

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19390231

研究課題名(和文)メタボリック症候群における高血圧：

交感神経系活性化の脳内機序解明及び治療法の開発

研究課題名(英文) Hypertension in metabolic syndrome: Mechanism involved in activation of the sympathetic nervous system and therapeutic approach

研究代表者

廣岡 良隆 (HIROOKA YOSHITAKA)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：90284497

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームで酸化ストレスの増大が脳内機序を介して交感神経活動亢進を生じ、高血圧の発症機転となっていることを明らかにし、その機序として脳内アンジオテンシン1型受容体の活性化による活性酸素産生シグナル経路が重要な役割を果たしていることを見いだした。臨床研究によりメタボリックシンドローム患者の交感神経系の活性化及び血管内皮機能低下は生じておりアンジオテンシン受容体拮抗薬による治療により改善することを観察した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we found that the increased oxidative stress in the brain, particularly in the cardiovascular center in the brainstem, enhanced sympathetic activity thereby causing hypertension in metabolic syndrome. As a major source of reactive oxygen species generation, we found that activation of the angiotensin type 1 receptors and related signaling pathway play an important role in the increased oxidative stress in the brain. In addition, we found that activation of the sympathetic nervous system and endothelial dysfunction occurred in patients with metabolic syndrome. Treatment with angiotensin receptor blockers improved these abnormalities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2010年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究代表者の専門分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学(高血圧、循環調節学)

キーワード：血圧、交感神経系、酸化ストレス、脳、肥満

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは内臓肥満を基盤とし、インスリン抵抗性及びそれを代償する高インスリン血症が病態の本質であると考えられている。メタボリックシンドロームの臨床的帰結は心血管病の発症であり、その診断・治療は心血管病予防のため極めて重要である。メタボリックシンドロームでは高

血圧発症が最も頻度が高く、交感神経系の活性化が鍵を握っている。しかし、その活性化機序は未だ不明であり、それ故病態の理解に基づく診断・治療へ至っていない。交感神経活動を規定するのは脳幹部に存在する心臓血管中枢(RVLM)であり、同部位は肥満に関連する重要な脳内神経核である視床下部と神経性回路を形成している。研究代表者の

グループは高血圧では RVLM の酸化ストレスの増大により交感神経活動亢進が生じていることを報告してきた。従って、脳内酸化ストレスとメタボリックシンドロームにおける交感神経活性化がリンクしており、高血圧発症に関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メタボリックシンドロームで酸化ストレス増大が脳内機序を介して交感神経活動亢進を生じ、高血圧の発症機序となっているか否かを明らかにすることであった。さらに、肥満やインスリンなどによるシグナルが脳内で視床下部から RVLM への脱抑制（過剰な興奮を抑制する仕組みの障害）がその機序として関わっているという仮説を検証する。また、レニン・アンジオテンシン系は循環血液中のみならず脳内にも独立して存在しているが、その活性化が生じているか否かを明らかにする。なぜならばアンジオテンシン 1 型受容体刺激は活性酸素種の産生源となっている可能性が考えられるためである。その重要性が判明すれば、治療薬としてのアンジオテンシン受容体拮抗薬の脳内作用を経口投与した場合も含め検討する。

また、臨床研究として、メタボリックシンドローム患者の酸化ストレスを反映する血管内皮機能、交感神経活性化、アンジオテンシン受容体拮抗薬の効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) メタボリックシンドロームモデル動物の確立及びそのモデル動物における脳内活性酸素産生機序の解明：

まず、メタボリックシンドロームモデル動物を作成し確立するため、dietary-induced obesity prone (DIO) ラット及びその対照として dietary-resistant (DR) ラットを作成し、メタボリックシンドロームとしてのプロファイルを有することを確認していった。これは高カロリー食を負荷して体重や内臓脂肪が増加し、中性脂肪増加や血糖・インスリンレベルの測定によりメタボリックシンドロームのプロファイルを示す群とそうでない群を作成した。これらの二群間で血圧・心拍数・交感神経活性を評価した。

脳内酸化ストレスの評価は Thiobarbituric reactive-substances (TBARS) の測定及び生体計測電子スピン共鳴 (in vivo ESR) 法を用いて行った。

