

食塩感受性高血圧における交感神経活動を介した抵抗血管機能不全とサイクリック GMP 依存性プロテインキナーゼ(PKG1 α)の役割

中村 太志

熊本大学病院医療情報経営企画部

概要

一酸化窒素やナトリウム利尿ペプチドは、サイクリック GMP (cGMP) の生成を介し、ナトリウム利尿や血管弛緩作用を發揮する。PKG1 α は、cGMP のエフェクター分子であり、cGMP の結合により活性化するホモ二量体のリン酸化酵素である。しかし、cGMP 結合ドメインの近位端に位置する 42 番目のシステイン (C42) が酸化されると、分子内にジスルフィド架橋が形成され機能が変化する。この PKG1 α レドックス制御機構は抵抗血管レベルの細小血管の平滑筋弛緩に関わり、C42 の酸化が体血圧を下げることで報告されている。食塩感受性における PKG レドックス制御機構の意義は不明だが、筆者らは高食塩で飼育したマウス腎組織内に PKG1 α ジスルフィド二量体が発現することを初めて確認している。また、C42 が特異的に酸化されると、ナトリウムを排泄するためにより高い血圧上昇が必要になり、食塩感受性亢進の機序に交感神経系の賦活化が関与していることがわかってきた。

今回我々は、腎臓交感神経除神経 (RDN) のモデルマウスを作製し、またヒトの野生型 PKG1 α (PKG1 α ^{WT}) および C42 をセリンに置換したレドックス非感受性の PKG1 α (PKG1 α ^{C42S}) を遺伝子導入した HEK 細胞を用いて、交感神経系賦活化における PKG1 α レドックス制御機構の意義を検討した。高塩食で飼育した PKG1 α ^{WT} での圧-ナトリウム利尿曲線の傾きは、PKG1 α ^{C42S} と比べて低下しており、ナトリウムを排泄するために高い血圧上昇が必要だったが、RDN によりその傾きは PKG1 α ^{C42S} と同レベルまで改善した。一方、PKG1 α ^{C42S} では RDN 群と Sham 群で傾きは変わらず、急峻のままであった。また、尿中ノルエピネフリン (NE) 値や腎臓組織内の NE 含有量は、高塩食飼育により PKG1 α ^{WT} でのみ有意な増加を認めしたが、RDN すると減少した。酸化型 PKG1 α における交感神経系賦活化の関与が再現性をもって示された。腎交感神経の求心路と遠心路における PKG1 α の分布を確認するため、マウス組織を用いて免疫組織学検査で評価した。求心路を束ねる後根神経節に PKG は共局在しており、腎皮質の抵抗血管に沿って神経が網状に走行していることを確認した。腎交感神経求心路や遠心路に分布する PKG1 α は、血管での直接作用だけでなく、神経を介し抵抗血管の機能調節に関わっていることが示唆された。神経活動における PKG の意義を検討するため、神経の活性化により早期に誘導される c-fos の遺伝子発現を HEK 細胞で確認した。PKG1 α を導入発現させた細胞では、導入しなかった細胞と比べ、c-fos の発現が増加した。また、PKG1 α を導入した細胞を NE で刺激すると c-fos の発現が有意に増強したが、両群間で差を認めなかった。PKG の発現や活性レベルの増加は、NE 刺激による IEGs の発現増強に寄与する一方で、PKG1 α 酸化による交感神経過活動の機序にシナプス後ニューロンでの反応性亢進は関与していないことが示唆された。シナプス前ニューロンでの解析結果が待たれる。

C42 を介す PKG ジスルフィド二量体の形成は、交感神経系の賦活化を介し食塩感受性の亢進に寄与していると考えられた。

1. 研究目的

食塩感受性高血圧は、腎臓におけるナトリウム排泄障害が先行することで、血液循環量の増加と心拍出量の増加により発症するとされている⁽¹⁾。そのため長期的には、血圧の恒常性を保つための機序として、細小血管レベルにおいて血管抵抗を下げるために弛緩反応が代償的に起こっていると考えられている^(2,3)。しかし、食塩摂取による血圧の上昇にナトリウム排泄障害が目立たないケースは多く、逆に血管抵抗が増加している場面に遭遇する。昨今、食塩感受性高血圧の代替的な機序として、「抵抗血管における機能不全」^(2,4,5)を主体としたメカニズムが注目されている。一酸化窒素(NO)やナトリウム利尿ペプチドは、細胞内セカンドメッセンジャーであるサイクリック GMP (cGMP)の生成を介し、ナトリウム利尿や血管平滑筋の弛緩作用を発揮している。そのため、細胞内 cGMP レベルの増加は食塩感受性高血圧の有効な治療戦略として期待される。実際、内皮型の NO 合成酵素を欠かさせたマウスでは、余剰のナトリウムを尿中へ排泄するためにより高い血圧上昇が必要(食塩感受性)になることが知られている^(6,7)。一方、予想に反し、ナトリウム利尿ペプチドの受容体である膜型グアニル酸シクラーゼを欠失(NPR-A)させた場合には食塩に抵抗性⁽⁸⁾となることが報告されており、二大経路の cGMP シグナルには格差が存在するにもかかわらず、解明されていない部分は多い。我々は、この cGMP のシグナル格差に、cGMP の主要なエフェクター分子であるプロテインキナーゼ(PKG1 α)⁽⁹⁾が中心的な役割を果たしていると考え、食塩感受性における意義検討を進めている。

