

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390058

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームと心血管病の分子機序の解明と創薬への応用

研究課題名(英文)Research on the molecular mechanism of metabolic syndrome and cardiovascular diseases and novel therapeutic strategy for these diseases

研究代表者

光山 勝慶(金勝慶)(Mitsuyama, Shokei)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：10195414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円、(間接経費) 4,440,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドローム(MetS)、脳・心血管病の分子機序および治療戦略の解明を目的としてASK1および腎神経を中心に検討をおこなった。ASK1が、虚血や高脂肪食による血管障害による認知症に関与していることをみつけた。また、腎神経の選択的抑制は、MetSでみられる血圧リズム異常や心血管障害、脳卒中に対する有望な治療戦略であることを示す基礎知見を得た。さらに、ASK1結合蛋白であるASK2が食塩感受性高血圧や心血管障害に関与することを示唆する知見を得た。ASK1および腎神経は、脳・心血管病の有望な治療標的と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The role of ASK1 and renal nerve was investigated to examine the molecular mechanism of metabolic syndrome and cerebrovascular and cardiovascular diseases and to develop promising therapeutic strategies for these diseases. ASK1 was involved in cognitive impairment induced by chronic cerebral ischemia or high-fat diet. Renal denervation suppressed the abnormality of blood pressure circadian rhythm and cardiovascular diseases induced by metabolic syndrome and also prevented the onset of cerebrovascular disease, thereby suggesting renal nerve as a promising therapeutic target for cerebrovascular and cardiovascular diseases. Furthermore, ASK2, the ASK1-binding protein, was found to participate in salt-sensitive hypertension and cardiovascular diseases. Thus, ASK1 and renal nerve seem to be a promising therapeutic target for cerebrovascular and cardiovascular diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：酸化ストレス ASK1 高血圧 動脈硬化 認知症 脳卒中 腎神経 高脂肪食

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドローム (MetS) は肥満、高血圧、糖尿病、脂質異常を構成疾患とするが、これらの疾患は動脈硬化を著明に促進し、認知症、脳卒中、心不全、腎不全などの心血管病の原因の中心である。しかしながら、その詳細な機序に関しては不明である。また、これらの生活習慣病の治療薬の開発は目覚ましい進歩を遂げているが、脳・心血管病は未だに十分に克服できていないのが現状である。新しい機序の解明および新しい治療戦略の開発が世界的に必要とされている。酸化ストレスは MetS 構成疾患、脳・心血管病、老化の成因に中心的役割を演じており、MetS、心血管病の有望な治療ターゲットであることは言うまでもない。しかしながら、その分子機序の解明は十分ではなく、治療への応用も十分でない。酸化ストレスの上流にある発生因子や下流にあるシグナル分子のどのレベルで酸化ストレスを制御することが MetS、心血管病の抑制に有効であるかを明らかにすることは極めて重要な課題である。一方、最近、腎神経を切除することにより、治療抵抗性高血圧患者の血圧が低下することが報告され、画期的な高血圧治療法として世界的注目を集めた。しかも、腎神経切除が高血圧のみならず、心肥大、血管障害、インスリン抵抗性、耐糖能異常の改善効果があることを示唆する臨床知見が次々報告され、腎神経が MetS や心血管病の成因にこれまでの想像を超える広範な役割を担っている可能性が注目されている。すなわち、酸化ストレスに加えて、腎神経をターゲットにした研究も、MetS、心血管病の機序や治療戦略に新たな視点を与えることが期待できる。

2. 研究の目的

酸化ストレスが MetS や心血管病の成因に関与することはよく知られているが、酸化ストレスによって活性化される代表的なシグナル伝達分子として Apoptosis signal regulating-kinase 1 (ASK1) が知られている。しかも ASK1 は、さまざまなストレス刺激による細胞応答に関与していることが注目されている。そこで、メタボリックシンドローム、脳・心血管病の分子機序および治療戦略の新たな開発を目的として ASK1 の役割と創薬への可能性を中心に検討をおこなった。さらに、ASK1 に加えて、腎神経の役割についても注目し、各種病態モデルにおける腎神経切除の効果について詳細に検討し、新しい治療法としての可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 動脈硬化は脳の慢性虚血状態を誘導することにより、認知機能の低下を引き起こす

