

血圧を調節する主要経路: 動脈圧受容器反射の脳内経路

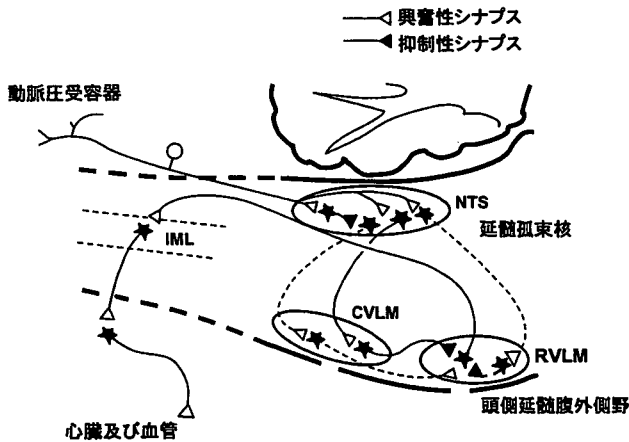


図1 動脈圧受容器反射を示す模式図

その当初から NO が交感神経系を介した循環調節機構に深く関わることを示してきた。初めは NTS や RVLM への NO 合成酵素 (NOS) 阻害薬を用いた微量注入実験が主体であった。しかし、麻酔の影響や急性実験であったため、各施設からの成績は必ずしも一定していなかった。そこで、筆者らは脳内局所への遺伝子導入法を循環調節研究に用いることにより、NTS や RVLM 局所で遺伝子発現を増加させ同部位の NO 産生を増加させると交感神経系を介した全身血圧の変化を観察する手法を確立した。無麻酔覚醒下での観察を可能とするため早くからテレメトリー法を用い、この手法に組み合わせた結果、強力なツールとなった<sup>3)</sup>。1999 年に開催された Experimental Biology でその成果を発表してから、循環調節研究に携わる多くの研究者達の注目を浴び、同手法を用いた新たな研究分野を開発した。

具体的には以下のように研究を進めてきた。内皮型 NOS (eNOS) 遺伝子あるいはコントロールとして  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクター (AdeNOS あるいは Ad $\beta$ gal) を NTS 局所に微量注入し、そこで遺伝子を発現させた。その確認は免疫組織化学法及び Western blot 法を用いて蛋白発現を定量的かつ局所的に確認した。発現した eNOS が活性を有していることは in vivo microdialysis 法を用いて nitrite/nitrate (NO<sub>x</sub>) を測定することによって評価した。腹部大動脈にテレメトリー送信器を植え込み無麻酔覚醒下で血圧・心電図をモニターした。交感神経活動の指標としては尿中ノルエピネフリン排泄量を測定した。その結果、NTS 局所への eNOS 遺伝子導入に

成功し、その発現のピークは遺伝子導入後 7 日目であった。NO<sub>x</sub> 産生量も eNOS 遺伝子導入群で増加しており、NTS における主要な神経伝達物質である L-glutamate の受容体のひとつである N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を刺激する NMDA や NO の前駆物質である L-arginine の投与によっても増加した。すなわち、発現した eNOS が酵素活性を有していることを示した。血圧・心拍数は遺伝子発現の経過に対応して降圧・心拍数減少が観察された。また、尿中ノルエピネフリン排泄量も eNOS 遺伝子導入群で低下した。以上の成績は、NTS における eNOS 過剰発現による NO 産生増加は交感神経活動抑制作用を介して降圧・心拍数低下を生じることを示すものである<sup>4)</sup>。NTS の神経活動は迷走神経系へも影響するので一部その影響があることは否定できないことは注意すべき点であろう。

次に、同手法を RVLM へ応用した<sup>5)</sup>。先に述べたように RVLM は交感神経活動を規定する重要な神経核である。C1 neuron 群の位置に一致し、約半数の C1 neuron が交感神経節前神経細胞の存在する脊髄中間外側部 (IML: intermediolateral cell column of spinal cord) へ投射している。RVLM は比較的狭い範囲に存在し、同部位を破壊すると血圧は 50 mmHg 以上低下し脊髄レベルの血圧になる。一方、ごく微量の L-glutamate を注入すると急峻な血圧上昇反応を生じる。筆者らは同部位への eNOS 遺伝子導入に成功した。その結果、やはり、降圧・心拍数低下反応が生じることを観察した。さらに、その機序として NO が GABA 放出を増加させることが in vivo microdialysis 法や GABA 受容体拮抗薬の効果から推察できた。

高血圧における神経性調節機序の解明を行うため同手法を高血圧モデルラットへ応用した。脳卒中易発症性自然発症高血圧ラット (SHRSP: stroke-prone spontaneously hypertensive rats) を用いて実験を行った<sup>6)</sup>。その結果、RVLM における eNOS 過剰発現は SHRSP で対照である正常血圧ラット (WKY: Wistar-Kyoto rats) より降圧の程度が大きく交感神経抑制作用も強かった。また、GABA 受容体拮抗薬の効果の改善度から SHRSP では RVLM への抑制性入力低下しており (disinhibition)、その機序に NO の作用の減弱が関与していることが示唆された。さらに、SHRSP において減弱している動脈圧受容器反射を介する心拍数の調節反応も RVLM への eNOS 過剰発現で改善することを示した<sup>7)</sup>。また、自然発症高血圧ラット (SHR: sponta-

neously hypertensive rats) を用いて NTS への eNOS 過剰発現を検討したが、やはり SHR では WKY に比べて降圧の程度が大きいことがわかった<sup>8)</sup>。従って、これらの脳幹部循環調節の鍵となる部位における NO の重要性を示せたと考える。

さて、現在用いられている降圧薬などの治療薬が脳内 NO 系を動かす可能性があるのだろうか？筆者らは高コレステロール血症治療薬である atorvastatin を 30 日間経口投与して脳内 NOS 発現レベルを検討した。興味深いことに脂溶性が強い atorvastatin は SHRS の脳、心臓、大動脈の eNOS 発現レベルを増加させた<sup>9)</sup>。さらに軽度ではあるが、降圧及び交感神経抑制作用も認めた。長時間作用型カルシウム拮抗薬である azelnidipine も同様の効果を認めた<sup>10)</sup>。これらの成績は、通常日常診療で用いている薬剤の付随効果として脳内 NO 産生増加作用がある可能性を示唆し興味深い。今後の更なる検討が待たれる。

### 3. 脳幹部における Rho/Rho-kinase 系の役割

低分子量 G 蛋白である Rho の循環器疾患における役割が俄然注目されている<sup>11)</sup>。Rho ファミリーには RhoA, Rac1, cdc42 が含まれる。ここでは特に RhoA の下流にある重要な治療ターゲットとして捉えられている Rho-kinase との関連で RhoA/Rho-kinase 系と考えて頂きたい。この経路は主として血管における過剰収縮における役割が研究されているが、脳内にも豊富に存在する。しかし、その機能的な役割について解明されていない。筆者らはこの系が交感神経系を介した血圧調節機序に関わっている可能性を考え独自の研究を進めてきた。Rho-kinase 阻害薬として Y-27632 や fasudil あるいはその代謝産物である hydroxyfasudil がある。まず、急性実験として Y-27632 や hydroxyfasudil を WKY の NTS 内へ微量注入すると降圧、心拍数減少、腎交感神経活動低下が認められた<sup>12)13)</sup>。すなわち、NTS の内因性 Rho-kinase は血圧を維持する方向へ作用していることになる。また、この反応は SHR において WKY より大きかった。すなわち、SHR の NTS では内因性 Rho-kinase 活性が亢進していることが示唆される。さらに、単に薬理実験結果だけではなく、dominant-negative Rho-kinase をアデノウイルスに組み込んで NTS の Rho-kinase 活性を抑制する実験を行い、無麻酔覚醒下で同様の現象を確認した<sup>12)</sup>。

また、別の高血圧モデルとして慢性的 NO 合成阻害ラットを用いて実験を行ったが、同様に脳幹部 Rho-

kinase 系の活性化が認められた<sup>14)</sup>。この実験では Y-27632 を大槽内へ持続注入すると NO 合成阻害による血圧上昇反応が抑制される点も興味深い結果であった。

また、脳幹部 Rho-kinase を抑制すると動脈圧受容器反射による心拍数調節を増強することも観察した<sup>15)</sup>。これは、SHR のみでなく WKY でも生じる。アトロピンやメトプロロールを用いた結果から心臓を支配する交感神経活動を抑制する作用が大きいことが考えられた。NTS における Rho-kinase の抑制が交感神経活動を抑制する機序は不明である。Rho/Rho-kinase 系は神経細胞では樹状突起の spine という形態の変化をもたらす。シナプス伝達を変化させることが報告されている。そこで、筆者らは NTS における主要な興奮性神経伝達物質である L-glutamate に対する感受性が Rho-kinase の抑制によって生じるか否かを調べた。その結果、Rho-kinase を抑制すると L-glutamate に対する感受性が增强することがわかった<sup>16)</sup>。この成績は、動脈圧受容器反射増強効果を説明するひとつの機序と考えられる。Rho/Rho-kinase 系の活性化が生じる機序は不明である。血管平滑筋細胞ではその上流にアンジオテンシン II, エンドセリン-1, セロトニンなどの生理活性物質による刺激が考えられている。筆者らは脳内アンジオテンシン II による昇圧反応に AT<sub>1</sub> 受容体を介した Rho/Rho-kinase 系の活性化が関与していることを報告した<sup>17)</sup>。

