

厚生労働省科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）

平成19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  
(九州大学病院 循環器内科)

平成20（2008）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	9
	岸 拓弥	
3.	分担研究報告書 九州大学病院	11
	井手 友美	
4.	分担研究報告書 九州大学大学院医学研究院	14
	砂川 賢二	
5.	分担研究報告書 九州大学大学院薬学研究院	17
	内海 英雄	
6.	刊行物一覧	19
7.	論文別刷り	

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
（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：研究要旨：超高齢化社会を迎えた現代、高血圧症患者数の増加、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診断・予防・治療は急務である。高血圧では発症初期から脳内活性酸素産生が増加していることが判明した。そのため、生体計測電子スピン共鳴法を用い手法を確立した。また、脳内活性酸素産生機序の解明を行った。一部の長時間作用型カルシウム拮抗薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬、高コレステロール血症治療薬が高血圧モデルの脳内活性酸素を減少させた。さらに、環境因子として重要な食塩負荷が脳内活性酸素産生を増加させることを明らかにした。

【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

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。従来、脳内活性酸素の測定は困難であったが、生体計測電子スピン共鳴（ESR）法を応用した。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、臨床研究への展開・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、社会全体で健康な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、生体計測電子スピン共鳴（*in vivo* 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。

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我が国のみならず世界で推定されている。従って、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極めて重要な課題である。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、特に高血圧がその増加の程度に影響するか、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

- 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I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。
- 4) 降圧薬治療による脳内活性酸素産生抑制効果(廣岡、岸、砂川)：カルシウム拮抗薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬を一ヶ月間経口投与し、脳内活性酸素産生レベルをSHRSPとWKYで比較検討した。また、高コレステロール血症治療薬であり、抗酸化作用を有する可能性が示唆されているアトルバスタチンにおいても同様の検討を行った。
- 5) 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(廣岡、岸、砂川)：修正可能な生活習慣として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、高血圧の病態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いその機序を検討した。

(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。さらに、この差は週齢を重ねても存在し、後に述べるように一部の降圧治療で軽減される。従って、脳保護という観点から重要なターゲットとなりうる。
- 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)：先に述べたように*in vivo* ESRは生体で脳内活性酸素を評価する上で有用であることを確立したと言える。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、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、交感神経活動を介して血圧レベルを規定する心血管中枢の存在する脳幹部延髄孤束核(NTS)および頭側延髄腹外側野(RVLM)の活性酸素産生源およびその機序についてSHRSPとWKYの違いを調べた。その結果、SHRSPのNTSやRVLMでは低分子量G蛋白であるRac1を介して活性酸素産生源として重要な酵素として注目されている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。
- 4) 降圧薬治療による脳内活性酸素産生抑制効果(廣岡、岸、砂川)：SHRSPに対して、降圧薬として臨床的に使用されている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純粋な血管拡張薬であるヒドララジンと比べ、明らかな抗酸化作用を示した。また、長時間作用型カルシウム拮抗薬と同様に現在降圧薬として頻用されているアンジオテンシン受容体拮抗薬の一部も脳内で抗酸化作用を有することが判明した。さらに、高コレステロール血症治療薬であるアトルバスタチンが脳内活性酸素消去作用を有することを見出した。
- 5) 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(廣岡、岸、砂川)：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。この機序としてアンジオテンシン1型受容体のアップレギュレーションを介したNAD(P)H oxidaseの活性化が関与していることが示唆された。

### D. 考察

本研究の成果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は既に高血圧発症初期の段階から生じていることを*in vivo* ESR法を用いて見出した。2) 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。3) 一部の長時間作用型カルシウム拮抗薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬、さらには高コレステロール血症治療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。4) 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こと、その機序としてアンジオテンシン受容体を介して NAD(P)H oxidase が活性化される機序が関与していることを示した。