ことが知られている。そこで、マイクロコイルを用いてマウスの両側頸動脈を部分狭窄 (BCAS) することにより慢性脳虚血モデルを作成し、ASK1 を中心に慢性虚血による認知機能低下の機序を検討した。野生型マウスと ASK1 欠損マウスそれぞれにおいて BCAS による慢性脳虚血モデルを作成し、フェノタイプに関して詳細に比較検討した。また、野生型マウスと ASK1 欠損マウスの脳内皮細胞を単離し、in vitro で脱酸素・脱グルコース (oxygen-glucose deprivation: OGD) 処理 (虚血模擬処置) や TNF- α 刺激の影響を両群間で比較検討した。さらに、選択的 ASK1 阻害薬、p38 阻害薬、抗酸化薬を BCAS モデルに投与し、その効果を検討した。

(2) 高脂肪食摂取は MetS や動脈硬化を引き起こす中心的な原因の一つである。そこで野生型マウスと ASK1 欠損マウスそれぞれを長期間 (90 週間) 高脂肪食と低脂肪食で飼育し、高脂肪食の長期摂取の影響と ASK1 の役割を検討した。そして、認知機能、白質病変、海馬領域の神経細胞数、炎症細胞数、毛細血管数、血管機能、体重、脂肪組織量、骨格筋量、糖脂質代謝、運動能等を比較検討した。

(3) SHRcp は、肥満、インスリン抵抗性、耐糖能異常、高血圧、心肥大、血管内皮障害、腎障害を呈する特徴を持ち、メタボリックシンドロームやそれに起因する循環器疾患の機序を研究するための有用なモデルラットである。フェノール塗布法により SHRcp の両側腎神経を切除し、SHRcp の上述の各種異常に対する影響を詳細に検討した。また、テレメトリー法を用いて長期間 SHRcp の血圧を連続測定し、メタボリックシンドロームラットでみられる血圧日内変動異常 (non-dipper 型高血圧) に対する影響についても検討した。

(4) 脳卒中易発症高血圧ラット (SHRSP) を用いて、脳卒中や脳障害の発症機序における腎神経の役割を検討した。フェノール塗布法により、SHRSP の腎神経切除を行い、脳卒中の発症率、死亡率、血液脳関門、脳血流量、脳の各部位における酸化ストレス、NADPH オキシダーゼサブユニット、炎症に対する効果を詳細に検討した。また、降圧薬のヒドラジンの効果と比較検討した。

(5) ASK2 は ASK1 の結合蛋白であり、ASK1 の活性調節に関与していることが示唆されているが、その役割は不明である。そこで、ASK2 欠損マウスと野生型マウスのフェノタイプを詳細に比較した。すなわち、血圧、心拍数、交感神経機能、腎機能、さらに心臓の肥大、線維化および炎症、血管機能、レニン・アン

ジオテンシン系等を調べた。テレメトリー法を用いて、血圧や心拍数の日内変動を長期的に比較検討した。また、高食塩食を ASK2 欠損マウスに与え、血圧や臓器障害への影響を調べ、食塩感受性における ASK2 の役割を調べた。

(6) 野生型マウス、ASK1 欠損マウスに浸透圧ミニポンプにてアルドステロン（食塩感受性高血圧や心血管病の中心的な原因ホルモン）を持続注入し、それぞれのマウスのアルドステロン注入群、コントロール群の血管の網羅的遺伝子解析をおこない、アルドステロンによって制御される遺伝子の中で、ASK1 が関与している遺伝子群を調べた。さらに、ダール食塩感受性高血圧ラット（心血管障害の機序に、アルドステロンと ASK1 活性化が関与しているラット）に高食塩食を与え、障害血管の網羅的遺伝子解析を行い、上述の実験の解析結果と合わせるにより、アルドステロンと ASK1 に共通している下流分子の中で血管障害に関与する候補遺伝子を探索した。