交感神経系の賦活化は食塩感受性高血圧や腎臓病の進展と密接に関連しているが、腎交感神経系の経路は求心路から遠心路のシナプス終末に至るまで実に距離は長くまた複雑である。通常、腎臓の小葉間動脈や輸入細動脈、糸球体内圧における圧感知を契機とした圧受容体刺激は、求心性神経のインパルスとして L1 ~ 3 腰椎レベルの後根神経節に収束したあと脊髄の後角に入ることが想定されている。脊髄後角に入力されたシグナルは、交叉して脊髄視床路を上行し血管運動中枢の脳幹部へと伝達されるが、交感神経も一部で同じ経路を辿っておりシグナルを共有することが知られている。延髄からの血管運動神経は、胸腰髄の側柱から出た神経線維が直接か途中で神

経細胞を変えて全身の血管に分布しており、交感神経である血管収縮神経が常に活動することで細動脈の血管緊張の恒常性を維持している。PKGは求心神経が脊髄に入る手前の後根神経節や感覚神経などに発現していることが報告されているが⁽¹⁰⁾、腎交感神経の求心路や遠心路における役割や意義は不明である。

昨今、PKG1 α の活性調整機構として、cGMP に依存しないレドックス制御機構が報告され⁽¹¹⁻¹³⁾、その意義が注目されている。ヒトの PKG には 2 つのアイソフォームがあり、肺や心血管組織に豊富に発現する PKG1 α に特異的なアミノ酸配列である 42 番目のシステイン(C42)が酸化されると、分子内にジスルフィド架橋を形成し、ジスルフィド二量体化することが知られている。このジスルフィド二量体は、抵抗血管レベルの小血管において、cGMP 非依存性に血管を弛緩させることが報告されている^(13,14)。筆者の研究により、このジスルフィド二量体が腎臓でも初めて確認され、興味深いことに、C42 酸化が交感神経系の賦活化を伴い食塩感受性の発症に寄与していることがわかってきた。本研究でも従来のナトリウム排泄障害説とは違い、抵抗血管における機能不全を介す食塩感受性惹起のメカニズムが示唆されており、PKG1 α の酸化と腎交感神経系の過活動を結ぶ未知の機序解明が必要と考える。本研究は、一連の研究結果に基づき、腎交感神経除神経モデル、および C42 をセリンに置換したレドックス非感受性 PKG1 α を導入発現させた細胞モデルを用い、交感神経過活動における PKG1 α レドックス制御機構の意義解析を通じ、食塩感受性高血圧の機序解明と PKG の標的有用性の明確化を目的とする研究である。

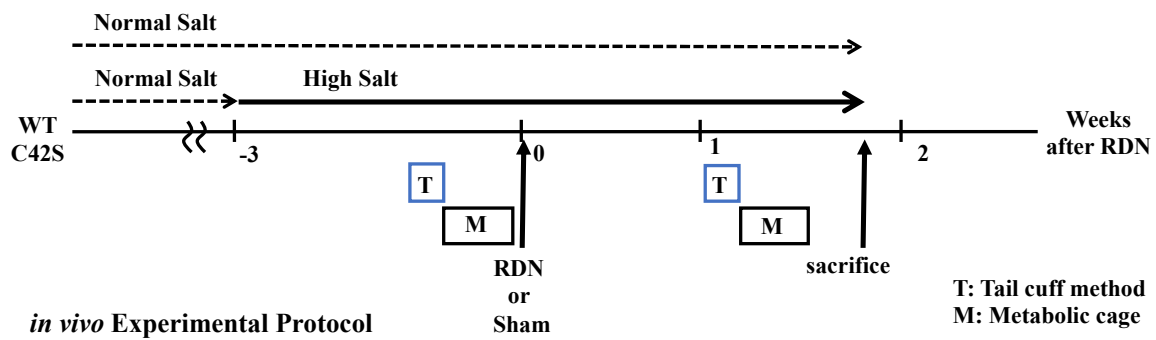
2. 研究方法

2.1 動物マウス

- C42 をセリンに置換したレドックス非感受性 PKG1 α マウス(PKG1 α ^{C42S})
- PKG1 α ^{C42S} と同腹子の野生型 PKG1 α マウス(PKG1 α ^{WT})

2.2 動物実験プロトコール

C42 をセリンに置換させたレドックス非感受性 PKG1 α (PKG1 α ^{C42S}) のノックインマウスに高塩食(8%)飼育を 3 週間行った後、腎交感神経除神経術(RDN)または偽手術(Sham)を行った。手術前と、RDN による有意な降圧効果



が持続する手術 1 週間後の時点で、血圧とナトリウム排泄量を評価し、圧-ナトリウム利尿の推移を野生型マウス ($PKG1\alpha^{WT}$) と比較した。正常食塩食 (0.3%) 飼育のマウスにも同様のプロトコールで実験を行った。本研究は、熊本大学動物実験計画の審査承認 (A30-083) を得て、熊本大学動物資源開発施設 CARD にてヘテロの C42S ノックインマウス同士で繁殖させ、3 ヶ月齢時のマウスを用いて行った。

2. 3 腎交感神経除神経術 (RDN)

2% イソフルラン麻酔下に腹臥位で体位を確保し、皮膚を除毛後、正中切開した。脊柱起立筋の筋膜に切開を加え、後腹膜に侵入。脂肪組織等の周囲をペアンで剥離し、腎動脈を確保した上で可視可能な神経を鋭的に切離した。次に、純エタノールを溶媒とした 10% フェノールを動脈周囲に塗布し、十分に生理食塩水で洗浄した。対側も同様に処置し、4-0 ナイロン糸で皮膚を縫合して手技を終了した⁽¹⁵⁾。偽手術は皮膚の切開と縫合のみで終了した。