さらに、昨今問題となっている閉経後の女性における高血圧発症や心血管イベントの増加に脳内 Rho/Rho-kinase 系の活性化が関与していないかについて、SHR の卵巣摘出モデルを用いて検討を行った<sup>18)</sup>。その結果、卵巣摘出による内因性エストロゲンの欠乏が脳幹部レニン・アンジオテンシン系及び Rho/Rho-kinase 系の活性化を生じる機序が雌 SHR の血圧上昇に一部関与している可能性を示した。

### おわりに

以上、筆者らの一連の研究成果を中心に中枢性循環調節における NO 及び Rho-kinase の役割について概説した。NO は活性酸素とのバランスで規定されている。RVLM における活性酸素産生増加と高血圧についても研究を行っており、その重要性については、筆者らが世界で初めて報告した<sup>19)</sup>。誘導型 NOS (iNOS) も NO を大量に産生すると酸化ストレス増大に転ずる<sup>20)</sup>。これらの研究成果は、加齢による脳内酸化ストレス増

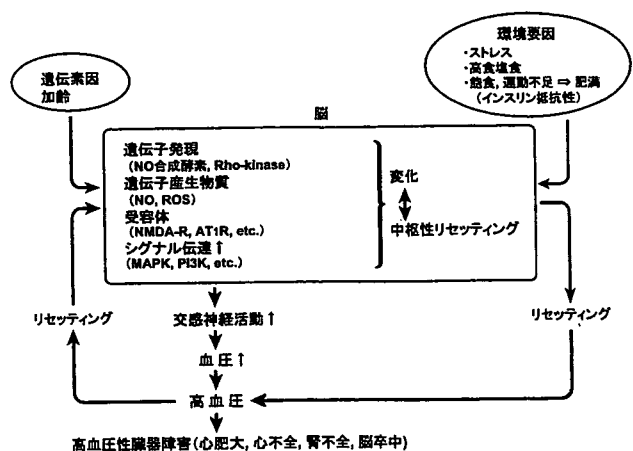


図2 交感神経系を介した高血圧発症・維持に如何に「脳」が関わるかを示す模式図

大や血圧上昇機序に関わる可能性を有しており、今後の研究発展が期待される分野である。また、昨今注目されているメタボリックシンドロームにおいても交感神経系の活性化が高血圧・心血管病の発症に重要な役割を果たしていることが知られている。従って、中枢性循環調節機序の解明は非常に魅力的な研究分野であり、新たな手法の導入によりその仕組みを解明し、鍵となる標的分子をターゲットとした治療法の開発が望まれる(図2)。実際、既に、現在使用されている薬剤にもそのような作用機序を有しているものがあるかも知れない。これらの視点からの研究も重要である。

謝辞：本稿で述べた一連の研究を遂行するにあたり、九州大学名誉教授、竹下 彰先生、久留米大学心臓血管内科教授、今泉 勉先生、九州大学循環器内科教授砂川 賢二先生に深謝致します。また、真摯に研究を遂行した大学院生、研究生に深謝致します。最後にここに掲げた数多くの一連の研究は日本学術振興会科学研究費金(基盤研究)、厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)などによって成果が報告できたことに深謝致します。

## § 文 献

- 1) Guyenet PG: The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7: 335—346, 2006
- 2) Pilowsky PM, Goodchild AK: Baroreceptor reflex pathways and neurotransmitters: 10 years on. *J Hypertens* 20: 1675—1688, 2002
- 3) Hirooka Y: Localized gene transfer and its application for the study of central cardiovascular control. *Auton Neurosci* 126-127: 120—129, 2006

- 4) Sakai K, Hirooka Y, Matsuo I, et al: Overexpression of eNOS in NTS causes hypotension and bradycardia in vivo. *Hypertension* 36: 1023—1028, 2000
- 5) Kishi T, Hirooka Y, Sakai K, et al: Overexpression of eNOS in the RVLM causes hypotension and bradycardia via GABA release. *Hypertension* 38: 896—901, 2001
- 6) Kishi T, Hirooka Y, Ito K, et al: Cardiovascular effects of overexpression of endothelial nitric oxide synthase in the rostral ventrolateral medulla in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 39: 264—268, 2002
- 7) Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, et al: Overexpression of eNOS in RVLM improves impaired baroreflex control of heart rate in SHRSP. *Hypertension* 41: 255—260, 2003
- 8) Hirooka Y, Sakai K, Kishi T, et al: Enhanced depressor response to endothelial nitric oxide synthase gene transfer into the nucleus tractus solitarius of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 26: 325—331, 2003
- 9) Kishi T, Hirooka Y, Mukai Y, et al: Atorvastatin causes depressor and sympatho-inhibitory effects with upregulation of nitric oxide synthases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 21: 379—386, 2003
- 10) Kimura Y, Hirooka Y, Sagara Y, et al: Long-acting calcium channel blocker, azelnidipine, increases endothelial nitric oxide synthase in the brain and inhibits sympathetic nerve activity. *Clin Exp Hypertens* 29: 13—21, 2007
- 11) Hirooka Y, Shimokawa H: Therapeutic potential of Rho-kinase inhibitors in cardiovascular diseases. *Am J Cardiovasc Drugs* 5: 31—39, 2005
- 12) Ito K, Hirooka Y, Sakai K, et al: Rho/Rho-kinase pathway in brain stem contributes to blood pressure regulation via sympathetic nervous system: possible involvement in neural mechanisms of hypertension. *Circ Res* 92: 1337—1343, 2003
- 13) Ito K, Hirooka Y, Kimura Y, et al: Effects of hydroxyfasudil administered to the nucleus tractus solitarius on blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 27: 269—277, 2005
- 14) Ito K, Hirooka Y, Kishi T, et al: Rho/Rho-kinase pathway in the brainstem contributes to hypertension caused by chronic nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension* 43: 156—162, 2004
- 15) Ito K, Hirooka Y, Sagara Y, et al: Inhibition of Rho-kinase in the brainstem augments baroreflex control of heart rate in rats. *Hypertension* 44: 478—

- 483, 2004
- 16) Ito K, Hirooka Y, Hori N, et al: Inhibition of Rho-kinase in the nucleus tractus solitarius enhances glutamate sensitivity in rats. *Hypertension* 46: 360—365, 2005
  - 17) Sagara Y, Hirooka Y, Nozoe M, et al: Pressor response induced by central angiotensin II is mediated by activation of Rho/Rho-kinase pathway via AT<sub>1</sub> receptors. *J Hypertens* 25: 399—406, 2007
  - 18) Ito K, Hirooka Y, Kimura Y, et al: Ovariectomy augments hypertension through Rho-kinase activation in the brain stem in female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 48: 651—657, 2006
  - 19) Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, et al: Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 109: 2357—2362
  - 20) Kimura Y, Hirooka Y, Sagara Y, et al: Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress. *Circ Res* 96: 252—260, 2005
-

総説

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

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

古閑靖章\*, 廣岡良隆\*

### はじめに

交感神経系は古典的には、体位変換、運動、体液量の変化、心理的ストレスに順応するため血圧を短期間制御するものとして考えられてきた<sup>1)</sup>。しかしながら、近年の研究結果から、中枢神経系は高血圧を含む長期的な血圧調節にも寄与しており、本態性高血圧症の発症にも関与していることが分かってきた<sup>2)</sup>。ヒトの高血圧症の発症にも交感神経活動の亢進が主要な役割を果たしていることも多くの研究結果から示唆されている<sup>1)</sup>。例えば、高血圧症患者では正常血圧者と比べ、血漿ノルエピネフリン (NE) の増加、血管床における末梢交感神経終末からの NE 分泌亢進、筋交感神経活動亢進、心拍数増加等を認めることが知られている<sup>3)</sup>。また、高血圧症のリスクファクター (ストレス、喫煙、肥満、II 型糖尿病) と交感神経活動の亢進の関連も報告されている<sup>1,4)</sup>。一方、過剰な食塩摂取に伴う交感神経活動の亢進、高血圧症の増悪についても数多くの報告がある。しかし、そのことを理解することは意外に困難であり、機序から説明しようとすると、不明な点が多いことに気付く。したがって本総説では、食塩負荷による血圧上昇の中枢性機序について現在、どのように考えられているかについて紹介する。

### 視床下部前部神経における交感神経脱抑制を介した血圧上昇機序

自然発症高血圧ラット (spontaneously hypertensive rat; SHR) は食塩負荷により、さらなる血圧上昇、交感神経活動の亢進を示すことから、食塩感受

性高血圧症のモデルとして知られている<sup>5)</sup>。Wyssらは食塩負荷による血圧上昇の中枢性機序として、視床下部前部に注目している。SHR ではその正常血圧モデルであるウイスターキョウトラット (Wistar-Kyoto rat; WKY) と比べ、視床下部前部における NE 分泌が増加しているが、食塩負荷を行うと SHR では NE 分泌が減少し、WKY では変化を来たさないことを報告している<sup>6)</sup>。視床下部前部における NE 分泌は交感神経活動の抑制に働くことから、SHR の食塩負荷による血圧上昇には、視床下部前部における NE 分泌の減少が関与していることを示唆している<sup>1)</sup>。食塩負荷を行った SHR で WKY と比べ、視床下部前部における NE 分泌が減少する要因として、血漿ナトリウム濃度 ( $[Na^+]$ ) の関与が考えられている<sup>7)</sup>。血漿  $[Na^+]$  を 24 時間、経時的に観察した実験では、1% 食塩含有飼料を与えた場合、24 時間を通じて SHR では WKY と比べて血漿  $[Na^+]$  は高値を示し、これらに 8% 食塩含有飼料を与えた場合では、SHR, WKY 共に血漿  $[Na^+]$  は上昇するが、やはり 24 時間を通じて SHR では WKY と比べて血漿  $[Na^+]$  は高値を示し、さらに食塩負荷を行った SHR では血漿  $[Na^+]$  の日内変動リズムも失われることが報告されている。血漿  $[Na^+]$  の上昇は、organum vasculosum lamina terminalis (OVLT) に存在するナトリウム受容体に感知され、視床下部前部におけるナトリウム分泌を抑制し、交感神経活動の脱抑制反応を示す。その一方、視床下部前部には圧受容体からの入力も独立して存在し、食塩負荷による循環血液量の増加は視床下部前部における NE 分泌を増加させ交感神経活動を抑制する方向に働く。しかし、食塩負荷を行った SHR では、血漿  $[Na^+]$  の上昇による OVLT からの視床下部前部における NE 分泌抑制性の入