4. 研究成果

(1) マイクロコイルを用いて両側頸動脈の部分狭窄（BCAS）による慢性脳虚血状態を作成したところ、野生型マウスの脳組織や内皮細胞で ASK1、p38 が著明に活性化されたが、ASK1 欠損マウスでは p38 の活性化はみられず、ASK1 が p38 活性化に関与していることがわかった。ASK1 や p38 の活性化は抗酸化薬（アポシニン）投与によって有意に抑制され、酸化ストレスが ASK1 活性化に関与していた。すなわち、BCAS 処置によって酸化ストレス-ASK1-p38 カスケードが活性化されることがわかった。さらに、BCAS 施行3週間後には Y 迷路試験や Morris 水迷路試験等により、野生型マウスでは認知機能の著明な低下がみられたが、ASK1 欠損マウスでは認知機能の低下はみられなかった。さらに、野生型マウスでは著明な白質病変の形成がみられたが、ASK1 欠損マウスでは白質病変は軽減していた。エバンスブルー投与により、血液脳関門の機能を調べたところ、野生型マウスでは BCAS により著明な血液脳関門の破綻がみられ、内皮細胞の tight-junction 蛋白である claudin-5 の発現低下、TNF- α の増加、グリア細胞の活性化がみられたが、ASK1 欠損マウスではこれらの変化はみられなかった。野生型マウスと ASK1 欠損マウスから単離した脳内皮細胞を OGD 処理（虚血模擬処理）したところ、野生型マウス由来内皮細胞では、claudin-5 や occludin 発現の著明な低下が生じたが、ASK1 欠損マウス由来内皮細胞ではこれらの低下はみられなかった。TNF- α 刺激でも野生型由来の内皮細胞では、claudin-5 と occludin が有意に低下したが、ASK1 欠損マ

ウス由来内皮細胞では低下しなかった。すなわち、慢性脳虚血や TNF- α によって血管内皮細胞の claudin-5 や occludin が減少し、その結果、血液脳関門が破綻し、認知機能障害が惹起される。すなわち、酸化ストレスで活性化される ASK1 が慢性脳虚血による、さまざまな脳障害の原因分子であることがわかった。さらに、慢性虚血による認知機能障害に対する ASK1 阻害薬、p38 阻害薬、抗酸化薬（アポシニン）の効果を検討したところ、上述した慢性虚血による認知機能障害や白質病変等の変化はこれらの阻害薬で有意に抑制された。すなわち、酸化ストレス-ASK1-p38 カスケードを阻害することが動脈硬化によって誘導される認知症の治療戦略として有望である基礎的知見を得た。今後 ASK1 阻害薬のさらなる開発研究が創薬の観点から必要である。

(2) 高脂肪食を、8 週齢から 98 週齢まで（90 週間）野生型マウスと ASK1 欠損マウスに間与えたとところ、野生型マウスでは認知機能の低下（Y 迷路試験による作業記憶障害、Passive avoidance 試験による参照記憶障害）、海馬神経細胞数の減少、海馬の毛細血管密度減少、白質病変の形成、血管内皮機能の低下がみられたが、ASK1 欠損マウスではこれらの変化はすべて有意に少なかった。予想どおり、高脂肪食摂取は、低脂肪食摂取に比べて両マウスの体重を著明に増加したが、意外なことに約 60 週齢の時点から高脂肪食摂取群では体重は逆に減少方向に転じた。興味深いことに、長期の高脂肪食負荷をすると、野生型マウスに比べ ASK1 欠損マウスでは下肢の骨格筋量が有意に減少し、その結果を反映するように Rota-rod 試験では ASK1 欠損マウスの筋力や協調運動能は高脂肪食負荷で明らかに低下していた。一方、体重、白質脂肪重量、血糖値、脂質濃度、腎機能、肝機能は、両マウス群間で差はなかった。以上から、長期的な高脂肪食摂取は、脳血管密度低下を介した認知機能低下や、骨格筋減少による運動能低下を引き起こし、その機序に ASK1 が関与していることがわかった。

(3) メタボリックシンドローム（MetS）モデルラットである SHRcp は non-dipper 型高血圧を特徴とする血圧日内変動異常を呈し、さらには、交感神経活性の亢進、圧受容体反射機能低下、血中アルドステロン増加、腎臓でのナトリウム排泄能の低下等、さまざまな神経体液性因子の異常がみられた。SHRcp の両側腎神経を切除すると、血圧が低下するのみならず non-dipper 型血圧日内リズムが dipper 型血圧日内リズムに正常化した。さらに、尿中 Na 排泄が増加し、その機序に腎臓 Na-Cl 共輸送体発現増加の抑制が関与していることが示唆された。すなわち、MetS でみら

