

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 13 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461258

研究課題名(和文)腎除神経による慢性降圧における脳内レニン・アンジオテンシン系関連機序の解明

研究課題名(英文) Roles of brain renin-angiotensin system in the chronic blood pressure lowering effects by renal denervation

研究代表者

森本 聡 (Morimoto, Satoshi)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80257534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は治療抵抗性高血圧患者においてカテーテルによる腎除神経術(RDN)が慢性的降圧をもたらす脳内機序を検討するために企画された。しかし、HTN-3試験によりRDNによる偽手術に比しての降圧効果の優位性が否定され、RDNの降圧における有効性が疑問視されるようになった。そこで、テーマを修正して、高血圧自然発症ラット(SHR)における、脳内(プロ)レニン受容体[(P)RR]の役割について検討することとした。現在、SHRにおける脳内(P)RR発現の亢進の有無、および脳内(P)RR発現が血圧、脳内酸化ストレス、バゾプレシン分泌、交感神経活動、飲水行動、食塩嗜好に及ぼす影響を検討しているところである。

研究成果の概要(英文)：This study was planned to investigate the central mechanisms involved in the chronic blood pressure lowering effects by catheter-based renal denervation (RDN). In the HTN-3 Study, however, RDN failed to show significantly greater blood pressure reduction compared with sham procedure in resistant hypertension, directing questions at the blood pressure lowering effects of RDN. Therefore, the study theme was changed to investigation of roles of brain (pro)renin receptor in spontaneously hypertensive rats (SHRs). I am examining if (pro)renin receptor expression is increased in brain of SHRs and the roles of brain (pro)renin receptor in the regulation of blood pressure, brain oxidative stress, vasopressin secretion, sympathetic nerve activity, drinking behavior, and salt preference in these rats.

研究分野：高血圧

キーワード：交感神経活動 高血圧 レニン-アンジオテンシン系 (プロ)レニン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

本態性高血圧の成因には多因子が関与するが、中でも交感神経活動(SNA)の亢進が重要である。SNAの中核であり血管運動中枢として知られる頭側延髄腹外側野(rostral ventrolateral medulla, RVLM)のニューロンの電気活動亢進は、末梢交感神経の亢進をもたらす。その結果心臓や動脈に作用して血圧を上昇させる。腎臓においては、傍系球体細胞の1受容体刺激によるレニン分泌およびそれに基づくアンジオテンシン(Ang) IIやアルドステロン産生の亢進、尿細管細胞の1受容体刺激によるNa再吸収亢進、血管床の1受容体刺激による収縮をもたらす血圧を上昇させる。その結果もたらされる腎虚血、腎実質障害により求心性腎神経が亢進し、視床下部室傍核(PVN)等にその情報を伝えるが、PVNからはRVLMに下行性の情報が伝わる結果SNAが亢進する、という悪循環が形成される。

RVLMが亢進する脳内機序としては、全てのレニン・アンジオテンシン系(RAS)コンポーネントの発現が確認されること、研究代表者が作製した脳特異的Ang II過剰産生マウスはSNAの亢進や高血圧を呈する(Morimoto S, et al. Circ Res 2001, Morimoto S, et al. J Biol Chem. 2002)などの知見により、脳内RASの亢進が最も有力な候補と考えられている。さらに、RAS亢進の結果もたらされる酸化ストレスの亢進(Kishi T, et al. Circulation. 2004)の関与も示唆されている。一方、プロレニンはレニンの非活性化型前駆体であるが、(プロ)レニン受容体[(P)RR]と結合することにより活性化し、レニンと同様にアンジオテンシノーゲン(Agt)をAng Iに変換することが可能となる。さらに、(P)RRとプロレニンやレニンへの結合はMAP kinase等のアンジオテンシン非依存性の細胞内シグナルを惹起するため、組織RAS調節において重要な役割を果たすと考えられるようになった(Ichihara A, et al. J Clin Invest. 2004)。(P)RRの発現は様々な臓器で見られるが、特に脳、心、胎盤で多く、腎、肝、膵、肺、骨格筋よりも多い(Nguyen et al, J Clin Invest. 2002)。脳内においては(P)RRは広範囲に発現し、下垂体における発現が最も多いが、上記交感神経経路に関与する視床下部や延髄における発現も確認されている(Takahashi K, et al. J Neuroendocrinol. 2010)。脳内(P)RRにより産生されたAng IIがSNAの亢進を介して血圧上昇をもたらすことも報告されている(Li W, et al. Hypertension. 2012)。PVNにはRVLMに投射し交感神経を亢進させるニューロンのみならず、バゾプレッシンやオキシトシンを産生し下垂体後葉から分泌させる大細胞性ニューロンが存在する。

