

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15119

研究課題名(和文) 食塩感受性高血圧における視床下部のアルドステロン合成酵素の機能探索

研究課題名(英文) Physiological role of hypothalamic aldosterone synthase in high-salt diet-induced hypertension

研究代表者

山口 賀章 (Yamaguchi, Yoshiaki)

京都大学・薬学研究科・助教

研究者番号：30467427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧は、虚血性心疾患や腎不全などの発症原因となるため、その対策は臨床的に重要である。血圧制御機構として、末梢のレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系(RAAS)のネガティブフィードバック機構が知られており、血圧上昇後には腎臓からのレニン分泌が阻害され、血圧が下がるとされている。本研究において私は、高食塩負荷マウスにおいて、脳内では末梢とは逆に、アルドステロン合成酵素の発現が上昇することを見出した。この結果より、RAASが脳内ではポジティブフィードバック機構を形成すると考えられるが、これは、脳内のRAAS活性化レベルを正常化することが、高血圧の治療に有効であることを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Hypertension is a causative factor for ischemic heart disease, stroke, and kidney failure. Thus, its remedy is clinically important. It is widely recognized that a negative feedback mechanism of the renin - angiotensin - aldosterone system (RAAS) in the peripheral organs controls a blood pressure level; when blood pressure reaches a high level, renin secretion from the kidney is inhibited and blood pressure will be lowered. In this study, however, I found that expression of aldosterone synthase is elevated in the brain of mice fed with high salt diet. This increase is a sharp contrast with that in periphery. From this result, it is suggested that RAAS forms a positive feedback mechanism in the brain, and normalizing the activity level of RAAS in the brain is effective for treating hypertension.

研究分野：時間生物学

キーワード：高血圧 視床下部 アルドステロン

1. 研究開始当初の背景

私の所属する研究室では、概日リズムとその異常に起因する病態の研究を行っており、これまでに時計遺伝子を欠損し、概日時計を消失したりリズム異常のマウスでは、食塩感受性の高血圧症を発症することを報告した (Doi et al. Nat. Med. 16, 67-74, 2010)。生活習慣病のひとつである高血圧症 (血圧が正常範囲を超えて高く維持されている状態) は、自覚症状はなくとも虚血性心疾患、脳卒中、腎不全などの発症原因となるため、適切に血圧をコントロールする (収縮期血圧で 120mmHg 未満が望ましいとされる) ことは臨床的に極めて重要である。日本における高血圧症の患者数は、4000 万人を超えるとされているが、この数は、今後の日本人の高齢化に伴い増加することが確実であり、既存の治療法とは異なる対策を講じておくことが期待されていた。

2. 研究の目的

構造的な血圧の制御機構として、Renin-Angiotensin-Aldosterone System (RAAS) が知られる (図 1)。血圧が低下すると、腎臓の受容器がその低下を受容し、タンパク質分解酵素であるレニンを分泌する。レニンは、主に肝臓より血中に放出されるアンジオテンシノーゲンからアンジオテンシン I を遊離し、アンジオテンシン I は、血管内皮細胞膜にあるアンジオテンシン変換酵素 (ACE) によりアンジオテンシン II へと変換される。アンジオテンシン II は、強力な血管収縮作用を有するだけでなく、副腎からのアルドステロンの生成や分泌を促進し、腎臓での Na 再吸収を介し、血圧を上昇させる。その結果、レニンの分泌は抑制され、この RAAS

系の働きは低下する。

これまでの研究で、概日時計機能を欠損したリズム異常のマウスでは、血漿アルドステロン値が正常マウスのおよそ 10 倍に上がっており、これが食塩感受性高血圧の原因と考えられた。アルドステロンの制御としては、上記の通り、末梢臓器における RAAS ネガティブフィードバック機構が広く知られているが、実は脳内においては逆に RAAS がポジティブフィードバック機構を形成することを示唆するデータが得られていた。例えば、食塩感受性高血圧の患者では、塩分を多く摂ると腎臓の交感神経の活動が促進され、それに伴い塩分の排出が抑制されることで血中 Na 濃度が上昇し、その結果血圧が上昇するとされる。これは末梢 RAAS ネガティブフィードバックセオリーからすると逆の応答である。他にも、脳室内 Na 濃度が上がると、腎神経の活動が亢進し Na の再吸収が促進されるとも考えられている。実際、腎神経は高血圧の臨床において重要であり、薬剤による治療が奏効しない高血圧患者において、腎神経を切除することで、深刻な副作用なしに長期間にわたって血圧が下がることが報告されている (Lancet, 373, 1275-1281, 2009)。すなわち、腎除神経による治療抵抗性本態性高血圧症の改善は、脳内 RAAS が血圧調節に最も重要な反応であることを強く示唆するものである。これは、脳内で一旦アルドステロンが増加しだすと、さらなるアルドステロン値の上昇へとつながることを意味している。もしそうであるならば、末梢ではなく脳内の RAAS の制御こそが、血圧の調節に最も重要ということになる。そこで私たちは、本当に脳内では RAAS がポジティブフィードバック機構を形勢しているのか、また脳内のアルドステロンは、血圧制御における生理的意義を有するのかの解明を目的として、研究を開始させた。