れる高血圧、血圧日内リズム異常に腎神経が関与しており、その機序に腎臓 Na-Cl 共輸送体発現亢進を介した Na 貯留が関与していると考えられる。また、腎神経切除により、SHRcp の心肥大や心筋繊維化の抑制、血管内皮機能障害の改善効果がみられた。その機序として、心血管組織内での酸化ストレスの減少が関与していることが示唆された。一方、SHRcp の肥満、耐糖能障害、インスリン抵抗性に関しては腎神経切除により改善はみられなかった。また、尿中アルブミン排泄や腎系球体硬化は腎神経切除によって改善しなかった。血漿レニン活性やアルドステロン濃度にも有意な影響はなかった。高血圧、血圧日内リズムの異常、心血管障害に腎神経が関与しており、腎神経を選択的に阻害することが高血圧や心血管障害の新しい治療戦略になる可能性がある。

(4) SHRSP を高食塩食で飼育すると、低食塩食飼育に比べて脳卒中の発症や死亡は著明に促進された。高食塩食負荷した SHRSP において、腎神経切除群とヒドララジン投与群は血圧を同程度に低下したが、腎神経切除群では脳卒中の発症率や死亡率が有意に減少したが、ヒドララジン投与群では腎神経切除群と同程度の血圧低下をきたしたにもかかわらず、脳卒中の発症率や死亡率は有意に減少しなかった。すなわち、腎神経切除による脳卒中の抑制には血圧非依存的な機序が関与していた。高食塩負荷した SHRSP の脳血流量は有意に減少し、血液脳関門の著明な破綻、occludin の減少、白質病変の形成がみられたが、腎神経切除はこれらの変化を有意に抑制した。一方ヒドララジン投与では、有意な抑制はみられなかった。さらに、高食塩負荷 SHRSP では脳の皮質、白質、傍室核領域での活性化ミクログリア、活性化アストロサイト、マクローファージの著明な増加、酸化ストレスの著明な増加がみられたが、腎神経切除はこれらの増加を有意に抑制した。一方、ヒドララジン投与では抑制しなかった。さらに高食塩負荷した SHRSP の脳内では NADPH オキシダーゼサブユニットの p67 phox および Rac1 の発現亢進がみられたが、腎神経切除はこれらの増加を抑制し、ヒドララジンは抑制しなかった。NADPH オキシダーゼを介する脳内酸化ストレス増加を腎神経切除は血圧非依存的に抑制した。すなわち、腎神経切除は酸化ストレスを軽減する効果がある。SHRSP の血漿レニン活性は腎神経切除により有意に低下したが、ヒドララジン投与では低下しなかった。従って、腎神経切除による脳保護作用の機序の一つとしてレニン-アンジオテンシン系の抑制が関与していることが示唆された。腎神経の選択的抑制は、MetS でみられる血圧リズム異常や心血管障害のみならず、脳卒中

に対する有望な治療戦略であることを示す知見を得た。現在、治療抵抗性高血圧患者を対象に腎神経切除（腎神経アブレーション）の降圧治療としての有効性が世界中で研究されているが、今後は、脳・心血管系臓器障害の新たな治療法としての可能性を検討することは有意義と考える。また、上述の効果が腎神経切除による中枢神経系への影響を介しているのか、それとも腎臓機能の修飾を介しているのかを明らかにすることが今後の重要課題である。

(5) テレメトリー法により、ASK2 欠損マウスは、野生型マウスと比較して血圧が有意に高いことがわかった。血圧、心拍数のスペクトラム解析により、ASK2 欠損マウスでは野生型マウスと比較して血管交感神経機能が亢進しており、血管の酸化ストレスも増加していた。ASK2 欠損マウスではフェニレフリンによる血管の収縮反応が野生型マウスに比して亢進しており、血管収縮性の亢進が血圧上昇の原因であると考えられた。さらに、ASK2 欠損マウスは著明な心臓の肥大および線維化、冠動脈リモデリングを呈し、心臓内の酸化ストレスの増加、炎症反応の亢進がみられた。ASK2 欠損マウスに RA 系阻害薬を投与すると心臓障害が改善することから、その機序に心臓 RA 系の関与が示唆された。一方、ASK2 欠損マウスの血中レニン-アンジオテンシン-アルドステロン系、尿量および尿中 Na 排泄量は野生型マウスと差はなかったが、尿中 Ca 排泄、NO 排泄が増加していた。また、高食塩食を与えると ASK2 欠損マウスの血圧はさらに上昇し、食塩感受性の特徴を持つことが示された。また、高食塩食により尿中の Ca 排泄のさらなる増加、心肥大の増悪がみられた。以上から、ASK1 の結合蛋白である ASK2 が血圧調節や心臓の肥大、リモデリングを調節する新たな分子であることを証明した。

