

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16007

研究課題名(和文) 活性酸素種とリンパ管機能障害との関連：高血圧症の新規治療法開発に向けて

研究課題名(英文) Oxidative stress and lymphatic system: New therapeutic target for hypertension

研究代表者

向田 昌司 (Mukohda, Masashi)

岡山理科大学・獣医学部・講師

研究者番号：80824797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、先進諸国にて高血圧症の基準値や降圧目標値が改定され、より厳格な血圧管理が求められるようになってきた。これまで高血圧症の病態研究では、心臓・血管系の直接的な関わりに加え、腎臓と中枢神経の血圧調節機能に重点が置かれてきた。本研究は、これまであまり検討されていなかったリンパ管に着目し、高血圧症との関連を明らかにすることを目的とした。主な本研究成果は、以下の通りである；高血圧を呈する高血圧ラットSHRにおいて、集合リンパ管内皮機能の障害が認められた。この障害機序はNADPHオキシダーゼによる活性酸素種の産生と示唆された。本研究により高血圧病態においてリンパ管が障害されるという新規知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高血圧症の原因として、血管内皮機能障害による弛緩反応の障害については議論されてきたが、リンパ管内皮機能の影響については未着手のままである。血管内皮機能障害にはROSの蓄積が密接に関与し、その原因因子として炎症性サイトカインやアンジオテンシンIIが知られているが、これについてもリンパ管を用いた検討はなされていない。本研究では、これまで報告のない「リンパ管機能と高血圧症」という観点から、高血圧症の病態機序を明らかとするとともに、学術的意義ならびに社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To lower cardiovascular disease and mortality, hypertension guidelines were recently changed in several developed countries. Since blood pressure is regulated by a complex interplay of various elements, such as the sympathetic nervous system, the endothelium and the immune system. Although the lymphatic system coordinates with the cardiovascular system, the linkage between the lymphatic system and hypertension remains unclear. In this study, we examined changes in contractile activities of lymphatic vessels using the hypertensive model rat SHR. We found that endothelium-dependent NO-mediated relaxation was decreased in thoracic ducts from SHR compared with control rat. Lymphatic vessel in SHR exhibited an increase in reactive oxygen species production with increased expression of NADPH oxidase 2. NADPH oxidase inhibitor restored the impaired endothelial dysfunction. These data support a new concept showing the relationship between lymphatic vessel and systemic blood pressure.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：高血圧 リンパ管 血管 内皮 活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

高血圧症は死亡要因となる心臓疾患や脳卒中のリスクを上昇させるが、その **90~95%** は原因が不明の、あるいは複数の原因が複雑に絡み合う本態性高血圧症に分類される。**2017** 年末、高血圧症の新基準が米国心臓病学会/米国心臓協会より発表され (**2017 High Blood Pressure Clinical Practice Guideline**)、米国において成人の約半数が高血圧症を有病しているとされた。現在、我が国を含めた先進諸国においても、高血圧症は深刻な問題となっており、診断・治療ガイドラインの改定が進められ、これまで以上に厳格な管理が求められている。

これまで国内外で進められてきた高血圧症の病態研究は、血管平滑筋臓器を対象とした研究が主であり、これをコントロールする中枢神経や腎臓、心臓の機能なども対象とされてきた。血管における高血圧症の発症機序の一つとして、リンパ球 (**T cell**) が血管壁に浸潤し、サイトカインやケモカインによる血管炎症を誘導する経路が報告されている。この炎症反応に付随する活性酸素種 (**ROS**) 産生は、血管内皮や平滑筋細胞に影響し血管弛緩反応の障害を介して血圧上昇を来すとされる。

高血圧症の研究において、リンパ管に着目したものは極めて少ないが、以下に示すような興味深い報告がある ; (1) 食塩負荷により毛細リンパ管の過形成がみられ、このリンパ管内に体液が貯留されることで血圧上昇を緩衝することを指摘した研究 (*Nat Med*, 2009) (2) 自然発症高血圧モデルラット (**SHR**) において、**ROS** は動脈のみならず毛細血管、さらにリンパ管内皮にも蓄積されるという研究 (*Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005)。しかしながら、その後、リンパ系の高血圧病態への関与は実証されていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、高血圧症で見られるリンパ管の内皮機能障害と **ROS** 蓄積の関連を明らかにすること、さらに、この **ROS** 蓄積の原因因子を明らかにすることである。また、**ROS** とリンパ管機能に着目した高血圧の新たな治療標的を明らかにすることを目標とした。

## 3. 研究の方法

高血圧を呈する成熟 **SHR** (**10~14** 週齢) およびコントロールラットとして同週齢のウィスター京都 (**WKY**) ラットを用いた。また、高血圧を示さない (正常血圧または僅かな血圧上昇) 若齢 **SHR** (**4~5** 週齢) を用いて比較することで、リンパ管の障害が原因で血圧上昇が誘導されるかどうかを検討した。

リンパ管機能評価 : 集合リンパ管の内皮機能評価は、マグヌス法を用いて行った。高血圧を呈する **SHR** のリンパ管機能の検討、ならびに各種 **ROS** 阻害薬 (例 : **tempol** など) を用いて、**ROS** がリンパ管機能に及ぼす影響を検討した。また、リンパ管内皮において、アセチルコリンによる弛緩反応には、一酸化窒素 (**NO**) に加え、プロスタサイクリン (**PGI2**) や内皮由来過分極因子 (**EDHF**) が関与する可能性も考えられる。そこで本研究は、**NO** ドナーである **sodium nitroprusside** を用いて検討した。さらに、高血圧を示さない若齢 **SHR** においてもリンパ管機能解析を行い、リンパ管障害と血圧上昇の関連について検討した。

**ROS** の解析 : 集合リンパ管の **ROS** 蓄積を確認するために、**ELISA** 法を用いて **nitrotyrosine** 量を測定した。また、**ROS** 産生に関わる分子 (例 : **NADPH** オキシダーゼや **p47<sup>phox</sup>** など) の蛋白質発現変化を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 高血圧症におけるリンパ管機能

本研究では、自然発症高血圧モデル **SHR** の集合リンパ管の機能について検討を行った。**10~14** 週齢の成熟 **SHR** において、同週齢のコントロール **WKY** ラットと比較し、収縮期血圧の上昇と心重量の増加を確認した。成熟 **SHR** の胸腔において、アセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応が有意に障害された。一方、**sodium nitroprusside** による内皮非依存性弛緩反応も **SHR** において障害がみられたが、その障害の差はアセチルコリンのものと比べて僅かであった。このことから、リンパ管の内皮機能、つまりアセチルコリンによる弛緩反応に注目し、その障害メカニズムの検討を行った。

### (2) 高血圧ラット **SHR** におけるリンパ管内皮由来 **NO** による弛緩反応

血管と同様、集合リンパ管の内皮依存性弛緩反応は、一酸化窒素である **NO** に依存することが報告されている。この報告を確認するために、**NO** 合成酵素阻害薬 **L-NAME** を用いて検討を行った。コントロール **WKY** ラットの集合リンパ管において、**L-NAME** (**100 μM**) の前処置により、アセチルコリンによる弛緩反応は大きく抑制した。一方、**SHR** においては、**L-NAME** による弛緩反応の抑制が見られなかった。これらの結果から、正常なリンパ管において、アセチルコ

リンによる内皮依存性弛緩反応は **NO** であることを確認した；しかしその一方で、**SHR** のリンパ管において、内皮由来 **NO** 弛緩反応はほぼ完全に失われていることが示唆された。

### (3) 高血圧ラット **SHR** におけるリンパ管内皮障害と活性酸素種との関連

次に、薬理学的手技を用いて、酸化ストレスがリンパ管内皮障害に及ぼす影響について検討を行った。活性酸素種スカベンジャー **tempol** の前処置により成熟 **SHR** でみられる弛緩反応障害を有意に改善した；一方、コントロールラットではアセチルコリンによる弛緩反応に影響を与えなかった。**NADPH** オキシダーゼ(**NOX**)は、血管組織における活性酸素種産生の主要な要因である。そこで、選択的な **NOX** 阻害薬 **apocynin** の及ぼす影響について検討した。成熟 **SHR** リンパ管において、**apocynin** 処置によりアセチルコリンによる弛緩反応障害を有意に改善した；一方、コントロールラットでは影響を与えなかった。以上の結果から、高血圧 **SHR** のリンパ管弛緩反応障害に **NOX** 誘導性の活性酸素種産生が関与することが示唆された。

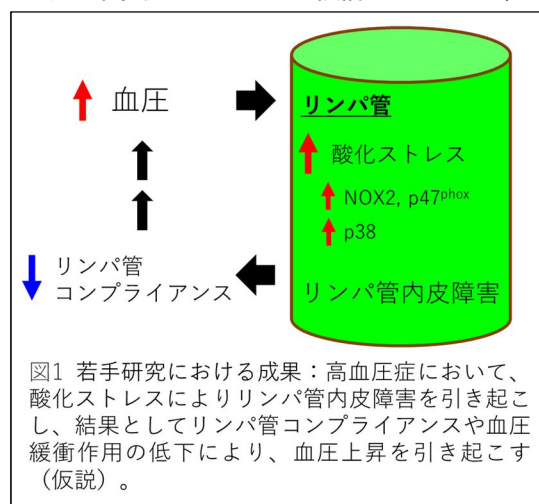
**NOX** にうち、**NOX2** は血管内皮細胞における活性酸素種産生の主要な因子である。**NOX2** の活性は、そのサブユニットである **p47<sup>phox</sup>** のリン酸化 (**Ser345**) により調節される。そこで、**NOX2** 発現および **p47<sup>phox</sup>** のリン酸化について検討を行った。**SHR** のリンパ管において、コントロールと比較し、**NOX2** 発現の上昇および **p47<sup>phox</sup>** のリン酸化の亢進が観察された。

さらに、**p47<sup>phox</sup>** のリン酸化の亢進に関わる **p38 MAPK** の検討を行った。**SHR** のリンパ管において、コントロールと比較し、**p38** のリン酸化の亢進が観察された。

### (4) 若齢 **SHR** におけるリンパ管機能について

最後に、**SHR** のリンパ管障害に加齢による血圧上昇が関与しているかを検討するために、血圧上昇の認められない若齢 **SHR** を用いて検討を行った。4週齢の **SHR** において、同週齢のコントロールラット **WKY** と比較し、収縮期血圧の上昇は認められなかった。成熟 **SHR** の結果とは異なり、4週齢の **SHR** において、アセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応および **sodium nitroprusside** による内皮非依存性弛緩反応は、コントロールラットと同程度であった。

以上の結果から、高血圧症においてリンパ管内皮の機能障害が起こり、この障害に活性酸素種が関与していることが明らかとなった (図1)。本研究成果は、高血圧研究において権威ある学術誌とされる、米国心臓協会の *Hypertension* 誌に掲載され、さらに秋季の **High Impact Paper in Hypertension** (注目論文) にも選出された。



・ **Mukohda M et al., Increased blood pressure causes lymphatic endothelial dysfunction via oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 76(2): 598-606, 2020.**

### (5) その他の研究成果

最近、高血圧患者ならびに高血圧動物において腸内細菌叢が変化し、血圧を間接的に調節する可能性が指摘されている。本研究に関連する可能性が考えられたため、高血圧症で増加する腸内細菌 **Streptococcus** 属、特に **Streptococcus** 属の細菌毒素ストレプトリジン **O** に着目し、検討を行った。

#### 5-1) 血管収縮反応性に及ぼす影響

ラットの血管組織を用いて、細菌毒素ストレプトリジン **O** が血管収縮反応性に及ぼす影響を検討した。7-12週齢ウィスターラットから摘出した大動脈に、ストレプトリジン **O** 処置 (1-100 ng/ml, 30分) し、マグヌス法により収縮性張力の測定を行った。ストレプトリジン **O** はアンジオテンシン **II** やフェニレフリンによる収縮反応性や最大収縮率に影響を与えなかった。

#### 5-2) 血管弛緩反応性に及ぼす影響

次に、血管弛緩反応性に及ぼす影響を検討した。ラット大動脈および腸間膜動脈にストレプトリジン **O** 処置 (1-100 ng/ml, 30分) し、マグヌス法により収縮性張力を測定した。ストレプトリジン **O** はアセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応を濃度依存的に低下させた。一方、**sodium nitroprusside** による内皮非依存性弛緩反応に影響を与えなかった。

#### 5-3) 内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の活性に及ぼす影響

細菌毒素ストレプトリジン **O** が、血管弛緩反応に関わる **eNOS** の活性に及ぼす影響を検討した。ストレプトリジン **O** の処置により、活性抑制に働く **eNOS Thr495** のリン酸化を亢進したが、**eNOS** 発現そのものには影響を及ぼさなかった (図2)。**eNOS** 阻害薬 **L-NAME** の処置により、アセチルコリンによる弛緩反応は阻害された。

#### 5-4) p38 MAPK の関与の検討

肥満細胞において、ストレプトリジン O は p38 MAPK およびプロテインキナーゼ C (PKC) を活性化することが報告されている。

ストレプトリジン O がラット大動脈において p38 MAPK を活性化するかどうか検討を行った。ストレプトリジン O 処置により、p38 MAPK のリン酸化を有意に亢進したが、p38 MAPK 発現そのものには影響を与えなかった。

次に、p38 MAPK 阻害薬がストレプトリジン O による内皮障害に及ぼす影響について検討した。p38 MAPK 阻害薬 SB203580 処置は、ストレプトリジン O による血管弛緩反応の障害に影響を及ぼさなかった。このことから、ストレプトリジン O は p38 MAPK の活性化を誘導するものの、この活性はストレプトリジン O による弛緩反応障害には関与しないことが示唆された。

#### 5-5) PKC の関与の検討

次に、ストレプトリジン O が PKC に及ぼす影響を検討した。PKC 阻害薬 Ro 31-8222 処置は、ストレプトリジン O による弛緩障害を改善した (図 2)。PKCβ 選択的阻害薬 LY333531 の処置においても、弛緩障害の改善作用がみられた。

以上の結果から、*Streptococcus* 属細菌毒素ストレプトリジン O は血管内皮障害を引き起こすことが明らかになった。その機序として、p38 MAPK ではなく、PKC に作用し引き起こされることが明らかになった。本成果は米国薬理・実験治療学会機関誌である *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* に掲載された。

- ・ Mukohda M *et al.*, Streptococcal Exotoxin Streptolysin O Causes Vascular Endothelial Dysfunction Through PKCβ Activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 379(2):117-124, 2021.

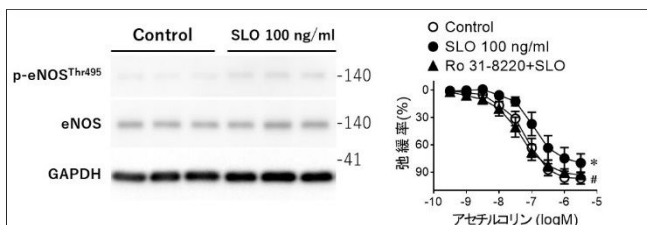


図2 細菌毒素ストレプトリジンO (SLO) が血管内皮機能に及ぼす影響について

大動脈におけるSLOの処置は、eNOS活性を抑制するThr495のリン酸化を亢進した。SLO処置は、アセチルコリンによる内皮依存性弛緩反応を障害し、PKC阻害薬Ro 31-8220前処置により改善した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mukohda Masashi, Mizuno Risuke, Ozaki Hiroshi	4. 巻 76
2. 論文標題 Increased Blood Pressure Causes Lymphatic Endothelial Dysfunction via Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypertension	6. 最初と最後の頁 598 ~ 606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14636	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mukohda Masashi, Nakamura Sho, Takeya Kosuke, Matsuda Akira, Yano Takanori, Seki Mihiro, Mizuno Risuke, Ozaki Hiroshi	4. 巻 379
2. 論文標題 Streptococcal Exotoxin Streptolysin O Causes Vascular Endothelial Dysfunction Through PKC<i> </i> Activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 117 ~ 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.121.000752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 向田昌司、水野理介、尾崎博
2. 発表標題 自然発症高血圧ラットにおいて、胸管の収縮反応性が増強される
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 向田昌司、水野理介、尾崎博
2. 発表標題 高血圧症におけるリンパ管収縮性機能の検討
3. 学会等名 第29回日本循環薬理学会 第55回高血圧関連疾患モデル学会 合同学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Mukohda, Risuke Mizuno, Hiroshi Ozaki
2. 発表標題 Lymphatic Smooth Muscle Relaxation Was Impaired in Spontaneously Hypertensive Rats
3. 学会等名 Gordon Research Conference 2020: Lymphatics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masashi Mukohda, Toshiyasu Matsui, Risuke Mizuno, Hiroshi Ozaki
2. 発表標題 Lymphatic Contraction Was Enhanced in Spontaneously Hypertensive Rats
3. 学会等名 American Heart Association, Hypertension 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 向田昌司、水野理介、尾崎博
2. 発表標題 腸内フローラと生活習慣病：高血圧症の新たな治療標的を探る
3. 学会等名 第3回日本比較薬理学・毒性学会春季研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関美宙、向田昌司、水野理介、尾崎博
2. 発表標題 ストレプトリジン0の血管収縮反応に及ぼす影響
3. 学会等名 第63回日本平滑筋学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向田昌司、松井利康、中村翔、宮前二郎、矢野嵩典、水野理介、尾崎博
2. 発表標題 自然発症高血圧ラットSHRにおけるdysbiosisと腸管機能の解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向田昌司、松井利康、水野理介、尾崎博
2. 発表標題 高血圧病態における集合リンパ管収縮機能の検討
3. 学会等名 第31回日本循環薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向田昌司、森北奈佑、永西紗耶香、中村翔、水野理介、尾崎博
2. 発表標題 高血圧病態におけるプロテインキナーゼC 阻害の有用性の検証
3. 学会等名 第4回日本比較薬理学・毒性学会春季研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sayaka Naganishi, Masashi Mukohda, Sho Nakamura, Toshiyasu Matsui, Risuke Mizuno, Hiroshi Ozaki
2. 発表標題 PKC inhibitor blocked angiotensin II-induced vascular smooth muscle proliferation and oxidative stress
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masashi Mukohda, Risuke Mizuno, Hiroshi Ozaki
2. 発表標題 Gut Microflora and Metabolic Syndrome: New Insight into the Pathogenesis of Hypertension
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関