2. 4 代謝ケージ

室温 24 度の換気設定にて 12 時間周期に自動で明暗管理された環境で、マウスを単独飼育用代謝ケージ (TECNIPLAST) で飼育した⁽⁶⁾。飼育中の飲水量や食餌量は連日計測し、糞の混入を避けながら 24 時間採尿を行った。

2. 5 ノルエピネフリン測定

Noradrenaline Research ELISA (BA E-5200, LDN 社) を用いて、代謝ケージで採尿したサンプル中のノルエピネフリン (NE) 濃度を測定した。また、腎臓組織を 0.01 M の塩酸 (1 mM エチレンジアミン四酢酸 (343-01861, 富士フィルム和光純薬株式会社), 4 mM メタ亜硫酸ナトリウム

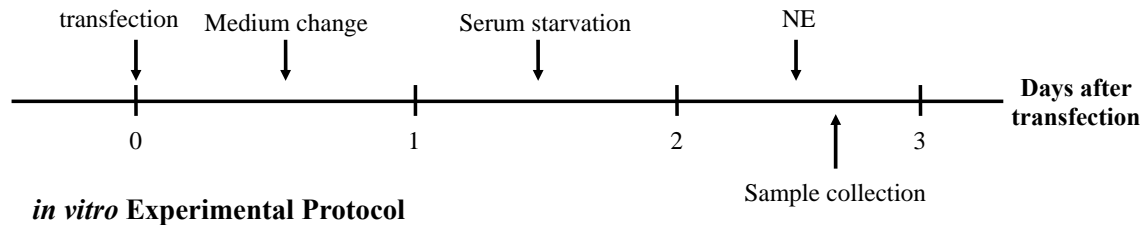
(197-02365, 富士フィルム和光純薬株式会社)) でホモジナイズし、同様に腎臓組織中の NE 濃度を測定した。

2. 6 免疫組織化学検査

$PKG1\alpha^{WT}$ の腎臓及び後根神経節を 4% パラホルムアルデヒドで 4°C, 24 時間固定後、パラフィン包埋ブロックを作製し、3 μm で薄切した。スライドを脱パラフィン後、蒸留水で洗浄。10 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (102189, 株式会社 LSI メディエンス, 0.05% Tween20 (P2287, SIGMA-ALDRICH)) の入ったマイクロウェーブ耐性のプラスチック製染瓶にスライドを静置し、マイクロウェーブを 500 W 5 分で 4 回作動させ、抗原賦活化を行った。スライドは室温で徐々に冷却した後に、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) の入った洗浄瓶で 5 分間静置。浸潤箱の中で、0.2% サポニン (30502-42, ナカライテスク株式会社) を添加した 3% ウシ血清アルブミン (A2153, SIGMA-ALDRICH) で室温 70 分間ブロッキングした。抗 αSMA 抗体 (ab7817, abcam, 希釈濃度 1:200) と抗 βIII チュブリン抗体 (ab18207, abcam, 希釈濃度 1:800)、および抗 $PKG1\alpha$ 抗体 (13511S, Cell Signaling TECHNOLOGY, 希釈濃度 1:200) と抗 βIII チュブリン抗体 (ab78078, abcam, 希釈濃度 1:800) をそれぞれに混ぜた一次抗体でスライドを 4°C 一晩反応させた後、PBS で洗浄 (5 分 x 3 回)。蛍光標識二次抗体 (Alexa Fluor, Thermo Fisher Scientific) で検出し、レーザー走査型顕微鏡 (FV1200, Olympus Life Science) を用いて二重染色像をイメージングした。

2. 7 細胞培養実験プロトコール

10% FBS (SV30014.03, Hyclone) と 1% Penicillin-Streptomycin (168-23191, 富士フィルム和光純薬株式会社) を添加した Dulbecco's Modified Eagle



Medium (DMEM, 11885092, Gibco™)で HEK-293T を培養。播種した HEK-293T が 70%コンフルエントになった対数増殖期に、Lipofectamine 3000 (L3000008, Invitrogen™)を用いて FLAG タグを融合したヒトの PKG1α^{WT} または PKG1α^{C42S} を遺伝子導入⁽¹⁾し、12 時間後に培地交換した。トランスフェクション翌日より serum starvation し、24 時間後に 100 nM のノルエピネフリン NE (A7257, SIGMA-ALDRICH) で 30 分間刺激し、Buffer RLT Lysis Buffer (79216, QIAGEN) で細胞を回収した。

2. 8 RNA 抽出, リアルタイム PCR

HEK-293T から RNeasy Fibrous Mini Kit (74704, Qiagen)を用いて total RNA を抽出した。精製した RNA は PrimeScript RT-PCR システムで逆転写した。鋳型 DNA は下記の特異的な相補塩基配列プライマーと SYBR Green を用いて増幅し、PCR 反応中の増幅産物をリアルタイムにモニタリングした。発現量は 18S で補正し、相対的に定量した。Human c-fos Forward; 5'-TGC CTC TCC TCA ATG ACC CTG A -3', Reverse; 5'-ATA GGT CCA TGT CTG GCA CGG A-3'

2. 9 統計解析

データはすべて平均値±標準偏差で表示。また、尿中 NE 排泄量、腎臓組織中 NE 含量、HEK-293T の c-fos 発現量は、Two-way ANOVA にて高塩食飼育や RDN, NE 刺激による影響と PKG1α の遺伝子型の影響に交互作用があるか検定し、交互作用が有意な場合は群間で比較を行った。各群のサンプルサイズはそれぞれの Figure 内に記載した。統計解析は GraphPad Prism Version 7 を用いて行い、有意水準 5% で検定した。