(6) 高食塩負荷したダール食塩感受性高血圧ラットの障害血管組織の DNA マイクロアレイをおこなったところ、アルドステロン受容体を介して 31 種類の分泌蛋白質、16 種類の酸化ストレス系分子、26 種類の炎症系分子が血管で過剰発現していた。さらに、野生型マウスと ASK1 欠損マウスにアルドステロンを慢性的に持続注入した実験における血清のプロテインアレイを行った結果、エンドカン、ペントラキシン 2、ペントラキシン 3、ペリオスチン等、主に炎症関連分子がアルドステロンと ASK1 の共通の下流分子であることをみつけた。さらに、エンドカンはラット脳虚血により著明に増加することを見つけ、脳虚血障害への関与が示唆された。このように、ASK1 欠損マウスや食塩感受性高血圧ラットを用いた網羅的解析により、アルドステロン

-ASK1 カスケードの下流分子の中で、血管障害に關与する候補分子を同定した。今後、これらの分子の役割をさらに検討することにより、脳・心血管病の新しい分子機序や治療戦略の開発につながることを期待される。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計4件)

Toyama K, Koibuchi N, Uekawa K, Hasegawa Y, Kataoka K, Katayama T, Sueta D, Ma MJ, Nakagawa T, Yasuda O, Tomimoto H, Ichijo H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Apoptosis signal-regulating kinase 1 is a novel target molecule for cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 34:616-25. 2014 査読有
DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.302440.

Sueta D, Kataoka K, Koibuchi N, Toyama K, Uekawa K, Katayama Ma Mingjie, Nakagawa T, Waki H, Maeda M, Yasuda O, Matsui K, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. A novel mechanism for disrupted circadian blood pressure rhythm in a rat model of metabolic syndrome - the critical role of angiotensin II. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000035. 2013 査読有
DOI: 10.1161/JAHA.113.000035.

Katayama T, Sueta D, Kataoka K, Hasegawa Y, Koibuchi N, Toyama K, Uekawa K, Mingjie M, Nakagawa T, Maeda M, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Long-term renal denervation normalizes disrupted blood pressure circadian rhythm and ameliorates cardiovascular injury in a rat model of metabolic syndrome. *J Am Heart Assoc.* 2(4):e000197. 2013 査読有
DOI: 10.1161/JAHA.113.000197.

Nakagawa T, Hasegawa Y, Uekawa K, Ma M, Katayama T, Sueta D, Toyama K, Kataoka K, Koibuchi N, Maeda M, Kuratsu J, Kim-Mitsuyama S. Renal denervation prevents stroke and brain injury via attenuation of oxidative stress in hypertensive rats. *J Am Heart Assoc.* 2(5):e000375. 2013 査読有
DOI: 10.1161/JAHA.113.000375.

〔学会発表〕(計4件)

光山勝慶、RA系阻害による心血管保護のパラダイムシフト、第61回日本心臓病学会学術集会、2013年9月22日、くまもと県民交流館パレア(熊本)

光山勝慶、降圧薬開発の現状と近未来、第35回日本高血圧学会総会、2012年9月21日、ウエスティンナゴヤキャッスル(名古屋)

光山勝慶、高齢化社会を踏まえた高血圧治療戦略-脳卒中、認知症の治療戦略-、第35回日本高血圧学会総会、2012年9月21日、ウエスティンナゴヤキャッスル(名古屋)

光山勝慶、生活習慣病とRAA系、第16回日本適応医学会学術集会、2012年6月9日、ホテルサンルート有明(東京)

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.yggcsp.com/Pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

光山 勝慶 (MITSUYAMA, Shokei)
熊本大学・生命科学研究部・教授
研究者番号: 10195414