興味深いことにPVNにはAng 1型(AT1)受容体が存在し、外因性にAng IIを投与するとSNAやバゾプレッシンの分泌亢進が見られ

る。さらに、PVNにおいては大細胞性ニューロンにおいて(P)RRはバゾプレッシンやオキシトシンと共発現が見られる(Takahashi K, et al. J Neuroendocrinol. 2010)。

SNAの亢進は高血圧のみならず、様々な臓器障害の原因となるためその制御が重要と考えられる。それに対し、高血圧自然発症ラット(SHR)など数多くの高血圧モデルにおいて、腎交感神経除神経術(RDN)によりSNAの抑制や降圧が得られることが報告されてきた(Dibona, GF. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005)。すなわち、RDNは上記の脳-交感神経-求心性腎神経回路の悪循環を断ち切ることができると考えられる。近年、難治性高血圧患者においてカテーテルを用いて『遠心性腎交感神経・求心性腎神経を同時に焼灼して除神経する治療(Catheter-based RDN)』が行われるようになり注目されるようになった。治療抵抗性高血圧においてcatheter-based RDNにより、SNAが抑制され(Schlaich, et al. N Engl J Med. 2009)、2年以上にわたり著明な降圧が見られること(Henry Krum, et al. Hypertension. 2011)や心肥大の退縮(Brandt, et al. J Am Coll Cardiol. 2012)や糖代謝・インスリン抵抗性(Felix Mahfoud, et al. Circulation. 2011)の改善が報告され、RDNの降圧のみならず、臓器保護・代謝改善に及ぼす好影響が広く知られるようになった。興味深いことに血圧は1か月以降にもさらに増強していく傾向が見られる。遠心性腎交感神経の切断のみの効果だけではなく、中枢性血圧調節機構、血管内皮機能、腎機能の変化が関与している可能性も考えられるが、これらについてはほとんど解明されていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、そのうち高血圧におけるRDNが降圧をもたらす脳内血圧調節機構に関する神経因子、液性因子の変化について検討することとした。

## 3. 研究の方法

### (1) SHRSPにおける検討

#### 【使用する動物モデルについて】

SNAや脳内RASが亢進している高血圧モデルである高食塩食負荷stroke-prone SHR(SHRSP)を用いる。

#### 【手術法】

##### RDN

12週齢のSHRSPおよびコントロールとしてのWistar-Kyoto rat(WKY)において、ペントバルビタール麻酔下に、テレメトリー器(MLE1022 交感神経・血圧送信機(AD INSTRUMENTS))を大腿動脈に挿入・左腎交感神経に装着する。SHRSPを2群に分け、RDN(第10胸椎~第2腰椎レベルにおける後神経根切断術(Campese VM, et al. Hypertension. 1995)あるいは偽手術を行い、WKYには偽手術を行う。

脳室内注入用カニューラの挿入  
RDN 施行後に一期的に行う。定位脳固定装置を使用して右側脳室内に薬物注入用カニューラ(26ゲージ、ステンレス製)を挿入し、デンタルセメントで固定する。

#### 【グループ分け】

SHRSP(+)群: RDN を施行した SHRSP 群、SHRSP(-)群: 偽手術を施行した SHRSP 群、およびコントロール群: 偽手術を施行した WKY 群に分ける。食餌はいずれの群も 8%高食塩食とする。

#### 【検討項目】

体重、尿量(尿は代謝ケージで採取)(RDN 直前、1週、2週、3週、4週後)

血圧、脈拍数、腎 SNA (RDN 直後より 4 週後まで、テレメトリー法を用いて持続的に測定)

24 時間尿中排泄量測定 (RDN 直前、4 週後): アルブミン、Na、K、ノルアドレナリン (HPLC 法で測定)