(2) 脳内アンジオテンシン系の活性化及び治療薬としてのアンジオテンシン受容体拮抗薬の効果の検討：

脳内活性酸素産生源として NAD(P)H oxidase/Rac1 経路の活性化が考えられる。従って、それらの発現や活性を測定した。また、

その上流にアンジオテンシン 1 型受容体の活性化が生じている可能性が考えられるため、それらの発現・活性化についてウエスタンブロット法などを用いて調べた。また、ミトコンドリアの関与についても培養細胞を用いた実験やミトコンドリアに存在する Mn-superoxide dismutase (MnSOD) 遺伝子を過剰発現させアンジオテンシン II 刺激を行った際のミトコンドリア活性酸素消去効果を検討した。

さらに、アンジオテンシン受容体拮抗薬の効果についても脳内投与や末梢投与を行い、脳内酸化ストレス・血圧・交感神経活性の変化を観察した。

(3) 視床下部から心臓血管中枢への脱抑制（結果として興奮性増強）の効果の検討：

メタボリックシンドロームモデル動物を用いて、おそらくは脂肪細胞から分泌される何らかの物質からの刺激により脳内視床下部へシグナルが伝達され視床下部から RVLM の興奮性を調節していることが推察される。従って、その異常が交感神経活動亢進を生じ、高血圧発症機序として関与しているかを調べた。RVLM への興奮性入力や抑制性入力の変化は興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸や抑制性神経伝達物質である γ-アミノ酪酸 (GABA) の受容体拮抗薬を投与して調べた。RVLM の酸化ストレスを減ずるために同部位へ MnSOD 遺伝子を過剰発現させた。また、視床下部室傍核を刺激した際の交感神経出力が変化するかを調べた。

(4) メタボリックシンドローム患者における臨床研究：

肥満があり耐糖能異常、高血圧を合併しているメタボリックシンドローム患者に対して半年間の生活習慣修正（食事・運動療法）、あるいは二種類のアンジオテンシン受容体拮抗薬による治療前後で血圧、心拍数、血管内皮機能、交感神経活性、動脈圧受容器反射機能を検討した。

4. 研究成果

(1) メタボリックシンドロームモデル動物の確立及びそのモデル動物における脳内活性酸素産生機序の解明：

DIO ラットはメタボリックシンドロームのプロファイルを有すること（体重・内臓脂肪量、血液生化学検査結果）、高血圧、交感神経系の活性化が生じていることを確認した。

TBARS 法で評価した脳内酸化ストレスは視床下部、脳幹部、そして RVLM 局所でも DIO ラットで増大していた。また、in vivo ESR 法で脳内酸化ストレスを評価することができた。脳内酸化ストレスが高血圧モデルで増加していることを in vivo ESR 法を用いて確認し、アンジオテンシン受容体拮抗薬による治療で脳内酸化ストレスが抑制され交感神

経活性抑制による降圧効果を生じることを観察した。

(2) 脳内アンジオテンシン系の活性化及び治療薬としてのアンジオテンシン受容体拮抗薬の効果の検討：

活性酸素産生源として NAD(P)H oxidase/Rac1 系の活性化が重要であること、ミトコンドリア内での活性酸素産生にもつながっていることを見いだした。

また、RVLMにおいてアンジオテンシン II 刺激を行うことによりこれらの活性化が生じること、アンジオテンシン受容体拮抗薬で抑制できることを培養細胞実験及び動物実験両者で観察した。

(3) 視床下部から心臓血管中枢への脱抑制(結果として興奮性が増強する)の効果の検討：

高血圧によって生じている RVLM 酸化ストレス増大を抑制すると、亢進している興奮性入力が低下し、減弱している抑制性入力が改善することが解った。すなわち、交感神経活性化につながる RVLM の過剰な興奮状態はシナプス伝達の異常が関与していることが示唆された。さらに、視床下部からの興奮性入力は RVLM の活性酸素を消去すると抑制されることを見いだした。

(4) メタボリックシンドローム患者における臨床研究：

メタボリックシンドローム患者では交感神経系の活性化が認められ、血管内皮機能・動脈圧受容器反射機能が減弱していた。半年後、生活習慣修正(食事・運動療法)によりこれらの若干の改善が認められた。アンジオテンシン受容体拮抗薬による治療を行うとより明らかな改善効果が認められた。また、使用したアンジオテンシン受容体拮抗薬の間で有効性の程度に差が認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

全て査読有り

- (1) Kishi T, Hirooka Y, et al (3 名・2 番目) . Caloric restriction inhibits sympathetic nerve activity via anti-oxidant effect in the rostral ventrolateral medulla of obesity-induced hypertensive rats. Clin Exp Hypertens 2011 (in press).
- (2) Hirooka Y, Kishi T, et al (3 名・1 番目) . Imbalance of central nitric oxide and reactive oxygen species in the regulation of sympathetic activity and neural mechanisms of hypertension. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 300: R818-826, 2011.
- (3) Hirooka Y.