3. 研究結果

3. 1 PKG1α 酸化で惹起された食塩感受性の亢進は RDN により緩和された

縦軸にナトリウム排泄量、横軸に血圧をプロットした圧-利尿の近似直線を描くと、PKG1α^{C42S} と比べ、PKG1α^{WT} では傾きが緩やかになり、ナトリウムを排泄するためにより高い血圧上昇が必要になる。そのため、酸化型の PKG1α^{WT} は、PKG1α^{C42S} に比べると食塩に感受性を示すことが示唆される。また、PKG1α^{WT} と PKG1α^{C42S} の間には、体液貯留やナトリウム排泄量に差を認めず、テレメトリーを用いた血圧の変動解析において、PKG1α^{WT} では高塩食飼育により LF/HF 比が暗期優位に上昇する一方で、PKG1α^{C42S} では変化がみられないことがわかっている。すなわち、PKG1α の酸化は腎交感神経系の過活動を介して抵抗血管の機能に関わっており、食塩感受性の惹起に深く関与していることが示唆される。そこで、腎交感神経系過活動における PKG レドックス制御の役割を検討するため、RDN を行い食塩感受性への影響を PKG1α^{WT} と PKG1α^{C42S} で比較した。圧-ナトリウム利尿曲線 (Figure 1) において、高塩食飼育の Sham 群でみられた PKG1α^{WT} の緩やかな傾き (黒点線) は、RDN により PKG1α^{C42S} と同程度まで改善した (黒実線)。一方、PKG1α^{C42S} の傾きは、RDN により改善を認めなかった (赤点線/赤実線)。以上より、PKG1α 酸化による食塩感受性の亢進には、交感神経過活動が関与していることが示唆された。

3. 2 食塩感受性が亢進する PKG1α^{WT} では NE の分泌放出が亢進しており、RDN で抑制された

NE の spillover の指標となる尿中 NE 排泄量や腎臓組織中 NE 含量を ELISA で測定した。尿中 NE 排泄量は、高塩食により酸化型の PKG1α^{WT} で有意に増加した (Figure 2.左)。また、増加した尿中 NE 排泄量は、RDN により抑制された。PKG1α^{C42S} では高塩食による尿中 NE の増加を認めなかった。腎臓組織中 NE 含量も同様の結果であった (Figure 2.右)。これより、尿サンプルや腎臓で認められた NE spillover には、PKG1α 酸化と引き続き交感神経賦活化の関与が示唆された。

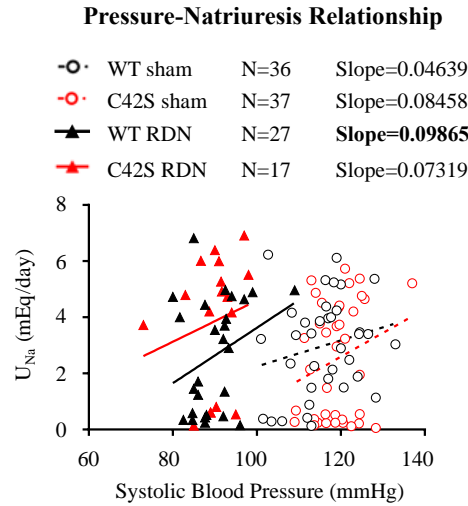


Figure 1. RDN recovered the decreased slope of pressure natriuresis relationship in $\text{PKG}\alpha^{\text{WT}}$ to the same as $\text{PKG}\alpha^{\text{C42S}}$

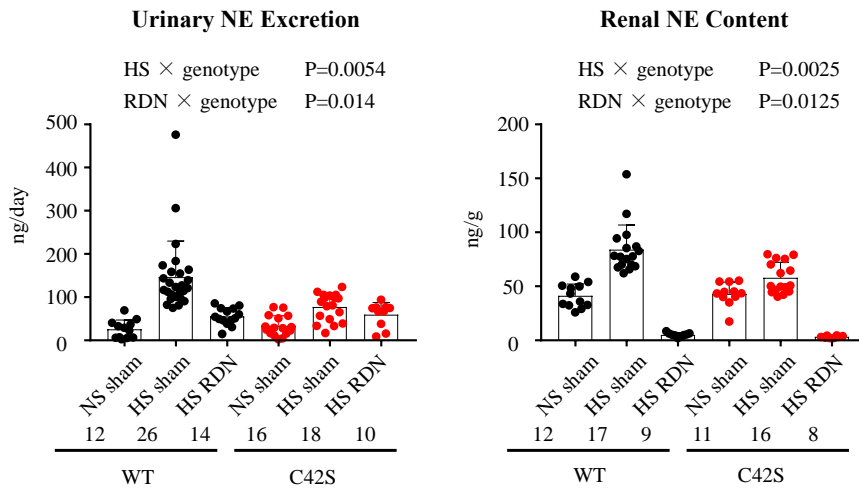


Figure 2. High salt diet significantly increased urinary NE excretion only in $\text{PKG}\alpha^{\text{WT}}$, which was suppressed by RDN operation. Similar responses were observed in renal NE content excised from $\text{PKG}\alpha^{\text{WT}}$