脳室内注入: 無麻酔・無拘束下に、下記薬剤を 1 分間かけて注入し、血圧、脈拍数、腎 SNA の変化を観察する。

a) プロレニン (RDN4 週後) (投与量は予備実験を行って決定する)

b) カンデサルタン (ARB) (投与量は予備実験を行って決定する)、その 5 分後にプロレニン (投与量は予備実験を行って決定する) (RDN4.5 週後)

c) (P)RR に対する handle region peptide[(P)RR 阻害薬] (RDN 5 週後) (投与量は予備実験を行って決定する)

d) tempol (活性酸素消去剤) 投与 (RDN5.5 週後) (投与量は Nagae A et al. Circulation. 2009. に準じる)

以下の実験は脳内への薬物の注入などによる影響が出ないように、上記とは別に RDN のみ行った (すなわちテレメトリーや脳室内注入用カニューラを植え込んでいない) ラットで行う。

血中濃度 (活性): 断頭堵殺し採取した血液を用いる (RDN4 週後)

Na、K、クレアチニン、レニン活性、アルドステロン、バゾプレシン、Ang II (RIA 法で測定)

脳内の RAS コンポーネントの mRNA 発現 (RDN4 週後)

断頭堵殺したのち脳を取り出し、視床下部および延髄の RNA を抽出する。real time quantitative RT-PCR を用いて以下の mRNA レベルを測定する。

レニン、AGT、ACE、(P)RR (測定方法は Ichihara A et al. Hypertension. 2006 に準じる)、AT1 受容体 (Nishimura M, et al. Acta Physiol 2007 に準じる)。

脳内 Ang II 濃度 (RDN4 週後)

断頭堵殺したのち脳を取り出し、視床下部および延髄の Ang II 濃度を RIA 法にて測定する (Ichihara et al. J Clin Invest. 2004 に準じる)。

脳内の NADPH oxidase (活性酸素種の供給源) 活性、Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) (活性酸素産生の指標)

断頭堵殺したのち脳を取り出し、視床下部および延髄における活性を測定する (Nishihara M et al. J Hypertens. 2012 に準じる)

視床下部における (P)RR、バゾプレシン二重免疫染色 (RDN4 週後)

断頭堵殺したのち脳を取り出し、ホルマリンで固定し、視床下部における切片を作成する。非蛋白融解的に活性化されたプロレニン染色および総 (活性化 + 非活性化) プロレニン受容体染色 (Ichihara et al. J Clin Invest. 2004 に準じる) とバゾプレシン染色 (Takahashi K et al. J Neuroendocrinol. 2010 に準じる) の共染色を行い、陽性細胞数をカウントする。

これらの結果を SHRSP(+)群、SHRSP(-)群、コントロール群の 3 群間で比較を行う。

## (2) ヒト (P)RR トランスジェニック・ラットにおける検討

脳内 (P)RR 由来の Ang 非依存性細胞内シグナルに RDN が及ぼす影響について検討するために以下の実験を行う。本研究では視床下部および脳幹部のニューロンにおいて Ang 非依存性細胞内シグナルとして確認されている ERK1/2 のリン酸化 (pERK) (Shan Z et al, Exp Physiol. 2008;93:701-708) などに着目する。

#### 【使用する動物モデルについて】

ヒト (P)RR トランスジェニック (TG) ラット (Kaneshiro Y et al. J Am Soc Nephrol. 2007) を用いる。このラットでは、組織の Ang II 濃度は増加しないが、Ang 非依存性細胞内シグナルが亢進していることが確認されている。

#### 【手術およびグループ分け】

12 週齢の TG ラットに上記と同様に RDN あるいは偽手術を行う。RDN4 週後に下記項目を検討し、結果を RDN 施行群と偽手術施行群の 2 群間で比較する。食餌は普通食とする。

#### 【検討項目】

視床下部および延髄で検討

ヒト (P)RR mRNA 発現量 (RT-PCR 法)

