

令和元年5月17日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09657

研究課題名(和文) 脳内Na<sup>+</sup>負荷による食塩嗜好および血圧上昇における脳内(プロ)レニン受容体の役割研究課題名(英文) Roles of brain (pro)renin receptor in increased salt preference and blood pressure caused by central infusion of high Na<sup>+</sup>

研究代表者

森本 聡 (Morimoto, Satoshi)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80257534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの脳室内に慢性的高Na<sup>+</sup>負荷を行うと、血圧、交感神経活動、飲水量および食塩嗜好が上昇を示した。また、視床下部室傍核における(プロ)レニン受容体、アンジオテンシンII、アルドステロンの発現量が有意な増加を示すことを確認した。また、これらの変化は脳内への(プロ)レニン受容体阻害薬、アルドステロン合成酵素阻害薬、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬投与により有意に抑制されることが示された。

脳内への慢性的Na<sup>+</sup>負荷により、(プロ)レニン受容体の発現が増え、アンジオテンシンII・アルドステロン産生が増加する結果食塩嗜好が増し、さらなるNa<sup>+</sup>負荷により血圧上昇がもたらされる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食塩の過剰摂取により脳内Na<sup>+</sup>濃度が上昇し、その結果脳内(P)RRを介するレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系が亢進する結果、食塩嗜好が増加し食塩摂取量が増える、という悪循環が形成される可能性が考えられる。高血圧治療においては減塩が極めて重要であるが、実際に患者に減塩を実践してもらうことは困難である場合が多い。食塩嗜好を抑制させる治療の開発が究極的な目標となるが、本試験の結果から食塩嗜好制御機構に関する知見が増すと考えられる。その結果将来的に食塩嗜好抑制を目指した新規治療法の確立に役立つ可能性があり、本研究は極めて独創的で意義深いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chronic central infusion of high Na<sup>+</sup> increased blood pressure, sympathetic nerve activity, drinking volume, and salt preference, and caused increased expressions of (pro)renin receptor, angiotensin II, and aldosterone in paraventricular nucleus. These changes were significantly inhibited by (pro)renin receptor inhibitor, aldosterone synthase inhibitor, and mineralocorticoid receptor antagonist. These data suggested that chronic infusion of high Na<sup>+</sup> into the brain may stimulate brain renin-angiotensin-aldosterone system via overexpression of (pro)renin receptor to cause increases in salt preference and blood pressure level.

研究分野：高血圧

キーワード：高血圧 交感神経 レニン-アンジオテンシン系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 脳内 Na<sup>+</sup>負荷時の RAAS を介した血圧調節機構について

中枢神経は SNA や水・電解質バランスを調節することにより血圧の調節を行っている。高食塩負荷により血圧が上昇するが、その機序の一つとして脳内血圧調節機構が関与していることが知られている。視床下部の PVN には AVP やオキシトシンを産生し下垂体後葉から分泌させる大細胞性ニューロンが存在する。さらに PVN からは、SNA の中枢である頭側延髄腹外側野 (rostral ventrolateral medulla, RVLM) へ下行性の情報が伝えられ、その結果末梢 SNA の亢進をもたらす。また PVN ニューロンは食塩嗜好を増加させる作用があると考えられる。このため、PVN は中枢性血圧調節機構において極めて重要な役割を担う領域である。一方、脳内には全てのレニン・アンジオテンシン系 (RAS) コンポーネントの発現が確認されること、研究代表者が作製した脳特異的 Ang II 過剰産生マウスは SNA の亢進や食塩嗜好・飲水量の増加を介して高血圧を呈する (Morimoto S. *Circ Res.* 2001, Morimoto S. *J Biol Chem.* 2002) などの知見により、脳内 RAS の亢進により食塩嗜好や SNA の亢進により高血圧が招来されると考えられている。また、PVN 内においても全ての RAS コンポーネントの発現が確認されている。