\*九州大学医学研究院循環器内科

力が、圧受容体を介したNE分泌促進性の入力より優位になることで、交感神経活動の亢進、血圧のさらなる上昇を来たと考えている。また、視床下部前部におけるNEの調節因子として、他にatrial natriuretic peptide (ANP)の関与が考えられている。SHRに食塩負荷を行うと循環血漿中および視床下部前部においてANPの増加を認める。SHRの視床下部前部にANPを投与すると、同部位におけるNE分泌の低下、血圧の上昇を認める<sup>8)</sup>。視床下部前部においてSHRではWKYと比べてANPは増加しており、抗ANP抗体の視床下部前部への投与ではSHRで用量依存的な血圧の低下を認めるが、WKYでは認めない。これらのことより視床下部前部におけるANPは食塩負荷による、同部位におけるNE分泌、血圧調節に関与していることが考えられている。また、ANPは孤束核(nucleus tractus solitarius; NTS)において圧受容器反射にも関与しており、SHRのNTSへANPを微量投与すると心拍数の制御に関わる圧受容器反射感度の低下を認めるが、WKYではそれを認めない。このことから、NTSにおけるANPも食塩感受性高血圧に関与していることが示唆されている<sup>9)</sup>。

以上の成績より食塩感受性高血圧発症の機序としてWyssらは図1の様な仮説を提唱していること

が分かる。食塩抵抗性のモデルでは、食塩負荷を行うと血漿ナトリウムは増加し、血漿[Na<sup>+</sup>]の増加はOVLTに存在する浸透圧受容器、ナトリウム受容器に感知され、視床下部前部におけるNEの分泌を抑制し、交感神経活動の脱抑制反応、すなわち交感神経活動の亢進を来たす。他方、この血漿[Na<sup>+</sup>]の増加は細胞内から細胞外液へのシフトを来たし、血管内ボリュームを増加させる。血管内ボリュームの増加は圧受容器に感知され、視床下部前部を含む交感神経抑制系ニューロンへの入力を増強させる。これらの交感神経亢進・抑制のバランスによって、食塩抵抗性モデルでは食塩負荷を行っても正常血圧を維持している。しかしながら、食塩感受性モデルにおいては、血漿[Na<sup>+</sup>]は食塩抵抗性モデルと比べて高く、また日内変動リズムを失っているため夜間も通じて血漿[Na<sup>+</sup>]は高値を示す。このことは交感神経活動の脱抑制反応、すなわち交感神経活動の亢進の増強を来たすことを示唆し、また、ANPの増加が心拍数の制御に関わる圧受容器反射感度の低下を来たし交感神経抑制系ニューロンへの入力が増強し、これらによって交感神経活動の亢進を来たすという考え方である。

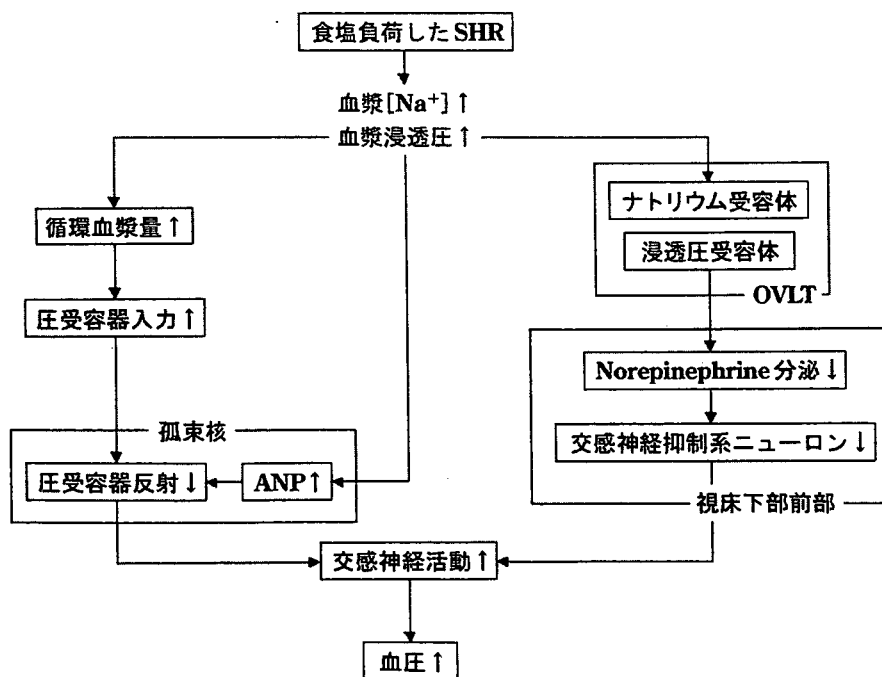


図1 Wyss JM らの仮説 (Carlson SH, et al: Am J Hypertens 2001; 14 引用, 改変)  
SHR: 自然発症高血圧ラット, ANP: 心房利尿ペプチド, OVLT: 終板血管器官

### 中枢におけるウアバイン様物質の増加を介した血圧上昇機序

一方、血漿 $[Na^+]$ の上昇とともに、脳脊髄液 $[Na^+]$ の上昇が食塩感受性高血圧症発症に必須であると考えているグループもある。Leenenらは、SHRや同じく食塩感受性高血圧のモデルとして知られるダール食塩感受性ラット(Dahl salt-sensitive rats; DSラット)に食塩負荷を行うと、循環血漿中で増加した $[Na^+]$ が、脈絡叢に存在する $Na^+/K^+$ -ATPaseの活性化によってepithelial sodium channels (ENaC), mineralocorticoid receptors (MR)を介して、脳脊髄液中の $[Na^+]$ が上昇すると報告している<sup>10)</sup>。これらの反応は、spironolactoneによるMRの阻害、benzamilによるENaCの阻害により、脳脊髄液中ナトリウムの増加は抑制されることを報告している<sup>11)</sup>。脳脊髄液中の $[Na^+]$ の上昇は、brain Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub> (FMRFamide)の増加、それによるbrain FMRFamide-gated  $Na^+$  channelsの活性化を来たし、視床下部、下垂体におけるウアバイン様物質(ouabain-like compounds; OLC)の産生を増加させる<sup>12,13)</sup>。OLCは一方で $Na^+/K^+$ -ATPaseに結合し、その作用を低下させ脳脊髄液中ナトリウムのさらなる上昇を抑制するが、他方で脳内レニンアンジオテンシン系(renin-angiotensin system; RAS)を活性化させ交感神経活動の亢進、血圧上昇を増強させると考えられている<sup>14)</sup>。このOLCによるRAS系の活性化は、OLCに高い親和性を持つFab fragmentの脳室内投与により阻害される<sup>15)</sup>。脳脊髄液中 $[Na^+]$ の上昇が食塩感受性高血圧症の鍵になっていることは、通常Wistar ratsでは、経口食塩負荷による血圧上昇は認めないが、髄液中に高ナトリウム人工脳脊髄液を持続投与すると、交感神経活動の亢進、血圧の上昇を認める成績からも支持される<sup>14,15)</sup>。また、Kuboらのグループは、高 $[Na^+]$ 人工脳脊髄液をSHR、WKYに脳室内投与すると、ともに昇圧を認めるもののSHRの群で昇圧の程度が大きく、低 $[Na^+]$ 人工脳脊髄液をSHR、WKYに脳室内投与するとSHRでは昇圧を認めるものの、WKYでは昇圧を認めないことを報告しており、SHRではWKYと比べ、脳脊髄液中 $[Na^+]$ に対する昇圧反応の感度が高く、閾値が低いと考察している<sup>16)</sup>。Kuboらは脳脊髄液 $[Na^+]$ の上昇に

伴うRASの活性化について、段階的に $[Na^+]$ を変えた人工脳脊髄液の脳室内投与を行った実験で、SHRやDSラットでそれぞれの抵抗性モデルであるWKYやDRラットより、視床下部前部におけるAngiotensin II感受性ニューロンの発火頻度が前者で高く、発火閾値は低いと報告しており、その差異が食塩感受性高血圧症の発症機序に関与していることを示唆している<sup>16)</sup>。また、経口食塩負荷に伴う血圧上昇効果には圧受容器反射の関与も示唆されており、WKYでは経口食塩負荷により腎交感神経制御に関わる圧受容器反射の感度が鋭敏になる一方、SHRやDSラットでは腎交感神経制御に関わる圧受容器反射の感度は不変または低下しており、これが血圧上昇の増強に関与しているとしている<sup>17)</sup>。しかし、WKYにおいても高 $[Na^+]$ の人工脳脊髄液の持続投与を行うと、経口で食塩負荷を行ったSHRと同様の圧受容器反射の感度の低下を来たし、これはFab fragmentまたはAngiotensin II type1受容体拮抗薬(ARB)であるlosartanの髄液中同時投与で抑制され、食塩負荷による圧受容器反射の感度の低下にはOLCやRAS系が関与していることが示唆されている。

