

厚生労働省科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）

平成18年度
総括・分担研究報告書

高血圧における老化促進因子としての
脳内活性酵素をターゲットとした
診断・治療法の開発
(H18-長寿-一般-001)

主任研究者：廣岡 良隆

平成19（2007）年4月

目 次

		頁
1.	総括・分担研究報告書 九州大学病院	1
	廣岡 良隆	
2.	分担研究報告書 九州大学大学院医学研究院	7
	岸 拓弥	
3.	分担研究報告書 九州大学病院	9
	井手 友美	
4.	分担研究報告書 九州大学大学院医学研究院	11
	砂川 賢二	
5.	分担研究報告書 九州大学大学院薬学研究院	15
	内海 英雄	
6.	刊行物一覧	
7.	論文別刷り	

高血圧における老化促進因子としての脳内活性酸素をターゲットとした
診断・治療法の開発に関する研究

主任研究者 廣岡 良隆 九州大学病院 循環器内科 講師

研究要旨：超高齢化社会を迎え高血圧症患者数、合併症としての脳血管障害及びそれに先行する認知症患者の増加が危惧され、その対策は急務である。加齢及び高血圧は脳内活性酸素産生増加を促進することが予想される。その検証を行い、脳内活性酸素産生源及び神経細胞傷害機序を明らかにする。どのクラスの降圧薬が良いか、抗酸化薬・減塩の効果調べる。脳内活性酸素をターゲットとした診断・治療法を開発し、臨床研究・治療戦略へつなげる。

【研究組織】

主任研究者	
廣岡 良隆	九州大学病院 循環器内科 講師
分担研究者	
岸 拓弥	九州大学大学院医学研究院 循環器内科 非常勤研究員
井手 友美	九州大学病院 循環器内科 臨床助手
砂川 賢二	九州大学大学院医学研究院 循環器内科 教授
内海 英雄	九州大学大学院薬学研究院 機能分子解析学 教授

A. 研究目的

超高齢化社会を迎え、今後、高血圧症患者数自体増加することが予想される。その管理・治療は、脳血管障害の発症抑制のみならず、それ以前に認められる認知機能障害や無症候性脳梗塞の予防につながり、健康な高齢化社会を築く上で急務である。近年、高血圧における酸化ストレスの役割が示唆されているが、加齢を促進する因子としての脳内活性酸素の役割については明らかではない。従って、本研究では、まず脳内活性酸素が加齢によってどの程度増加するか、特に高血圧があることによって増加の程度に大きな違いがあるかまた、そのことがどの程度神経細胞障害や自律神経機能異常に結びついているか、を明らかにすることである。引き続き、脳内活性酸素消去やその機序を有すると考えられて

いる降圧薬治療によって、脳内活性酸素産生が抑制され脳保護を有するか否か、を明らかにし、診断・治療法の開発を目指す。老化における脳内活性酸素の役割及び、特に高血圧でその関与が大きいことを科学的に証明し、それをターゲットとした効果的な治療法を提示できれば、臨床研究・応用が期待され、加齢と共に増加する高血圧人口に対して適切な治療法を社会に広く普及させ、社会全体で高齢者を支える基盤となることが期待される。

B. 研究方法

- 1) 加齢及び高血圧における脳内活性酸素産生（廣岡、岸、内海、砂川）：ヒト本態性高血圧症のモデルである自然発症高血圧ラット（SHR）もしくは脳卒中易発症性自然発症高血圧ラット（SHRSP）において、週齢の異なるラット（6, 12, 24週齢）を用いて、脳内活性酸素産生を測定する。対照として、正常血圧ラット（WKY）を用いる。具体的には、Thiobarbituric acid-reactive substances（TBARS）法、電子スピン共鳴（ESR）法を用いる。
- 2) in vivo ESR法による脳内活性酸素産生測定法の確立（廣岡、内海）：in vivo ESR-CT image法を用いて、WKY及びSHR、SHRSPの脳内活性酸素産生を定量評価する方法を確立する。週齢による変化の比較、また大脳、視床下部、脳幹部など部位別に活性酸素産生を比較定量する。
- 3) 活性酸素産生源としてのNAD(P)H oxidase、ミトコンドリア傷害・機能異常に関する検討（廣岡、井手）：脳内

活性酸素の産生源としては、特に NAD(P)H oxidase が注目されている。それは、その上流にアンジオテンシン II があり AT1 受容体刺激を介して活性化されることが示唆されているからである。従って、その活性化や脳内活性酸素産生について WKY と高血圧モデルの間で比較検討した。

(倫理面への配慮)

九州大学動物実験倫理規定を遵守する。

C. 研究結果

- 1) 加齢及び高血圧における脳内活性酸素産生 (廣岡、岸、内海、砂川) : 大脳・小脳・視床下部・脳幹部の活性酸素産生の指標として測定した TBARS レベルは 12 週齢 SHRSP で WKY より高値を示した。一方、in vivo ESR で測定したフリーラジカル計測においては既に 6 週齢で SHRSP の方が WKY より高値を示しており、これは 12 週齢、24 週齢においても継続して認められた。従って、SHRSP の脳内酸化ストレス増大には、高血圧発症初期の段階からフリーラジカル産生増加が関与していることを示唆する成績である。一方、WKY では大きな変化は認められず、正常血圧ラットでの加齢変化をみるにはかなりの期間のラットの育成が必要であることが考えられた。
- 2) in vivo ESR 法による脳内活性酸素産生測定法の確立 (廣岡、内海) : 現時点での in vivo ESR の結果は先に示したとおりである。また内海が開発したオーバーハウザー MRI (overhauser-enhanced MRI; OMRI) を本研究に応用することを試みている。現在、本研究の目的のため、ESR 法と MRI 融像を得るべく研究を進めている。
- 3) 活性酸素産生源としての NAD(P)H oxidase、ミトコンドリア傷害・機能異常に関する検討 (廣岡、井手) : 脳内活性酸素産生源としての NAD(P)H oxidase の役割について検討した。特に、心血管中枢の存在する脳幹部の延髄孤束核 (NTS) や頭側延髄腹外側野 (RVLM) について SHRSP と WKY の違いについて調べた。その結果、SHRSP の NTS や RVLM では低分子量 G 蛋白である Rac1 を介

した NAD(P)H oxidase の活性化が生じており、活性酸素産生が増加していることが明らかになった。また、この増加が交感神経系を介して血圧上昇機序に関与していることを示した。

D. 考察

当該年度の成績の主要な点は以下の 3 点である。

- 1) 高血圧モデルラットの脳内活性酸素産生増加が既に高血圧発症初期の段階で生じていることを見出した。
- 2) この観察を行う上で、in vivo ESR 法を用いることに成功した。
- 3) 高血圧発症・維持の神経性調節機序に脳幹部活性酸素産生増加が関与しており、その産生源として Rac1 を介した NAD(P)H oxidase の活性化が重要であることを明らかにした。

さらに、副次的成果として以下の 2 点が上げられる。

1. 高血圧モデルラットに食塩負荷を行うと脳幹部活性酸素産生増加が生じ血圧上昇機序に関与している。
2. 高コレステロール血症薬であるアトルバスタチンの経口投与で脳内活性酸素産生が減少し、交感神経活動も抑制されうることを見出した。

1. 高血圧における活性酸素の影響

実験高血圧モデルとしてアンジオテンシン II インフージョンがしばしば用いられ、心臓・血管の肥大や線維化やリモデリングが生じる。その機序に活性酸素が関与していることが示され、ACEI や ARB などのレニン-アンジオテンシン系抑制薬の有用性が認められている。このことが、多くの研究者が ARB の beyond blood pressure lowering effects を論じる根拠である。臨床におけるその証明の困難さは昨今の大規模臨床試験の成績が降圧作用そのものの重要性を凌駕できないことによるが、NAD(P)H oxidase 系を主体とする活性酸素の産生が高血圧の成因から病変形成まで深く関わっていることを示唆する成績が蓄積されてきた。原因か結果かを結論づけるのはあらゆる研究において非常に困難であり、今後の研究成果による。そもそも高血圧における活性酸素産生増加は産生系の異常か、消去系の異常か、両者による