## 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 の皮下注入実験モデルがしばしば用いられ、心臓・血管の肥大・線維化やリモデリングが生じることが知られている。その機序に活性酸素が関与していることが示され、アンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬などのレニン・アンジオテンシン系抑制薬の有用性が認められている。これが、多くの研究者がこれらの薬剤が beyond blood pressure lowering effects を有すると論じる根拠である。現在、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ている。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るが我々は高血圧発症早期から完成期に至るまで脳内活性酸素産生が増加していることを生体計測 ESR 法という比較的新しい手法を用いて見出した。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 の活性が低下していた。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 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、その意味からもアンジオテンシン受容体拮抗薬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。我々は iNOS 遺伝子発現が SHRSP の脳内で増加していることを見出した。この過剰発現は以前の成績で酸化ストレスを生じることが報告しており、本モデルでの血圧上昇機序に一部関与している可能性が考えられる。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<sup>+</sup> 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。本研究で我々はミトコンドリアからの活性酸素産生がNAD(P)H oxidaseの活性化を介する機序があることを見出した。

#### 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。

### 1. 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。

### 2. 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。今回、iNOS発現がSHRの脳内で増加していることはこの点興味深い。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。さらに、脳内には血液脳関門を欠く部位もあり、しかもそ

これらの部位はアンジオテンシン受容体が豊富であることも知られている。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。本研究で末梢投与したアンジオテンシン受容体拮抗薬やその他の薬剤が脳内活性酸素産生抑制効果を示した点は新たな薬剤の作用機転を示唆する。

#### 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アンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬 A 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高コレステロール血症治療薬であ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。今回、脳内から指令を出されて制御されている迷走神経を刺激すると心筋虚血モデルで心筋細胞の活性酸素産生を抑制することを示した。新たな展開が期待される。

#### 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、述べたように脳内活性酸素は高血圧の病態に深く関与していること、従って臓器の老化を促進する。In vivo ESR 法を用いた脳内活性酸素測定系は実験系では確立できた。脳内活性酸素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、脳内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。アンジオテンシン受容体拮抗薬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。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アンジオテンシン受容体拮抗薬の *beyond BP lowering effect* を示唆するが、ヒトにおける検討はまだ少ない。我々は ARB であるバルサルタンが高血圧患者の *flow-mediated vasodilation* を改善することを示した。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。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キング, 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ンイン・アンジオテンシン系の役割. ホルモンと臨床. 49-56, 2007.
  7. 古閑 靖章, 廣岡 良隆：高血圧と食塩感受性：交感神経活動亢進の重要性と中枢性機序. 循環制御 28: 203-209, 2007.
  8. 廣岡 良隆：中枢性循環調節機構 (NO および Rho-kinase). 自律神経 44: 272-276, 2007.
  9. 廣岡 良隆, 砂川 賢二：中枢神経, 自律神経による心血管機能調節. 循環器科 63: 1-6, 2008.
  10. 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. 50: 62-68, 2007.
  11. 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. 30: 3-11, 2008.
  12. Tsutsumi T, Ide T, Yamato M, Kudou W, Andou M, Hirooka Y, Utsumi H, Tsutsui H, Sunagawa K: Modulation of the myocardial redox state by vagal nerve stimulation after myocardial infarction. Cardiovasc Res. 77: 713-721, 2008.
- G-2 学会発表**
1. 61<sup>st</sup> Annual High Blood Pressure Research Conference, September 26-29, 2007, Tucson, AZ, USA  
Koga Y, Hirooka Y, Nozoe M, Araki S-I, Sagara Y, Kishi T, Sunagawa K. Excess Dietary Salt Exacerbates Hypertension via Oxidative Stress in the Rostral Ventrolateral Medulla and Sympathetic Hyperactivity in Spontaneously Hypertensive Rats.
  2. Satellite Symposium of the 5<sup>th</sup> Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN 2007), October 3, 2007, Wakayama, Japan  
New Insights into Central Control Mechanisms of Circulation (Organization Committee Member)  
Hirooka Y. Increased reactive oxygen species in brainstem contribute to neural mechanisms of hypertension (Symposium).
  3. Scientific Sessions 2007, November 4-7, Orlando, Florida, USA  
Koga Y, Hirooka Y, Araki S, Nozoe M, Kishi T, Sunagawa K. High salt diet exacerbates hypertension via increased oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla and sympathetic hyperactivity in spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 116(Suppl II): II-282, 2007.  
Kishi T, Hirooka Y, Sunagawa K. Impaired neurogenesis in the rostral ventrolateral medulla cause hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 116(Suppl II): II-284, 2007.