さらに近年、コレステロールからアルドステロン合成に至る全ての酵素遺伝子が脳内で発現していることが確認され、脳内の内因性アルドステロンの役割が注目されるようになった。特にアルドステロン合成酵素は強い活性があり、視床下部や海馬、扁桃核、小脳、大脳に発現している (Yu L. *Mol Cell Endocrinol.* 2002) が、視床下部においては内因性アルドステロンの存在が確認されている (Youngue BG. *Brain Res.* 1987)。ミネラルコルチコイド受容体 (MR) (コルチゾール、コルチコステロンを不活化させる) 11 $\beta$ -HSD2 とともに PVN において発現していることが確認されている (Gomez-Sanchez EP. *Mol Cell Endocrinol.* 2012)。またラットの脳室内に高 Na<sup>+</sup>負荷を行うと、視床下部のアルドステロン濃度およびアンジオテンシン変換酵素 (ACE) と Ang 1 型受容体 (AT1R) の発現が増加し、MR 拮抗薬であるスピロノラクトンの脳室内投与により阻害される昇圧をもたらすこと (Huang BS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006) や、脳室内にアルドステロンを注入すると視床下部における ACE と AT1R の発現および SNA が亢進し血圧が上昇すること (Zhang ZH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008) が報告された。さらに、少量の Ang II の慢性皮下投与により緩徐に血圧が上昇するが、その昇圧は脳室内へのアルドステロン合成酵素阻害薬の前投与で遮断されることが示された (Xue B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011)。これらより『脳内 Na<sup>+</sup>濃度の上昇 脳内 Ang II 増加 脳内アルドステロン増加 (アルドステロンによる Ang II 増加の系もあり) SNA 亢進 血圧上昇』という中枢神経を介した血圧上昇機序の存在が指摘されるようになった。

### (2) (P)RR について

プロレニン はレニンの非活性型前駆体であるが、(P)RR と結合することにより活性化し、レニンと同様にアンジオテンシノーゲン (AGT) を Ang I に変換することが可能となる。さらに、(P)RR とプロレニンやレニンへの結合は MAP kinase 等のアンジオテンシン非依存性の細胞内シグナルを惹起するため、組織 RAS 調節において重要な役割を果たすと考えられるようになった (Ichihara A. *J Clin Invest.* 2004)。 (P)RR の発現は様々な臓器で見られるが、その発現量は特に脳で多い (Nguyen G. *J Clin Invest.* 2002)。脳内においては (P)RR は広範囲に発現し、下垂体における発現が最も多いが、上記交感神経経路に關与する視床下部や延髄における発現も確認されている (Takahashi K. *J Neuroendocrinol.* 2010)。脳内 (P)RR により産生された Ang II が SNA の亢進を介して血圧上昇をもたらすことも報告されている (Li W. *Hypertension.* 2012)。興味深いことに、PVN においては細胞性ニューロンにおいて (P)RR は AVP やオキシトシンとの共発現が見られる (Takahashi K. *J Neuroendocrinol.* 2010)。

## 2. 研究の目的

以上のような知見の蓄積にも関わらず、高食塩負荷状態 (脳内 Na<sup>+</sup>負荷状態) における血圧上昇機序については未だ不明な点が多く、更なる検討が必要である。そこで、1) 脳内 Na<sup>+</sup>負荷により PVN における (P)RR の発現が亢進する結果、Ang II・アルドステロン産生が増加する、さらにその結果として 2) 食塩嗜好や AVP の産生・分泌が増加することが血圧上昇の一因であるとの仮説を立て、本仮説の妥当性を検証することを目的として本研究を行うこととした。

## 3. 研究の方法

### (1) 手術方法 (実験 1~3 において共通)

正常食塩食飼育下の 9 週齢の雄性 Wistar ラット において、麻酔下に、血圧測定用テレメトリーを腹部大動脈に挿入する。10 週齢時に定位脳固定装置を使用して側脳室内に薬物注入用カニューラを挿入し、浸透圧ミニポンプを皮下に植込む (実験 0 日と規定する。実験 1, 2 においてはカニューラは両側脳室に、浸透圧ミニポンプは 2ヶ挿入する)。これらを用いて以下 (A~J 群) の薬剤を脳室内に 21 日間持続投与し、その後断頭屠殺あるいは灌流固定を行う。なお、脳室内投与された薬剤は PVN に到達することが確認されていること、および PVN 局所への慢性投与は困難であることより、脳室内投与法を選択した。