3. 3 腎交感神経求心路及び遠心路における $\text{PKG}\alpha$ の発現が確認された

$\text{PKG}\alpha$ と交感神経活動との関連を確認するため、腎交感神経の求心路を L1-3 レベルで束ねる後根神経節神経における $\text{PKG}\alpha$ の局在と、遠心路終末と想定される腎皮質の神経を、間接蛍光抗体法による免疫組織化学染色で可視化した。後根神経節の細胞質は、抗 $\text{PKG}\alpha$ 抗体(緑色)で染まり、神経マーカーである抗 β III チュブリン抗体(赤色)と共局在(黄色)を確認できた(Figure 3.上段)。また、 $\text{PKG}\alpha$ は腎皮質の抵抗血管にも局在しており(not shown)、腎皮質糸球体に入入りする抗 α SMA 抗体(赤色)

陽性の血管に沿って、抗 β III チュブリン抗体(緑色)で染まる神経が網状に走行していることも確認できた(Figure 3.下段)。腎交感神経求心路や遠心路に分布する $\text{PKG}\alpha$ は、血管への直接的な作用だけでなく、神経を介し抵抗血管の機能に影響を及ぼしていることが示唆された。

3. 4 $\text{PKG}\alpha$ を導入した HEK-293T における最初期遺伝子の発現レベルは、NE 刺激により増加したが、両遺伝子型間で差を認めなかった

神経の活性化は、DNA の二本鎖切断により早期に c-fos や Egr-1 などの最初期遺伝子 immediate early genes

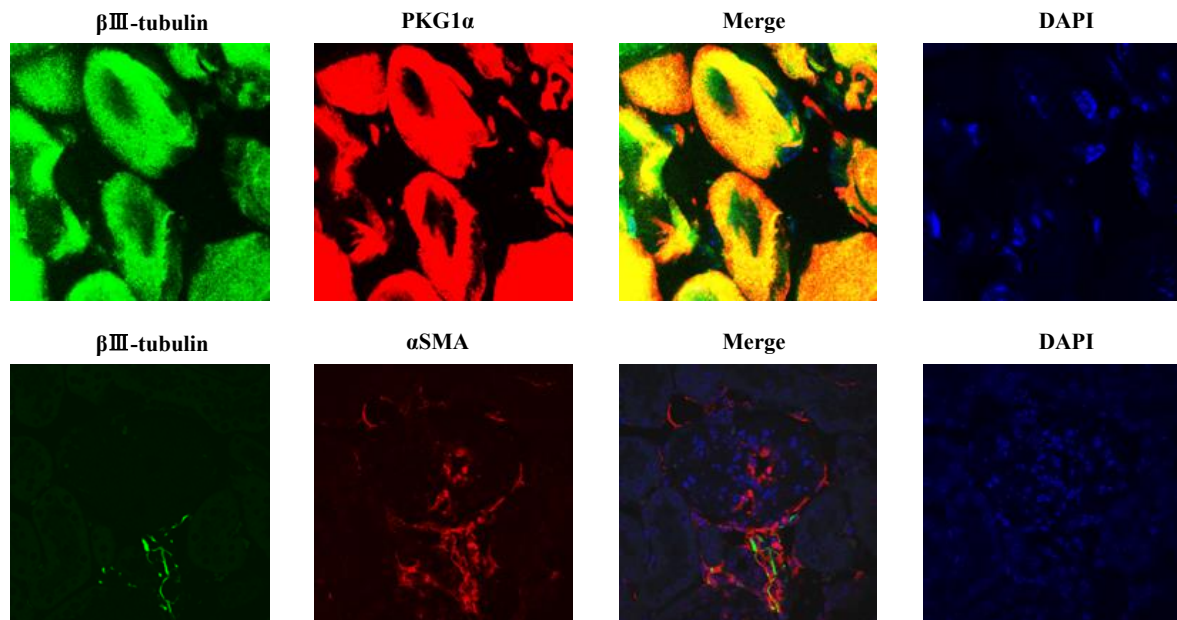


Figure 3. The upper confocal micrographic images showed colocalization of βIII tubulin and PKG1α in dorsal root ganglia, suggesting PKG1α can be involved in afferent sympathetic nervous system. The lower images showed renal nerves innervated arterioles to and from glomerulus, proposing potential regulation of vascular tone in renal resistant vessels.

(以下, IEGs)を誘導する⁽¹⁶⁾。これまでの結果を踏まえ、「神経活動が PKG1α 上の特異的な C42 酸化還元によって制御されることで、腎交感神経系の賦活化と食塩感受性の亢進に寄与している」という仮説を立て、交感神経節後線維のシナプス前膜から放出される神経伝達物質である NE を用いて、交感神経節後線維に支配される腎臓を想定した HEK-293T を刺激し、IEGs の発現を確認した。NE 刺激後の IEGs の発現と、PKG1α 酸化の関係を比較するために、HEK-293T に PKG1α を導入し、NE で刺激する群と、刺激しない群で比較した。PKG1α^{WT} を導入した HEK-293T では c-fos の発現が増強し、NE 刺激によりさらに増強した (Figure 4)。PKG1α^{C42S} を導入した HEK-293T でも結果は同様であったが、NE で増強した c-fos の発現は両遺伝子型間で差を認めなかった。以上から、PKG の発現や活性レベルの増加は、NE 刺激による IEGs の発現増強に寄与する一方で、PKG1α 酸化による交感神経過活動の機序にはシナプス後ニューロンでの反応性亢進は関与しないことが示唆された。