免疫染色

a. ヒト (P)RR

b. リン酸化 ERK1/2、リン酸化 JNK、リン酸化 EGF 受容体、TGF-

一部のラットにおいては RDN あるいは偽手術施行時に脳室内注入用カニューラを挿入し、その 3 週後に osmotic minipump を用いて以下の薬剤を 1 週間注入した後にリン酸化 ERK1/2、リン酸化 JNK、リン酸化 EGF 受容体、TGF- 染色を行う。

c. 脳室内カンデサルタン投与後

d. 脳室内 handle region peptide 投与後

## 4. 研究成果

### (1) 研究体制の確立

テレメトリー法による血圧・脈拍数測定：腹部大動脈からのカテーテルの挿入・留置、無麻酔・無拘束下における血圧、脈拍数の測定の練習を行い、安定した手技を習得するに至った。

畜尿、尿量測定：代謝ケージを用いて畜尿、尿量の測定を行うことができるようになった。

RDN：RDNの方法としては神経再生による除神経効果の減弱が無いとされる第10胸椎～第2腰椎レベルにおける後神経根切断術を試みた。しかし、そのために必要な椎体の切除に難渋し、繰り返し試したものの低侵襲でかつ有効な除神経を得ることができなかった。そのため、ラットにおいて後神経根切断術を用いた研究を行なっている東京大学泌尿器科で見学し、手術手技を学んだ。その後繰り返し練習を行ったが、多くのラットは術後に全身状態が悪化し、その後の慢性実験を行うに足る良好な全身状態を保つことが極めて困難であった。RDNを（腎動脈周囲神経の物理的切断およびフェノール塗付による）遠心性腎交感神経除神経術に切り替えることとし、香川大学薬理学教室にて実験手技を学んだ。腎交感神経とリンパ管の鑑別が難しく手技の習熟に時間がかかったが、最終的にはRDN後、ラットの活動性が低下することはなく、かつ腎臓組織におけるノルアドレナリン濃度が測定感度以下となることが確認され手技は習得できたと考えられた。

脳室内薬物注入：脳定位固定装置を用いて側脳室内への薬物注入用カニューラ挿入術を行い、術後に無麻酔・無拘束下に薬物を注入することが可能となった。

関連因子の脳内発現の検討：レニン・アンジオテンシン系コンポーネントを含む各関連因子の脳内発現を検討するために real time quantitative RT-PCR、Western blot を行うことができるようになった。

## (2) 研究内容の見直し

上記のごとく研究体制の確立を行っていた際の2014年1月、米国において行われた臨床試験（HTN-3試験）において、catheter-based RDN施行群とコントロール群（catheterを腎動脈まで挿入するが通電はしないという偽手術群）の2群間では降圧効果には有意差は見られなかったことが報告された（Bhatt DL, et al. N Engl J Med. 2014）。このため、catheter-based RDNの有効性が見直されるようになり、RDNの有効性機序に関する検討を行う研究の意義が疑問視されるようになった。しかし、高血圧の発症機序における脳内(P)RRを含むRASが重要な役割を有する可能性は依然として残る。代表的な遺伝性高血圧モデルであるSHRは、脳内RASの発現およびSNAの亢進が高血圧の原因の一つと考えられるが、すでに脳内における(P)RRの発現が正常血圧のWKYに比し亢進していることが報告されている。そこで、熟考の末テ

ーマを修正して、SHRにおける脳内(P)RRの役割について検討することとした。

## (3) 修正後の研究テーマ：SHRの血圧上昇機序における脳内(プロ)レニン受容体の役割

本研究では以下の検討を行う予定とした。

実験1：脳内(P)RRの発現量についての検討

雄性のSHRとWKYにおいて脳内の(P)RR mRNAおよび(P)RR蛋白の発現レベルをそれぞれ real time quantitative RT-PCR法およびWestern blot法を用いて測定する。検討部位は脳全体、視床下部(全体、あるいは室傍核、視索上核)、脳幹部(全体、あるいは延髄全体、頭側延髄腹外側野)とする。また、(P)RRとプロレニンあるいは活性化プロレニンとの二重染色を行う。