以上の成績は、SHRやDSラットに食塩負荷を行うと血漿 $[Na^+]$ の増加を来たす、これは脈絡叢に存在する $Na^+/K^+$ ATPaseを活性化し、ENaC、MRを介して脳脊髄液 $[Na^+]$ を増加させる。増加した脳脊髄液 $[Na^+]$ はBrain FMRFamideを増加させ、FaNaChを活性化させる。これは下垂体および視床下部におけるOLCの分泌を増加させ、 $Na^+/K^+$ ATPaseを抑制し、更なる脳脊髄液 $[Na^+]$ の上昇を抑制すると同時に、脳内RASを活性化させ、交感神経活動の亢進、血圧の上昇を来たすと考えている。また、増加したOLCは直接または、RASを介して腎交感神経制御に関わる圧受容器反射の感度を低下させ交感神経活動の亢進を増強し食塩感受性高血圧症を来たすという機序を示唆する(図2)。つまり、食塩感受性高血圧では、脳脊髄液 $[Na^+]$ の増加を介した中枢におけるOLCの増加が脳内RASを活性化させることが、食塩感受性高血圧症発症、食塩負荷による高血圧症の増悪の鍵であると考えている。



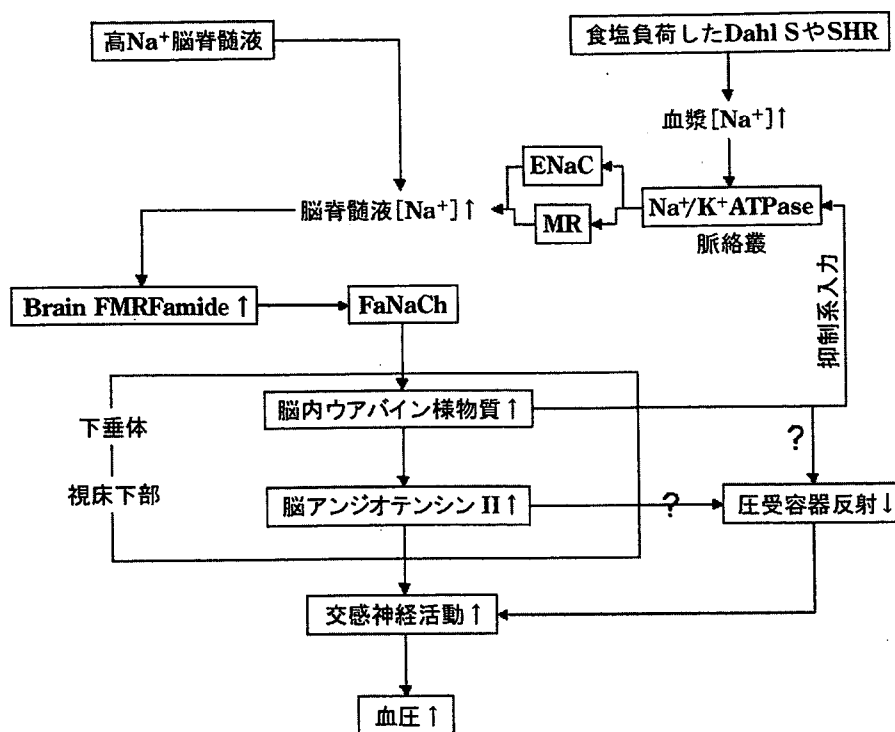


図2 Leenen FH らの仮説 (Huang BS, et al: Hypertension 2002; 39 より引用, 改変)

Dahl S: ダール食塩感受性ラット, SHR: 自然発症高血圧ラット, ENaC: epithelial sodium channels, MR: mineralocorticoid receptors, FMRamide: brain Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>

### 室傍核神経の興奮, vasopressin 分泌の増加を介した血圧上昇機序

一方, 室傍核 (paraventricular nucleus; PVN) からの交感神経興奮入力の増加, vasopressin 分泌の増加を介した血圧上昇機序を提唱するグループもある。Brooks らは, ナトリウム摂取が増加すると脳脊髄液 [Na<sup>+</sup>] の上昇を来たし, その情報は OVLT, subfornical organ (SFO), median preoptic nucleus (MnPO) の ENaC-like channel で感知され, また髄液浸透圧が上昇すると, OVLT, SFO, MnPO などに存在する TRPV4 と呼ばれる transient receptor potential family イオンチャンネルや tonicity responsive enhancer-binding protein に感知され, PVN に伝達されると考えている<sup>18)</sup>。PVN からの情報は中間外側細胞柱, NTS, 外側傍腕核, 交感神経活動を規定する頭側延髄腹外側野 (Rostral ventrolateral medulla; RVLM) に伝わり, 交感神経の緊張を来たすとしている<sup>19)</sup>。また, 一方, 食塩感受性高血圧症モデルの一つである Deoxycorticosterone acetate-salt ラット (DOCA-salt ラット) を用いた実験で vasopressin antagonist を大槽内投与すると, sham ラットと比べ, 大きな降圧を認めることを報告し

ており, vasopressin 分泌の増加も食塩感受性高血圧の発症に関与していることを示唆している<sup>20)</sup>。食塩抵抗性のモデルでは, 血漿浸透圧の上昇, 血漿 [Na<sup>+</sup>] の増加は, 血管内ボリュームを増加させる一方, アンジオテンシン II やアルドステロンの分泌の低下を来たし, 正常血圧を維持しているとしている。しかし, 食塩感受性高血圧モデルに食塩負荷を行うと, 血管内ボリュームの増加とともに, 機序は不明であるが, アンジオテンシン II やアルドステロンの分泌が増加しており交感神経活動の亢進, 血圧上昇を来たすと考えている<sup>19)</sup>。その機序として Angiotensin II type1 受容体や興奮性アミノ酸受容体が増加することや<sup>21)</sup>, PVN における酸化ストレスの増加, NO 産生の低下, 抑制性アミノ酸である GABA を分泌するニューロンの神経活動の低下を来たすことが交感神経活動の亢進を来たしている可能性が考えられている<sup>19)</sup>。すなわち, 食塩負荷によって通常は抑制される RAS の不適切な活性化が起きることが, 交感神経活動の脱抑制, 活性化を来たし, 食塩感受性高血圧症発症の鍵になっていると考えている<sup>19)</sup>。

### 食塩感受性高血圧症の脳幹における血圧上昇機序

先に述べた様に、食塩負荷がいずれの部位で感知、伝達されるかについては諸説あり、依然として不明な点は少なくない。一方、交感神経活動を規定する脳幹における、食塩負荷高血圧症に関する検討も多くなされている。Svedらは食塩負荷を行ったDSラットでは、食塩負荷を行っていないDSラットと比べて交感神経活動を規定するRVLMへのARBであるvalsartanの微量投与により、より大きな降圧反応を認め、また、PVNへのGABA受容体アゴニストであるmuscimolの投与でも同様の反応を認めることを報告している。また、食塩負荷DSラットと食塩負荷を行っていないDSラットのRVLMへAngiotensin II, glutamateの微量投与を行うとAngiotensin IIでは食塩負荷群でより大きな昇圧反応を認めたものの、glutamateの投与では有意な昇圧反応の差を認めず、食塩負荷に伴う血圧上昇にはPVNを起源としたAngiotensin II type1受容体を介したRVLMの血管作動性神経の興奮(PVN-to-RVLM経路)が、食塩負荷に伴う交感神経活動の亢進、血圧上昇に関与しているとしている<sup>22)</sup>。一方、DiBonaらは、食塩感受性を示さないとされるスプラグ・ドローラット(Sprague Dawley rats; SDラット)を低食塩負荷、通常食塩負荷、高食塩負荷の3群に分け、それぞれの群のSDラットのRVLMへARBであるcandesartanの微量投与を行った実験を行った。その結果、3群ともに心拍数の低下は認められたが、血圧低下、腎交感神経活動の低下は低食塩負荷SDラットでのみ認められた。また、圧受容器反射については低食塩群で、RVLMへのcandesartan微量投与によって、より低いレベルへの腎交感神経活動の変移を認めた。これらのことより、RVLMにおけるRASは低食塩負荷SDラットで亢進していることを報告しており、食塩感受性モデルと食塩抵抗性モデルでは、中枢において食塩負荷で異なる反応が起きていることが考えられる<sup>23,24)</sup>。

### 今後の展開が期待されるその他の血圧上昇中枢性機序

我々はRVLMにおける活性酸素が高血圧症の発症進展に重要な役割を果たしていることを報告し

た。それに引き続き食塩感受性高血圧症発症の機序に中枢における食塩負荷に伴う高血圧症の発症に中枢活性酸素が関与しているという報告もなされた<sup>25)</sup>。すなわち、食塩負荷を行ったDSラットの視床下部において、活性酸素種、活性酸素種の産生源として知られるNAD(P)H oxidaseの活性が増加しており、superoxide dismutase様物質であるtempolやNAD(P)H oxidaseの阻害剤であるdiphenyleneiodoniumを側脳室投与すると、食塩負荷を行ったDSラットで、食塩負荷を行わないDSラットまたは食塩抵抗性であるダール食塩抵抗性ラットと比べより大きな降圧効果、交感神経活動抑制効果を示す<sup>25)</sup>。しかし、食塩負荷による中枢における活性酸素種の増加を介した交感神経活動の亢進、血圧の上昇にはRASの関与が示唆されているもののこれらの関与、相互作用については未だ不十分であり、さらなる研究が必要である<sup>26)</sup>。