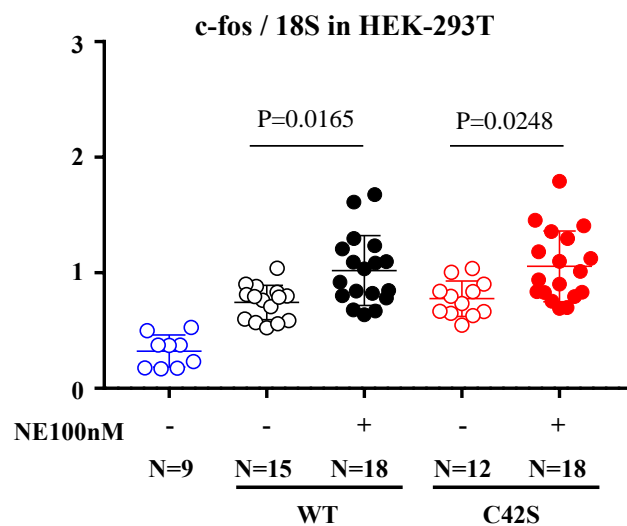


Figure 4. NE stimulation similarly upregulated c-fos expression in HEK-293T cells transfected with either PKG1α^{WT} or PKG1α^{C42S}

4. 考察

血管の緊張やナトリウム利尿作用を制御する NO やナトリウム利尿ペプチドは、cGMP の主要なエフェクター分子である PKG1α を介し、シグナルを細胞内に伝達し作用を發揮している。筆者は、cGMP の結合による PKG1α の活

性化とは違い、新たな機序として報告された C42 の酸化修飾を介すレドックス制御機構に着目し、その表現型解析を進めている。その中で、C42 の酸化によるジスルフィド PKG1 α 二量体が腎臓組織にも発現していることを初めて確認しており、PKG1 α 上の特異的なアミノ酸が酸化されるだけで食塩感受性が惹起される結果を得ている。また、その機序に交感神経賦活化を介す抵抗血管の機能不全を病態とした食塩感受性の機序が示唆され、C42 を治療標的とした研究の発展が期待される。

自律神経系には血圧を調節する機能があり、頸動脈洞や大動脈弓にある圧受容器が感知すると、圧受容器反射により神経調節される。また、血圧が上昇すると、迷走神経や舌咽神経を介して延髄の心臓血管中枢が刺激され、交感神経の活動の低下および迷走神経の活動亢進により心収縮力や心拍数が抑制されると、心拍出量が減少する結果、血圧は低下に転じる⁽¹⁷⁾。しかし、食塩感受性高血圧においては過剰な交感神経活動が起こっており、圧受容器反射による血圧調節が障害され、上昇した血圧を抑制できないことが知られている⁽¹⁸⁾。交感神経活動が起こり、腎交感神経遠心路の節前線維から分泌されたアセチルコリン (Ach) が節後線維のニコチン性アセチルコリン受容体に結合すると、節後線維のシナプス前終末からノルエピネフリン (NE) が放出される。NE は腎臓や心臓、血管に作用し、長期的な血圧調節に関わっている。本研究を振り返ると、PKG1 α ^{WT} においてのみ高塩食で増加を示した尿中や腎臓組織中の NE 値が、RDN により著明に抑制された。また、尿中にナトリウムを排泄するために、PKG1 α ^{C42S} と比べ、PKG1 α ^{WT} でより必要になる血圧上昇は RDN により緩和された。以上の結果は、テレメリーを用いた心拍変動解析で以前に得ていた、酸化型 PKG が食塩負荷における交感神経系賦活化に関与していることを裏付けるものであり、交感神経活動の調節における PKG1 α レドックスの重要性をあらためて確認できた。今回、免疫組織化学染色による検討において、後根神経節などの腎交感神経求心路に PKG1 α の局在を確認した。また、神経ニューロンが腎皮質の糸球体に入出力する輸入輸出細動脈にまでネットワークを密に張り巡らせていることも可視化でき、腎交感神経の求心路だけでなく遠心路にも PKG1 α レドックスが深く関与していることが示唆された。

神経活動が起こると、早期に DNA の二本鎖が切断され、c-fos 等の最初期遺伝子 (IEGs) が誘導される。このような発現誘導により、神経突起の伸長や、シナプスの成熟発達が起こり、シナプスの興奮抑制バランスが調整されることが知られている。神経細胞における c-fos の発現には、電位依存性カルシウムチャンネルを介したカルシウムの流入が重要な役割を果たしている⁽¹⁹⁾。また、神経細胞における NO は、cGMP/PKG 経路を介して c-fos を誘導し、学習や記憶において重要なシナプス可塑性の長期的な変化に関与している^(20,21)。ラットの側脳室に C 型ナトリウム利尿ペプチドを投与すると、受動回避学習の改善をもたらす⁽²²⁾ことも知られている。このように、NO やナトリウム利尿ペプチドを介す cGMP/PKG 経路は、中枢神経系における様々な神経活動に関与しているが、腎交感神経系の活動における意義は不明である。交感神経過活動を表す NE の分泌放出の亢進に、PKG1 α ^{WT} と PKG1 α ^{C42S} の間で差が生じるメカニズムを探るため、交感神経遠心路のシナプス後終末にあたる腎臓を想定し、HEK-293T 細胞に PKG1 α を導入して検討した。遺伝子導入した HEK-293T を NE で刺激すると、神経活動を表す c-fos の発現は増強したが、興味深いことに、PKG1 α ^{WT} と PKG1 α ^{C42S} の間で差を認めなかった。この結果は、一旦放出された NE に対する反応性にはシナプス後終末 (腎臓) で差がないことを示しており、PKG1 α 酸化を介す NE spillover の機序を探るには、シナプス前ニューロンでの NE 生成経路や求心路を想定した検討が必要と考えられた。ラット副腎褐色細胞腫由来の神経細胞である PC-12 細胞は、神経成長因子を作用させると、交感神経様細胞に分化することが知られる^(23,24)。交感神経様細胞に分化した PC12 細胞は、Ach で刺激すると、NE の放出が認められるため⁽²⁵⁾、腎交感神経のシナプス前ニューロンのモデルとして有用と考えられ、さらなる解析を予定している。