実験2：急性脳室内投与の影響に関する検討

【手術方法】

a) テレメトリーの挿入

10週齢のラットの腹大動脈からテレメトリーの測定用カテーテルを挿入し、腹腔内に本体を留置する。

b) 脳室内カニューレの挿入

a)のテレメトリーの挿入時に一期的に側脳室に薬剤注入用のガイドカニューレを挿入する。

【検討項目】

上記手術を受けたラットにおいて、11週齢の時点で、無麻酔・無拘束下にラットの側脳室内に以下の薬剤を1分間かけて注入する。注入前から注入1時間後まで血圧、脈拍数、血管SNAを連続測定する。各実験の間には3日の間隔を空けることとする。

a) Ang II

b) プロレニン

c) テルミサルタン(ARB)側脳室内投与5分後にプロレニン

d) handle region peptide (HRP) [(P)RR拮抗薬]側脳室内投与5分後にプロレニン

実験3：慢性脳室内投与の影響に関する検討

【手術方法】

浸透圧ポンプの挿入：12週齢時に持続注入用のポンプを皮下に留置する。ポンプは一定の速度で内容を放出することができ、脳室内の薬物濃度を長期間一定にすることが可能となる。投与期間は4週間とする。使用する浸透圧ポンプは予め投与薬剤を封入してから留置する。

【検討項目】(図)

a) 実験群の設定：SHR、WKYをそれぞれHRP投与群と溶解液であるACSF投与群に振り分ける。すなわち、SHR-HRP群、SHR-ACSF群、WKY-HRP群、WKY-ACSF群の4群に分類する(それぞれn=5)。

b) 薬剤の慢性投与実験 下記を行い、4群間で比較する。

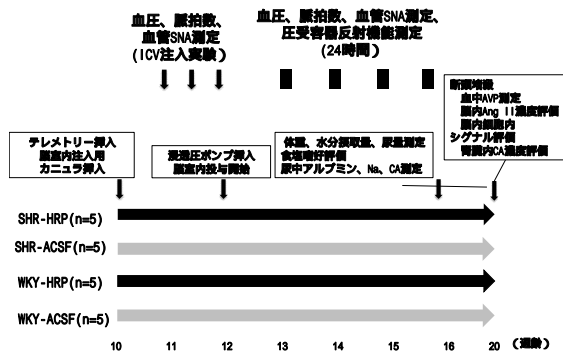


図 3. 実験 3 のプロトコール

脳室内カニューレから、浸透圧ポンプで HRP または ACSF を持続投与する。期間を 4 週間とし、1 週間に一度の割合で 24 時間テレメトリーによる血圧・脈拍・血管 SNA 測定を行う。

i. 4 週間の投与が終了した (16 週例) のラットにおいて以下を測定する。

- ・水分摂取量・尿量
- ・食塩嗜好：無塩食下に食塩水と水道水を自由に飲水できる状況とした場合の食塩水飲水量を総飲水量で除した値で評価する
- ・尿中アルブミン排泄量、尿中 Na 排泄量
- ・尿中カテコラミン濃度 (HPLC 法)

ii. 20 週齢時に断頭屠殺を行い下記の測定を行う。

- ・血中バソプレシン濃度 (RIA 法)
- ・腎内カテコラミン濃度測定 (HPLC 法)

以下は脳全体、視床下部、脳幹部において評価する。

- ・脳内 Ang 濃度 (RIA 法)
- ・脳内細胞内シグナル (活性化した ERK・PI3K/Akt、Western blot 法)
- ・脳内酸化ストレス：NADPH oxidase (活性酸素種の供給源) 活性、Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) (活性酸素産生の指標) (Nishihara M et al. J Hypertens. 2012 に準じる)

#### (4) 修正後の研究テーマにおける研究進捗状況

これまでに、SHR では正常血圧の WKY に比べ、1) 血圧が高値で、水分摂取量が多く、食塩嗜好が高いこと、2) 脳内に Ang II あるいはプロレニンを注入した時の昇圧が大きいこと、3) プロレニンによる昇圧は ARB の前投与、(P)RR 阻害薬の前投与により阻害されることが確認された。しかし、a) 脳全体、および b) (水電解質・SNA 調節において重要な役割を担う) 視床下部全体、延髄全体、PVN、視索上核、RVLM の各領域において (P)RR の発現を検討しているが、これまでのところ SHR における発現の亢進が確認できていない。そのため、現在再実験および高食塩負荷後における同様の検討を行っているところである。

SHR における脳内 (P)RR 発現の亢進が確認されれば、引き続き残りの検討を行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

該当事項なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

森本 聡 (Morimoto, Satoshi)

東京女子医科大学・内科学 (第二) 講座・准教授

研究者番号：80257534

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし