

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：86202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592132

研究課題名(和文)脳梗塞の性差におけるエストロゲン欠乏と体内塩分貯留

研究課題名(英文) Sex difference on salt sensitivity and effects of estrogen deficiency on ischemic brain damage through water-free sodium accumulation

研究代表者

兼松 康久 (KANEMATSU, Yasuhisa)

独立行政法人国立病院機構四国こどもとおとなの医療センター(臨床研究部(成育)、臨・その他部局等・その他)

研究者番号：90363142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：正常血圧下において体内塩分貯留量と脳血管障害との関連性を調べた。高塩分食を負荷した場合の虚血性脳損傷への影響について、性差および卵巣摘出の有無による違いを明らかにし、エストロゲン欠乏状態では血圧とは独立してNa貯留が脳損傷に影響し、血圧とは別に、Na蓄積を制御することが重要であるという見解を新たに示した。この成果をまとめて英文誌に投稿、revision中である。エストロゲン欠乏に塩分が負荷された状態での研究は国内・外ともにほとんどないことから本研究は、新たな観点から脳梗塞予防や治療を考える上で、意義が深いと思われる。

研究成果の概要(英文)：Estrogen deficiency and hypertension are risk factors for stroke. In ovariectomized (OVX+) rats fed a high-salt diet (HSD), an increase in the body Na+/water ratio was associated with detrimental vascular effects. We hypothesized that an increase in brain water-free Na+ accumulation is associated with ischemic brain damage. The brain Na+/water ratio was increased in OVX+/normal diet (ND) rats as well as in OVX-/HSD and male rats fed HSD. It was augmented in OVX+/HSD rats. Importantly, the increased brain Na+/water ratio before ischemia was positively correlated with the expansion of cortical infarct. Neither OVX+ nor HSD affected the BP in female rats, while HSD increased BP in male rats. Our findings show that an increase in the brain Na+/water ratio elicited by HSD or estrogen deficiency is associated with ischemic brain damage, suggesting the importance of regulating the accumulation of brain water-free Na+

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳虚血性疾患 エストロゲン 高塩分食 組織内Na貯留

1. 研究開始当初の背景

一般に閉経前の女性が同世代の男性と比べ脳・心血管疾患の発症率が低いのに、閉経後はその発症率(右図)のみならず、重症度も増加する。しかし高年齢女性における脳梗塞発症を想定した病態や薬効およびその分子機構を探求した報告は国内外ともに、ほとんどない。エストロゲンは血管障害に対して脳保護作用を示すことが多くの報告で証明されており、閉経によるエストロゲン欠乏が脳血管障害の増加に関与していると考えられている。一方、脳血管障害の高いリスクファクターである高血圧は男性に多くみられ、発症率や予後に悪影響を及ぼす。これまで高血圧と塩分摂取は一体化して考えられており、塩分摂取により高血圧を誘導し、その結果心臓や脳血管障害にいたると考えられている。我々は雄性ラットを用いた脳梗塞モデルにおいて angiotensin II type I receptor blocker (ARB) による血圧非依存性の虚血脳損傷に対する脳保護作用を報告している (J hypertension 2008)。さらに最近、雌性ラットを用いてエストロゲンの虚血に対する脳神経保護に、エストロゲン受容体 (ER) の活性化が重要な役割を示すことを明らかにした (Hypertension, 2011)。また予備検討から 血圧非依存的に塩分の体内貯留の増加によって脳血管障害が増加することを示唆する結果を得ている(下図)、またこの増悪作用は エストロゲン欠乏状態ではさらに増強された。これらの知見から 脳血管障害の予防や治療には降圧のみならず、体内塩分貯留量を制御することが重要であると思われる。高血圧が脳虚血損傷を増加することを示している研究は数多いが、血圧と独立した塩分過剰摂取の影響に着目して雌雄差や脳血管障害との関係を調べた報告はほとんどみられないことから、正常血圧の状態に過剰の塩分負荷を継続した場合