自律神経系を介す長期的な血圧調節として、腎交感神経系の重要性が増している⁽²⁶⁾。本研究にて腎交感神経系における PKG1 α レドックス制御機構の役割と機序の解析を進めるにつれ、食塩感受性高血圧における腎交感神経活動の重要性をあらためて再認識できた。PKG1 α は、腎交感神経求心路や遠心路における神経活動に関わり、特異的な C42 酸化修飾により、交感神経系過活動を介して抵抗血管の機能を障害し食塩感受性を惹起することがわ

かってきた。食塩感受性高血圧の有用な治療標的として、PKG1 α レドックス制御機構を介す新たな戦略の確立が期待される。

5. 今後の課題

食塩感受性は、交感神経の緊張やレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の賦活化を介し、高血圧だけでなく心血管病や慢性腎臓病進展などの標的臓器障害と密接に関連している^(1,3)。PKG1 α 上の特異的なC42酸化が惹起する腎交感神経系の過活動が、抵抗血管の機能不全を機序とした食塩感受性亢進に深く関わっていることが明らかになるにつれ、交感神経系過活動に対する標的有用性と食塩感受性高血圧の治療戦略に新たな展開を生んでいる。本実験の結果を踏まえると、PKG1 α 酸化を介するNEの分泌放出機序に、腎交感神経のシナプス後ニューロンにおけるメカニズムは否定的であった。今後は、PC12細胞を交感神経様細胞に分化させ、シナプス前ニューロンを想定したモデルで検討を進める予定である。交感神経様細胞にPKG1 α を遺伝子導入し、Ach刺激によりシナプス前ニューロンの興奮に対するNE放出量とPKG1 α 酸化の関連性を比較していきたい。

また、NE生合成の律速酵素とされるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) は、NEの放出量と密接に関わっており、L-チロシンをL-DOPAに変換し、L-DOPAはドパミンやNEに変換する。THのリン酸化部位には、Ser8, 19, 31, 40があり、様々なプロテインキナーゼによりリン酸化され、活性制御を受けることが知られている。その中で、THの活性にはSer40のリン酸化が最も大きな影響を与え、PKGやPKA, PKC, CaMK II のリン酸化部位としても知られる⁽²⁷⁾。THリン酸化によるNE生合成とPKG1 α レドックス制御機構の関連性は不明であり、さらなる検討が必要である。

6. 文献

- (1) He J, Ogden LG, Vupputuri S, Bazzano LA, Loria C, Whelton PK. Dietary sodium intake and subsequent risk of cardiovascular disease in overweight adults. *JAMA*. 1999 282(21):2027-34
- (2) Hall JE. Renal dysfunction, rather than nonrenal vascular dysfunction, mediates salt-induced hypertension. *Circulation*. 2016 133(9):894-907
- (3) Feng W, Dell'Italia LJ, Sanders PW. Novel Paradigms of Salt and Hypertension. *J Am Soc Nephrol*. 2017 28(5):1362-1369
- (4) Morris RC Jr, Schmidlin O, Sebastian A, Tanaka M, Kurtz TW. Vasodysfunction that involves renal vasodysfunction, not abnormally increased renal retention of sodium, accounts for the initiation of salt-induced hypertension. *Circulation*. 2016 133(9):881-93
- (5) Kurtz TW, DiCarlo SE, Pravenec M, Morris RC. Changing views on the common physiologic abnormality that mediates salt sensitivity and initiation of salt-induced hypertension: Japanese research underpinning the vasodysfunction theory of salt sensitivity. *Hypertens Res*. 2019 42(1):6-18
- (6) Nakamura T, Kataoka K, Tokutomi Y, Nako H, Toyama K, Dong YF, Koibuchi N, Yamamoto E, Yasuda O, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Novel mechanism of salt-induced glomerular injury: critical role of eNOS and angiotensin II. *J Hypertens*. 2011 29(8):1528-35
- (7) Kopkan L, Hess A, Huskova Z, Cervenka L, Navar LG, Majid DS. High-salt intake enhances superoxide activity in eNOS knockout mice leading to the development of salt sensitivity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010 299(3):F656-63
- (8) Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubols S, Mach V, Friesen J, Garbers DL, Beuve A. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. *Nature*. 1995 378(6552):65-8
- (9) Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2005 11(2):214-22
- (10) Gangadharan V, Wang X, Luo C. Cyclic GMP-dependent protein kinase-1 localized in nociceptors modulates nociceptive cortical neuronal