ものかについても完結してはいない。高血圧モデルでは、内因性の消去系である Cu/ZnSOD、MnSOD、ecSOD がそれぞれ活性が低下しているという。また、次に述べる産生源の章でもわかるよう産生系の異常も数多く示されている。さらに、スーパーオキシドは NO と反応して SOD よりも 3 倍も早く分解される。その結果、パーオキシニトリトを産生する。NO 減少は内皮機能低下を生じ、心血管病の進展につながる。

2. 高血圧における活性酸素の産生源

a. NAD(P)H oxidase

活性酸素の産生源として最も注目を浴びているのが NAD(P)H oxidase である。心血管系における主要な触媒サブユニットは Nox1, gp91phox (Nox2)、Nox4 であり、調節系サブユニットは p22phox、p47phox、p67phox、rac である。これらの酵素の高血圧における役割は数多く研究がなされている。特に、アンジオテンシン II インフージョンモデルにおける検討が多い。従って、アンジオテンシン II が AT1 受容体刺激を介して NAD(P)H oxidase を活性化してスーパーオキシドを産生する経路は明らかになりつつある。また、その意味からも ARB が活性酸素産生抑制を生じることが理解しやすい。上記の 4 つの phox はアンジオテンシン II 刺激によって血管内皮細胞、血管平滑筋細胞ともにアップレギュレートする。スーパーオキシド産生が低下することは SHR や DOCA-salt ラットでも認められている。さらに、エンドセリン-1 (ET-1) 刺激でも NAD(P)H oxidase 活性によってスーパーオキシド産生増加が認められている。

b. 一酸化窒素合成酵素 (NOS)

NOS には constitutive NOS である内皮型 NOS である eNOS、神経型 NOS (nNOS) と誘導型 NOS (iNOS) の三つのアイソフォームがある。これらの酵素は前駆物質である L-arginine と補酵素である tetrahydrobiopterin (BH4) によって活性化される。L-arginine と BH4 の不足は NOS のアンカップリングという状態を生じ、NO ではなくスーパーオキシドを産生する。スーパーオキシドと反応して NO はさらに減少してパーオキシニトリトという極めて酸化作用の強い物質を産生し、BH4 の酸化を生じ NOS アンカップリングを促

進する。慢性的 NOS 阻害薬投与や eNOS ノックアウトマウス、BH4 ノックアウトマウスでは高血圧が生じる。NOS 蛋白発現が必ずしも減少していなくても NO 産生は低下する。また、NO 産生が高血圧に対して代償的に働いた場合、慢性的に L-arginine や BH4 の欠乏状態が生じ、アンカップリングが生じスーパーオキシド産生が増加する可能性も考えられる。さらに、NOS アンカップリングに NAD(P)H oxidase が関与している可能性も示唆されている。

c. ミトコンドリア

ミトコンドリアはスーパーオキシドの重要な産生源である。通常、ミトコンドリア内の MnSOD によって消去されるが、SHRSP では MnSOD 活性が低下していることを我々は報告した。また、特に心筋細胞においてミトコンドリア由来のスーパーオキシドの重要性が報告されており、アンジオテンシン II 刺激による NAD(P)H oxidase の活性化とリンクしている可能性が示唆されている。ミトコンドリアによって産生されるスーパーオキシドは ATP-sensitive K⁺ channels を介してミトコンドリア内に入り更なる産生増加やミトコンドリア傷害を生じる可能性が考えられる。しかし、高血圧における肥大心筋でミトコンドリアからのスーパーオキシド産生が増加しているか、脳や腎臓ではどうかについては今後の重要課題である。また、NAD(P)H oxidase とその他の活性酸素産生源がどの程度リンクしているかも重要な質問である。

d. Xanthine oxidase

活性酸素の産生源として xanthine oxidase も有名である。アロプリノール、オキシプリノールなどが阻害薬として用いられている。特に、食塩負荷によって活性が増加する。さらに、NAD(P)H oxidase 活性化によって xanthine oxidase がアップレギュレートすることも示唆されている。これらのクロストークや高血圧における役割は注目される。ARB の中でもロサルタンは尿酸値が低下することが知られており、その機序とどのように結ぶ付くか検討が待たれる。

3. 高血圧における活性酸素と血管

a. 血管収縮・拡張反応

NO 減少に加えて活性酸素は血管収縮反応を生じ高血圧を惹起する。血管平滑筋細

胞では、活性酸素はイノシトール3リン酸の増加、細胞内カルシウム濃度増加、カルシウム再吸収ポンプ抑制、cGMP減少を生じる。また、摘出血管ではスーパーオキシド産生物質である tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) や過酸化水素が SHR では増加しており、tempol や SOD で抑制される。さらに、SOD やヒドロキシラジカルは ET-1、セロトニン、低酸素による血管収縮反応を抑制する。しかし、カタラーゼの反応は一樣ではない。過酸化水素は内皮由来過分極因子として血管拡張反応を生じることも知られている。

b. 増殖反応

高血圧における血管肥厚は活性酸素が血管平滑筋細胞を増殖させることを示唆する。In vitro では、アンジオテンシン II、セロトニン、ET-1、platelet-derived growth factor は活性酸素を産生し血管平滑筋細胞の過形成や肥大によって増殖させることが知られている。これらの反応は、NAD(P)H oxidase 阻害薬、カタラーゼ、抗酸化薬によって抑制される。また、様々な高血圧モデルラットで抗酸化薬によって血管のリモデリングが抑制されることも報告されている。

4. 高血圧における活性酸素の標的臓器

a. 脳及び交感神経系

高血圧モデルで脳内の活性酸素が増加していることを我々は報告し、交感神経活動亢進の機序に一部関与していることを示唆した。周知の通り、血圧は心拍出量と末梢血管抵抗で決定されるが、その主要な調節因子は交感神経系とレニン-アンジオテンシン系である。ARB は交感神経抑制作用を有することが示唆されており、その作用部位としては中枢神経系及び末梢神経系の両者が考えられている。脳幹部には、交感神経活動を規定する頭側延髄腹外側野 (rostral ventrolateral medulla; RVLM) が存在し、アンジオテンシン II によって昇圧反応を生じる。また、動脈圧受容器反射から最初の入力を受ける延髄孤束核 (nucleus tractus solitarius; NTS) は RVLM の神経活動を調節することによって血圧を一定の値に保つ役割を果たす。ARB や ACEI は NTS に作用して高血圧モデルで低下した動脈圧受容器反射を改善することが知られている。また、ARB を RVLM に作用させると交感神経活動抑制を介し

た降圧反応が生じることも示唆されている。一方、我々は、RVLM における活性酸素を消去すると交感神経活動が抑制されることも報告した。さらに、高血圧は炎症性疾患であるという概念も提唱されており、脳内 iNOS が増加すると酸化ストレスを増加させ、交感神経活性化によって血圧上昇を生じることも報告した。また、アンジオテンシン II は脳微小血管の内皮細胞の NAD(P)H oxidase を活性化して活性酸素を産生して、神経細胞に作用するという報告もある (11)。従って、ARB は末梢投与しても脳保護につながる可能性が充分考えられる。さらに、末梢投与した ARB は BBB を超えて直接神経細胞に作用する機序も示唆されている。高血圧では BBB が減弱していることも一部関与しているであろう。事実、末梢投与したロサルタンや embusartan は血液脳関門を超え脳内に作用するという報告はラットで認められている。今後、経口投与した ARB が脳内へ作用して脳保護や認知機能低下を抑制するか、交感神経活動を抑制するか、は重要な研究課題である。

b. 心臓

高血圧は心臓の活性酸素増加と深く関連している。高血圧で心肥大が生じるが、持続した十分な降圧治療が心肥大を退縮させることが知られている。数ある降圧薬の中でもレニン-アンジオテンシン系抑制薬の効果が大きいとされている。すなわち、NAD(P)H oxidase 活性化を抑制する作用がある ACEI や ARB の効果が大きいということはスーパーオキシド産生抑制効果が関与している可能性が考えられる。また、同様に NAD(P)H oxidase 活性化抑制作用を有することが知られているスタチンでも心肥大退縮が認められるという。スーパーオキシドと NO のバランスが心機能を保つ上で重要な因子であると考えられる。また、長期に渡って活性酸素増加が持続すると肥大のみならず線維化も生じる。

c. 腎臓

腎臓は重要な血圧の調節臓器であるとともに高血圧の標的臓器である。腎機能低下がある場合、ACEI や ARB による降圧治療は極めて重要であることが最近の大規模臨床試験の成績からも明らかである。高血圧では、腎臓の活性酸素は増加しており、一方、NO 産生は低下していることが知られている。また、これらが組織障害や

