

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：12611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870639

研究課題名(和文)神経性高血圧症の中枢内分子細胞機序の解明

研究課題名(英文)Cellular mechanisms in the brainstem underlying neurogenic hypertension

研究代表者

グホ サビン(GOURAUD, Sabine)

お茶の水女子大学・理学部・学部教育研究協力員

研究者番号：30453179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高齢者の半数以上が原因不明の本態性高血圧症に罹患している。このうち交感神経活動の賦活化に起因する症例は神経性高血圧症と呼ばれている。その動物モデルであるSHRでは、主要な血圧調節中枢である延髄孤束核の異常が高血圧の発症に関与しており、特に炎症性因子など神経機能を調節する分子の異常発現が近年数多く報告されている。したがって、神経性高血圧の発症には神経細胞だけに焦点をあてるのではなく、神経機能を調節するアストロサイトを含む支持細胞の特徴を理解することが重要である。本研究によってアストロサイトの先天的な遺伝子発現異常も神経性高血圧の発症に寄与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of neurogenic hypertension is not well understood. However, several inflammation-related factors have been found abnormally expressed in the primary cardiovascular centers of SHR. Since neural supporting cells are major source for these molecules, biological characteristics of these cells should be determined for further understanding of hypertension mechanisms. We prepared primary astrocytes from the medulla oblongata of SHR and gene expression profiles were investigated. Moreover, effects of LTB<sub>4</sub>, which is highly produced in the brain of SHR, on these cells were investigated. This project revealed that gene expression profiles of inflammation/apoptosis-related factors were different between SHR and control rats even at the level of astrocytes. Moreover, LTB<sub>4</sub> and other class of molecules such as neurotrophins may also contribute to abnormal functions of cardiovascular centers. These results will provide us a novel insight into the mechanisms of essential hypertension.

研究分野：生理学、分子生物学

キーワード：高血圧 循環調節 孤束核 アストロサイト サイトカイン ケモカイン 炎症 神経栄養因子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 日本では高齢者の半数以上が高血圧症に罹患しているといわれている。その多くは原因不明の本態性高血圧症である。このうち交感神経活動の賦活化に起因する症例は神経性高血圧症と呼ばれており、その発症機序は脳内に存在する。神経性高血圧症の動物モデルである spontaneously hypertensive rat (SHR) では、主要な血圧調節中枢である延髄孤束核の異常が高血圧の発症に関与していること、特に孤束核における炎症性因子やアポトーシス関連因子の異常発現が高血圧発症に関与していることが明らかとなった (Gouraud et al, 2011a, 2011b)。

(2) 炎症性因子については、SHR の孤束核ではロイコトリエン B4 (LTB4) が過剰に合成されており (Waki et al, 2013) その調節の下流にあるケモカイン Ccl5 の発現はむしろ低下していることがわかっている (Gouraud et al, 2011a) 。また、Ccl5 の異常発現は高血圧を誘発すること、さらに LTB4 受容体 (BLT1) はアストロサイトに発現していることから (Gouraud et al, 2011a) 炎症性因子などによる、アストロサイト - 神経細胞間クロストークの破綻が神経性高血圧の発症に起因している可能性が示されている (Waki et al, 2014) 。

(3) 以上から、神経性高血圧発症の機序について理解するには、神経細胞だけに焦点をあてるのではなく、神経機能を調節する支持細胞の特徴を十分に理解することが重要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、神経性高血圧発症の分子細胞機序について調べることを目的とし、以下の3つを検証した。

(1) 高血圧発症に関わる循環調節中枢内新規分子を探索する。SHR の孤束核において神経系の発達や機能に直接影響を及ぼし、且つ炎症性因子やアポトーシス関連因子と相互

作用を有する神経栄養因子の遺伝子発現やその循環調節作用について明らかにする。

(2) SHR の循環調節中枢由来培養アストロサイトにおける炎症性因子、アポトーシス関連因子および神経栄養因子の遺伝子発現プロファイルについて明らかにする。

(3) LTB4 に着目し、LTB4 がラットの孤束核および培養アストロサイトの遺伝子発現に及ぼす影響について調べる。

## 3. 研究の方法

(1) 高血圧発症に関連した循環調節中枢内新規分子の探索

PCR アレーを用いて高血圧動物モデル (SHR) と正常血圧ラット (Wistar Kyoto Rat: WKY) の孤束核において発現している神経栄養因子の遺伝子を調べ、その発現水準およびタンパク質発現量を両者で比較した。また、SHR に発現異常を認めた分子 (Hcrt, Orexin A の前駆体、以下参照) の機能的役割について調べるため、SHR および WKY の孤束核へ Orexin A を微量注入した際の循環応答について調べた。