3. 研究の方法

C57Bl/6 マウスを 3 群に分け、それぞれを高食塩食、普通食、低食塩食による給餌を 2 週間行った。その後、視床下部および副腎をサンプリングし、RNA を精製したのち、逆転写反応を行い、cDNA を得た。続いて、リアルタイム PCR 法により、Cyp11b2 の発現量を定量した。

4. 研究成果

副腎におけるアルドステロン合成酵素である Cyp11b2 の発現量を定量したところ、既報通り、普通食負荷マウスに比べ、高食塩食負荷マウスでは 4%に下がり、低食塩食負荷マウスでは 10 倍に増加した (図 2)。一方で、視床下部では、Cyp11b2 は高食塩食負荷によりおよそ 1.5 倍に増加し、低食塩食負荷により半減した (図 3)。この結果より、RAAS が、

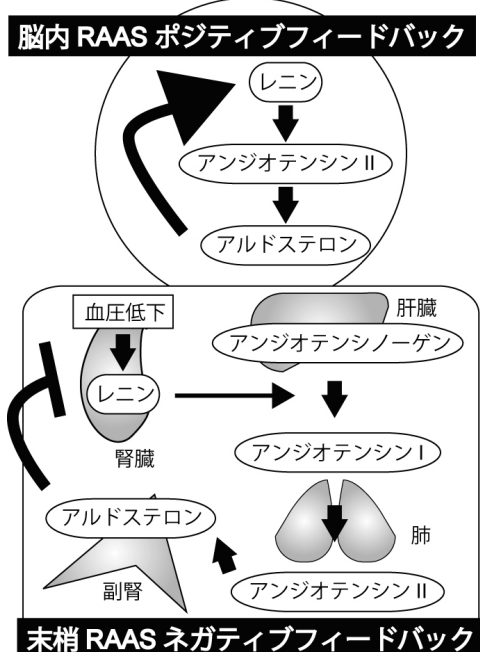


図 1 脳内と末梢の RAAS の模式図

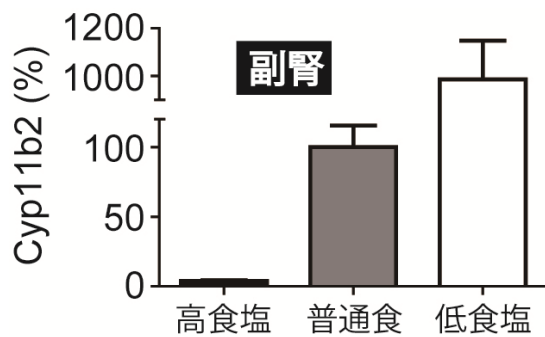


図2 副腎では、高食塩負荷により、Cyp11b2 は抑制される

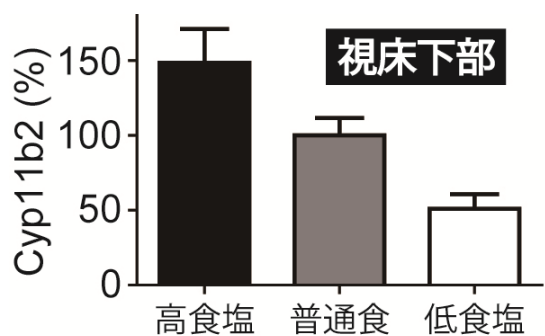


図3 視床下部では、高食塩負荷により Cyp11b2 は誘導される

視床下部ではポジティブフィードバック機構を、副腎では反対に、ネガティブフィードバック機構を形成することが示唆された。

続いて、高食塩負荷により、視床下部のどの脳領域において、Cyp11b2 の発現が誘導されるかの検討を行った。このために、私は、Cyp11b2 の遺伝子座に LacZ 遺伝子が挿入された遺伝子改変マウスを作製した (図4)。このマウスに高食塩を負荷した後に、脳切片を作製し、X-gal 染色により LacZ の発現部位を探索したところ、視床下部の室傍核において、LacZ の強いシグナルが検出された (図5)。したがって、高食塩負荷は、室傍核において Cyp11b2 の発現を誘導するものと考えられる。今後の実験においては、in situ hybridization 法により、上記の検証を行いたい。また、室傍核をレーザーマイクロダイセクション法により正確に単離し、リアルタイム PCR 法により Cyp11b2 や RAAS 構成分子の発現変動を定量的に解析したい。