Oxidative stress in the cardiovascular center has a pivotal role in the sympathetic activation in hypertension.

Hypertens Res 34: 407-412, 2011.

- (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) Hirooka Y, Kishi T, et al (2 名・1 番目) . Oxidative stress and central cardiovascular regulation-Pathogenesis of hypertension and therapeutic aspects-. Circ J 74: 827-835, 2010.
- (6) Kishi T, Hirooka Y, et al (3 名・2 番目) . Angiotensin II type 1 receptor-activated caspase-3 through ras/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in the rostral ventrolateral medulla is involved in sympathoexcitation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Hypertension 55: 291-297, 2010.
- (7) Kishi T, Hirooka Y, et al (2 名・2 番目) . Sympathoinhibition induced by centrally administered atorvastatin is associated with alteration of NAD(P)H oxidase and Mn superoxide dismutase activity in rostral ventrolateral medulla of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. J Cardiovasc Pharmacol 55: 184-190, 2010.
- (8) Kishi T, Hirooka Y, et al (2 名・2 番目) . Cilnidipine inhibits the sympathetic nerve activity and improves baroreflex sensitivity in patients with hypertension. Clin Exp Hypertens 31: 241-249, 2009.
- (9) 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.
- (10) Konno S, Hirooka Y, Kishi T, et al (3 名・2 番目) . Azelnidipine decreases sympathetic nerve activity via antioxidant effect in the rostral ventrolateral medulla of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. J Cardiovasc Pharmacol 52: 555-560, 2008.
- (11) Araki S, Hirooka Y, Kishi T, Utsumi H, et al (2 名・2 番目) . Olmesartan reduces oxidative stress in the brain of stroke-prone spontaneously hypertensive rats assessed by an in vivo ESR method.

- Hypertens Res 32: 1091-1096, 2009.
- (12) Kimura Y, Hirooka Y, Kishi T, et al (3名・2番目) .
Role of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla in blood pressure regulation in spontaneously hypertensive rats.
Clin Exp Hypertens 31: 281-286, 2009.
- (13) Koga Y, Hirooka Y, Kishi T, et al (3名・2番目) .
High salt intake enhances blood pressure increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats.
Hypertens Res 31: 2075-2083, 2008.
- (14) Nozoe M, Hirooka Y, Kishi T, Ide T, et al. (4名・2番目) .
Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate sympathoexcitation induced by angiotensin II in the rostral ventrolateral medulla.
J Hypertens 26: 2176-2184, 2008.
- (15) Hirooka Y.
Role of reactive oxygen species in brainstem in neural mechanisms of hypertension.
Auton Neurosci 142: 20-24, 2008.

[学会発表] (計 32 件)