蛋白尿に関与していることも知られている。さらに、これらの異常は抗酸化薬で改善する。

おわりに

以上、述べたように活性酸素は高血圧の病態に深く関与している。その産生増加に組織レニン-アンジオテンシン系の活性化によるAT1受容体を介したNAD(P)H oxidaseの活性化が機序として考えられる。また、活性酸素増加は交感神経系の活性化にも関与しており、従来から言われているレニン-アンジオテンシン系と交感神経系の二大調節系を結びつける重要な因子である可能性がある。ARBは活性酸素産生抑制作用・交感神経抑制作用を有するため降圧薬として利点を持つ可能性がある。一方、AT1受容体の下流にはさまざまなシグナル経路があることも忘れてはならない。近年、アンジオテンシンII刺激によってRho/Rho-kinase系が活性化され、高血圧の成因あるいは高血圧性血管病変形成に関与していることが示されている。多くの基礎研究の成績はARBのbeyond BP lowering effectを示唆するが、ヒトにおける検討はまだまだ少ない。ARBであるカンダサルタンが高血圧患者のflow-mediated vasodilationを改善したという報告がなされている。その機序として酸化ストレスマーカーの改善から抗酸化作用が推測される。一方、降圧治療による酸化ストレスマーカーの改善は降圧薬の種類によらないという報告もある。レニン-アンジオテンシン系抑制薬の効果をみる上で、特に日本人でどうかという点は、重要である。今後の更なる研究成果及び臨床研究による検討が必要である。

E. 結論

高血圧モデルラットにおける脳内活性酸素産生は高血圧発症時期から亢進しており、その持続状態が酸化ストレス増加を長期にわたり継続させることになることが示唆された。新たな手法として、in vivo ESR法を用いることによって、高血圧モデル動物で無侵襲かつリアルタイムに活性酸素を検出することを可能にした。また、高血圧の成因の一つとしての交感神経系を介する神経性調節異常に脳幹部の脳内活性酸素産生増加が関与していること、その機序としてRac1を介したNAD(P)H oxidaseの活性化が関与していることを見出した。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

G-1 論文発表

- 1) 廣岡良隆：酸化ストレスと交感神経。「酸化ストレスと心血管病」横山光宏、藤田敏郎編集、日本医学出版、113-118, 2007.
- 2) 内海英雄、安川圭司：酸化ストレスマーカーの測定、電子スピン共鳴（ESR）法。「酸化ストレスと心血管病」横山光宏、藤田敏郎編集、日本医学出版、79-84, 2007.
- 3) 内海英雄、安川圭司：活性酸素種のバイオイメージング、MRI。「酸化ストレスと心血管病」、横山光宏、藤田敏郎編集、日本医学出版、95-100, 2007.
- 4) 井手友美、砂川賢二：酸化ストレスマーカーの測定、バイオマーカー測定法。「酸化ストレスと心血管病」、横山光宏、藤田敏郎編集、日本医学出版、85-87, 2007.
- 5) 井手友美：活性酸素種産生系、ミトコンドリア電子伝達系。「酸化ストレスと心血管病」、横山光宏、藤田敏郎編集、日本医学出版、13-16, 2007.
- 6) 廣岡良隆：脳中枢神経系におけるレニン・アンジオテンシン系の役割。ホルモンと臨床 49-56, 2007.
- 7) Kishi T, Hirooka Y, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa K: Atorvastatin reduces oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Hypertens. 2007 (in press).
- 8) Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, Sagara Y, Kishi T, Engelhardt, JF, Sunagawa: Inhibition of Rac1-derived reactive oxygen species in NTS decreases blood pressure and heart rate in stroke-prone SHR. Hypertension. (Revision submitted).

G-2 学会発表

- 1) 60th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research, October 4-7, San Antonio, TX, USA.

Kishi T, Hirooka Y: Anti-oxidant effect of atorvastatin in the brain contributes to the

atorvastatin-induced sympatho-inhibitory effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

- 2) 第10回日本心不全学会学術集会
(平成18年10月13-15日、東京)

Tsutsumi T, Ide T, Yamato M, Kamiya A, Utsumi H, Hirooka Y, Sunagawa K: Vagal nerve stimulation acutely decreases the generation of free radicals in failing myocardium. *J Cardiac Fail.* 12(Suppl. 2): S168, 2006.

- 3) The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension (Investigator-Initiated-Symposium): Central Cardiovascular Regulation: From Hypertension to Heart Failure, October 14, 2006, Fukuoka, Japan, Organized by Chalmers JP and Hirooka Y.

Hirooka Y: Central cardiovascular regulation: from hypertension to heart failure (Opening Remarks and Introduction).

- 4) The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension; 5th Asian-Pacific Congress of Hypertension; 29th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension, October 15-19, 2006, Fukuoka, Japan.

Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, Sagara Y, Kishi T, Sunagawa K: Increased reactive oxygen species in nucleus tractus solitarius is involved in neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 24(Suppl. 6): 158, 2006.

Koga Y, Hirooka Y, Araki S, Nozoe M, Sagara Y, Kishi T, Sunagawa K: High salt diet increases blood pressure via oxidative stress in the brainstem in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 24(Suppl. 6): 180, 2006.

Kishi T, Hirooka Y, Takeshita A, Sunagawa K: The sympatho-inhibitory effect of statin in the SHRSP along with anti-oxidant effect in the RVLM. *J Hypertens.* 24(Suppl. 6): 390, 2006.

- 5) The 12th International Symposium on SHR: Concurrent 42nd Japanese SHR Symposium, October 20-21, 2006, Kyoto, Japan.

Hirooka Y: Role of reactive oxygen species in brainstem in blood pressure regulation of hypertensive rats ("State of the Art").

Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K: Sympatho-inhibitory effects of statin in stroke prone spontaneously hypertensive rats along with the anti-oxidant effect in the rostral ventrolateral medulla.

- 6) 第59回日本自律神経学会総会
(平成18年11月1-3日、東京)

Hirooka Y: Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the brainstem controlling blood pressure via modulation of the sympathetic nervous system (シンポジウム2: 生体リズムと高血圧).

- 7) Scientific Sessions 2006, November 12-15, Chicago, IL, USA.

Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, Araki S-I, Kishi T, Sunagawa K: Increased reactive oxygen species in the nucleus tractus solitarius are involved in the neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 114(Suppl. II): II-169, 2006.

Sagara Y, Hirooka Y, Nozoe M, Koga Y, Sunagawa K: Contribution of angiotensin II in the increased reactive oxygen species in the rostral ventrolateral medulla and enhanced sympathetic outflow in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation.* 114(Suppl. II): II-271, 2006.

- 8) 第71回日本循環器学会総会
(平成19年3月15-17日、神戸)

Koga Y, Hirooka Y, Araki S, Nozoe M, Kishi T, Sunagawa K: Blood pressure elevation on high salt diet via central oxidative stress in spontaneously hypertensive rats involves central renin-angiotensin system. *Circ J.* 71(Suppl. I): 631, 2007.

Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, Sagara Y, Kishi T, Sunagawa K: Rac1/NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species in the nucleus tractus solitarius are involved in the neural mechanisms of hypertension of SHRSP. *Circ J.* 71(Suppl. I): 632, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

加齢及び高血圧における脳内活性酸素：抗酸化薬としてのスタチンの役割

分担研究者 岸 拓弥 九州大学大学院医学研究院 循環器内科 非常勤研究員

研究要旨：高血圧の原因の一つとして考えている頭側延髄腹外側野での脳内活性酸素種上昇に対する治療として、HMG-CoA 変換酵素阻害薬の有効性があるか否かについて、高血圧モデルラットを用いて検討を行った。活性酸素種産生が減少、亢進していた交感神経活動も低下することを明らかにし、現在はその機序および加齢との関係についての検討を行っている。

A. 研究目的

以前、我々は、脳幹部に存在する交感神経活動の中核である頭側延髄腹外側野（RVLM）における活性酸素種上昇が交感神経活動を亢進させ血圧上昇をきたすことを報告した。しかし、抗酸化作用を有することが示唆されている薬剤をある一定期間経口投与した際、脳内活性酸素産生が抑制されるか否かについては明らかではない。そこで、抗酸化作用があるHMG-CoA変換酵素阻害薬（statin）の内服によるRVLMにおける活性酸素種および交感神経活動や血圧にあたる効果を検討し、今後の加齢と脳内活性酸素種との関係の研究における検討項目とすることを目的とした。

B. 研究方法

交感神経活動が著明に亢進している高血圧モデルとして知られている脳卒中易発症性自然発症高血圧ラット（SHRSP）を用い、atorvastatinを30日経口投与した群と非投与群において、RVLMにおける活性酸素種をTBARS法を用いて測定した。交感神経活動の指標として24時間蓄尿による尿中カテコールアミン排泄量を用いた。

（倫理面への配慮）
九州大学動物実験倫理規定を遵守する。

C. 研究結果

Atorvastatin投与群では、血圧・尿中カテコールアミン排泄量いずれも非投与群に比べて有意に低下していた。また、RVLMにおけるTBARSは、atorvastatin投与群で非投与群に比し有意に低下していた。

D. 考察

本研究の結果から、交感神経活動亢進高血圧モデルラットにおいて、atorvastatin内服により、上昇していたRVLMでの活性酸素種が減少し、そのことにより、亢進していた交感神経活動も低下することが明らかとなった。中枢、特にRVLMにおけるstatinの抗酸化作用により交感神経活動を抑制できることは、これまでも報告はない。これまでの我々の研究により、RVLMにおける活性酸素種が神経活動を調節し交感神経活動を亢進させることは明らかであり、高血圧や心不全などの循環器疾患においてその重要性が再認識されてきている交感神経活動調節異常に対する治療として、脳内特にRVLMにおける活性酸素種に対するアプローチが重要である。しかしながら、臨床応用が可能な手法での脳内活性酸素除去の手法はまだ未解明な点が多い。そのような状況において、その単なるコレステロール低下作用以外の様々な効果から循環器疾患に対する治療薬として日常診療で繁用されているstatinの内服により、RVLMにおける活性酸素を除去できることが今回明らかになったことの意義は非常に意義深い。また、その機序には今後のさらなる実験が必要であるが、この効果が加齢とともにどのように変化するかは、加齢と脳内活性酸素、高血圧に関する本研究において、治療の開発という点で重要な結果といえる。

E. 結論

交感神経活動亢進高血圧モデルラットにおいて、HMG-CoA変換酵素阻害薬内服により、交感神経活動中枢での活性酸素種が減少し、そのことにより亢進してい

た交感神経活動も低下することが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Kishi T, Hirooka Y, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa K. Atorvastatin reduces oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Hypertens. 2007 (in press)

G-2 学会発表

1. Kishi T, Hirooka Y. Long-term treatment with atorvastatin reduced oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla with sympatho-inhibitory effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Experimental Biology 2007 (April 1-5, 2007, San Francisco, USA)
2. Kishi T, Hirooka Y. Anti-oxidant effect of atorvastatin in the brain contributes to the atorvastatin-induced sympatho-inhibitory effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. 60th Annual Fall Conference and Scientific Sessions of the Council for High Blood Pressure Research (Oct 4-7, 2007, San Antonio, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

老化促進因子としての活性酸素をターゲットとした診断・治療法の開発

分担研究者 井手 友美 九州大学病院 循環器内科 臨床助手

研究要旨：老化に関与している因子の中でも、ミトコンドリア由来の活性酸素は極めて重要な役割を果たしていることが示唆されている。われわれは、慢性的、進行性に活性酸素が暴露される病態モデルとして、心筋梗塞後リモデリングを用いて、その in vivo ESR による測定系の確立を行った。その結果、組織での酸化ストレス上昇と in vivo ESR により計測した局所の活性酸素産生レベルは亢進しているが、それらは血中、尿中には反映されないことが明らかとなった。また、以前よりミトコンドリア DNA の保護因子として知られる Tfam (Transcriptional factor A) を用いることで、そのミトコンドリア DNA を保護することで活性酸素の産生を抑制し、細胞保護的に働くことを示しているがこの Tfam 過剰発現マウスでは、心筋梗塞後のリモデリングにおいて活性酸素産生が抑制されていることが明らかとなった。

A. 研究目的

慢性的に局所の酸化ストレスに暴露されているモデルとして、心筋梗塞後リモデリング心を用いた。生体内活性酸素を測定する手段として、in vivo ESRを用いた。また、それらの測定系が妥当であること及び全身性の酸化ストレスマーカーの感度を検討するために、血中、および尿中の活性酸素産物および抗酸化酵素の活性を測定し、また同時サンプリングにより心筋での抗酸化酵素活性および脂質過酸化を測定した。また、Tfam過剰発現マウスを用いて、in vivo ESRを行った。

B. 研究方法

慢性的に局所の酸化ストレスに暴露されているモデルとして、心筋梗塞後リモデリング心を用いた。生体内活性酸素を測定する手段として、in vivo ESRを用いた。また、それらの測定系が妥当であること及び全身性の酸化ストレスマーカーの感度を検討するために、血中、および尿中の活性酸素産物および抗酸化酵素の活性を測定し、また同時サンプリングにより心筋での抗酸化酵素活性および脂質過酸化を測定した。また、Tfam 過剰発現マウスを用いて、in vivo ESR を行った。

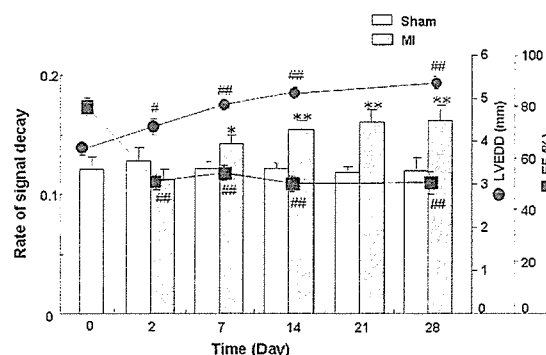
(倫理面への配慮)

九州大学動物実験倫理規定を遵守する。

C. 研究結果

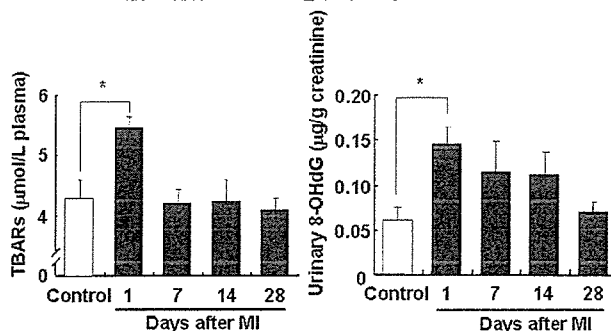
慢性心不全モデルでは、in vivo ESRによって、時間経過とともに徐々に酸化ストレ

スの上昇が認められた。また、それは組織における酸化ストレスの上昇を伴っていた（下図）。



しかし、血中および尿中の酸化ストレスは心筋梗塞急性期には上昇したが、その後、徐々に正常化し、最も組織での酸化ストレス上昇時には、全く反映されていなかった。（下図）