(2) SHR の循環調節中枢由来培養アストロサイトの遺伝子発現プロファイル

SHR と WKY の尾側延髄部からアストロサイトを単離し初代培養を行った。培養成功の有無は GFAP 抗体を用いた免疫組織学的手法と GFAP 遺伝子発現解析により検討した。また、リアルタイム PCR 法により高血圧関連因子の遺伝子発現について両群間で比較した。

(3) LTB4 がラットの孤束核、および培養アストロサイトの遺伝子発現に及ぼす影響

ラットの孤束核に LTB4 を微量注入した際の遺伝子発現変化について観察した。次に、市販の初代培養アストロサイト (ラット大脳皮質由来) と培養神経細胞 (マウス Neuro2A) を用い、LTB4 を添加することによる Ccl5 などの炎症性因子の発現変動についてリアルタイム PCR 法および Elisa 法を用いて調べた。

最後に(2)で作成した SHR の循環調節中枢由来培養アストロサイトを、LTB4 添加に対する遺伝子発現変化についても調べた。

#### 4. 研究成果

(1) SHR の孤束核では、神経栄養因子に分類される Gfra 3、Hcrt( prepro-orexin )、IL10ra、Crhbp、Fas、および IL6 の遺伝子発現に異常を認めた。更に、Hcrt 遺伝子の異常発現(発現低下)を受け、SHR の孤束核へ Orexin A を微量注入したところ、血圧が低下し、その減少量は正常血圧ラット(WKY)に比べ大きかった(図1)。以上より、SHR の高血圧発症には孤束核 Hcrt 遺伝子発現低下が一部寄与している可能性が示された。また抗体の特異性が示された Gfra 3 についてタンパク質発現量を調べたところ、RNA で得られた結果と同様の知見が得られた。

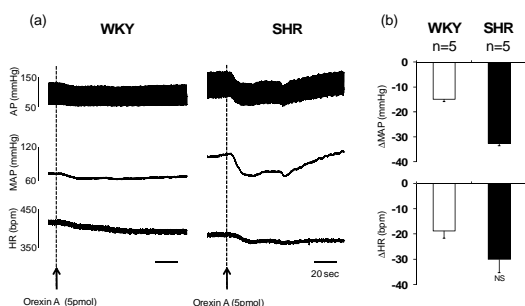


図1 Orexin A を孤束核へ微量注入した時の循環反応 (A:実際の記録例、B:グループデータ)

(2) SHR と WKY の孤束核を含む尾側延髄背側核部からアストロサイトを単離し、初代培養を行った。繊維芽細胞の混在を如何に少なくするかが重要であり、既知のプロトコルを改変することにより、より純度の高い初代培養技術を確認することができた(図2)。SHR 由来のアストロサイトでは、WKY に比較し Fas、Gfra 3、IL6 および IL10ra の遺伝子発現に異常を認め、孤束核で確認された結果と同様であった。この他に酸化ストレスや低酸素で反応する heme oxygenase-1 (HO-1) 遺

伝子も SHR の孤束核組織同様に過剰発現していることがわかった。また SHR および WKY 由来アストロサイトでは共に LTB4 受容体である BLT1 発現を認めたが、両者に差を認めなかった。

以上の結果は延髄循環調節中枢におけるアストロサイトの遺伝子発現異常が高血圧発症に少なからず寄与している可能性を示唆している。

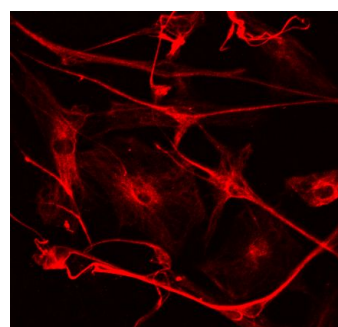


図2 SHR の延髄由来培養アストロサイト

(3) 孤束核内への LTB4 投与および市販のラット培養アストロサイトへ LTB4 を添加することにより共通して得られた反応は、Ccl5 の発現低下であった。しかし、培養神経細胞 (Neuro2A) を用いても LTB4 に対する反応は観察されなかった。また、SHR および WKY の延髄由来培養アストロサイトを用いて LTB4 添加が炎症性サイトカイン遺伝子発現に及ぼす影響について検討した結果、SHR では上記の見解と同様に Ccl5 遺伝子発現の低下を認めた(図3)。これらの結果は、少なくとも LTB4 過剰生成に依存した高血圧症では、孤束核アストロサイトを介した Ccl5 発現低下が孤束核機能の異常とそれに伴う神経性高血圧の発症に関与している可能性を示唆している。恐らく Ccl5 は神経細胞機能の恒常性にある種の役割を担っており (Gouraud et al, 2011a) その発現低下がアストロサイト-神経細胞クロストークに影響し孤束核機能を低下させている可能性が考えられる。

