

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19599022
 研究課題名（和文）循環調節中枢の炎症反応と本態性高血圧発症との関係
 研究課題名（英文）Specific inflammatory condition in the nucleus tractus solitarii and human essential hypertension
 研究代表者
 和気 秀文（WAKI HIDEFUMI）
 和歌山県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号：50274957

研究成果の概要：我が国では60才以上の高齢者の約半数が本態性高血圧症であると言われているが、その発症機序は未だ不明である。本研究では血圧調節中枢の異常が高血圧発症の一因であるという仮説のもと、高血圧の動物モデル（ラット）を用いてこの仮説を検証した。その結果、血圧調節中枢の一部における炎症反応異常が高血圧発症の一因となっている可能性が示唆された。これらの結果は今後の高血圧症治療の発展に寄与するものと思われる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：循環調節、高血圧、炎症反応、神経科学、循環調節中枢、サイトカイン、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

我が国では60才以上の高齢者の約半数が本態性高血圧症であると言われている。本態性高血圧症は肥満、高脂血症、糖尿病との合併によりメタボリックシンドロームに発展し、心疾患、脳卒中および腎不全などのリスクファクターとなることから、その発症機序解明は極めて重要な課題である。本態性高

血圧発症は遺伝的素因が一因であるが今のところ本態性高血圧発症の原因遺伝子および発症機序については明らかにされていない。本態性高血圧症およびその動物モデルである自然発症性高血圧ラット（spontaneously hypertensive rat: SHR）において、通常交感神経活動の賦活化が見ら

れる (Grassi, Curr Opin Nephrol Hypertens, 2004 など) ので、高血圧の発症は循環調節中枢の異常が一因であると考えられている。循環調節中枢は間脳から脳幹に亘り複数点にしているが、その中でも我々は延髄孤束核の役割に関心を持っている。当該核は血圧反射系の中で最も重要な圧受容器反射の一次中継核であり、反射感度ならびに血圧のセットポイントを調節する役割があるからである (Talman et al, Circ Res, 1981 など)。

我々はこれまでに、SHR の孤束核では、接着因子の一つであり、炎症反応誘発因子である junctional adhesion molecule-1 (JAM-1) が過剰発現しており、高血圧の発症に間接的に関与していることを明らかにした (Waki et al, Hypertension, 2007)。JAM-1 は血管内皮細胞に発現しており、循環血液中の白血球や血小板と結合し血管外への遊走性を活性化することが知られている (Ostermann et al, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005 など)。また、SHR の孤束核では、白血球の働きを活性化するロイコトリエン B4 の代謝に関わる遺伝子群が異常発現しており、ロイコトリエン B4 が過剰に合成されている可能性を報告した (Waki et al, ISAN 2007 にて発表)。更に、SHR の脳内毛細血管には白血球が過剰に接着していることなどから (Waki et al, Hypertension, 2007)、我々は孤束核における炎症反応異常が、当該核機能の恒常性を破綻し、血圧調節反射機能の減弱と高血圧の発症を引き起こすという独自の研究仮説を立てた。しかし今のところ、孤束核の神経細胞に直接作用し、その機能的変化を引き起こす炎症性分子本体については明らかにされていない。

2. 研究の目的

「本態性高血圧症の一部は循環調節中枢における炎症反応異常が原因である。」とい

う研究仮説を検証するための一助として、本研究では以下の研究目的のもとに実験を行った。

- SHR の孤束核で異常発現しているサイトカインなどの炎症性分子を網羅的にスクリーニングし、同定分子の循環調節に関わる機能的特性について調べ、高血圧発症との関与について調べる。
- 孤束核での過剰な白血球の接着は、孤束核血流を阻害する可能性があるとも考えられる。よって、孤束核領域での血流阻害が循環調節に及ぼす影響について検討する。

3. 研究の方法

全ての実験は和歌山県立医科大学動物実験委員会の承認を得て実施された。

(1) SHR の孤束核で遺伝子発現異常を示す炎症性分子のスクリーニング

10 週齢の SHR (n=6) および正常血圧ラット (Wistar Kyoto Rat, WKY, n=6) の延髄孤束核を取り出し、群別に標本を 1 つのマイクロチューブにプールしたあと、RNA Isolation Kit および RT2 PCR Array First Strand Kit (共に SABioscience 社製) を用いて RNA の抽出および cDNA の合成を行った。次いで、サイトカインやケモカイン等の炎症性分子をターゲットとした RT2 Profiler PCR Array (SABioscience 社製) を用いて SHR と WKY ではどのような遺伝子の発現に差異が見られるか調べた。また、PCR Array により発現量が 2 倍以上異なる遺伝子について、別の SHR (n=6) および WKY (n=6) より得られた孤束核標本を用いてリアルタイム PCR (QuantiTect Primer Assay, Qiagen 社製) および iCycler Thermal Cycler、Bio-Rad