この他、DOCA-saltラットに食塩負荷を行うと、サイトゾル蛋白質でカルシウム動員、小胞輸送、伝達物質放出に関わるprotein kinaseを制御するとして知られる $\gamma$ -adducinが視床下部で減少しており、また、培養神経細胞をangiotensin IIで処理すると $\gamma$ -adducinが同じく減少していることが報告されている<sup>27)</sup>。 $\gamma$ -adducinの減少は $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpの活性化を介し神経活動を亢進させること、Myristoylated alanine-rich C kinase substrate(MARCKS)のリン酸化を来し神経細胞における小胞輸送を促進することなどが報告されており、食塩感受性高血圧発症の中枢性機序に関与していることが示唆されている。また、食塩負荷を行ったDOCA-saltラットで、angiotensin IIをangiotensin IIIに変換する酵素であるaminopeptidase Aの阻害薬EC33の脳室内投与を行うと、sham, WKYと比べ大きな降圧を示すことが報告されており、食塩感受性高血圧発症の中枢性機序にAngiotensin IIIが関与することが示唆されている。これらは食塩感受性高血圧症の中枢性機序に迫る比較的新しい知見でありさらなる研究が期待される<sup>28,29)</sup>。

### おわりに

以上、食塩感受性高血圧症発症の中枢性機序についていくつかを紹介した。諸説の概略を脳内部

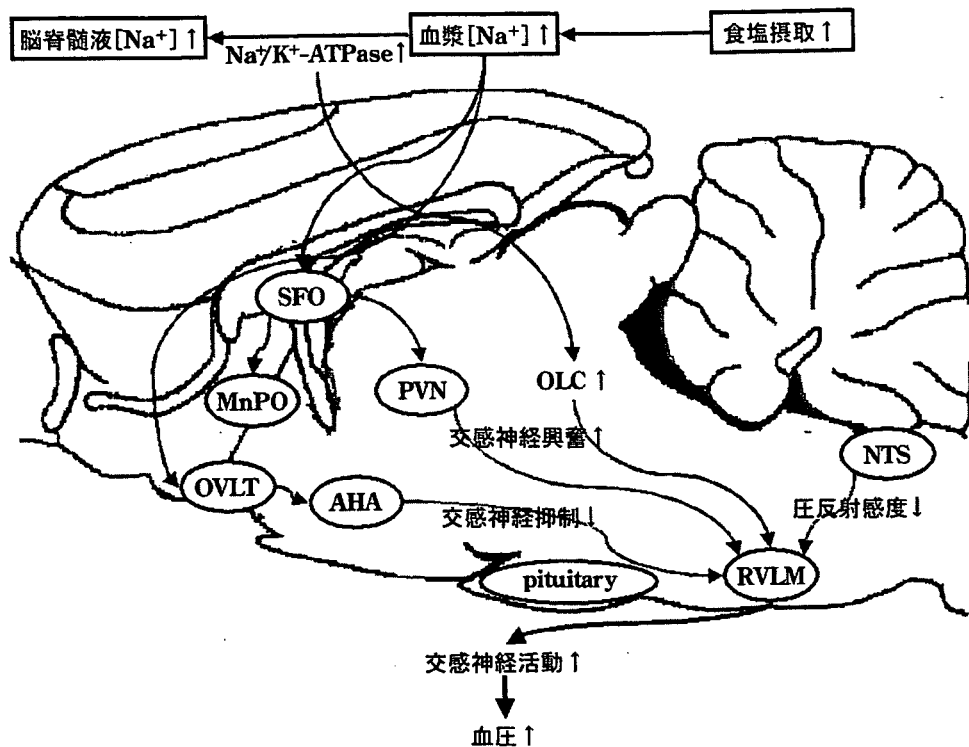


図3 食塩感受性高血圧症に関する脳内部位

SFO: 脳弓下器官, MnPO: 正中視索前核, PVN: 室傍核, OLC: ウアバイン様物質, AHA: 視床下部前部, NTS: 孤束核, RVLM: 頭側延髄腹外側野

位の図にまとめたものを図3に示す。以上述べた様に中枢性機序については諸説がある。例えば本症の発症に、血漿 $[Na^+]$ の上昇を介するが、脳脊髄液 $[Na^+]$ の上昇は介さないというWyssらの説と、脳脊髄液 $[Na^+]$ の上昇が必須と提唱しているLeenenらのグループなど矛盾点も認める<sup>30,31)</sup>。しかしながら、いずれの実験成績、仮説においても、交感神経活動の亢進が食塩感受性高血圧症発症の鍵になっていることは共通しており、交感神経活動を規定するRVLMの本症発症への関与が重要であると考えられる。しかし、依然としてそのような研究はない。また、中枢の活性酸素の関与など食塩感受性高血圧症に関わる新しい概念についても、さらなる研究が待たれる。無論、食塩感受性高血圧症の発症機序に中枢以外の臓器、特に腎の機能障害が関与していることも考えなければならない。しかしながら、これまで述べた研究結果から交感神経制御を介した中枢による機序の関与が大きいことは明白である。また、中枢性機序に限定しても研究対象となっている部位、物質は多岐に渡っており、それらが中枢性機序の理解を複雑にしている。我が国の高血圧者数は3,500万人以上と言われており、その30~50%が食塩感受性を有する

とも言われている。このことから食塩感受性高血圧症の発症機序の解明は、最も重要な研究課題の一つと考えられる<sup>1,4)</sup>。今後の研究に期待したい。

### 文 献

- 1) Carlson SH, Roysomutti S, Peng N, et al: The role of the central nervous system in NaCl-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2001; 14: 155-62S.
- 2) Dampney RA, Coleman MJ, Fontes MA, et al: Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29: 261-8.
- 3) Mancina G, Grassi G, Parati G, et al: The sympathetic nervous system in human hypertension. *Acta Physiol Scand Suppl* 1997; 640: 117-21.
- 4) Kubo T: Mechanisms of hypertension in the central nervous system. *Yakugaku Zasshi* 2006; 126: 695-709.
- 5) Ono A, Kuwaki T, Kumada M, et al: Differential central modulation of the baroreflex by salt loading in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 29: 808-14.
- 6) Oparil S, Chen YF, Peng N, et al: Anterior hypothalamic norepinephrine, atrial natriuretic peptide, and hypertension. *Front Neuroendocrinol* 1996; 17: 212-46.
- 7) Peng N, Meng QC, Oparil S, et al: Acute saline infusion decreases norepinephrine release in the anterior hypo-

- thalamic area. *Hypertension* 1996; 27: 578-83.
- 8) Peng N, Oparil S, Meng QC, et al: Atrial natriuretic peptide regulation of noradrenaline release in the anterior hypothalamic area of spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest* 1996; 98: 2060-5.
  - 9) Jin H, Yang RH, Calhoun DA, et al: Atrial natriuretic peptide modulates baroreceptor reflex in spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1992; 20: 374-9.
  - 10) Huang BS, Van Vliet BN, Leenen FH: Increases in CSF  $[Na^+]$  precede the increases in blood pressure in Dahl S rats and SHR on a high-salt diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H1160-6.
  - 11) Wang H, Leenen FH: Brain sodium channels and central sodium-induced increases in brain ouabain-like compound and blood pressure. *J Hypertens* 2003; 21: 1519-24.
  - 12) Huang BS, Leenen FH: Brain amiloride-sensitive Phe-Met-Arg-Phe-NH<sub>2</sub>-gated  $Na^+$  channels and  $Na^+$ -induced sympathoexcitation and hypertension. *Hypertension* 2002; 39: 557-61.
  - 13) Kala G, Kumarathasan R, Peng L, et al: Stimulation of  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase activity, increase in potassium uptake, and enhanced production of ouabain-like compounds in ammonia-treated mouse astrocytes. *Neurochem Int* 2000; 36: 203-11.
  - 14) Huang BS, Cheung WJ, Wang H, et al: Activation of brain renin-angiotensin-aldosterone system by central sodium in Wistar rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H1109-17.
  - 15) Huang BS, Veerasingham SJ, Leenen FH: Brain "ouabain," ANG II, and sympathoexcitation by chronic central sodium loading in rats. *Am J Physiol* 1998; 274: H1269-76.
  - 16) Sasaki Y, Fujimura M, Furukawa M, et al: Sensitivity of pressor responses to central hypertonic saline is greatly enhanced even in pre-hypertensive spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Lett* 2006; 399: 255-8.
  - 17) Huang BS, Leenen FH: Brain 'ouabain,' sodium, and arterial baroreflex in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 25: 814-7.
  - 18) Toney GM, Chen QH, Cato MJ, et al: Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand* 2003; 177: 43-55.
  - 19) Brooks VL, Haywood JR, Johnson AK: Translation of salt retention to central activation of the sympathetic nervous system in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32: 426-32.
  - 20) O'Donoghue TL, Qi Y, Brooks VL: Central action of increased osmolality to support blood pressure in deoxycorticosterone acetate-salt rats. *Hypertension* 2006; 48: 658-63.
  - 21) Brooks VL, Freeman KL, Clow KA: Excitatory amino acids in rostral ventrolateral medulla support blood pressure during water deprivation in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1642-8.
  - 22) Ito S, Hiratsuka M, Komatsu K, et al: Ventrolateral medulla AT<sub>1</sub> receptors support arterial pressure in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 2003; 41: 744-50.
  - 23) DiBona GF, Jones SY: Sodium intake influences hemodynamic and neural responses to angiotensin receptor blockade in rostral ventrolateral medulla. *Hypertension* 2001; 37: 1114-23.
  - 24) DiBona GF: Central angiotensin modulation of baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in the rat: influence of dietary sodium. *Acta Physiol Scand* 2003; 177: 285-9.
  - 25) Fujita M, Ando K, Nagae A, et al: Sympathoexcitation by oxidative stress in the brain mediates arterial pressure elevation in salt-sensitive hypertension. *Hypertension* 2007; 50: 360-7.
  - 26) Campese VM, Shaohua Y, Huiquin Z: Oxidative stress mediates angiotensin II-dependent stimulation of sympathetic nerve activity. *Hypertension* 2005; 46: 533-9.
  - 27) Yang H, Reaves PY, Katovich MJ, et al: Decrease in hypothalamic gamma adducin in rat models of hypertension. *Hypertension* 2004; 43: 324-8.
  - 28) Reaux A, Fournie-Zaluski MC, David C, et al: Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 13415-20.
  - 29) Fournie-Zaluski MC, Fassot C, Valentin B, et al: Brain renin-angiotensin system blockade by systemically active aminopeptidase A inhibitors: a potential treatment of salt-dependent hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 7775-80.
  - 30) Huang BS, Leenen FH: Brain "ouabain" and angiotensin II in salt-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1996; 28: 1005-12.
  - 31) Mozaffari MS, Jirakulsomchok S, Oparil S, et al: Changes in cerebrospinal fluid  $Na^+$  concentration do not underlie hypertensive responses to dietary NaCl in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 1990; 506: 149-52.