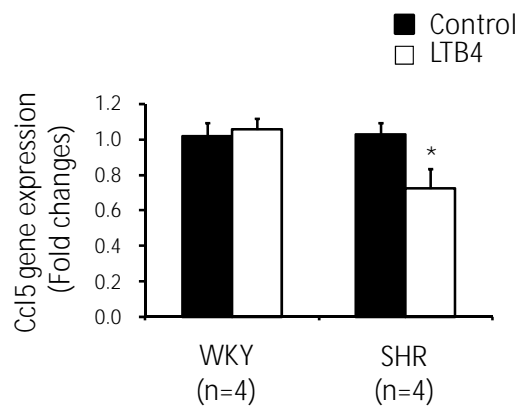


図3 LTB4が延髄由来培養アストロサイトのCcl5発現に及ぼす影響

この他の結果として、Ccl5の添加はNeuro2Aのc-fos発現には影響を及ぼさないことが確認された。すなわち、in vivo実験で観察されたCcl5の孤束核投与による降圧効果(Gouraud et al, 2011a)には更に別のメディエーターが関与し孤束核神経細胞を興奮させている可能性が示された。但しこの点については、ラット延髄由来の初代培養神経細胞を用いてさらに検証する必要がある。

以上より、SHRの孤束核において過剰合成されているLTB4は、アストロサイトに発現しているBLT1に作用し、アストロサイト由来のCcl5発現を減少させると考えられた。Ccl5発現低下はSHRにおける高血圧発症に寄与していると考えられているが(Gouraud et al, 2011a)、今のところCcl5が孤束核における圧受容器感受性神経細胞に直接影響を及ぼす根拠は得られていない。また、SHRのアストロサイトにおけるFas、Gfra 3、IL6、IL10raおよびHO-1の発現異常と病態発症との関連性、特にこれらの因子が孤束核内に存在するオレキシン神経細胞の軸索(Hcrt遺伝子を発現している)に及ぼす影響については今後さらに検討していく必要がある。

結論として本研究によりアストロサイトの遺伝子発現異常も神経性高血圧の発症に寄与している可能性が示された。

<引用文献>

Waki H, Henty EB, Hindmarch CCT, Gouraud S, Toward T, Kasparov S, Murphy D, Paton JFR, Excessive leukotriene B4 in nucleus tractus solitarius is pro-hypertensive in spontaneously hypertensive rat, *Hypertension*, 61, 2013, pp194-201

Gouraud SS, Waki H, Bhuiyan MER, Takagishi M, Cui H, Kohsaka A, Paton JFR, Maeda M, Down-regulation of chemokine Ccl5 gene expression in the NTS of SHR may be pro-hypertensive, *J Hypertension*, 29, 2011a, pp732-740

Gouraud SS, Waki H, Bhuiyan MER, Takagishi M, Kohsaka A, Maeda M, Increased anti-apoptotic conditions in the nucleus tractus solitarius of spontaneously hypertensive rat, *Auton Neurosci*, 162, 2011b, pp15-23

#### 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2件)

Waki H, Takagishi M, Gouraud SS, Central mechanisms underlying anti-hypertensive effects of exercise training, *J Phys Fitness Sports Med*, 査読有, 3, 2014, pp317-325

DOI: 10.7600/jpfsm.3.317

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpfsm/3/3/3\\_3\\_17/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpfsm/3/3/3_3_17/_pdf)

Waki H, Gouraud S, Brain inflammation in neurogenic hypertension, *World Journal of Hypertension*, 査読有, 4, 2014, pp1-6

DOI:10.5494/wjh.v4.i1.1

<http://www.wjgnet.com/2220-3168/full/v4/i1/1.htm>

[学会発表](計3件)

和気 秀文、高岸 美和、グホ サビン、向阪 彰、前田 正信、結節乳頭核 - 孤束核

経路は昇圧反応を惹起する、第 92 回日本生理学会大会、神戸コンベンションセンター、神戸市、兵庫県、2015 年 3 月 22 日

グホ サビン、和気 秀文、高岸 美和、向阪 彰、前田 正信、SHR 孤束核におけるプレプロオレキシン遺伝子発現低下は高血圧発症に關与する。第 91 回日本生理学会大会、鹿児島大学、鹿児島市、2014 年 3 月 17 日

Gouraud S, Waki H, Takagishi M, Kohsaka A, Paton JF, Maeda M, Altered expression profile of neurotrophin transcripts and proteins in the NTS of spontaneously hypertensive rats, 37<sup>th</sup> Congress of IUPS, International Convention Centre, Birmingham, UK, 2013 年 7 月 24 日

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

グホ サビン (GOURAUD, Sabine)

お茶の水女子大学・理学部・学部教育研究協力員

研究者番号：30453179