- activity and pain hypersensitivity. *Mol Pain*. 2017 13:1744806917701743
- (11) Nakamura T, Ranek MJ, Lee DI, Shalkey Hahn V, Kim C, Eaton P, Kass DA. Prevention of PKG1 α oxidation augments cardioprotection in the stressed heart. *J Clin Invest*. 2015 125(6):2468-72
- (12) Nakamura T, Zhu G, Ranek MJ, Kokkonen-Simon K, Zhang M, Kim GE, Tsujita K, Kass DA. Prevention of PKG-1 α oxidation suppresses antihypertrophic/antifibrotic effects from PDE5 inhibition but not sGC stimulation. *Circ Heart Fail*. 2018 11(3):e004740
- (13) Burgoyne JR, Madhani M, Cuello F, Charles RL, Brennan JP, Schroder E, Browning DD, Eaton P. Cysteine redox sensor in PKG1 α enables oxidant-induced activation. *Science*. 2007 317(5843):1393-7
- (14) Prisyazhna O, Rudyk O, Eaton P. Single atom substitution in mouse protein kinase G eliminates oxidant sensing to cause hypertension. *Nat Med*. 2012 18(2):286-90
- (15) Hasegawa Y, Nakagawa T, Matsui K, Kim-Mitsuyama S. Renal denervation in the acute phase of ischemic stroke provides brain protection in hypertensive rats. *Stroke*. 2017 48(4):1104-1107
- (16) Madabhushi R, Gao F, Pfenning AR, Pan L, Yamakawa S, Seo J, Rueda R, Phan TX, Yamakawa H, Pao PC, Stott RT, Gjoneska E, Nott A, Cho S, Kellis M, Tsai LH. Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. *Cell*. 2015 161(7):1592-605.
- (17) Dampney RA. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. *Adv Physiol Educ*. 2016;40(3):283-96
- (18) Grillo A, Salvi L, Coruzzi P, Salvi P, Parati G. Sodium Intake and Hypertension. *Nutrients*. 2019 Aug 21;11(9)
- (19) Ram Madabhushia, Tae-Kyung Kim. Emerging themes in neuronal activity-dependent gene expression *Molecular and Cellular Neuroscience* 87 (2018) 27–34.
- (20) Gallo EF, Iadecola C. Neuronal nitric oxide contributes to neuroplasticity-associated protein expression through cGMP, protein kinase G, and extracellular signal-regulated kinase. *J Neurosci*. 2011 31(19):6947-55.
- (21) Gudi T, Casteel DE, Vinson C, Boss GR, Pilz RB. NO activation of fos promoter elements requires nuclear translocation of G-kinase I and CREB phosphorylation but is independent of MAP kinase activation *Oncogene*. 2000 Dec 14;19(54):6324-33
- (22) Telegdy G, Kokavszky K, Nyerges A. Action of C-type natriuretic peptide (CNP) on passive avoidance learning in rats: involvement of transmitters. *Eur J Neurosci*. 1999 Sep;11(9):3302-6
- (23) Rogers SW, Mandelzys A, Deneris ES, Cooper E, Heinemann S. The expression of nicotinic acetylcholine receptors by PC12 cells treated with NGF. *J Neurosci*. 1992;12(12):4611-23.
- (24) Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(7):2424-8.
- (25) Wei-Gang Duan, Jing Shang, Zhen-Zhou Jiang, Jin-Cheng Yao, Yu Yun, Ming Yan, Bin Shu, Qing Lin, Ze-Pu Yu and Lu-Yong Zhang. Rho Kinase Inhibitor Y-27632 Down-Regulates Norepinephrine Synthesis and Release in PC12 Cells *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009 Jun;104(6):434-40.
- (26) Osborn JW, Foss JD. Renal Nerves and Long-Term Control of Arterial Pressure. *Compr Physiol*. 2017 16;7(2):263-320.
- (27) Dunkley PR, Dickson PW. Tyrosine hydroxylase phosphorylation in vivo. *J Neurochem*. 2019 149(6):706-728.

Role of cGMP-Dependent Protein Kinase on Salt Sensitive Hypertension and the Significance of Vasodysfunction in Resistance Vessels via Activation in Sympathetic Nervous System.

Taishi Nakamura

Medical Informatics Science and Administration Planning, Kumamoto University Hospital

Summary

Background PKG1 α can be stimulated by oxidation at cysteine42 (C42), by which an intermolecular disulfide linking is formed to enhance vasorelaxation in resistance vessels. However, the definition of C42 redox sensor in salt sensitivity is unknown.

Objective/Method We compared blood pressure (BP) with telemetry between wild-type (WT) PKG1 α and the C42S mutant mice, and examined sodium balance in metabolic cages.

Results Non-reducing SDS-PAGE showed disulfide dimer of PKG1 α only in WT kidney subjected to high salt diet. Interestingly, C42 oxidation required a greater increase in BP for sodium excretion than C42S without no differences in fluid retention between two genotypes. Importantly, Low/High Frequency ratio in BP variability, an indicator for sympathetic nervous (SN) activity, showed a significant elevation by salt loading in WT especially during dark period, while it was prevented in C42S. Activation of SN system in WT compared to C42S was recapitulated in either urinary norepinephrine (NE) excretion or renal NE content. We confirmed in immunohistochemistry that PKG substantially localized in nervous system such as dorsal root ganglia and also that neuron in renal cortex followed arterioles to and from glomerulus. We performed renal denervation (RDN) operation to assess if renal SN activity contributed to exacerbate salt sensitivity. RDN turned a decreased slope of pressure-natriuresis relationship in WT into about the same as C42S, whereas no further improvement in the slope from C42S. Increased NE spillover in WT was significantly suppressed by RDN, corroborating PKG1 α oxidation ascribes salt sensitivity to NE biogenesis. To assess the mechanism of PKG1 α oxidation in neuronal activity, we next transfected either PKG1 α ^{WT} or PKG1 α ^{C42S} into HEK-293T and compared NE-induced gene expression of c-fos, an early marker for neuronal activity. NE increased c-fos expression levels, but there were no differences between genotypes, suggesting PKG1 α oxidation may not attribute to an efferent renal SN once SN system was equally activated.

Conclusion We demonstrated both SN activity and salt sensitivity can be ameliorated by preventing PKG1 α oxidation. We propose C42 redox modification can be a novel therapeutic target for salt sensitive hypertension through regulation of SN system.