# Inhibition of Rac1-Derived Reactive Oxygen Species in Nucleus Tractus Solitarius Decreases Blood Pressure and Heart Rate in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats

Masatsugu Nozoe, Yoshitaka Hirooka, Yasuaki Koga, Yoji Sagara, Takuya Kishi, John F. Engelhardt, Kenji Sunagawa

**Abstract**—Reactive oxygen species (ROS) in the brain are thought to contribute to the neuropathogenesis of hypertension by enhancing sympathetic nervous system activity. The nucleus tractus solitarius (NTS), which receives afferent input from baroreceptors, has an important role in cardiovascular regulation. reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase is thought to be a major source of ROS in the NTS. Rac1 is a small G protein and a key component of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase. The role of Rac1-derived ROS in the NTS in cardiovascular regulation of hypertension is unknown. Therefore, we examined whether inhibition of Rac1 in the NTS decreases ROS generation, thereby reducing blood pressure in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs). The basal Rac1 activity level in the NTS was greater in SHRSPs than in Wistar-Kyoto rats. Inhibition of Rac1, induced by transfecting adenovirus vectors encoding dominant-negative Rac1 into the NTS, decreased blood pressure, heart rate, and urinary norepinephrine excretion in SHRSPs but not in Wistar-Kyoto rats. Inhibition of Rac1 also reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase activity and ROS generation. In addition, Cu/Zn-superoxide dismutase activity in the NTS of SHRSPs was decreased compared with that of Wistar-Kyoto rats, despite the increased ROS generation. Overexpression of Cu/Zn-superoxide dismutase in the NTS decreased blood pressure and heart rate in SHRSPs. These results indicate that the activation of Rac1 in the NTS generates ROS via reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase in SHRSPs, and this mechanism might be important for the neuropathogenesis of hypertension in SHRSPs. (*Hypertension*. 2007;50:62-68.)

**Key Words:** blood pressure ■ heart rate ■ sympathetic nervous system ■ hypertension ■ brain

There is accumulating evidence that reactive oxygen species (ROS) in the cardiovascular regulatory nuclei in the brain have a crucial role in blood pressure regulation in hypertension via modulating the sympathetic nervous system.<sup>1-5</sup> Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate [NAD(P)H] oxidase is a major source of ROS in hypertension<sup>6</sup> and has a critical role in generating ROS in the brain.<sup>2,5,7</sup> Rac1 is a small G protein that is an important signaling molecule involved in integrating intracellular transduction pathways toward NAD(P)H oxidase activation.<sup>2,8,9</sup> Rac1 requires lipid modifications to migrate from the cytosol to the plasma membrane, which is a necessary step for activating the ROS-generating NAD(P)H oxidase enzyme system.<sup>8,9</sup>

The nucleus tractus solitarius (NTS) in the brain stem has an important role in cardiovascular regulation.<sup>10-16</sup> The NTS receives afferent input from baroreceptors and chemoreceptors<sup>12</sup> and has reciprocal interconnections with other nuclei

involved in central autonomic regulation.<sup>17</sup> In addition, the essential NAD(P)H oxidase subunit gp91<sup>phox</sup> is present in somatodendritic and axonal profiles that contain angiotensin II (Ang II) subtype 1 receptors in the NTS, and Ang II increases ROS generation via NAD(P)H oxidase in NTS neurons in vitro.<sup>7</sup> The role of Rac1 and its derived ROS in the NTS in cardiovascular regulation of hypertension in vivo, however, is not known. Therefore, the aim of the present study was to determine the effects of the inhibition of Rac1 in the NTS on cardiovascular regulation of hypertension in the awake state. For this purpose, we transfecting an adenovirus vector dominant-negative Rac1 into the NTS of stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSPs) and compared the effects with those in normotensive Wistar-Kyoto rats (WKYs).

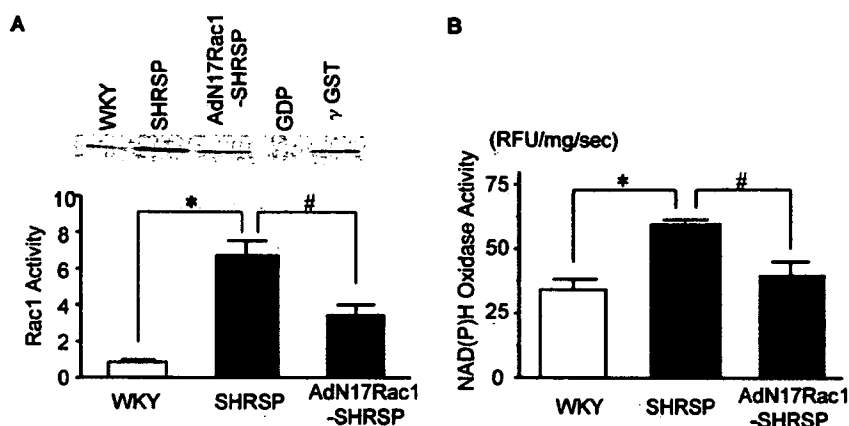
## Methods

An expanded Methods section is available in the online data supplement at <http://hyper.ahajournals.org>.

Received January 24, 2007; first decision February 12, 2007; revision accepted April 27, 2007.  
From the Department of Cardiovascular Medicine (M.N., Y.H., Y.K., Y.S., T.K., K.S.), Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan; and the Department of Anatomy and Cell Biology (J.F.E.), University of Iowa, Iowa City.  
Correspondence to Yoshitaka Hirooka, Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan. E-mail [hyoshi@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp](mailto:hyoshi@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp)  
© 2007 American Heart Association, Inc.

*Hypertension* is available at <http://www.hypertensionaha.org>

DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.087981



**Figure 1.** Rac1 and NAD(P)H oxidase activities are elevated in SHRSPs but not in WKYs. A, Rac1 activity in the NTS. The top panel shows a representative Western blot of Rac1-GTP bound to glutathione *S*-transferase-Pak1. Quantification of Rac1-GTP activity expressed as the relative ratio to control (WKYs), which was assigned a value of 1 (bottom). Rac1 activity in the NTS of SHRSPs was significantly increased compared with that of WKYs. Furthermore, dominant-negative Rac1 gene transfer significantly attenuated Rac1 activity in the NTS of SHRSPs. Lysates incubated with GDP or  $\gamma$ -GTP served as negative and positive controls, respectively ( $n=4$  for each; \* $P<0.01$  vs WKY; # $P<0.05$  vs SHRSP). B, NAD(P)H oxidase activity evaluated by lucigenin chemiluminescence in the NTS. NAD(P)H-dependent superoxide production was significantly higher in SHRSPs than in WKYs. Furthermore, dominant-negative Rac1 gene transfer significantly attenuated NAD(P)H oxidase activity in the NTS of SHRSPs (WKY rats =  $34.2 \pm 4.1$ ; SHRSP =  $59.6 \pm 1.5$ ; AdN17Rac1-transfected SHRSP =  $39.2 \pm 5.8$  relative fluorescence units/mg/s;  $n=5$  for each; \* $P<0.05$  vs WKY; # $P<0.05$  vs SHRSP).

### Animals and General Procedures

Male SHRSPs and WKYs (280 to 340 g; 14 to 18 weeks old) were obtained from SLC Japan (Hamamatsu, Japan). The study was reviewed and approved by the Committee of Ethics of Animal Experiments, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, and was conducted according to the Guidelines for Animal Experiments of Kyushu University.

### Rac1 Activation Assays

Rac1 activity can be monitored by its interaction with p21-activated kinase (PAK), which only occurs when Rac1 is active.<sup>8</sup> We used a Rac1 Activation kit (Upstate Biotechnology) to evaluate Rac1 activity in the NTS.

### NAD(P)H-Dependent Superoxide Production

NAD(P)H-dependent superoxide production in the NTS was measured by lucigenin luminescence.<sup>8,18,19</sup> A luminescence assay was performed in a balanced salt solution buffer containing 5  $\mu\text{mol/L}$  of lucigenin (Sigma) using a luminescence reader (Berthold Technology). The reaction was started by adding 100  $\mu\text{mol/L}$  of  $\beta$ -NAD(P)H (Sigma) as the substrate.