Laboratories 社製)を実施し、得られた結果の再検証を行った。

(2) 同定分子(蛋白質)発現の局在同定

実験1でスクリーニングされた分子の一部について、蛋白質発現の局在を免疫組織化学的手法(10週齢の雄性SHRおよびWKY)を用いて調べた。この際、標的分子は2次抗体にビオチン化されたものを用い、シグナルを増幅した後蛍光染色を行った。また、神経細胞(anti-NeuN, Millipore社製)あるいはアストロサイトのマーカー(anti-GFAP, Invitrogen社製)を用いた2重染色を行った。

(3) 同定分子の孤束核における機能的役割

近年、代表的な炎症性分子であるサイトカインが脳内でも常時発現しており、神経細胞の分化や成長に関わるだけでなく、神経伝達物質としての役割さえあることが明らかにされた(Rothwell & Hopkins, Trends Neurosci, 1995; Rostene et al, Nat Rev Neurosci, 2007など)。このような背景からからも上記実験(1)で同定された炎症性分子が孤束核において急性作用を呈し、循環調節に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで本研究では麻酔下ラットを用いた急性機能実験を行った。ウレタン(1.45g/kg)をラット(全て10週齢以上の成熟SHR、WKYおよびWister雄性ラットを用いた)の腹腔内に投与して麻酔し、気管カニューレを挿管後、人工呼吸装置で呼吸管理を行い、大腿動脈のカニューレーションにより動脈圧とそしてその血圧波より心拍数を測定した。また、両側大腿静脈を確保し体液平衡を維持するための輸液や薬物の注入に備えた。これらの手術後、ラットを腹臥位にして外耳孔を脳固定装置に正確に固定し、後頭部を開頭して脳幹部(延髄)を露出し、孤束核に実験(1)で同定

されたサイトカイン系分子を微量注入した(一回注入量は最大100nl)。尚孤束核内微量注入前後に $\alpha 1$ 血管作動薬(フェニレフリン、10-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を静注し、圧受容器反射機能に及ぼす影響についても調べた。また、実験中はブランケットでラットを保温して体温を約37に保った。

(4) 孤束核ロイコトリエンB4の定量

我々はこれまでに炎症反応誘発因子とも言われるロイコトリエンB4の代謝に関わる遺伝子群がSHRの孤束核において異常発現していることを見出したが、ロイコトリエンB4自体の定量については試みていなかった。本研究では、10週齢の雄性SHR(n=10)とWKY(n=10)の孤束核を摘出し、酵素免疫測定法(LTB4 EIA kit, Cayman chemical社製)により定量し、両群間で比較した。

(5) 孤束核の血流阻害が循環動態へ及ぼす影響(急性実験)

本実験には成熟Wister系雄性ラットを用いた(n=12)。麻酔薬はウレタン(1.45g/kg)を使用し、上記実験(3)と同様の手順で手術を行った。そして、延髄背側にあり孤束核からの出力血管系およびそれを受ける小静脈を切断した際の循環動態の変化を観察し、圧反射系を破壊(求心路の切断)した群(n=6)とコントロール群(n=6)とで比較した。

(6) 孤束核の血流阻害が循環動態へ及ぼす影響(慢性実験)

本実験には成熟Wister系雄性ラット(n=8)を用いた。覚醒状態での血圧を慢性的に測定するためにテレメトリーシステムを用いた(DSI社製)。ネンプタール(50mg/kg)の腹腔内投与により麻酔した後、ラットを背臥位

で固定後、開腹し、腹部下行大動脈に血圧測定用送信機のカテーテル部を挿入し、次いで、送信器を腹腔内に埋め込み開腹部を縫合した。ラットが麻酔から回復後、飼育ケージに戻し実験開始まで一週間以上の回復期間を設けた後、コントロールデータを 48 時間記録した。その後、もう一度ネンブタール麻酔 (50mg/kg) を行い、上記実験 (5) と同様の手順で動物を脳固定装置に正確に固定し、延髄を露出した後、延髄背側の小静脈を切断した(小静脈切断群 4 匹、コントロール群 4 匹)。動物が麻酔から回復後、再び血圧を 1 週間測定した。また、得られた血圧波から、申請者らが開発したプログラム (Waki et al. Exp Physiol, 2006) を用い、自発性圧反射感度の経時的変化も観察した。

4 . 研究成果

PCR ArrayおよびリアルタイムPCRにより炎症性サイトカイン(ケモカインやそれらの受容体を含む)である、IL-6、CCL5、CCR3およびOX40Lの発現量がWKYに比較しSHRの孤束核では有意に低値であることがわかった。一方炎症反応誘発因子であるロイコトリエンB4はWKYに比較しSHRの孤束核では有意に増加していた。