4. 第28回日本循環制御医学会総会（平成19年5月11日-12日、和歌山）  
古閑 靖章, 廣岡 良隆, 野副 純世, 荒木 周一郎, 相良 洋治, 岸 拓弥, 砂川 賢二：自然発症高血圧ラットへの食塩負荷による中枢での活性酸素種増加を介した血圧上昇には中枢のレニン・アンジオテンシン系が関与する。
5. 日本適応医学会第11回学術集会（平成19年6月8日-9日、札幌）  
相良 洋治, 廣岡 良隆, 砂川 賢二：AT1受容体拮抗薬は高血圧モデルラットの脳内活性酸素を減少し交感神経活動亢進を軽減する。
6. 第80回日本内分泌学会学術総会（平成19年6月14日-16日、東京）  
クリニカルアワー13 ACE 阻害薬とARBの心血管イベント抑制効果  
廣岡 良隆：ACE阻害薬の脳保護効果。
7. 第6回九州脳と高血圧研究会（平成19年6月30日、福岡）  
古閑 靖章, 廣岡 良隆, 荒木 周一郎, 野副 純世, 相良 洋治, 岸 拓弥, 砂川 賢二：自然発症高血圧ラットへの食塩負荷による血圧上昇には中枢におけるレニンアンジオテンシン系、NAD(P)H oxidase 活性の亢進を伴う活性酸素種増加が関与する。
8. 第8回 Neurocardiology Workshop（平成19年7月21日、東京）  
古閑 靖章, 廣岡 良隆, 荒木 周一郎, 野副 純世, 相良 洋治, 岸 拓弥, 砂川 賢二：頭側延髄腹外側野におけるレニンアンジオテンシン系、NAD(P)H oxidase 活性の亢進を伴う活性酸素種増加が自然発症高血圧ラットへの食塩負荷により血圧上昇に関与する。
9. 第9回時間循環血圧研究会（平成19年7月28日、東京）  
木村 好邦, 廣岡 良隆, 岸 拓弥, 伊藤 浩司, 相良 洋治, 砂川 賢二：頭側延髄腹外側野における誘導型一酸化窒素合成酵素発現増加は自然発症高血圧ラットの血圧上昇機序に関与する。
- 岸 拓弥, 廣岡 良隆, 砂川 賢二：N型カルシウムチャンネルブロッカーの自律神経機能に与える影響について。
10. 第5回交感神経とアンジオテンシンII研究会（平成19年8月4日、福岡）  
野副 純世, 廣岡 良隆, 古閑 靖章, 荒木 周一郎, 今野 里美, 岸 拓弥, 相良 洋治, 伊藤 浩司, 砂川 賢二：延髄孤束核における Rac1/NAD(P)H oxidase 系を介した活性酸素種の増加は神経性高血圧機序に関与している。
11. 第3回 西日本循環器カンファレンス（平成19年9月21日、福岡）  
廣岡 良隆：イベント発症抑制のための治療戦略-降圧療法を中心に-、循環器専門医の立場から。
12. 第29回 別府循環器研究会（平成19年10月18日、別府）  
廣岡 良隆：高血圧と交感神経系【特別講演】。
13. 第30回 日本高血圧学会総会（平成19年10月25日-27日、宜野湾市、沖縄）  
古閑 靖章, 廣岡 良隆, 荒木 周一郎, 野副 純世, 相良 洋治, 岸 拓弥, 砂川 賢二：自然発症高血圧ラットへの食塩負荷による血圧上昇には頭側延髄腹外側野におけるレニンアンジオテンシン系、NAD(P)H oxidase 活性の亢進を伴う活性酸素種増加が関与する。
- 荒木 周一郎, 廣岡 良隆, 野副 純世, 古閑 靖章, 岸 拓弥, 安川 圭司, 内海 英雄, 砂川 賢二：脳卒中易発症性自然発症高血圧ラットにおける脳内酸化ストレスとアンジオテンシンIIタイプ1受容体拮抗薬オルメサルタンによる治療効果：In vivo ESR法の応用。
- 今野 里美, 廣岡 良隆, 岸 拓弥, 砂川 賢二：本態性高血圧患者に対するアゼ

ルニジピン内服治療は交感神経活動抑制および動脈圧受容器反射改善作用を有する。

14. 第 11 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会（平成 19 年 11 月 16-17 日，東京）