全身性の酸化ストレスマーカーは心筋の酸化ストレスを反映しない



また、Tfam 過剰発現マウスを用いて、in vivo ESR を行ったところ、胸部での酸化ストレス産生が抑制されていることが明らかとなった。

D. 考察

本研究の結果から、*in vivo* ESR は、生体内局所での酸化ストレス産生を鋭敏に感知できる測定系であることが明らかとなった。また、これまで一般に用いられている血中および尿中の酸化ストレス測定は、局所の酸化ストレス産生を反映しないことが明らかとなった。つまり、老化における酸化ストレス学説において、生体内酸化ストレスを組織レベルで測定するシステムとして、*in vivo* ESR は有用であることが明らかとなった。さらに、Tfam を過剰発現することで、酸化ストレスは抑制されることが明らかになり、ミトコンドリア由来の酸化ストレス傷害を軽減し、ミトコンドリア DNA を保護することが酸化ストレス生成を制御する新たな戦略として有用であることが示唆された。

E. 結論

生体内の酸化ストレス産生を評価するためには、局所での産生を測定することが重要である。ミトコンドリア DNA を保護することで、ミトコンドリア由来の酸化ストレスを抑制することは、生体内酸化ストレス産生を抑制する。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. 井手友美、砂川賢二：酸化ストレスマーカーの測定、バイオマーカー測定法。「酸化ストレスと心血管病」、横山光宏、藤田敏郎編集、日本医学出版、85-87, 2007.
2. 井手友美：活性酸素種産生系、ミトコンドリア電子伝達系。「酸化ストレスと心血管病」、横山光宏、藤田敏郎編集、日本医学出版、13-16, 2007.

G-2 学会発表

1. American Heart Association 2006 Chicago, U.S.A. Nov 12-15, 2006

Monden Y, Kubota T, Ide T, Tumor Necrosis Factor- α is Toxic via Receptor 1 and Protective via Receptor 2 in a Murine Model of Myocardial Infarction

Ide T et al. Establishment of non-invasive and

direct measurement of ROS generation in the heart by *in vivo* ESR spectroscopy.

2. I S H R (International Society for Heart Research (ISHR) The 23rd Annual Meeting of ISHR Japanese Section 千葉 12/1-2, 2006

Monden Y, Kubota T, Ide T, Sunagawa K Tumor necrosis factor- α is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction

Ide T et al. Establishment of non-invasive and direct measurement of ROS generation in the heart by *in vivo* ESR spectroscopy

3. 日本心不全学会 東京 10/13-15, 2006 Inoue T, Ide T et al. Time-dependent activation of myocardial and peripheral oxidative stress is dissociated after myocardial infarction.

Tsutsumi T, Ide T, et al. Vagal Nerve Stimulation Acutely Decreases the Generation of Free Radicals in Failing Myocardium.

Monden Y, Kubota T, Ide T, Sunagawa K, Tumor necrosis factor- α is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

加齢及び高血圧における脳内活性酸素をターゲットとした診断・治療法の開発

分担研究者 砂川 賢二 九州大学大学院医学研究院 循環器内科 教授

研究要旨：超高齢化社会を迎え高血圧症患者数、合併症としての脳血管障害及びそれに先行する認知症患者の増加が危惧され、その対策は急務である。加齢及び高血圧は脳内活性酸素産生増加を促進することが予想される。その検証を行い、脳内活性酸素産生源及び神経細胞傷害機序を明らかにする。どのクラスの降圧薬が良いか、抗酸化薬・減塩の効果調べる。脳内活性酸素をターゲットとした診断・治療法を開発し、臨床研究・治療戦略へつなげる。

A. 研究目的

超高齢化社会を迎え、今後、高血圧症患者数自体増加することが予想される。高血圧は人類最大の危険因子であるにもかかわらず、その管理・治療は未だ不十分である。それは、循環調節異常としての高血圧の成因がわかっていないからである。確かに高血圧自体は多因子疾患であるが、その鍵となる仕組みを明らかにし、それをターゲットとした治療を考えるべきである。また、高血圧者の人口は加齢に伴い急増することが疫学研究からも知られている。私は、以前より、自律神経系を介した血圧調節における「脳」の重要性に着目しており、その制御機構に直接介入するデバイスを開発することを目的としたバイオニック医学を提唱した。本研究では、特に主任研究者の廣岡と共に脳内活性酸素の加齢・高血圧における役割を明らかにし、その制御機構の異常にどの程度関わるかを知ることが目的とする。その結果、高血圧性心不全や高齢者の自律神経異常に伴う起立性低血圧・臥位高血圧を克服する研究に発展させ、健康な超高齢社会を目指す。

B. 研究方法

- 1) 加齢及び高血圧における脳内活性酸素産生：ヒト本態性高血圧症のモデルである自然発症高血圧ラット（SHR）もしくは脳卒中易発症性自然発症高血圧ラット（SHRSP）において、週齢の異なるラット（6, 12, 24週齢）を用いて、脳内活性酸素産生を測定する。対照として、正常血圧ラット（WKY）を用いる。具体的には、Thiobarbituric acid-reactive substances（TBARS）法、電子スピ

ン共鳴（ESR）法を用いる。

- 2) 降圧薬治療による脳内活性酸素産生抑制効果：カルシウム拮抗薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬を経口投与し、脳内活性酸素産生レベルをSHRSPとWKYで比較検討した。また、降圧薬ではないが抗酸化作用を有すると可能性が示唆されているスタチンにおいても同様の検討を行った。
- 3) 高血圧ラットにおける食塩負荷と脳内活性酸素の関係に関する検討：食塩過剰摂取は特に我が国における健康管理上、重要な問題である。また、高血圧に本質的に関わる環境因子である。従って、食塩負荷による脳内活性酸素産生について検討を行った。

（倫理面への配慮）

九州大学動物実験倫理規定を遵守する。

C. 研究結果

加齢及び高血圧における脳内活性酸素産生：大脳・小脳・視床下部・脳幹部の活性酸素産生の指標として測定したTBARSレベルは12週齢SHRSPでWKYより高値を示した。一方、in vivo ESRで測定したフリーラジカル計測においては既に6週齢でSHRSPの方がWKYより高値を示しており、これは12週齢、24週齢においても継続して認められた。従って、SHRSPの脳内酸化ストレス増大には、高血圧発症初期の段階からフリーラジカル産生増加が関与していることを示唆する成績である。一方、WKYでは大きな変化は認められず、正常血圧ラットでの加齢変化をみるにはかなりの期

間のラットの育成が必要であることが考えられた。

降圧薬治療による脳内活性酸素産生抑制効果：SHRSPに対して、長期作用型カルシウム拮抗薬であるアゼルニジピンを一ヶ月経口投与すると対照であるヒドララジンと比べ脳内eNOSの発現が増加していた。NOは活性酸素を消去するので脳内で抗酸化作用を有する可能性が考えられた。また、スタチンであるアトルバスタチンは脳内活性酸素消去作用を有することを見出した。

高血圧ラットにおける食塩負荷と脳内活性酸素の関係に関する検討SHRに対して、食塩負荷による脳内活性酸素産生について検討を行ったところ、脳幹部に存在する心血管中枢の活性酸素産生が増加し更なる血圧上昇に関与していることを見出した。

D. 考察

本研究の当該年度の成果は初年度であり、高血圧モデルラットにおけるある週齢における脳内活性酸素産生増加の役割やそれを消去することが自律神経活動を介した血圧低下に結びつくことを示唆することにとどまっている。しかし、主任研究者が報告しているようにその産生源としてのNAD(P)H oxidaseの役割やその上流にあるアンジオテンシンII 刺激や下流にある低分子量G蛋白であるRac1やRhoなどのシグナルの流れを示した点は今後の研究や、薬剤の効果を見る上で非常に重要である。血管、特に培養血管細胞におけるこれらの研究は数多くなされているが脳内物質—神経細胞活動—血圧調節という流れをin vivoで検討した報告はほとんどない。