## (2) 実験1:脳室内へのNa<sup>+</sup>負荷の影響に関する検討

脳室内へのNa<sup>+</sup>負荷により血圧・脈拍数、SNA、食塩嗜好、飲水量、PVN内の(P)RR・Ang II・アルドステロン・AVP発現量が変化するかどうかを調べるために、下記のA、B群において以下の項目を測定し、両群間で比較する。

A群:高Na+人工脳脊髄液(ACSF):ACSFのNa+濃度を800mmol/lに調整したもの

B群:正常Na+ACSF:ACSFのNa+濃度を150mmol/lに調整したもの

### 測定項目

血圧・脈拍数に及ぼす影響:血圧・脈拍数(24時間平均、-3~14日の間の連日測定)

SNA・圧受容器反射機能に及ぼす影響:血管SNA(動脈圧波形を用いた周波数解析により求める)(-3~14日の間連日測定)、圧受容器反射機能(圧受容器反射計算ソフトHemoLabを用いて算出する)(-3~14日の連日測定)、尿中ノルアドレナリン(NA)排泄量/日(HPLC法、12、13、14日)、腎内NA濃度(HPLC法、断頭屠殺時)

水・電解質に及ぼす影響:体重・飲水量・尿量(-3、7、14日)、食塩嗜好(15、16、17日)(3日間測定:その間は無塩食とし、食塩水と水道水を自由に飲水できる状況とした場合の食塩水飲水量を総飲水量で除した値で評価する)、血清AVP濃度(屠殺時に採取した血液を用いる)、PVN内におけるAVP mRNA(屠殺時に摘出した組織よりRNAを抽出し、real time quantitative RT-PCR法にて求める)

PVNにおけるRAASコンポーネント発現に及ぼす影響:(屠殺時に摘出した組織を用いる)

a)PVNにおける以下の発現量について検討する。

・(P)RR、AGT、Renin、ACE、AT1RのmRNA発現量(real time quantitative RT-PCR法。測定方法はIchihara A et al. Hypertension. 2006、Nishimura M, et al. Acta Physiol 2007に準じる)。

・(P)RR蛋白(Western blot法)

・Ang II濃度(RIA法)

・アルドステロン濃度(RIA法)

b)(P)RR、AVP二重免疫染色

断頭屠殺したのち脳を取り出し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、PVNにおける切片を作成する。PVNにおいて(P)RRによるプロレニンが活性化されているかどうか、そしてその局在を調べるため非蛋白融解的に活性化されたプロレニン(Ichihara et al. J Clin Invest. 2004に準じる)とAVP(Takahashi K et al. J Neuroendocrinol. 2010に準じる)の共染色を行い、陽性細胞数をカウントする。

## (3) 実験2:脳室内へのNa<sup>+</sup>負荷による変化に及ぼす各薬剤の影響

実験1で得られた現象が(P)RRやアルドステロンの産生亢進を介するものかどうかを検討するために下記のC群、D群、E群において以下の項目を測定し、それぞれ上記A群、B群と比較する。

C群:(P)RR阻害薬(handle region peptide, HRP):上記高Na ACSFに溶解して作成する

D群:アルドステロン合成酵素阻害薬(FAD286):高Na ACSFに溶解して作成する

E群:MR拮抗薬(エプレレノン):高Na ACSFに溶解して作成する

### 測定項目

血圧・脈拍数に及ぼす影響:実験1と同じ

SNA・圧受容器反射機能に及ぼす影響:実験1と同じ

水・電解質に及ぼす影響:実験1と同じ

PVNにおけるRAASコンポーネント発現に及ぼす影響

PVNにおける以下の測定

・Ang II濃度(RIA法)