視床下部における Cyp11b2 の血圧制御における生理機能を解明するためには、視床下部特異的に Cyp11b2 を欠損したマウスを作製し、高食塩食、普通食、低食塩食負荷時の血圧を測定することが必要である。Cyp11b2 の遺伝子座に LacZ 遺伝子を組み込んだノックインマウスでは、LacZ と Neo 配列が Frt 配列で挟まれているため、これを Flippase 発現マウスと交配させることで、Cyp11b2 の flox 変異体 (Cyp11b2 flox/flox マウス) がえられる。さらに、この flox 変異体マウスを Cre リコンビナーゼ発現マウスと交配させることに

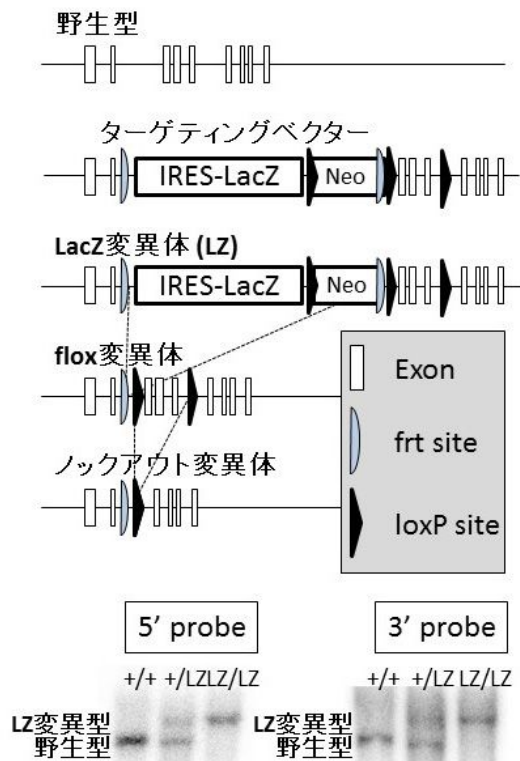


図4 Cyp11b2変異マウスの作製とサザンブロットによる確認

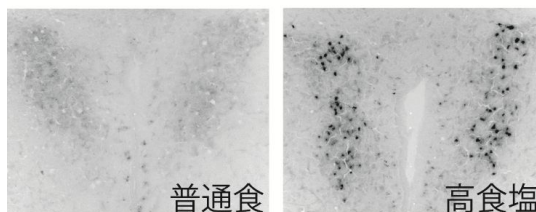
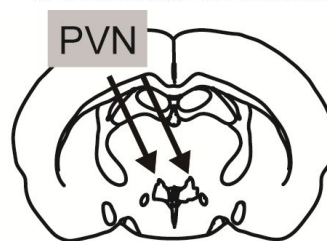


図5 高食塩負荷により室傍核の神経細胞が LacZ を強発現する

より、Cyp11b2 のエクソン 3-5 を欠損したノックアウトマウスを得ることができる。私は、全身あるいは脳特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウスを用いて、全身あるいは脳特異的に Cyp11b2 ノックアウトマウスを作製した。しかしながら、これらのノックアウトマウスは、発育が正常でないためか、交配が簡単ではなかった。そこで、血圧測定に十分な数を得るために、現在は大規模な交配を行っている。今後は、まず、これらのマウスを、Cre を発現しないコントロールマウスと比較し、脳の Cyp11b2 のみが消失し、副腎の Cyp11b2 発現は正常であることをリアルタイム PCR 法により確認する。次に、血圧テレメトリー送信器を用いて自由行動下マウスの血圧をモニタリングし、高食塩あるいは低食