加齢・老化という観点からは正常血圧ラットではほとんど変化を示さなかったため、依然不明である。これはラットの老化を見る実験系に限界があるかも知れない。4年くらいの経過をみないといけないからである。マウスはもっと寿命が短いため、病態モデルを用いて検討する価値がある。ただし、高血圧モデルとして適したものは残念ながらない。しかし、ヒトは齧歯類とは異なり加齢と共に大多数のヒトの血圧が上昇することは良く知られた事実である。また、女性の場合、閉経後に高血圧患者が急増することも知られている。主任研究者の廣岡と共にSHRの卵巣摘出を行

うと脳内Rho/Rho-kinase系が活性化することを報告した。その刺激として脳内アンジオテンシン系の活性化が生じていることも示した。先に述べたように、脳内アンジオテンシン系の活性化は活性酸素産生増加を介して交感神経活動亢進、血圧上昇につながる可能性が本研究で示せたことは加齢に伴うこれらの経路が重要である可能性を支持する成績である。

さらに、一部既に臨床で治療薬として用いられている薬剤が脳内活性酸素抑制効果を有する可能性を示せた点は価値がある。

従って、本研究は基礎研究ではあるがこれらの仕組みを解明し、科学的根拠を確かにした後、臨床試験を行う重要な研究となることが期待される。昨今、臨床試験に対する安全性の見直しがなされている。研究に対して、臨床への応用を期待する声は大きいものがあるが一朝一夕にはいかず慎重に基礎研究で確認した上で臨床研究への応用を考えたい。

E. 結論

以上の成績は、脳内活性酸素産生増加が高血圧発症初期の段階から生じており、自律神経系を介した血圧上昇の仕組みに深く関与していることを示唆する。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Monden Y, Kubota T, Tsutsumi T, Inoue T, Kawano S, Kawamura N, Ide T, Egashira K, Tsutsui H, Sunagawa K. Soluble TNF receptors prevent apoptosis in infiltrating cells and promote ventricular rupture and remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2007 Mar 1;73(4):794-805.
2. Matsusaka H, Kinugawa S, Ide T, Matsushima S, Shiomi T, Kubota T, Sunagawa K, Tsutsui H. Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates exacerbated left ventricular remodeling and failure in diabetes-associated myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006 Sep;48(3):95-102.
3. Ito K, Hirooka Y, Kimura Y, Sagara Y, Sunagawa K. Ovariectomy augments

- hypertension through rho-kinase activation in the brain stem in female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2006 Oct;48(4):651-7.
4. Matsushima S, Kinugawa S, Ide T, Matsusaka H, Inoue N, Ohta Y, Yokota T, Sunagawa K, Tsutsui H. Overexpression of glutathione peroxidase attenuates myocardial remodeling and preserves diastolic function in diabetic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Nov;291(5):H2237-45.
 5. Hirooka Y, Kimura Y, Nozoe M, Sagara Y, Ito K, Sunagawa K. Amlodipine-induced reduction of oxidative stress in the brain is associated with sympatho-inhibitory effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2006 Jan;29(1):49-56.
 6. Aiba T, Shimizu W, Hidaka I, Uemura K, Noda T, Zheng C, Kamiya A, Inagaki M, Sugimachi M, Sunagawa K. Cellular basis for trigger and maintenance of ventricular fibrillation in the Brugada syndrome model: high-resolution optical mapping study. *J Am Coll Cardiol*. 2006 May 16;47(10):2074-85.
 7. Kawano S, Kubota T, Monden Y, Tsutsumi T, Inoue T, Kawamura N, Tsutsui H, Sunagawa K. Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Sep;291(3):H1337-44.
 8. Matsushima S, Ide T, Yamato M, Matsusaka H, Hattori F, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Hasegawa Y, Kurihara T, Oikawa S, Kinugawa S, Tsutsui H. Overexpression of mitochondrial peroxiredoxin-3 prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2006 Apr 11;113(14):1779-86.
 9. Zheng C, Kawada T, Li M, Sato T, Sunagawa K, Sugimachi M. Reversible vagal blockade in conscious rats using a targeted delivery device. *J Neurosci Methods*. 2006 Sep 30;156(1-2):71-5.
 10. Matsusaka H, Ide T, Matsushima S, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Kinugawa S, Tsutsui H. Targeted deletion of p53 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res*. 2006 Jun 1;70(3):457-65.
 11. Matsusaka H, Ide T, Matsushima S, Ikeuchi M, Kubota T, Sunagawa K, Kinugawa S, Tsutsui H. Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload. *Hypertension*. 2006 Apr;47(4):711-7.
 12. Michikami D, Kamiya A, Kawada T, Inagaki M, Shishido T, Yamamoto K, Ariumi H, Iwase S, Sugeno Y, Sunagawa K, Sugimachi M. Short-term electroacupuncture at Zusanli resets the arterial baroreflex neural arc toward lower sympathetic nerve activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jul;291(1):H318-26.
 13. Uemura K, Kamiya A, Hidaka I, Kawada T, Shimizu S, Shishido T, Yoshizawa M, Sugimachi M, Sunagawa K. Automated drug delivery system to control systemic arterial pressure, cardiac output, and left heart filling pressure in acute decompensated heart failure. *J Appl Physiol*. 2006 Apr;100(4):1278-86.
- G-2 学会発表
- 1 Experimental Biology 2006 (April 1-5, 2006, San Francisco, USA)
- Koga Y, Hirooka Y, Nozoe M, Sagara Y, Sunagawa K. High salt dietary increases reactive oxygen species generation in the brain and contributes to the development of central activation of the sympathetic nervous system in spontaneously hypertensive rats.
- Nozoe M, Hirooka Y, Sagara Y, Koga Y, Kishi T, Sunagawa K. Mitochondrial Respiratory Chain Dysfunction in the Brain is not a Major Component of Increased Reactive Oxygen Species in Neural Mechanisms of Hypertension
- Sagara Y, Hirooka Y, Nozoe M, Koga Y, Sunagawa K. Reactive oxygen species via Rac1-dependent pathway in rostral ventrolateral medulla enhance central sympathetic outflow in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.
- 2 International Functional Electrical Stimulation Society 2006 (September

12-15, 2006, Sendai, Japan)

Sunagawa K. Bionic medicine revolutionizes clinical cardiology in the 21st century.

3 La Jolla-Capri-Yamaguchi-Seoul Research Conference (October 7-8, 2006, Yamaguchi, Japan)

Sunagawa K. Bionic medicine revolutionizes clinical cardiology in the 21st century.

4 The 21st Scientific Meeting of the International Society of Hypertension; 5th Asian-Pacific Congress of Hypertension; 29th Annual Scientific Meeting of the Japanese Society of Hypertension (October 15-19, 2006, Fukuoka, Japan)

Hirooka Y, Kimura Y, Nozoe M, Sagara Y, Sunagawa K. Amlodipine-induced reduction of oxidative stress in the brain is associated with sympatho-inhibitory effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

Hirooka Y, Kimura Y, Sagara Y, Ito K, Sunagawa K. Effects of valsartan or amlodipine on endothelial function and oxidative stress after one year follow-up in patients with essential hypertension.

Ito K, Hirooka Y, Takeshita A, Sunagawa K. Estrogen depletion induced hypertension through Rho-kinase activation in the brainstem in female spontaneously hypertensive rats.

Kishi T, Hirooka Y, Takeshita A, Sunagawa K. The sympatho-inhibitory effect of statin in the SHRSP along with the anti-oxidant effect in the RVLM.

Koga Y, Hirooka Y, Araki S, Nozoe M, Sagara Y, Kishi T, Sunagawa K. High salt diet increases blood pressure via oxidative stress in the brainstem in spontaneously hypertensive rats.

Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, Sagara Y, Kishi T, Sunagawa K. Increased reactive oxygen species in nucleus tractus solitarius is involved in neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

5 The 12th International Symposium on SHR: Concurrent 42nd Japanese SHR Symposium (October 20-21, 2006, Kyoto, Japan)

Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K. Sympatho-inhibitory effects of statin in stroke-prone spontaneously hypertensive rats

along with the anti-oxidant effect in the rostral ventrolateral medulla.

6 Scientific Sessions 2006 of the American Heart Association (November 12-15, 2006, Chicago, U.S.A.)

Ide T, Yamato M, Yoshida M, Utsumi H, Ikeuchi M, Tsutsumi T, Inoue H, Shiba T, Tsutsui H, Sunagawa K. Non-invasive analysis of oxidative stress in myocardial remodeling in mice using in vivo electron spin resonance (ESR) spectroscopy

Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, Araki S-I, Kishi T, Sunagawa K. Increased reactive oxygen species in the nucleus tractus solitarius are increased in the neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

Sagara Y, Hirooka Y, Nozoe M, Koga Y, Sunagawa K. Contribution of angiotensin II in the increased reactive oxygen species in the rostral ventrolateral medulla and enhanced central sympathetic outflow in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.

7 International Society for Heart Research (ISHR) The 23rd Annual Meeting of ISHR Japanese Section (December 1-2, 2006, Chiba, Japan)

Ide T, Yamato M, Yoshida M, Utsumi H, Ikeuchi M, Tsutsumi T, Inoue T, Shiba T, Tsutsui H, Sunagawa K. Non-invasive analysis of oxidative stress in myocardial remodeling in mice using in vivo electron spin resonance (ESR) spectroscopy.

Monden Y, Kubota T, Ide T, Sunagawa K. Tumor necrosis factor- α is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction.

8 International Symposium on Medical Information and Communication Technology 2006 (December 1-2, 2006, Yokohama, Japan)

Sunagawa K. ICT enabling intracorporeal network accelerates the development of hospital in-silico in the 21st century

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

生体内レドックス動態の同時分子イメージングシステムの開発と病態モデルへの応用

分担研究者 内海 英雄 九州大学大学院薬学研究院 機能分子解析学 教授

研究要旨：近年、脳梗塞や心血管病、糖尿病、癌などの疾患に活性酸素やフリーラジカルの関与が示唆されている。酸化ストレスがこれらの疾患の発症あるいは進展にどのように関与しているかを明らかにすることは、抗酸化の観点からみた疾患の予防や治療、または新規治療薬の開発につながり、超高齢化社会を迎えた現代重要な課題である。ニトロキシルプローブを用いた生体計測（in vivo）電子スピン共鳴（ESR）法は酸化ストレスを評価する上で非常に有用であり、本研究では、脳における評価法の開発・確立を目指す。

A. 研究目的

最近、糖尿病や高血圧、脳卒中などの疾患に、フリーラジカルが関与していることが明らかにされつつある。フリーラジカルの生体内無侵襲解析手法として、我々は生体計測電子スピン共鳴（in vivo ESR）/スピンプローブ法を提唱し、これまでにフリーラジカルと疾患の発症・進展との関わりを明らかにしてきた[1]。これら酸化ストレス疾患の、どの部位で、いつ、どの程度フリーラジカルが産生しているかを明らかにすることが、病態解析・薬効評価において極めて重要である。

しかし、細胞内外といったナノスケールでフリーラジカル反応も異なるため、細胞内外を切り分け、さらにそれらを同時に画像解析できれば、より詳細に疾患の成因を解明することが可能となる。近年フリーラジカルの画像化装置として新たに開発されたOMRIは、オーバーハウザー効果を原理としたMRIであり、高い空間分解能を持ち、短時間測定が可能である。しかし、導入した装置は、プロトタイプであることもあり、MRI共鳴磁場が15 mT（ミリテスラ）と非常に低いため、感度・分解能共に悪く、正確な意味での生体内臓器・組織画像を得ることができない。また原理的にESR照射時にマイクロ波パルスを照射するため、ニトロキシルラジカルが持つ最大の長所、すなわちスペクトル情報が欠如している。そこで本研究では、臨床用0.4 T MRIをベースとしてESR部および試料移動部を設計して試料移動型OMRI（ST-OMRI）を試作した。また、細胞内外のレドックス反応の同時画像化に向けたシステムを開発し、本シス

テムを疾患モデルの病態解析に応用した。

B. 研究方法

我々は、「生体計測 ESR・ニトロキシルプローブ法」を提唱し本手法を用いた生体内の酸化ストレスを測定する手法を開発してきた。このためには、微量な活性酸素を検出するためニトロキシルラジカルをスピンプローブとして ESR 法と組み合わせる必要がある。

特に脳における評価法ではMC-PROXYLをスピンプローブとして用い、ESR法と組み合わせ電子スピニングナルの減衰速度を測定することによって評価する。

また、プロトン核スピン共鳴画像（MRI）を応用し、高感度かつ短時間に画像取得できるオーバーハウザーMRI（OMRI）を用いた活性酸素種のバイオイメージングの開発を目指している。

（倫理面への配慮）

九州大学動物実験倫理規定を遵守する。

C. 研究結果

0.4 T ST-OMRI装置の開発

ESR励起部は0.4 T MRI装置の外枠(磁場中心から距離1 m)のさらに外側に設置されており、両者間に動物移動装置を設置した。1 m/秒の架台移動速度・100回移動後繰り返し時において、位置決め精度10 μm（動物固定部無し）、20 μm（装着時）であった。市販0.4 T MRIをベースとし、MRI装置のRF励起に同期したトリガ信号を用いて統合装置全体を制御するシステムを試作し、MRI装置/動物移動装置/ESR励起装置が、本試作機のOMRIシーケンスに基づいて連

携動作することを確認した。次に、内径14 mmのバイアルに肉厚0.35 mmの円筒3本と内寸3.3 mmの矩形容器を封入し、それぞれに蒸留水およびニトロキシラジカル造影剤 carbamoyl PROXYL (1 mM) を充填し、本装置で計測した。試作機は既存の0.015TのOMRI装置に比べて磁場強度が0.4Tと高くプロトン検出感度が高いため、既存装置では全く得られないMRI画像が、試作装置で明瞭に得ることが出来た。また、ニトロキシラジカルをESRで励起し、オーバーハウザー効果強調画像を撮像したところ、挿入した円筒(内径2.0 mm、肉厚0.35 mm)の輪郭や矩形容器の角が明瞭で、均一な画像が得られた。

レドックス動態の同時分子イメージングシステムの開発

生体内レドックス反応を解析する上で、細胞内外を区別して画像化することは非常に重要である。そこで、レドックス動態の同時分子イメージングシステムの開発に着手した。図1cのように、ニトロキシラジカルを含む試験管にアスコルビン酸を、ヒドロキシラジカルを含む試験管に過酸化水素とペルオキシダーゼの混合液を各々添加し、OMRIを用いて同時分離画像化を行った。

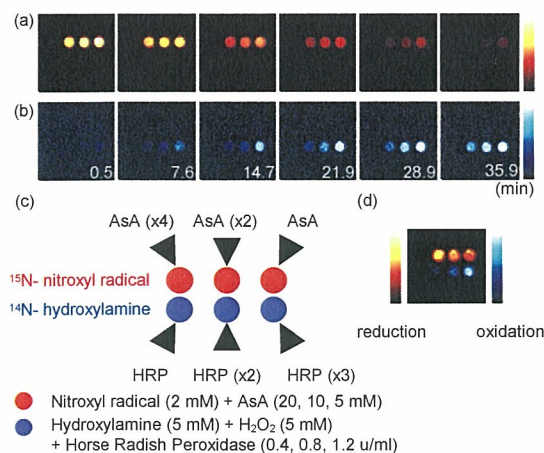


図1 レドックス動態の同時分離画像

a, b は各々ニトロキシラジカル還元、ヒドロキシラジカル酸化の時系列 OMRI 画像、c は模擬試料の配置図、d は OMRI 画像輝度の減衰・増加速度画像を示す。

その結果、図1a, bのように、 ^{14}N 、 ^{15}N 標識プローブの同時分離画像取得に成功した。従来の *in vivo* ESR解析でのシグナル減衰速度算出[1]と同様の手法で、OMRI画像

輝度の減衰・増加速度を画像化することで、還元反応でニトロキシラジカルが時間依存的に減少し、酸化反応でヒドロキシラジカルが酵素の用量依存的に増加することが明らかとなった(図1d)[2]。

アスコルビン酸(AsA)封入りリポソーム内外の同時分離画像

図2cのように、アスコルビン酸(AsA)封入りリポソームを作成し、膜透過プローブ ^{14}N -MC-PROXYL と非膜透過プローブ ^{15}N -carboxy-PROXYL を添加し、リポソーム内外での同時分離画像化を行った。同時分離画像(図2a, b)及び減衰速度画像(図2d)より、非膜透過性プローブではほとんど還元されないのに対し、膜透過性プローブでは、リポソーム内のアスコルビン酸によって還元されることが明らかとなった[2]。

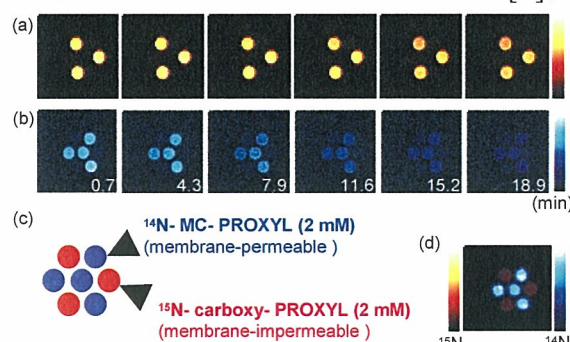


図2 アスコルビン酸封入りリポソーム内外の同時分離画像

a, b は各々、アスコルビン酸封入りリポソーム中での ^{14}N -MC-PROXYL(2 mM)、 ^{15}N -carboxy-PROXYL (2 mM)の時系列 OMRI 画像、c は模擬試料の配置図、d は OMRI 画像輝度の減衰速度画像を示す。

同時分子イメージングシステムの病態モデルへの応用

本システムをインドメタシン惹起胃潰瘍モデルラットの病態解析に応用した。インドメタシン処置ラットに膜透過性プローブ ^{15}N -MC-PROXYL と非膜透過性プローブ ^{14}N -trimethylammonium-TEMPO の混合液を経口投与し、直後に OMRI 撮像を行った。インドメタシン処置ラット胃内において、 ^{15}N -MC-PROXYL の画像輝度は顕著な減衰が認められたが、 ^{14}N -trimethylammonium-TEMPO の画像輝度はほとんど変化しなかった。以上より、インドメタシン処置ラットで、活性酸素は胃腔内のような親水的環境ではなく、胃粘液層、上皮細胞膜の表面や膜内部のような疎水的環境で生成することが示唆された。潰

瘍性大腸炎モデル等においても、発症から進展に至る過程において、細胞内と外とでレドックス動態が異なることが示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし。

D. 考察

生体計測 ESR/ニトロキシルプローブ法は疾患モデル動物で無侵襲かつリアルタイムに活性酸素を検出し、その生態機序を詳細に解析することが可能である。今後、種々の機能性ニトロキシルプローブ剤を開発することで、疾患モデルにおけるフリーラジカルの関与を細胞レベルで解明することが可能となり、医薬品の抗酸化作用に関する詳細な知見がえられるものと期待される。

また、MRI は解剖学的情報を得られることから ESR 法と併用することで、ニトロキシルプローブの体内動態や活性酸素の生成部位の特定に用いられる。さらに、オーバーハウザー効果を利用した OMRI では、疾患モデルで低侵襲かつリアルタイムに細胞膜内外で異なる活性酸素動態を区別し、かつ同時にイメージングをすることも可能である。

E. 結論

生体計測 ESR/ニトロキシルプローブ法は疾患モデル動物で無侵襲かつリアルタイムに活性酸素を検出し、その生態機序を詳細に解析することが可能である。特に、本研究では、研究代表者らと MC-PRPXYL を用いた脳内活性酸素の評価を行った。

G. 研究発表

1. Utsumi H, Yasukawa K, Soeda T, Yamada K, Shigemi R, Yao T, Tsuneyoshi M. Noninvasive mapping of reactive oxygen species by in vivo electron spin resonance spectroscopy in indomethacin-induced gastric ulcers in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Apr;317(1):228-35.
2. Yamada K, Yamamiya I, Utsumi H. In vivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue.

Free Radic Biol Med. 2006 Jun 1;40(11):2040-6.

3. Utsumi H, Yamada K, Ichikawa K, Sakai K, Kinoshita Y, Matsumoto S, Nagai M. Simultaneous molecular imaging of redox reactions monitored by Overhauser-enhanced MRI with ¹⁴N- and ¹⁵N-labeled nitroxyl radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 31;103(5):1463-8.

H. 知的財産権の出願・登録状況

【国際特許】

「生体計測装置及びその方法」
出願日：2006年1月27日出願
発明者：内海 英雄
出願番号：PCT/JP2006/301278

【国内特許】

「磁気共鳴イメージング装置」
出願日：2006年5月29日出願
発明者：内海 英雄、
(株)日立メディコ 高橋哲彦
出願番号：特願 2006-148333

「ニトロキシルラジカルの合成法」
出願日：2007年1月31日出願
発明者：内海 英雄、酒井 浄、山田健一
出願番号：特願 2007-022042

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Hirooka Y	Role of nitric oxide and oxidative stress in the brainstem in cardiovascular regulation.	Kubo T	Central Mechanisms of Cardiovascular Regulation.	Research Signport	Kerala India	2007	In press
井手友美	活性酸素種産生系ミトコンドリア電子伝達系	横山 光宏、 藤田 敏郎	酸化ストレスと心血管病	日本医学出版	東京	2007	12-16
内海英雄 安川圭司	酸化ストレスマーカーの測定電子スピン共鳴 (ESR) 法	横山 光宏、 藤田 敏郎	酸化ストレスと心血管病	日本医学出版	東京	2007	79-84
井手友美 砂川賢二	酸化ストレスマーカーの測定バイオマーカー測定法	横山 光宏、 藤田 敏郎	酸化ストレスと心血管病	日本医学出版	東京	2007	85-87
内海英雄 安川圭司	活性酸素種のバイオイメーキング MRI	横山 光宏、 藤田 敏郎	酸化ストレスと心血管病	日本医学出版	東京	2007	95-100
廣岡良隆	酸化ストレスと交感神経	横山 光宏、 藤田 敏郎	酸化ストレスと心血管病	日本医学出版	東京	2007	113-118
内海英雄	酸化ストレスマーカー生体磁気共鳴による酸化ストレス疾患の無侵襲解析	吉川 敏一	酸化ストレス Ver 2. フリーラジカル医学生物学の最前線	医歯薬出版	東京	2006	169-172

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
井手友美 砂川賢二	ROS のミトコンドリア DNA 傷害	日本臨床	65	238-242	2007
井手友美 砂川賢二	ミトコンドリアにおける活性酸素産生	細胞	38	306-309	2006
井手友美 砂川賢二 筒井裕之	レドックス制御における Tfam の役割	医学のあゆみ	218	119-122	2006
井手友美 筒井裕之	ミトコンドリア由来の酸化ストレスの制御によるあらたな心不全治療	医学のあゆみ	218	1333-1337	2006
井手友美 筒井裕之	ミトコンドリア傷害と心不全ーミトコンドリア由来のレドックス制御による新たな心不全の治療ー	循環器科	59	541-546	2006
Hirooka Y, Kimura Y, Nozoe M, et al	Amlodipine-induced reduction of oxidative stress in the brain is associated with sympatho-inhibitory effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.	International Society of Hypertension		83	2006
Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, et al	Increased reactive oxygen species in nucleus tractus solitarius is involved in neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats.	International Society of Hypertension		158	2006