### In Vivo Gene Transfer Into the NTS

We used adenoviral vectors encoding dominant-negative HA-tagged Rac1 (AdN17Rac1),<sup>2</sup> human Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD; AdCu/ZnSOD),<sup>2,20,21</sup> and  $\beta$ -galactosidase (AdLacZ). The vectors were constructed in the Gene Transfer Core Laboratory at the University of Iowa. We transfected AdN17Rac1, AdCu/ZnSOD, and AdLacZ into the NTS as described previously.<sup>10,11</sup> A telemetry system (DATA Sciences International) was used to measure mean blood pressure (MBP) and heart rate (HR).<sup>1,3,10,11</sup> On day 7 after gene transfer, we calculated the 24-hour urinary norepinephrine excretion as an indicator of sympathetic nerve activity.<sup>1,3,10,11</sup>

### Analysis of Gene Expression

To confirm the expression and localization of gene transfer in the NTS, we performed immunohistochemical staining for human Cu/Zn-SOD and  $\beta$ -galactosidase. To identify the cell types that were transfected by the adenovirus used in the present study, we performed double immunohistochemical staining for  $\beta$ -galactosidase and a neuronal marker (NeuN; Chemicon International Inc).<sup>22</sup> Western blot analysis was performed using rabbit anti-SOD-1 polyclonal IgG (1:10 000, Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-

hemagglutinin (HA) monoclonal IgG (1:10 000, Sigma), or rabbit anti- $\beta$  tubulin polyclonal IgG (1:10 000, Santa Cruz Biotechnology).

### In Situ Detection of Superoxide

Brain superoxide anion levels were estimated by dihydroethidium (DHE) staining.<sup>3,5</sup> Coronal sections (10  $\mu\text{m}$ ) were incubated for 10 minutes with the  $\text{O}_2^-$  specific fluorogenic probe DHE (1  $\mu\text{mol/L}$ , Sigma) at 37°C.

### Thiobarbituric Acid-Reactive Substances

We examined thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) levels in the NTS as an indicator of oxidative stress, as described previously.<sup>1,3</sup>

### Measurement of SOD Activity

Cu/Zn-SOD activity was assayed by monitoring the inhibition of the rate of xanthine/xanthine oxidase-mediated reduction of cytochrome *c*, as described previously.<sup>1</sup>

### Statistical Analysis

All of the values were expressed as the mean  $\pm$  SEM.  $P<0.05$  was considered significant.

## Results

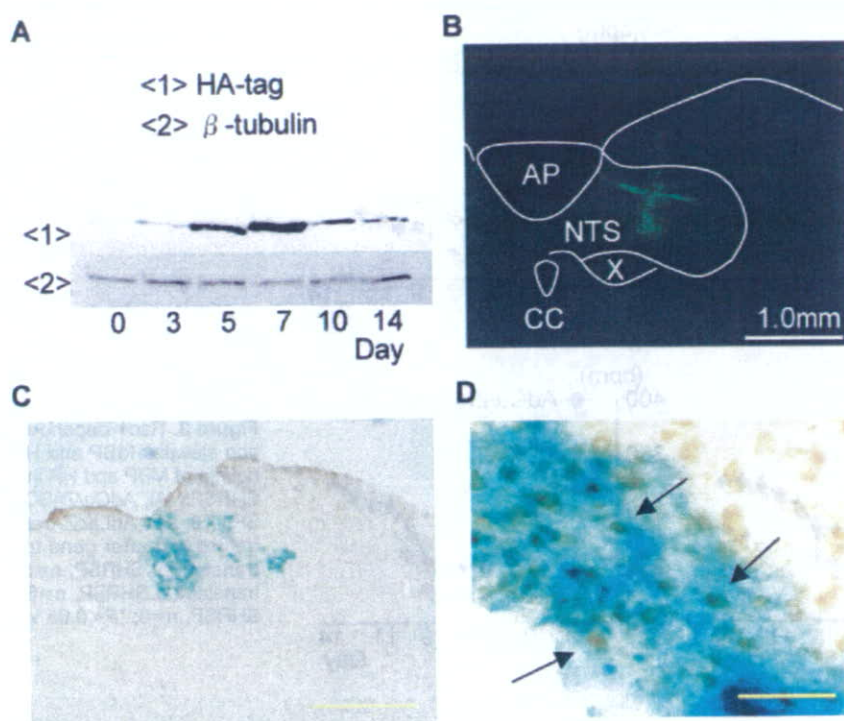
### Rac1/NAD(P)H Oxidase Pathway Is Activated in the NTS of SHRSPs

Rac1-GTP levels were assessed as an index of Rac1 activation using a glutathione *S*-transferase-PAK pull-down assay. These studies revealed that Rac1 activity in the NTS of SHRSPs was significantly higher than in the NTS of WKYs (Figure 1A). Consistent with increased Rac1 activation, NAD(P)H-dependent superoxide production was also significantly higher in the NTS from SHRSPs than in the NTS from WKYs (Figure 1B). Gene transfer of AdN17Rac1 into the NTS of SHRSPs suppressed both Rac1/PAK binding (Figure 1A) and NAD(P)H oxidase activity (Figure 1B).

### Effect of Rac1 Inhibition and Cu/Zn-SOD by Adenovirus-Mediated Gene Transfer

Western blot analysis of HA-tag, a marker of AdN17Rac1, was performed on tissue samples taken from rats on days 0,





**Figure 2.** Target gene expression in the NTS using recombinant adenovirus. **A**, To confirm the gene expression and time course of dominant-negative Rac1 in the NTS, we performed Western blot analysis of HA-tag, a marker of AdN17Rac1, on tissue samples taken from rats on days 0, 3, 5, 7, 10, and 14 after gene transfer. We examined 3 rats at each day, and the figure shows representative images. The expression level of HA-tag was significantly increased and peaked on day 7 after AdN17Rac1 transfection. **B**, Laser scanning microscopy images of a section of medulla, stained with anti-human Cu/Zn-SOD antibody on day 7 after gene transfer (high intensity, visualized using a fluorescein isothiocyanate-conjugated fluorescence probe). Staining was observed locally in the NTS (AP indicates area postrema; X, dorsal motor nucleus of vagus; CC, central canal; bar=1.0 mm). **C**, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactosidase staining on day 7 after gene transfer was localized in the NTS (bar=1.0 mm). **D**, To identify the cell types that were transfected by the adenovirus used in the present study, we performed double immunohistochemical staining for  $\beta$ -galactosidase and a NeuN. Some NeuN-positive cells expressed  $\beta$ -galactosidase protein, although NeuN-negative cells also expressed  $\beta$ -galactosidase (bar=50  $\mu$ m; arrows indicate NeuN-positive cells).

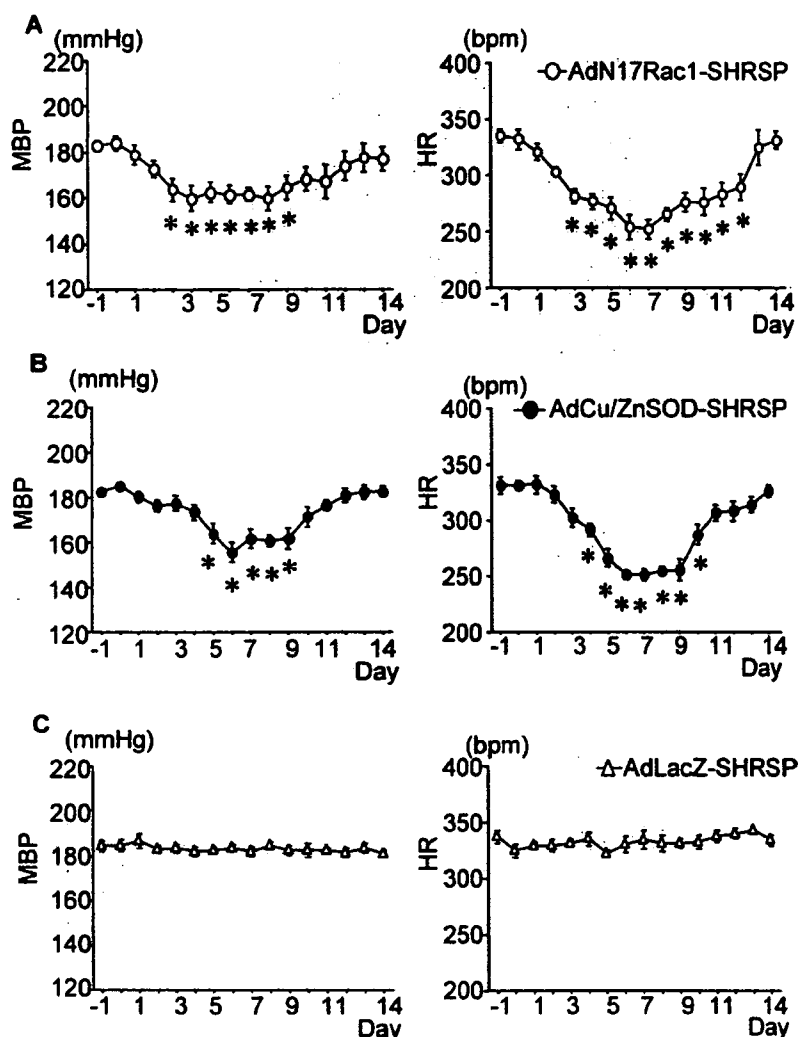
3, 5, 7, 10, and 14 after gene transfer ( $n=3$  per day), and representative images are shown in Figure 2A. The HA-tag expression level was significantly increased and peaked on day 7 after AdN17Rac1 transfection. We performed immunohistochemistry to examine the localization and distribution of adenoviral-mediated gene transfer. Immunohistochemical analysis on day 7 after gene transfer revealed localized human Cu/Zn-SOD (Figure 2B) or  $\beta$ -galactosidase gene expression (Figure 2C) in the NTS. Double staining of  $\beta$ -galactosidase and NeuN confirmed that some NeuN-positive cells expressed  $\beta$ -galactosidase protein, although NeuN-negative cells also expressed  $\beta$ -galactosidase protein (Figure 2D). AdN17Rac1-transfected SHRSPs exhibited a significant decrease in MBP and HR (Figure 3A). MBP and HR did not change in AdLacZ-transfected SHRSPs (Figure 3C). Urinary norepinephrine excretion measured on day 7 after gene transfer was significantly decreased in AdN17Rac1-transfected SHRSPs relative to that in non-treated SHRSPs (Figure 4A). In addition, overexpression of Cu/Zn-SOD in the NTS of SHRSPs decreased MBP, HR (Figure 3B), and urinary norepinephrine excretion (Figure 4A). In contrast, AdN17Rac1 and AdCu/ZnSOD transfection into the NTS of WKYs did not affect MBP, HR (Figure S1), or urinary norepinephrine excretion (Figure 4B).