岸 拓弥，廣岡 良隆，今野 里美，砂川 賢二：脳幹部心血管中枢の神経細胞再生異常が脳卒中易発症性自然発症高血圧ラットにおける高血圧発症・進展の原因である。

15. 第 44 回日本臨床生理学会総会（平成 19 年 11 月 21-22 日，大阪）

シンポジウム 3「病態生理」シンポジウム 3-1「自律神経研究の新たな展開」

廣岡 良隆：高血圧における脳幹部活性酸素の役割。

16. 第 9 回高血圧を考える会（平成 20 年 1 月 25 日，東京）

廣岡 良隆：高血圧における交感神経活性化機構-脳内一酸化窒素・活性酸素の役割-【特別講演】。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし。
2. 実用新案登録  
特になし。
3. その他  
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
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

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：高血圧の成因としての交感神経活動活性化の機序として頭側延髄腹外側野での活性酸素種上昇があるが、それに対する薬物治療の可能性について検討を行った。HMG-CoA 変換酵素阻害薬およびカルシウム拮抗薬により脳内活性酸素種抑制・交感神経活動抑制がおこることを明らかにした。

#### A. 研究目的

これまで我々は、延髄の頭側延髄腹外側野（RVLM）における活性酸素種増加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てきた。しかし、抗酸化作用を有する薬剤を内服で投与した際に脳内、特にRVMLにおいて活性酸素種が低下するかどうか、交感神経活動が抑制されるかどうかについては明らかではない。そこで、抗酸化作用のあるとされているHMG-CoA変換酵素阻害薬や一部のCa拮抗薬内服によるRVLMにおける活性酸素種や交感神経活動にあたる効果を検討し、加齢と脳内活性酸素との関連の検討において、治療のターゲットや治療法の開発に結びつけ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ラットである脳卒中易発症自然発症高血圧ラット（SHRSP）を用い、atorvastatinやazelnidipineを28日経口投与を行う群、ヒドララジンにより同程度に血圧を低下させた群、ヒドララジン内服で同程度に血圧を低下させた群、コントロール群に分けた。RVLMにおける活性酸素種をTBARS法を用いて、交感神経活動指標として24時間蓄尿による尿カテコールアミン排泄量を測定した。

（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

Atorvastatin群では、血圧・尿中カテコールアミン排泄量いずれもコントロールに比し有意に低下していた。RVLMにおけ

るTBARSも低下していた。Azelnidipine投与群においても、同様の結果であった。さらに、Azelnidipine群では、動脈圧受容器反射の改善、NAD(P)H oxidase活性の抑制、SOD活性の亢進も認められた。

#### D. 考察

本研究の結果から、atorvastatinやAzelnidipineの内服により、RVLMにおける活性酸素種が抑制され、交感神経活動低下をきたすことが明らかとなった。さらに、azelnidipineには、脳内活性酸素種の重要な産生源であるNAD(P)H oxidase活性を抑制し、脳内活性酸素種の消去系であるSOD活性を亢進することで活性酸素種を抑制しているという機序も明らかとなった。いずれも日常診療で使用されている薬剤であり、脳内活性酸素種抑制を介した交感神経活動抑制作用を有することは非常に意義深い。今回はその機序の解明も行えており、加齢と脳内活性酸素種、交感神経活動や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変換酵素阻害薬やCa拮抗薬内服により、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*. 30:1-9, 2008

### G-2学会発表

2. Konno S, Hirooka Y, Kishi T, Sunagawa K. Azelnidipine inhibits the sympathetic nerve activity and improves baroreflex control of heart rate via antioxidant effect in rostral ventrolateral medulla. 第72回日本循環器学会学術集会（平成20年3月28日-30日、福岡）

3.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得  
特になし。
- 2.実用新案登録  
特になし。
- 3.その他  
特になし。

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

分担研究者 岸 拓弥 九州大学病院 循環器内科 臨床助教

**研究要旨：**老化の原因として、脳内酸化ストレスの亢進が重要な役割を果たしていることが示唆される。酸化ストレスの産生源としてミトコンドリアに着目し、ミトコンドリア保護蛋白であるミトコンドリア転写因子Aを過剰発現することで、海馬における活性酸素産生を低下させ、老化に伴う記憶力の低下を抑制することが可能となった。ミトコンドリア転写因子Aは老化に伴う脳機能低下の新たなターゲットであると考えられる。