の体内塩分貯留量と脳血管障害との関連性を調べることに重要と考え、本研究を行うことにした。また基礎的に雌雄の脳血管障害に対する体内塩分貯留量の増加の影響を明らかにし、かつ有効な血管障害の予防策を講じることが、新たな観点から脳梗塞の予防や治療法を構築する上で重要であると考へた。正常ラットに塩分が負荷された状態での研究は国内・外ともに基礎的にも、臨床的にもほとんどないことから、塩分負荷時における性差による脳虚血での病態や薬物による脳梗塞制御のメカニズムを明らかにできれば、臨床に応用できる可能性があり、医療上、大いに貢献すると思われる。これまでにエストロゲン欠乏状態では脳梗塞サイズが増加し、それと相関して estrogen receptor (ER) の発現が低下することや逆に angiotensin II の発現増加やその変換酵素である ACE2 の低下による局所的な renin-angiotensin 系の活性化および apoptosis 抑制に作用する遺伝子の低下も認めている。今後、高塩食負荷における神経細胞・血管系 (neurovascular unit) の生存やその抑制に関わる分子を遺伝子および蛋白レベルで解析し、薬物投与による個々の分子の発現の変化からその意義についても明らかにする必要があると考えている。

2. 研究の目的

脳梗塞の性差におけるエストロゲン欠乏と体内塩分貯留の関与について明らかにする。ラット脳虚血モデルを用いて、Na 輸送関連分子の発現をもとに病態解析を行い、かつ脳虚血損傷に奏功する可能性のある薬物を用いた治療効果とその分子機構を調べ、脳梗塞の病態解明と予防・治療のターゲットを同定する。

- 1) 雌雄ラットにおける塩分負荷による血圧および脳虚血障害への影響を脳梗塞モデルで調べる。細胞の $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$

cotransporter (NKCC1), Na^+/H^+ exchanger (NHE1)、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCE)はそれぞれ Na^+ の取り込みに関与するポンプであり、 Na^+ 排出には Na^+/K^+ ATPase 移送に関与しており、食塩過剰摂取による影響を受け、血圧や脳血管障害に関与する可能性がある。また脳虚血後の脳浮腫にも影響すると思われる。虚血による脳損傷とこれらの分子の関連性から neurovascular unit への影響を明らかにする。

- 2) 雌性卵巢摘出ラットにおいて塩分負荷による脳虚血障害への影響を同様に調べる。
- 3) 塩分負荷した雌性卵巢摘出ラットにおいて mineralcorticoid receptor antagonist (MRA) を投与した場合の治療効果について評価する。また効果に寄与する関連分子を探求し、治療のターゲットを同定する。

脳梗塞のリスクファクターとしての高血圧と血管障害との研究は行われているが高塩食と高血圧は一体化された中での研究が多い。また雌性ラットでは雄性ラットに比べて脳虚血に対しての脳損傷が少なく、脳保護作用にエストロゲンが関与すると考えられているが、エストロゲン欠乏状態での脳虚血に対する影響を調べた研究や、エストロゲン欠乏状態に塩分を負荷しただけの状態での虚血脳損傷を調べた研究は少ない。薬物治療後の脳梗塞に対する有効性やそのメカニズムを解析した研究も少ない。本研究では雌雄ラットに塩分負荷のみの影響や卵巢摘出雌性ラットに塩分負荷した状態での虚血による脳損傷を調べることを特色としており、血圧の影響とは独立した脳血管障害における塩分やホルモンの影響を調べる点は独創的である。また雌性卵巢摘出ラットやさらにこれに塩分を負荷したラットを用いて、高血圧(MRA)に対する治療薬とし

て用いられている薬物を脳梗塞誘発前に投与し、脳梗塞発症予防に対する有効性や脳梗塞後の脳損傷の程度の軽減作用を評価すると同時に、これら薬物の脳細胞傷害抑制や修復・再生に関わる分子機構を明らかにすることにより、新たな脳梗塞の予防や治療の標的が解明される可能性がある。また性差による病態の違いを明らかにすることで、性差による至適な薬物治療法の手がかりとなり、脳梗塞の治療成績向上に大いに貢献する可能性がある。閉経後の女性に対するホルモン補充療法のような欠点を補える新たな治療法の可能性も期待される。

