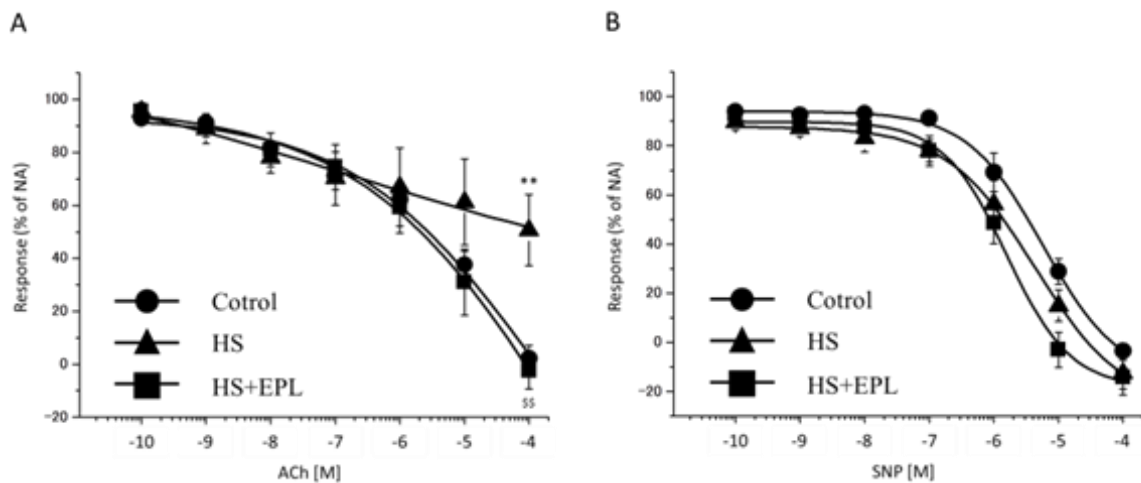


図 7. 陰茎海綿体の弛緩反応



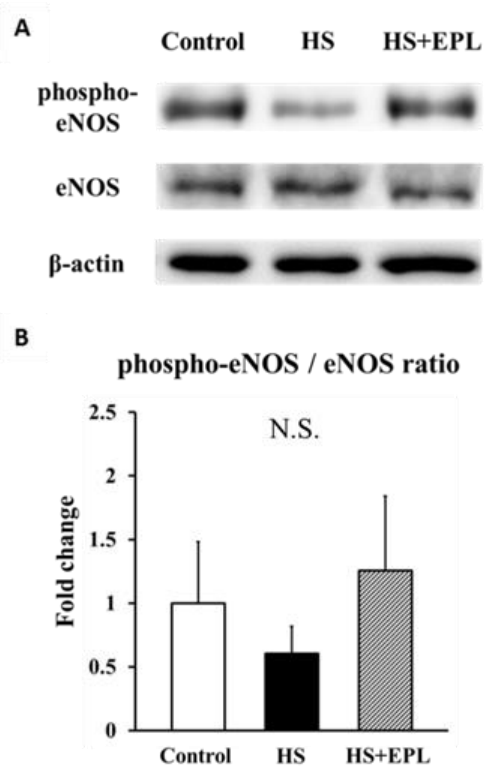


図 8. タンパク量の測定

#### 4. 考 察

近年、食塩の過剰摂取が MR を介して組織障害を引き起こすことが報告されているが、男性性機能に関する検討はなされていない。本研究では食塩感受性モデルラットを用いて、食塩の過剰摂取による MR を介した男性性機能への影響を内皮機能に着目して検討した。

6 週齢の Dahl-S ラットを用いて、6 週間食塩負荷を行ったところ、勃起機能の低下が観察された。これに対し、選択的 MR 阻害薬である EPL を投与することにより、濃度依存的に勃起機能の改善が観察された。興味深いことに、今回の 50 mg/kg および 75 mg/kg の投与量ではラットの血圧に変化を生じず、勃起機能を改善することが明らかとなった。また、血中のアルギニン代謝物の濃度を UPLC-MS/MS を用いて、メタボローム解析を行ったところ、食塩負荷により ADMA 濃度および SDMA 濃度が上昇したが、MR を阻害することで改善が見られた。今回、ADMA および SDMA の分解酵素である DDAH の発現量を検討したが、いずれの群でも変化が見られなかった。今後はアルギニン代謝物の産生経路等への影響を検討する必要があると思われる。

今回の検討において、6 週齢の Dahl-S ラットを用いて食塩負荷の検討を行ったが、5 週目前後から衰弱するラットが出現するようになった。そのため、食塩負荷の開始時期を 2 週間遅らせ、さらに検討することにした。また、EPL の効果が濃度依存的であったため、EPL の投与量を 75 mg/kg で行うことにした。

8 週齢の Dahl-S ラットに対して 4 週間食塩を負荷したところ、6 週齢で開始した時と同様に勃起機能の低下が観察され、EPL 投与により有意な改善が観察された。これらのラットの血管内皮機能を評価したところ、陰茎海綿体においては高食塩の負荷により ACh に対する弛緩反応の有意な低下が観察され、血管内皮機能の低下が示唆された。一方、MR 阻害薬の投与により ACh に対する反応性が改善し、MR 阻害によるラットの血管内皮機能の改善が示唆された。さらに、陰茎海綿体における eNOS タンパクについて検討したところ、食塩負荷により活性型のリン酸化 eNOS 発現量が低下傾向を示し、食塩の過剰摂取が eNOS を介して血管内皮機能を低下させる可能性が示唆された。また、MR 阻害薬によりリン酸化 eNOS の上昇傾向が観察され、MR を介した経路が eNOS の活性化に影響を及ぼす可能性が示唆された。

一方、大動脈を用いた検討では、食塩を負荷しても ACh に対する反応性に変化が見られず、血管内皮機能に影響は見られなかった。大動脈と陰茎海綿体における反応に差が見られたのは、大血管系の大動脈に比べ、末梢血管である陰茎海綿体の方がより早期に血管内皮機能障害が生じたためと考えられる。

#### 5. 引用文献

- Intersalt Cooperative Research Group. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. *BMJ*. 1988;297:319-28.
- Stamler J, Elliott P, Chan Q. INTERMAP appendix tables. *J Hum Hypertens*. 2003;17:665-75.
- Miura K, Nagai M, Ohkubo T. Epidemiology of hypertension in Japan. *Circ J*. 2013;77:2226-31.
- Fujiyoshi A, Ohkubo T, et al. Observational Cohorts in Japan (EPOCH-JAPAN) Research Group. Blood pressure categories and long-term risk of cardiovascular

- disease according to age group in Japanese men and women. *Hypertens Res.* 2012;35:947-53.
5. Tuomilehto J, Jousilahti P, Rastenyte D, Moltchanov V, Tanskanen A, Pietinen P, Nissinen A; Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: a prospective study. *Lancet.* 2001;357(9259):848-51.
  6. 国立研究開発法人国立循環器病研究センター <http://www.ncvc.go.jp/cvdfinfo/pamphlet/bp/pamph110.html>
  7. Strazzullo P, D'Elia L, Kandala NB, Cappuccio FP. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: metaanalysis of prospective studies. *BMJ.* 2009;339:b4567.
  8. He FJ, MacGregor GA. Salt reduction lowers cardiovascular risk: meta-analysis of outcome trials. *Lancet.* 2011;378:380-2.
  9. Cook NR, Cutler JA, et al. Long term effects of dietary sodium reduction on cardiovascular disease outcomes: observational follow-up of the trials of hypertension prevention (TOHP). *BMJ.* 2007;334:885-8.
  10. Arriza JL, Weinberger C, et al: Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science.* 1987;237:268-75,
  11. Rogerson FM, Fuller PJ. Mineralocorticoid action. *Steroids.* 2000;65:61-73
  12. He FJ, MacGregor GA. Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;(3):CD004937.
  13. Lüscher TF, Raji L, Vanhoutte PM. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive Dahl rats. *Hypertension.* 1987;9(2):157-63.
  14. Bibbins-Domingo K, et al. Projected effect of dietary salt reductions on future cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2010;362(7):590-9.
  15. Cianciaruso B, et al. Salt intake and renal outcome in patients with progressive renal disease. *Miner Electrolyte Metab.* 1998;24(4):296-301..
  16. Rossi GP, Sechi LA, Giacchetti G, Ronconi V, Strazzullo P, Funder JW. Primary aldosteronism: cardiovascular, renal and metabolic implications. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19(3):88-90.
  17. Nagase M, Matsui H, Shibata S, Gotoda T, Fujita T. Salt-induced nephropathy in obese spontaneously hypertensive rats via paradoxical activation of the mineralocorticoid receptor: role of oxidative stress. *Hypertension.* 2007;50(5):877-83.
  18. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, Palensky J, Wittes J: The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 1999;341:709-17.
  19. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, Bittman R, Hurley S, Kleiman J, Gatlin M: Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2003;348:1309-21.
  20. McCurley A, Jaffe IZ: Mineralocorticoid receptors in vascular function and disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;350:256-65.
  21. Burnett AL: Novel nitric oxide signaling mechanisms regulate the erectile response. *Int J Impot Res.* 2004;16:S15-19.
  22. George F, Lasker, Edward A. Pankey, Philip J. Kadowitz. Modulation of Soluble Guanylate Cyclase for the Treatment of Erectile Dysfunction. *Physiology.* 2013;28(4):262-9.
  23. NIH Consensus Development Panel on Impotence. *JAMA.* 1993;270:83-90
  24. Lizza EF, Rosen RC. Definition and classification of erectile dysfunction: report of the nomenclature committee of the International Society for Impotence Research. *Int J Impot Res.* 1999;11:141-3.
  25. Kishimoto T, Fukawa T, Yamaguchi K, Yamamoto Y, Nakatsuji H, Izaki H, Takahashi M, Fukumori T, Kanayama HO. Mineralocorticoid receptor expression in human penile corpus cavernosum. *J Med Invest.* 2013;60(1-2):21-6.
  26. Guo W, Liao C, Zou Y, Li F, Li T, Zhou Q, Cao Y, Mao