### A. 研究目的

本研究は、以下の点について明らかにすることを目的とした。

1. ミトコンドリア転写因子（TFAM）の過剰発現によって酸化ストレスが抑制されるか。
2. TFAM 過剰発現マウスによって、脳内の酸化ストレスが減少し、ミトコンドリアの機能を維持し、老化に伴う記憶力の低下を抑制するか。

### B. 研究方法

ミトコンドリア過剰発現細胞として、テトラサイクリン調節性の Hela 細胞を作成した。

ミトコンドリアの全身発現型マウスとして、 $\beta$  アクチンをプロモーターとして、トランスジェニックマウスを作成し、2ヶ月齢および 24ヶ月齢のマウスにおいて、脳内酸化ストレス、ミトコンドリア機能、さらには記憶力について比較した。

脳組織における脂質過酸化の指標として TBARS を測定し、海馬領域における 8-OH-dG の染色、さらにミトコンドリア酵素活性を測定することで、脳内のミトコンドリア機能の指標とした。

空間記憶力評価として、放射状水迷路を用い、その神経活動について海馬における長期増強作用を比較検討した。

（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 テトラサイクリンによって発現調節が可能な Hela 細胞を用いて実験を行った。TFAM 過剰発現細胞（約 2.1 倍の TFAM 発現）にロテノン（1  $\mu$ mol/L）を処理す

ると、DCFにて評価した細胞内のスーパーオキシド産生は、Vehicle群で有意に増加したが、TFAM過剰発現群において抑制された。（図1、n=7 each）

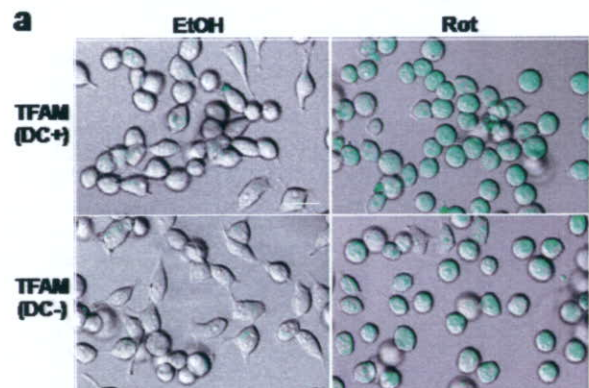
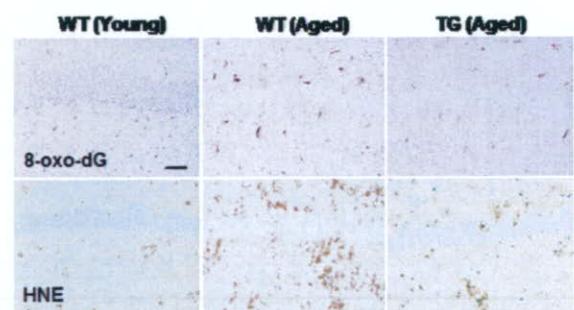


図1.ロテノンによる細胞内スーパーオキシド産生



- ② 野生型マウス(WT)マウスにおいては、老齢マウス脳組織中の脂質過酸化の増加が認められたのに対し、トランスジェニック (TG) マウスでは若齢マウスと同等に維持されていた。（図2）また、海馬 CA-1 領域における加齢にともなった 8-OH-dG の増加は、TG マウスで抑制を認めた。

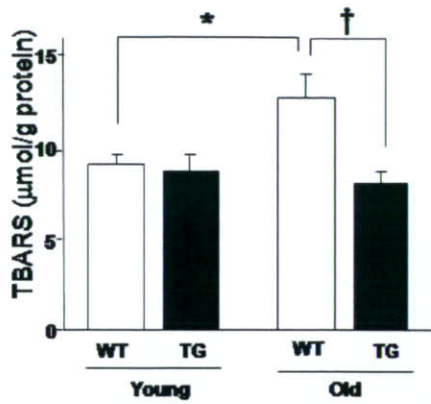


図2. 加齢に伴う脳内脂質過酸化生成量

3. WT マウスでは、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I, IV の活性が加齢に伴って低下するのに対し、TG マウスにおいては、若齢群と同等に維持されていた。(各 n=5 図 3)

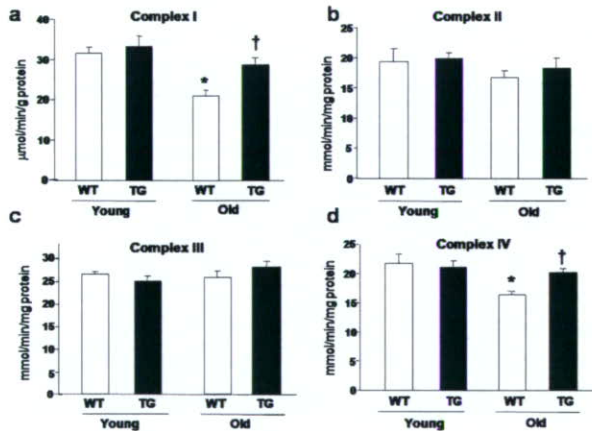


図3. 脳ミトコンドリア複合体活性

4. 水迷路による短期空間記憶力テストにおいては、若齢群では、WT および TG マウスの両群に差を認めなかった。一方、老齢群では、WT では、短期休憩後の 5 回目の試験において、プラットフォームの位置を正しく認識することができず、エラー回数の増加を認めたが、TG マウス群ではエラー数が有意に抑制された。(各群 n=5~7) (図 4)

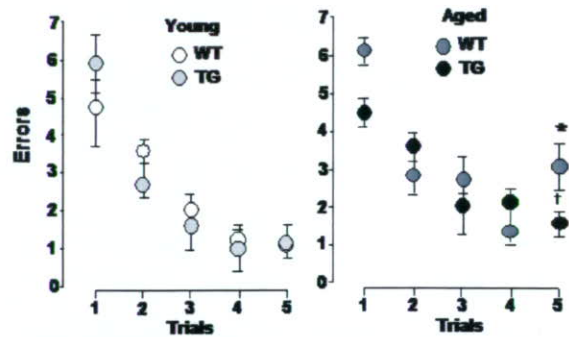


図4. 若齢および老齢マウスにおける水迷路でのエラー数

5. TG マウスにおいては、海馬 CA-1 領域における長期増強作用は、WT に比し、大であった。(図 5)

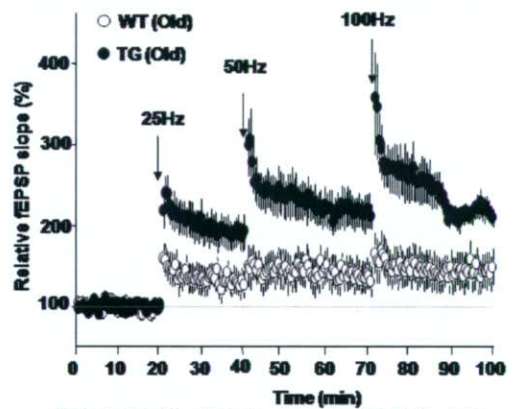


図5 海馬CA-1領域における長期増強作用

#### D. 考察

ミトコンドリア転写因子 A の過剰発現によってミトコンドリア内での活性酸素産生が抑制されることが明らかとなった。さらに、TFAM の過剰発現は vivo においても脳内の活性酸素産生を抑制し、最終的には老化に伴う脳機能の低下を抑制した。TFAM が活性酸素抑制に作用する細胞内シグナリングの解明は今後の課題である。

#### E. 結論

TFAM 過剰発現によるミトコンドリア内での活性酸素産生の抑制によって、老化に伴う機能低下抑制が可能である。ミトコンドリア内活性酸素の制御は種々の老化に伴う機能低下の新たなターゲットになりうる可能性が示唆される。

#### 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. Yoshinori Hayashi, Masayoshi Yoshida, Mayumi Yamato, Tomomi Ide, Zhou Wu, Tomotake Kanki, Dongchon Kang, Kenji Sunagawa, Hiroshi Nakanishi & Hiroyuki Tsutsui. Mitochondrial transcription factor A prevents age-dependent memory impairment. 投稿中

### G-2 学会発表

1. Tomomi Ide. Mitochondria, oxidative stress and heart failure-Regulation of mitochondrial DNA as a strategy for cardiac remodeling-日本循環器学会 (福岡国際会議場 2008.3.28-30)  
Japan-Korea Cardiovascular symposium
2. Masayoshi Yoshida, Tomomi Ide, et al. Overexpression of mitochondrial transcription factor A protects failing myocardium from oxidative stress. 日本循環器学会 (福岡国際会議場 2008.3.28-30)
3. Inoue Takahiro, Tomomi Ide et al. Overexpression of Twinkle, a Mitochondria DNA Helicase, Ameliorates Cardiac Remodeling and Failure in Mice. 日本循環器学会(福岡国際会議場 2008.3.28-30)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1.特許取得  
特になし。
- 2.実用新案登録  
特になし。
- 3.その他  
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

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と考えられ、それを示唆する成績を得た。脳内活性酸素産生源及び神経細胞傷害機序の一部を明らかにした。どのクラスの降圧薬が良いかについて検討し一部の降圧薬に事実脳内活性酸素産生抑制作用があることを見出した。生体計測電子スピン共鳴法を応用し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。そのためにはシステム医学的思考が重要である。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した。対照として、正常血圧ラット（WKY）を用いた。具体的には、Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) 法、生体計測電子スピン共鳴（ESR）法を用いた。

- 2) 降圧薬治療による脳内活性酸素産生抑制効果：長時間作用型カルシウム拮抗薬、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アトルバ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。しかし、NO産生増加のみならず活性酸素産生抑制を示すことも見出した。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の成果を更に進展させ、生体計測ESR法を用いた脳内活性酸素産生測定系を確立し、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。さらに、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。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。

また、脳幹部で制御されている迷走神経刺激が虚血心筋モデルで心臓の活性酸素産生を抑制すること、リモデリングを抑制することを示した点は今後、神経と活性酸素、臓器機能を考える上で重要となろう。

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展開を示している。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. 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. Clin Exp Hypertens. 2008 30(3):267-76.

2. 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. 2008 30(1):3-11.
3. Tsutsumi T, Ide T, Yamato M, Kudou W, Andou M, Hirooka Y, Utsumi H, Tsutsui H, Sunagawa K. Modulation of the myocardial redox state by vagal nerve stimulation after experimental myocardial infarction. Cardiovasc Res. 2008 77(4):713-21.
4. Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, Sagara Y, Kishi T, Engelhardt JF, Sunagawa K. Inhibition of Rac1-derived reactive oxygen species in nucleus tractus solitarius decreases blood pressure and heart rate in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 2007 50(1):62-8.
5. Sagara Y, Hirooka Y, Nozoe M, Ito K, Kimura Y, Sunagawa K. Pressor response induced by central angiotensin II is mediated by activation of Rho/Rho-kinase pathway via AT1 receptors. J Hypertens. 2007 25(2):399-406.
6. Kimura Y, Hirooka Y, Sagara Y, Sunagawa K. Long-acting calcium channel blocker, azelnidipine, increases endothelial nitric oxide synthase in the brain and inhibits sympathetic nerve activity. Clin Exp Hypertens. 2007 29(1):13-21.

**G-2 学会発表**  
なし

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

- 1.特許取得  
特になし。
- 2.実用新案登録  
特になし。
- 3.その他  
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

磁気共鳴法を用いた自然発症高血圧モデルラットにおけるレドックス動態の解析

分担研究者 内海 英雄 九州大学大学院薬学研究院 教授

**研究要旨：**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示唆されており、その関連性を明らかにするには生体レドックス動態の無侵襲解析手法の確立が不可欠である。昨年度は、新規磁気共鳴画像化装置であるオーバーハウザーMRI(OMRI)を用いて、生体レドックス動態の分子イメージング手法を確立した。

そこで今年度は、本手法を自然発症高血圧モデルラット(SHR)に応用し、全身での生体レドックス動態の視覚化に成功した。主に、頭部でのレドックス変動が認められ、*in vivo* ESR で得られた結果と一致していた。よって、OMRIを用いた生体レドックス動態の視覚化はSHRでのレドックス動態解析に有効であると考えられる。

### 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。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オーバーハウザーMRI(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。

昨年度は、新規レドックス動態画像化装置であるOMRIを用いて、生体レドックス動態の分子イメージング手法を確立した。そこで、本年度は自然発症高血圧モデルラット(SHR)など種々の疾患モデルにおける生体内レドックス動態の画像解析を行った。

### B. 研究方法

4週齢の雄性SHRに麻酔下MC-PROXYLを尾静脈内投与(1.25 mmol/kg)後、ラット全

身におけるMC-PROXYLのOMRI撮像を経時的に行った。対照群はWKY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

膜透過性プローブ剤MC-PROXYLをSHRに尾静脈内投与し、ラット頭部において*in vivo* ESR計測したところ、MC-PROXYLのESRシグナル減衰速度はWKY群に比べて有意に亢進した。膜透過性抗酸化剤Dimethylthiourea (DMTU)、Dimethylsulfoxide (DMSO)をMC-PROXYLと同時投与し、*in vivo* ESR計測した結果、それぞれ、シグナル減衰速度の亢進を63%、38%抑制した。次に、高血圧状態がSHR頭部のレドックス状態に及ぼす影響を調べるために、アンジオテンシン変換酵素阻害剤Captopril(10 mg/kg, i.v.)をSHRに前投与したところ、シグナル減衰速度の亢進が79%抑制され有意差が認められた。

ラット下腹部においても、MC-PROXYLのシグナル減衰速度はWKYに比べて有意に亢進し、その亢進はDMSOにより有意に抑制された。

そこで、OMRI/スピンプローブ法を本モデルに応用し、生体レドックス動態の視覚化を行った。MC-PROXYLを尾静脈内投与し、全身のOMRI撮像を行ったところ、頭部から腹部にかけて、フリーラジカルの体内挙動が明確に示された。経時的にOMRI画像を取得して画像輝度の減衰速度を算出した結果、主に頭部で減衰

速度が亢進し、その亢進は抗酸化剤 DMSO 処置で抑制された。

他にも、インドメタシン惹起胃粘膜損傷モデルやデキストラン硫酸ナトリウム惹起大腸炎モデルなど種々の疾患モデルにおいて、*in vivo* ESR/スピンプローブ法または OMRI/スピンプローブ法を用いて生体レドックス動態を解析し、細胞膜内・外でのレドックス動態の相違やこれらのレドックス動態と病態の発症・進展との関連性が示された。

#### D. 考察

撮像時間短縮のために Half scan 撮像を行い、全身撮像による FOV サイズの制約及び局所 ESR 照射の場合よりも画像 S/N 比の低下を考慮し、若齢のラットを使用した。これらの工夫により、従来極めて困難であった全身ラットの OMRI 撮像に成功したと考えられる。

高血圧では特に脳でのレドックス変動が重要視されていることから、さらに詳細な解析を進めていく必要があると思われる。

#### E. 結論

OMRI を用いて、SHR 全身での生体レドックス動態の視覚化に成功し、主に頭部でのレドックス変動が認められた。よって、OMRI を用いた生体レドックス動態の視覚化は SHR など種々の疾患モデル動物でのレドックス動態解析に有効であると考えられる。

#### 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. Matsumoto S., Yamada K, Hirata H, Yasukawa K, Hyodo F, Ichikawa K, Utsumi H. Advantageous application of a surface coil to EPR irradiation in Overhauser-enhanced MRI, *Magn. Reson. Med.*; **57**(4): 806-811; 2007
2. Ichikawa K., Sakabe E., Kuninobu K., Yamori T., Tsuruo T., Yao T., Tsuneyoshi M., Utsumi H., Application of *in vivo* ESR/spin-probe technique to monitor

tumor *in vivo* in mouse footpad., *Antioxidants & Redox Signaling*; **9**(10): 1699-1717; 2007

3. Yamato, M.; Matsumoto, S.; Ura, K.; Yamada, K.I.; Naganuma, T.; Inoguchi, T.; Watanabe, T.; Utsumi, H., Are free radical reactions increased in the diabetic eye?, *Antioxidants & Redox Signaling*; **9** (3): 367-373; 2007.

##### G-2 学会発表

2. Kawaguchi K. *et al.*, 4<sup>th</sup> JSPS Core-to-Core Seminar: International *In Vivo* Redox Symposium, Nov 4-5, 2007, Shizuoka

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得  
特になし。

2.実用新案登録  
特になし。

3.その他  
特になし。