3. 研究の方法

雌雄ラットに高塩食を給餌した後の脳血管障害への影響を Na^+ 移送に関連した蛋白を中心に高血圧と独立した影響が否かを調べる。卵巢摘出ラットを用いエストロゲン欠乏状態での塩分負荷後の脳梗塞に対する影響を調べる。脳梗塞のリスクを軽減する可能性がある、作用の異なる薬剤を用いて細胞傷害抑制と修復・再生機能に対する有効性を解析し、新たな治療の標的を解明し、性差による至適な薬物療法の構築をめざす。

(平成 24 年度)

1. 雌雄ラットにおける塩分負荷による脳虚血障害の影響

中大脳動脈閉塞(MCAO)モデルは20mmの4-0 ナイロン suture を外頸動脈より内頸動脈に挿入して作製。Laser doppler flowmetry を用いて局所脳血流の20-30%の低下、左旋回行動にて脳虚血完了を確認。その後90分後に再灌流し、24時間後に摘出した脳の梗塞サイズを解析する。高塩食給餌はMCAO誘発前2週間とする。群構成は以下の6群とする。

雄性 SD ラット普通食

雄性 SD ラット 8%高塩食

雌性 SD ラット普通食

雌性 SD ラット 8%高塩食

雌性卵巣摘出(OVX)ラット普通食

雌性卵巣摘出(OVX)ラット高塩食

評価項目

- 1) 脳梗塞体積：冠状に 2mm 幅で切断し TTC 染色後、画像を NIH image で解析する。
- 2) 血圧測定：無麻酔下で投薬開始前後には tail-cuff 法で、MCAO 前、中、後には telemetry 法で継時的に測定する。
- 3) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter (NKCC1)、 Na^+/H^+ exchanger (NHE1)、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchanger (NCE)、 Na^+/K^+ ATPase、mineralcorticoid receptor (MR)、PPAR、estrogen receptor (ER) および ER、TNF、eNOS、NO receptor、O-GlucNAc、angiotensin II type 1receptor (AT1R) および AT2R、angiotensin II の虚血 penumbra における発現量や局在を虚血・再灌流後、24 時間後に免疫染色および western blot で解析し、脳組織損傷とこれらの分子との関連を調べる。
- 4) NKCC1、NHE1、NCE、 Na^+/K^+ ATPase や TNF、PPAR、ER および ER、AT1R および AT2R、アンジオテンシン変換酵素(ACE)および ACE2 の mRNA 発現量を定量 real-time-PCR で解析する。

性差および高塩食負荷の影響を調べる。現在、雌雄ラットともに脳梗塞サイズは塩分負荷により増悪する結果が得られている。また estrogen 欠乏状態でも増悪する結果を得ている。更に estrogen 欠乏状態で塩分負荷の影響を検討し、そのメカニズムを明らかにする予定である。

(平成 25 年度)

1 薬物投与による治療効果の評価とその分子機構の解明

1) 高塩食負荷雄性ラット、雌性卵巣摘出あるいは非卵巣摘出ラットにおける塩分過剰摂取における血圧への影響を検討する。

予備検討で塩分負荷による雌雄ラットの血圧への影響が異なる結果が得られた。そこでこのメカニズムを明らかにするため尿量、摂取量、血中および尿中 Na 量の測定により体内 Na 貯留量を算定する。血圧上昇に關与する分子と Na の取り込みや排泄に關与する分子に着目して、腎皮質、腎外髄、腎内髄、大動脈、脳、脳血管について、血圧制御に關連すると推察される分子の遺伝子発現レベルの解析を行う。