- (1) Kishi T, et al. Angiotensin II-activated caspase 3-dependent apoptosis in the RVLM contributes to sympathoexcitation through the activation of Ras/MAPK/ERK pathway. American Heart Association Scientific Sessions 2009, 2009年11月15日, Orlando, Florida, USA.
- (2) Kishi T, et al. Apoptosis of astrocyte mediated by Toll-like receptor 4 in the cardiovascular center causes excessive sympathoexcitation in hypertensive rats. American Heart Association Scientific Sessions 2010, 2010年11月15日, Chicago, Illinois, USA.
- (3) Nishihara M, et al. Reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contributes to neural mechanisms of hypertension by modulating paraventricular nucleus of hypothalamus. American Heart Association Scientific Sessions 2010, 2010年11月15日, Chicago, Illinois, USA.
- (4) Kishi T, et al. Autoimplantation of astrocytes into cardiovascular center of brainstem causes sympathoexcitation and decreases the mortality rate in hypertensive rats. American Heart Association Scientific Sessions 2010, 2010年11月16日, Chicago, Illinois, USA.
- (5) Nakagaki T, et al. Endogenous angiotensin-(1-7) activity in the rostral ventrolateral medulla in spontaneously hypertensive rats via sympathetic nerve activity. American Heart Association Scientific Sessions 2010, 2010年11月16日, Chicago, Illinois, USA.
- (6) 廣岡 良隆. 高血圧の病態における脳内RASの役割: 酸化ストレスを介した交感神経活性化【シンポジウム】. 第33回日本高血圧学会総会. 2010年10月16日, 福岡国際会議場.
- (7) 廣岡 良隆. 血圧の神経性調節【教育セッション】. 第33回日本高血圧学会総会. 2010年10月15日, 福岡国際会議場.
- (8) 西原 正章その他. 自然発症高血圧ラットの頭側延髄腹外側野における活性酸素種増加は視床下部室傍核由来の興奮性入力を修飾し交感神経活動活性化に関与している. 第33回日本高血圧学会総会. 2010年10月15日, 福岡国際会議場.
- (9) 岸 拓弥その他. 神経幹細胞から分化誘導させたアストロサイトの高血圧ラット脳延髄交感神経中枢への自家移植による交感神経活動抑制および予後改善作用. 第33回日本高血圧学会総会. 2010年10月15日, 福岡国際会議場.
- (10) 篠原 啓介その他. 高血圧モデルラットの脳幹部交感神経中枢内酸化ストレス増大による交感神経活動活性化作用は一酸化窒素活性低下を介した機序が関与している. 第33回日本高血圧学会総会. 2010年10月16日, 福岡国際会議場.
- (11) 小河 清寛その他. 脳卒中易発症性自然発症高血圧ラットにおける頭側延髄腹外側野の活性酸素消去は動脈圧受容器反射機能を増強し交感神経活動を抑制する. 第33回日本高血圧学会総会. 2010年10月17日, 福岡国際会議場.
- (12) 中垣 俊明その他. 頭側延髄腹外側野(RVLM)における内因性のangiotensin-(1-7)-Mas系は血圧維持および交感神経興奮作用を有しており高血圧モデルラットで増強している. 第33回日本高血圧学会総会. 2010年10月17日, 福岡国際会議場.
- (13) Kishi T, et al. Telmisartan improves endothelial function and decreases sympathetic nerve activity to a greater extent than candesartan in patients with metabolic syndrome. 第74回日本循環器学会学術総会・学術集会. 2010年3月7日, 京都国際会議場.
- (14) Konno S, et al. Telmisartan decreases sympathetic nerve activity via reduction in oxidative stress through the blockade of AT1 receptor in the vasomotor center in dietary-induced obesity rat. American Heart