塩食負荷により、脳特異的 Cyp11b2 ノックアウトマウスの血圧が、コントロールマウスのものと比較して、それぞれ異常に上昇するかあるいは下降するかを調べたい。

神経性血圧調節としては、これまでに「血圧変動の頸動脈洞・大動脈弓の受容器による感知 迷走神経・舌咽神経を介した延髄の心臓血管中枢活性化 延髄から自律神経を介した心収縮力・心拍数制御」という経路がよく研究されてきた。これは、出血による血圧低下といった急性反応に対する制御機構といえる。一方で、脳内 RAAS による血圧制御は、個体の構造的な血圧制御分子の発現や活性を決め、慢性的な血圧を設定するものと考えられる。特に欧米人と比較して日本人には食塩感受性高血圧が多いとされているため（高血圧患者のおよそ 4 割）、本研究の成果は日本人の高血圧臨床において多大な治療成果が期待できる点で意義深い。

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)

Dojo K., Yamaguchi Y., Fustin J. M., Doi M., Kobayashi M., Okamura H.: "Carbachol Induces Phase-dependent Phase Shifts of Per1 Transcription Rhythms in Cultured Suprachiasmatic Nucleus Slices." *J Biol Rhythms* 32, 101-108, 2017.

査読有

DOI: 10.1177/0748730417691205

Kori H., Yamaguchi Y., Okamura H.: "Accelerating recovery from jet lag: prediction from a multi-oscillator model and its experimental confirmation in model animals." *Scientific reports* 7, 46702, 2017.

査読有

DOI: 10.1038/srep46702.

〔学会発表〕(計 7 件)

山口賀章、岡田和樹、水野貴暢、程肇、重吉康史、小林正樹、岡村均：「ラット視交叉上核における時計遺伝子概日振動の in vivo リアルタイム計測」

第 63 回 日本生化学会 近畿支部例会

2016 年 5 月 21 日 神戸薬科大学

山口賀章 「時差を担う視交叉上核バソプレッシン V1a, V1b 受容体」

第 16 回日本抗加齢医学会総会

2016 年 6 月 10 日 パシフィコ横浜

山口賀章、岡田和樹、水野貴暢、程肇、重吉康史、小林正樹、岡村均：「自由行動中

ラットの視交叉上核における時計遺伝子 Per1 および Per2 変動のリアルタイムモニタリング」

第 39 回日本神経科学大会

2016 年 7 月 20 日 パシフィコ横浜

田井中元美、陳宇林、山口賀章、鈴木暢、岡村均：「時差環境下の視交叉上核における光応答性の解析」

第 39 回日本神経科学大会

2016 年 7 月 20 日 パシフィコ横浜

山口賀章、陳宇林、鈴木暢、岡村均：「時差環境下における視交叉上核神経細胞の光応答性」

第 23 回 日本時間生物学会学術大会

2016 年 11 月 12-13 日 名古屋大学 豊田講堂

Kumiko Dojo, Yoshiaki Yamaguchi, Jean-Michel Fusti, Masao Doi, Masaki Kobayashi and Hitoshi Okamura: "Carbachol induces phase-dependent phase-shifts of Per1 transcription rhythms in cultured suprachiasmatic nucleus slices." *J Biol Rhythms* 32, 101-108, 2017.

第 23 回 日本時間生物学会学術大会

2016 年 11 月 12-13 日 名古屋大学 豊田講堂

山口賀章、岡田和樹、水野貴暢、程肇、重吉康史、小林正樹、岡村均：「ラット視交叉上核における時計遺伝子 Per1 および Per2 概日振動のインビボリアルタイム計測」

第 39 回日本分子生物学会年会

2016 年 11 月 30 日 パシフィコ横浜

〔図書〕(計 1 件)

山口賀章：「アルギニンバソプレッシン V1a, V1b 受容体」*脳内環境辞典*、高橋 良輔、山中 宏二、樋口 真人、漆谷 真 (編)、メディカルドゥ、26-27, 2017

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

京都大学大学院薬学研究科

医薬創成情報科学専攻

システムバイオロジー分野

ホームページ

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp//system-biology/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 賀章 (YAMAGUCHI, Yoshiaki)
京都大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号： 3 0 4 6 7 4 2 7

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

高橋 伯夫 (TAKAHASHI, Hakuo)
関西医科大学 名誉教授
医療法人幸生会 琵琶湖中央病院 院長

岡村 均 (OKAMURA, Hitoshi)
京都大学大学院薬学研究科 教授

黒岩 沙也華 (KUROIWA, Sayaka)
京都大学薬学部 学部生