2) 雌性卵巣摘出ラットにおける脳虚血損傷に対する mineral corticoid receptor antagonist (MRA)の効果を評価する。

雄性ラットを用いた検討で有効性が示されている薬物を用い、治療のターゲットとなる分子を同定するための検討を行う。予備検討で MRA である eplerenone の投与期間は 2 週間が妥当と考えている。無処置および卵巣摘出後 4 週間経過した雌性ラットに 2 週間投与し、溶媒投与の MCAO ラットとの比較で梗塞抑制効果が見られることを確認し、その奏効する分子機構を検討する。

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter (NKCC1), Na^+/H^+ exchanger (NHE1), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchanger (NCE), Na^+/K^+ ATPase, mineral corticoid receptor (MR), PPAR, estrogen receptor (ER) および ER, TNF, eNOS, NOreceptor, O-GlucNAc, angiotensin II type 1receptor (AT1R) および AT2R, angiotensin II の虚血 penumbra における発現量や局在を虚血・再灌流後、24 時間後に免疫染色およびwestern blotあるいは遺伝子レベルを解析(定量 real-time PCR)し、脳虚血損傷の程度とこれらの分子との関連を調べる。

3) 神経細胞再生に対する薬物の作用評価

骨髄由来前駆細胞は血管損傷後の修復に關与すると報告されており、循環血中の造血幹細胞が MCA 後の血管新生や神経再生に關与することを我々も確認している。薬物

によってそれが増強可能か否かについて検討する。予備実験的に放射線量の至適強度を調べ、骨髄抑制が認められるが生存可能な放射線量を 9-10Gy と決定した。

ドナーラットに 10Gy の X 線を照射し、GFP-ラットの骨髄細胞 (5×10^7) を静脈内に投与する (GFP-ラット 1 匹あたり 4 匹のドナーラット)。

フローサイトメトリーにより、注入した細胞の定着を確認する。

約 1 ヶ月後に卵巣摘出を行い、その 3 週間後に 90 分の中大脳動脈閉塞 (MCAO) を誘発する。

最灌流 24 時間後に摘出した脳の薄切切片を作製後、神経細胞 (NeuN) および血管内皮 (CD31) の免疫染色を行い、GFP 蛋白結合細胞の局在と比較観察する。

MCAO 後 1, 3, 7, 14 日目に摘出した脳の薄切切片を作製後、神経細胞 (NeuN)、幹細胞 (Nestin, Musashi-1)、新生細胞 (Brd-U) および血管内皮 (CD31) の免疫染色を行い、GFP 蛋白結合細胞の局在と比較観察する。

MRA による造血幹細胞の増加や活性化を調べ、神経細胞、血管の再生を解析する。GFP 細胞の局在と神経細胞の伸張と関連した蛋白の局在を免疫染色で観察し、薬物投与による骨髄由来細胞による神経再生増強作用を解析する。

(平成 26 年度)

24 年度、25 年度分の継続
研究内容をまとめ投稿する。

4. 研究成果

高血圧は男性に多くみられるが、女性も閉経期以後上昇する場合が多くなる。脳血管障害のリスクファクターとして高血圧、糖尿病は発症率や予後に悪影響を及ぼす。これまでは高血圧と塩分摂取は一体化して考えられており、塩分摂取により高血圧を誘導、その結果心臓や脳血管障害にいたると考えられている。しかし、我々のグルー

プにおける脳動脈瘤の形成における実験的研究から、雌性ラットにおいて高塩分食を負荷すると血圧には影響なく脳動脈瘤形成頻度が上昇することを見出した。この結果から血圧とは独立して、体内 Na 貯留の増加が脳血管障害に関係することが示唆された。

エストロゲンは血管障害に対して保護作用を示すことが多くの報告で証明されており、閉経によるエストロゲン欠乏が脳血管障害の増加に関与していると考えられている。これらの知見を踏まえ、正常血圧下において体内塩分貯留量と脳血管障害との関連性を調べた。通常食を与えた雌雄ラットに較べて、高塩分食により雄性ラットでは体内 Na 貯留および水分貯留に関連して血圧が上昇するのに対し、雌性ラットでは卵巣摘出の有無にかかわらず、水分貯留の増加は見られず、血圧への影響も見られなかった。雄性ラットの血圧上昇には体内水分貯留や CL 濃度増加との関連が示唆された。

これらのラットに脳梗塞を誘発したところ卵巣摘出した雌性ラットでは雄性ラットより脳梗塞サイズの拡大が認められた。この作用と脳内 Na 貯留との関連が見られた。

卵巣摘出ラットでは正常食でも脳内 Na 貯留量が増加しており、脳損傷の拡大が見られた。血圧に対する塩分感受性の性差だけでなく、エストロゲン欠乏による組織障害では Na 蓄積の重要性を示唆した。

この Na 蓄積のメカニズムをさらに検討するために、Na の体内貯留に関係するミネラルコルチコイド受容体阻害剤を用いて調べた。脳損傷の抑制と関連して脳内 Na 量の低下がみられた。さらにこの作用にミネラルコルチコイド受容体の発現低下や Na 排泄ポンプの ATP1a3 の増加が関与していることを見出した。高塩分食を負荷した場合の虚血性脳損傷への影響について、性差および卵巣摘出の有無による違いを明らかにし、エストロゲン欠乏状態では組織内に Na の蓄積が増加し、さら

に塩分を負荷すると、この作用が増悪され、
血圧とは独立して Na 貯留が脳損傷に影響
することから、血圧とは別に、Na 蓄積を制
御することが重要であるという見解を新た
に示した。この成果をまとめて英文誌に投
稿、revision 中である。

エストロゲン欠乏に塩分が負荷された状態
での研究は国内・外ともにほとんどないこと
から本研究は、新たな観点から脳梗塞予防や治
療を考える上で、意義が深いと思われる。

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 4 件)

- 1) Tada Y, Yagi K, Uno M, Matsushita N, Kanematsu Y, Kuwayama K, Shimada K, Nishi K, Hirasawa M, Satomi J, Kitazato K, Kageji T, Matsuura E, Nagahiro S Improvement of plasma biomarkers including angiotensin-(1-7) after switching from other angiotensin II type I receptor blockers to olmesartan in stroke patients with insufficient blood pressure control. J stroke cerebrovasc dis 2015. in press 査読あり
- 2) Tada Y, Shimada K, Furukawa H, Wada K, Wei Y, Tada Y, Kuwabara A, Shikata F, Kanematsu Y, Lawton MT, Kitazato KT, Nagahiro S, Hashimoto T. Angiotensin-(1-7) protects against the development of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in mice. J Cereb Blood Flow Metab. 2015 in press Mar 11. 査読あり
- 3) Tada Y, Wada K, Shimada K, Makino H, Liang EI, Murakami S, Kudo M, Shikata F, Pena Silva RA, Kitazato KT, Hasan DM, Kanematsu Y, Nagahiro S,

Hashimoto T. Estrogen protects against intracranial aneurysm rupture in ovariectomized mice. Hypertension. 2014; 63: 1339-1344. 査読あり

- 4) Matsushita N, Kitazato KT, Tada Y, Sumiyoshi M, Shimada K, Yagi K, Kanematsu Y, Satomi J, Nagahiro S. Increase in body Na+/water ratio is associated with cerebral aneurysm formation in oophorectomized rats. Hypertension. 2012; 60: 1309-1315. 査読あり

[学会発表](計 1 件)

- 1) Shimada K, Tada Y. Kanematsu Y, Kitazato K, Nagahiro S, Hashimoto T et al, Role of Angiotensin-(1-7) on intracranial aneurysm rupture, 9th World Stroke Congress, October 22 - 25 2014, Istanbul, Turkey,

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼松 康久 (KANEMATSU, Yasuhisa)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：90363142

(平成25年度削除)

(2) 研究分担者

永廣 信治 (NAGAIRO, Shinji)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：60145315

里見 淳一郎 (SATOMI, Junichiro)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授

研究者番号：10304510