・アルドステロン濃度(RIA法)

## (4) 実験3:脳室内へのNa<sup>+</sup>負荷時におけるプロレニン脳室内投与の影響に関する検討

実験1で確認された反応が(P)RRによるプロレニン活性化の下流にあるかどうかを調べるためにH、I、J群において以下の項目を測定し、それぞれ上記A群、B群と比較する。

H群:プロレニン:高Na ACSFに溶解して作成する

I群:(P)RR阻害薬(HRP)とプロレニンの同時投与(それぞれを片側の側脳室内に投与):HRPは上記正常Na+ACSFに、プロレニンは高Na+ACSFに溶解する

J群:エプレレノンとプロレニンの同時投与(それぞれを片側の側脳室内に投与):エプレレノンは上記正常Na+ACSFに、プロレニンは高Na+ACSFに溶解する

### 測定項目

血圧・脈拍数に及ぼす影響:実験1と同じ

SNAに及ぼす影響:実験1と同じ

水・電解質に及ぼす影響:実験1と同じ

#### 4. 研究成果

正常食塩食飼育下の雄性 Wistar ラット において、脳室内に慢性的高 Na<sup>+</sup> 負荷を行うと、血圧、血管交感神経活動(SNA)、飲水量、尿量、および食塩嗜好が上昇を示した。また、食塩嗜好、バゾプレッシン分泌や SNA の調節において重要である視床下部室傍核(PVN)における(プロ)レニン受容体、アンジオテンシン II、アンジオテンシン 1 型受容体、アルドステロンの発現量、およびバゾプレッシン陽性細胞数が有意な増加を示すことを確認した。また、これらの変化は脳内への(プロ)レニン受容体阻害薬、アルドステロン合成酵素阻害薬、ミネラルコルチコイド受容体拮抗薬投与により有意に抑制されることが示された。

さらに、プロレニンを脳室内に持続注入すると血圧、血管 SNA、飲水量、尿量、食塩嗜好および PVN 内の(プロ)レニン受容体・アンジオテンシン II・アルドステロン・バゾプレッシンの発現量が増加していることを確認した。

以上より、脳内への慢性的高 Na<sup>+</sup> 負荷により、1) (プロ)レニン受容体の発現が増え、アンジオテンシン II・アルドステロン産生が増加すること、さらにその結果として 2) 食塩嗜好や AVP の産生・分泌亢進がもたらされ、これらが血圧上昇をもたらしている可能性が示唆された。現在、この仮説の更なる検証のため、(プロ)レニン受容体阻害薬とプロレニンの同時投与、およびミネラルコルチコイド受容体拮抗薬とプロレニンの同時投与によるこれらの変化についての検討を行っているところである。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Bokuda K, Morimoto S, Mizuguchi Y, Seki Y, Yatabe M, Watanabe D, Yatabe J, Ando T, Itoh H, Ichihara A. Greater Reductions in Plasma Aldosterone with Aliskiren in Hypertensive Patients with Higher Soluble (Pro)renin Receptor Level. *Hypertens Res.* 査読あり, 41(6), 2018. 435-443.

(2) Mizuguchi Y, Morimoto S, Kimura S, Takano N, Yamashita K, Seki Y, Bokuda K, Yatabe M, Yatabe J, Watanabe D, Ando T, Ichihara A. Prediction of response to medical therapy by serum soluble (pro)renin receptor levels in Graves' disease. *PLoS One.* 査読あり, 13(4). 2018. e0195464.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 森本聡. 尿中可溶性(プロ)レニン受容体排泄量と尿 pH との関連に関する検討. 第 21 回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会. 2017 年

(2) 木村しほり. 血清可溶性(プロ)レニン受容体濃度と肥満・代謝関連因子との関連について. 第 49 回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 2017 年

#### 6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：市原 淳弘、新山 道大、須田 睦士

ローマ字氏名：Atsuhiko Ichihara, Michita Niiyama, Chikahito Suda