麻酔下ラットの孤束核にCCL5およびIL-6を微量注入すると血圧低下が引き起こされ、特にWKYに比較しSHRにおいてその反応が顕著であった。また、IL-6について蛋白質の局在を免疫組織化学的手法により調べたところ、孤束核尾側部の神経細胞集団に主として発現していることがわかった。

孤束核血流障害が循環調節に及ぼす影響を調べるために、麻酔下正常血圧ラットにおいて、延髄背側部にある孤束核からの出力血管系とそれらを受ける静脈系を切断した結果、血圧の持続的な上昇を認め、この反応は圧反射系の破壊(求心路の切断)により増幅され

た。一方血管を切断してから24時間以降に覚醒状態で血圧を一週間に亘って測定したところ、血圧変化などは観察されなかった。恐らく血管切断後にある程度の時間が経過すれば他の調圧系による代償作用が惹起されるものと考えられた。

以上より SHR の孤束核では、JAM-1 やロイコトリエン B4 等の炎症反応誘発因子の過剰発現により毛細血管において白血球の過剰接着が引き起こされているが、炎症反応の悪化を防ぐために、サイトカイン系分子の発現はむしろ抑制されている可能性が示された。しかし、IL-6 や CCL5 は孤束核において降圧作用があると考えられ、炎症反応の悪化を防ぐ代償として、これらの分子の発現抑制が結果的に血圧の上昇を引き起こしている可能性が示唆された。また、機序は不明であるが、孤束核血流障害も血圧を上昇させる作用があると考えられ、孤束核内毛細血管における白血球の過剰接着はこのような機序を介して SHR の血圧上昇を助長させている可能性も示唆された。

以上、本研究により、「本態性高血圧症は孤束核での炎症反応異常が一因である」という研究仮説を一層支持することが出来た。従って本研究成果は、今後の高血圧治療の発展に寄与することと期待される。特に抗炎症薬を応用し、神経性高血圧症をターゲットとした新しい降圧剤開発に貢献するもの期待される。

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3件)

Bhuiyan MER、Waki H、Takagishi M、Gouraud SS、Cui H、Yamazaki T、Kohsaka A and Maeda M、Complex

cardiovascular actions of α -adrenergic receptors expressed in the nucleus tractus solitarii of rats、Exp Physiol.、2009、in press、査読有
Waki H、Gouraud SS、Maeda M、Paton JF、Gene expression profiles of major cytokines in the nucleus tractus solitarii of the spontaneously hypertensive rat、Auton Neurosci.、142、40-44、2008、査読有
Waki H、Gouraud SS、Maeda M、Paton JF、Specific inflammatory condition in nucleus tractus solitarii of the SHR: Novel insight for neurogenic hypertension?、Auton Neurosci.、142、25-31、2008、査読有

〔学会発表〕(計9件)

和気 秀文、延髄孤束核における遺伝子発現異常と高血圧発症との関係、第64回日本体力医学会大会、平成20年9月19日、別府ビーコンプラザ

和気 秀文、延髄孤束核におけるロイコトリエン B4 過剰生成と高血圧発症との関係、第101回近畿生理学談話会、平成20年9月13日、国立循環器病センター

高岸 美和、延髄孤束核への IL-6 微量注入は圧受容器反射機能を抑制する、第101回近畿生理学談話会、平成20年9月13日、国立循環器病センター

Mohammad ER Bhuiyan、Complex cardiovascular actions of α adrenergic receptors expressed in the nucleus tractus solitarii、第101回近畿生理学談話会、平成20年9月13日、国立循環器病センター

Sabine S Gouraud、Gene expression profiles of cytokines, chemokines, neurotrophins and apoptosis factors in the nucleus tractus solitarii of spontaneously hypertensive rat、第101回近畿生理学談話会、平成20年9月13日、国立循環器病センター

和気 秀文、循環調節中枢における炎症反応と本態性高血圧発症との関連、第9回 Neurocardiology Workshop、平成20年7月26日、東京ステーションコンファレンス

和気 秀文、IL-6 in the NTS attenuates baroreflex in rats、第31回日本神経科学大会、平成20年7月10日、東京国際フォーラム

和気 秀文、延髄孤束核における炎症反応異常と高血圧発症との関係、第7回九州脳と高血圧研究会、平成20年7月5日、ホテル日航福岡

和気 秀文、Up-regulation of Leukotriene B4 in the NTS of SHR may be pro-hypertensive、第85回日本生理解学会大会、平成20年3月26日、京王プラザホテル

6. 研究組織

(1)研究代表者

和気 秀文 (WAKI HIDEFUMI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50274957

(2)研究分担者

前田 正信 (MAEDA MASANOBU)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80181593

(3)連携研究者