- X. Erectile dysfunction and risk of clinical cardiovascular events: a meta-analysis of seven cohort studies. *J Sex Med.* 2010;7:2805-16
27. Montorsi F, Briganti A, et al. Erectile dysfunction prevalence, time of onset and association with risk factors in 300 consecutive patients with acute chest pain and angiographically documented coronary artery disease. *Eur Urol.* 2003;44:360-5
28. Montorsi P, Ravagnani PM, et al. Association between erectile dysfunction and coronary artery disease. Role of coronary clinical presentation and extent of coronary vessels involvement: the COBRA trial. *Eur Heart J.* 2006;27:2632-9
29. Hodges LD, Kirby M, Solanki J, O'Donnell J, Brodie DA. The temporal relationship between erectile dysfunction and cardiovascular disease. *Int J Clin Pract.* 2007;61:2019-25
30. Shi H, Zhang FR, Zhu CX, Wang S, Li S, Chen SW. Incidence of changes and predictive factors for sexual function after coronary stenting. *Andrologia.* 2007;39:16-21
31. Foroutan SK, Rajabi M. Erectile dysfunction in men with angiographically documented coronary artery disease. *Urol J.* 2007;4:28-32.
32. Kloner RA. Erectile dysfunction and cardiovascular risk factors. In: Kloner RA ed. Heart disease and erectile dysfunction. Totowa, NJ, USA: *Humana Press Inc.*, 2004:39-49.
33. ED 診療ガイドライン 2012 年版(リッチヒルメディカル). 2012

## Investigation of High Salt Induction on Endothelial Function Using Metabolomic Analysis

Tomoya Kataoka<sup>1</sup>, Tomoteru Kishimoto<sup>2,3</sup>, Taketo Asano<sup>1</sup>, Yuka Yamamoto<sup>1</sup>, Yuji Hotta<sup>1</sup>,  
Yasuhiro Maeda<sup>1</sup>, Hiroomi Kanayama<sup>3</sup>, Kazunori Kimura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Nagoya City University, <sup>2</sup>Tokushima Red Cross Hospital, <sup>3</sup>Tokushima University

### Summary

High salt intake is considered as a risk factor for cardiovascular diseases including erectile dysfunction through mineralocorticoid receptor (MR) activation, however, the mechanisms underlying high salt intake on erectile function remain unclear. We investigated whether high salt intake directly impair erectile function and whether MR inhibition protect erectile function from high salt intake.

Male Dahl salt-sensitive (Dahl-S) rats were distributed into 3 groups: normal salt (0.3% NaCl) diet (Control), high salt (8% NaCl) diet (HS), and high salt plus eplerenone (HS+EPL). In the HS+EPL group, rats received daily oral doses of EPL.

Erectile function using intracavernosal pressure (ICP) and mean arterial pressure (MAP) measurements after electrical stimulation of the cavernous nerve. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels using ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Endothelial function was measured using isometric tension as previously reported.

In the HS group, the ICP/MAP ratio significantly was decreased. Serum ADMA was increased. The HS group exhibited significantly lower responses to ACh, as compared to those in the control group. However, EPL administration significantly improved each of these parameters.

Normal salt (0.3% NaCl) diet did not change the blood pressure in Dahl-S rats, whereas high salt (8% NaCl) diet increased the blood pressure. In this study, erectile function was impaired in high salt intake Dahl-S rats. The high salt diet also caused hypertension. On the other hands, EPL administration improved the erectile function in high salt intake Dahl-S rats. However, EPL did not change the blood pressure in high salt intake Dahl-S rats. Some reports also showed EPL administration did not change the blood pressure in high salt intake Dahl-S rats. In conclusion, high dietary salt intake impaired erectile function and enhanced MR expression in Dahl-S rats. Selective MR inhibitor improved erectile function without changing blood pressure. These results indicate that high salt intake caused ED through MR pathway beyond its effect on blood pressure.