- Association Scientific Sessions 2009. 2009年11月15日, Orlando, Florida, USA.
- (15) 岸 拓弥その他. メタボリックシンドロームモデルラットではテロメア依存性脳神経細胞老化・海馬での brain-derived neurotrophic factor 減少により認知機能が低下している. 第32回日本高血圧学会総会. 2009年10月1日, 大津プリンスホテル.
- (16) 岸 拓弥その他. テルミサルタンはメタボリックシンドローム患者において血管内皮機能および動脈圧受容器反射機能改善効果を有する. 第32回日本高血圧学会総会. 2009年10月2日, 大津プリンスホテル.
- (17) 今野里美その他. メタボリックシンドロームモデルラットに対するテルミサルタン経口投与は脳延髄交感神経活動中枢内酸化ストレス抑制による交感神経活動抑制作用を有する. 第32回日本高血圧学会総会. 2009年10月2日, 大津プリンスホテル.
- (18) Konno S, et al. Increased oxidative stress in cardiovascular center of brain stem causes sympatho-excitation in dietary-induced obesity rat. 第73回日本循環器学会総会・学術集会. 2009年3月20日, 大阪国際会議場.
- (19) Kishi T, et al. Caspase 3-dependent neural cell apoptosis and telomere-dependent senescence are activated in the cortex and brainstem in dietary-induced obesity rat. 第73回日本循環器学会総会・学術集会. 2009年3月20日, 大阪国際会議場.
- (20) Ito K, et al. Enhanced brain Na sensitivity contributes to salt-induced sympathetic hyperactivation and deterioration of cardiac function in mice with LVH. 第73回日本循環器学会総会・学術集会. 2009年3月20日, 大阪国際会議場.
- (21) Kishi T, et al. Ras/Raf/p38MAPK/ERK pathway is activated in the rostral ventrolateral medulla of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. American Heart Association Scientific Sessions 2008. 2008年11月10日, New Orleans, Louisiana, USA.
- (22) Ito K, et al. High salt intake superimposed on left ventricular hypertrophy activates brain ENaC and leads to sympathetic hyperactivation and ventricular dysfunction. American Heart Association Scientific Sessions 2008. 2008年11月10日, New Orleans, Louisiana, USA.
- (23) 荒木 周一郎その他. アポリポ蛋白 E 遺伝子ノックアウトマウスにおけるアルドステロン-食塩負荷高血圧には脳内酸化ストレスが関連する. 第31回日本高血圧学会総会. 2008年10月10日, ロイトン札幌.
- (24) 岸 拓弥その他. Atorvastatin は脳卒中易発症性自然発症高血圧ラット脳延髄交感神経中枢内の redox 感受性アポトーシスを誘導する Ras/MAPK/ERK/caspase-3 pathway および JNK を抑制し交感神経活動を抑制する. 第31回日本高血圧学会総会. 2008年10月9日, ロイトン札幌.
- (25) 今野里美その他. アゼルニジピン経口投与は脳卒中易発症性自然発症高血圧ラットにおいて頭側延髄腹外側野内の抗酸化作用を介した交感神経抑制作用を有する. 第31回日本高血圧学会総会. 2008年10月9日, ロイトン札幌.
- (26) Hirooka Y. Role of nitric oxide and oxidative stress within the brain in neural influences in hypertension. (Symposium). 第72回日本循環器学会総会・学術集会. 2008年3月30日, 福岡国際会議場.
- (27) Kishi T, et al. Sympathetic hyperactivity, baroreflex dysfunction and insulin resistance might be responsible for impaired vasodilation in patients with metabolic syndrome. 第72回日本循環器学会総会・学術集会. 2008年3月29日, 福岡国際会議場.
- (28) Koga Y, et al. High salt intake exacerbates hypertension via increased oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla and sympathetic hyperactivity in spontaneously hypertensive rats. American Heart Association Scientific Sessions 2007. 2007年11月7日, Orlando, Florida, USA.
- (29) Kishi T, et al. Impaired neurogenesis in the rostral ventrolateral medulla causes hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. American Heart Association Scientific Sessions 2007. 2007年11月7日, Orlando, Florida, USA.
- (30) 廣岡 良隆. 血圧調節機構の根幹に迫る: 中枢・交感神経の研究. 第30回日本高血圧学会総会. 2007年10月26日, 沖縄コンベンションセンター.
- (31) 古閑 靖章その他. 自然発症高血圧ラットへの食塩負荷による血圧上昇には頭側延髄腹外側野におけるレニン・アンジオテンシン系, NAD(P)H oxidase 活性の亢進を伴う活性酸素種増加が関与する. 第30回日本高血圧学会総会. 2007年10月26日, 沖縄コンベンションセンター.
- (32) 荒木 周一郎その他. 脳卒中易発症性自然発症高血圧ラットにおける脳内酸化ストレスとアンジオテンシン II タイプ1受容体拮抗薬オルメサルタンによる治療効果: in vivo ESR 法の応用. 第30回日本

高血圧学会総会. 2007年10月26日, 沖縄コンベンションセンター.

[図書] (計2件)

- (1) 廣岡 良隆. 中枢神経系・自律神経系調節「高血圧診療学」, 永井書店, p31-38, 2010.
- (2) 伊藤 浩司, 廣岡 良隆. 高血圧における酸化ストレスと β 遮断薬「 β 遮断薬の全て: 第3版」, 先端医学社, p134-138, 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/cardiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣岡 良隆 (HIROOKA YOSHITAKA)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 90284497

(2) 研究分担者

岸 拓弥 (KISHI TAKUYA)

九州大学・大学院医学研究院・客員助教

研究者番号: 70423514

江島 健一 (ESHIMA KENICHI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 20444804

井手 友美 (IDE TOMOMI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号: 90380625

内海 英雄 (UTSUMI HIDEO)

九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点・特任教授

研究者番号: 20101694

(H20-H22: 連携研究者)

(3) 連携研究者

内海 英雄 (UTSUMI HIDEO)

九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点・特任教授

研究者番号: 20101694

(H19-H20: 研究分担者)