### Oxidative Stress in the NTS

Confocal analysis of DHE fluorescence was used to estimate superoxide levels in the NTS. We examined 4 groups (WKY, SHRSP, AdN17Rac1-transfected SHRSP, and AdCu/ZnSOD-transfected SHRSP;  $n=5$  for each), and representative images are shown in Figure 5A. There was a significant increase in DHE fluorescence in sections that contained the NTS of SHRSPs compared with sections of the NTS of WKYs. Furthermore, DHE fluorescence in the NTS was significantly attenuated in both AdN17Rac1-transfected SHRSPs and AdCu/ZnSOD-transfected SHRSPs (Figure 5A). TBARS levels were also significantly higher in the NTS of SHRSPs than in the NTS of WKYs (Figure 5B). Gene transfer of either AdN17Rac1 or AdCu/ZnSOD suppressed TBARS levels in the NTS (Figure 5B), suggesting that the TBARS increase was the result of enhanced superoxide generation.

### Expression and Activity of Cu/Zn-SOD in the NTS of SHRSPs

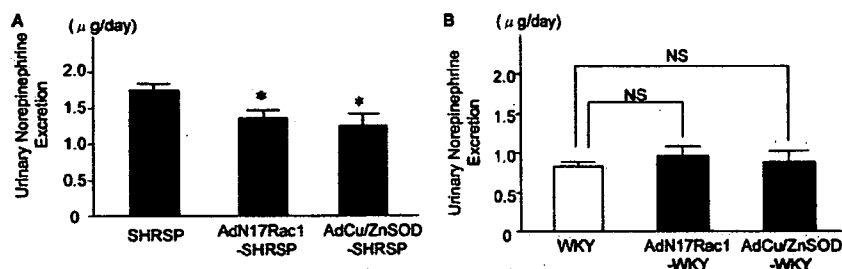
Western blot analysis revealed that the expression of a  $\approx 17$ -kDa isoform of rat Cu/Zn-SOD protein in the NTS was decreased in SHRSPs compared with WKYs (Figure 6A). There was also significantly less total SOD activity ( $5.9 \pm 0.3$  versus  $4.9 \pm 0.1$  U/mg;  $P < 0.05$ ;  $n=5$ ) and Cu/Zn-SOD activ-



**Figure 3.** Rac1-dependent superoxide production elevates MBP and HR in SHRSPs. Time course of MBP and HR in AdN17Rac1-transfected SHRSPs (A), AdCu/ZnSOD-transfected SHRSPs (B), and AdLacZ-transfected SHRSPs (C) before and after gene transfer (AdN17Rac1-transfected SHRSP, n=5; AdCu/ZnSOD-transfected SHRSP, n=6; AdLacZ-transfected SHRSP, n=6; \*P<0.05 vs before gene transfer).

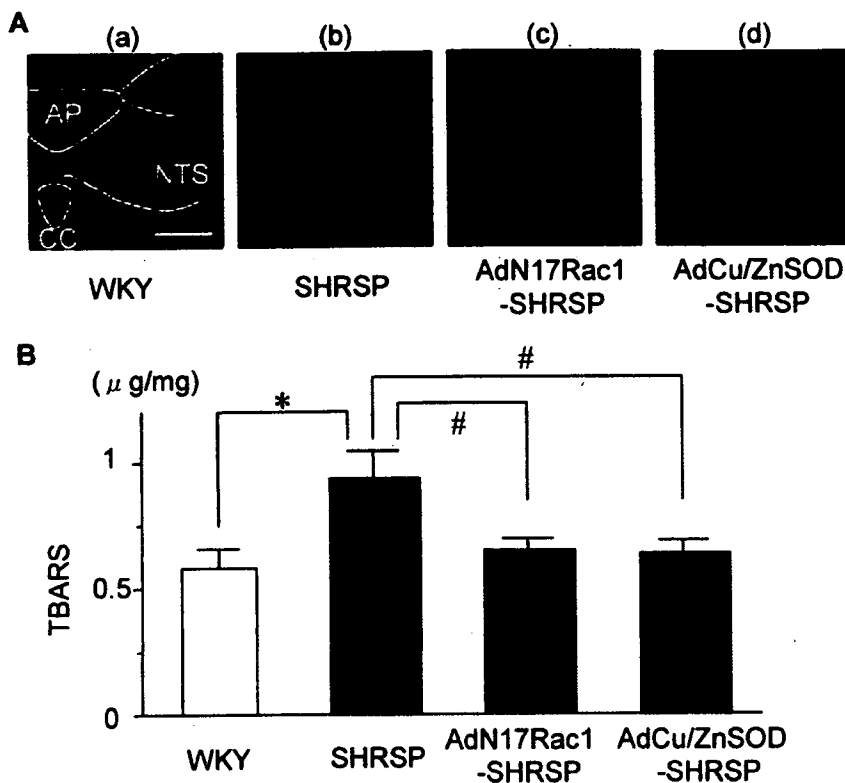
ity in the NTS of SHRSPs compared with the NTS of WKYs ( $3.0 \pm 0.1$  versus  $2.5 \pm 0.2$  U/mg;  $P < 0.05$ ; n=5 for each; Figure 6B). The human Cu/Zn-SOD gene, which we used in the present study, produces a  $\approx 19$ -kDa isoform of human Cu/Zn-SOD protein.<sup>21</sup> The NTS tissues from AdCu/ZnSOD-transfected SHRSPs on day 7 after transfection had a clear band representing human Cu/Zn-SOD. Human HeLa cells

served as a positive control. The bands representing the expression of endogenous Cu/Zn-SOD at  $\approx 17$  kDa were identical to those in AdCu/ZnSOD-transfected SHRSPs. AdLacZ-transfected SHRSPs did not produce human protein. We examined 5 individual AdCu/ZnSOD-transfected SHRSPs, and representative images are shown in Figure 6C. The increased Cu/Zn-SOD activity in the NTS of AdCu/ZnSOD-



**Figure 4.** Rac1-dependent superoxide production elevates urinary norepinephrine excretion in SHRSPs but not in WKYs. A, 24-hour urinary norepinephrine excretion as an indicator of sympathetic nerve activity. Urinary norepinephrine excretion on day 7 after gene transfer was significantly decreased in AdN17rac1-transfected SHRSPs and AdCu/ZnSOD-transfected SHRSPs (SHRSP= $1.7 \pm 0.1$   $\mu$ g per day; AdN17Rac1-treated SHRSP= $1.4 \pm 0.1$   $\mu$ g per day; AdCu/ZnSOD-transfected SHRSP= $1.2 \pm 0.2$   $\mu$ g per day; n=6 for each; \*P<0.05 vs SHRSP). B, 24-hour urinary norepinephrine excretion in WKY rats. We did not detect any changes among WKY rats, AdN17Rac1-transfected WKY rats, and AdCu/ZnSOD-transfected WKY rats (WKY rats= $0.8 \pm 0.1$   $\mu$ g per day; AdN17Rac1-transfected WKY rats= $1.0 \pm 0.1$   $\mu$ g per day; AdCu/ZnSOD-transfected WKY rats= $0.9 \pm 0.2$   $\mu$ g per day; n=6 for each).





**Figure 5.** Rac1-dependent superoxide production is elevated in the NTS of SHRSPs and increases TBARS. **A**, Images of DHE-treated brain sections. We examined 4 groups (WKY, SHRSP, AdN17Rac1-transfected SHRSP, and AdCu/ZnSOD-transfected SHRSP;  $n=5$  for each), and the figure shows representative images. Sections including the NTS of SHRSPs showed a significant increase in DHE fluorescence compared with the WKY sections. Furthermore, DHE fluorescence in the NTS was significantly attenuated in both AdN17Rac1-transfected SHRSPs and AdCu/ZnSOD-transfected SHRSPs on day 7 after gene transfer (AP indicates area postrema; CC, central canal; bar=1.0 mm). **B**, Lipid peroxidation as indicated by TBARS levels in the NTS. TBARS levels in the NTS of SHRSPs were significantly increased compared with WKYs. Gene transfer of either dominant-negative Rac1 or human Cu/Zn-SOD suppressed TBARS levels in the NTS (WKY= $0.58 \pm 0.08$   $\mu\text{g}/\text{g}$  of protein; SHRSP= $0.93 \pm 0.10$   $\mu\text{g}/\text{g}$  of protein; AdN17Rac1-transfected SHRSP= $0.64 \pm 0.05$   $\mu\text{g}/\text{g}$  of protein; AdCu/ZnSOD-transfected SHRSP= $0.63 \pm 0.05$   $\mu\text{g}/\text{g}$  of protein;  $n=5$  for each; \* $P<0.05$  vs WKY; # $P<0.05$  vs SHRSP).

transfected SHRSPs ( $2.5 \pm 0.2$  versus  $3.5 \pm 0.4$  U/mg;  $P<0.05$ ;  $n=5$  for each; Figure 6D) indicated that human Cu/Zn-SOD was bioactive in rat tissues *in vivo*.

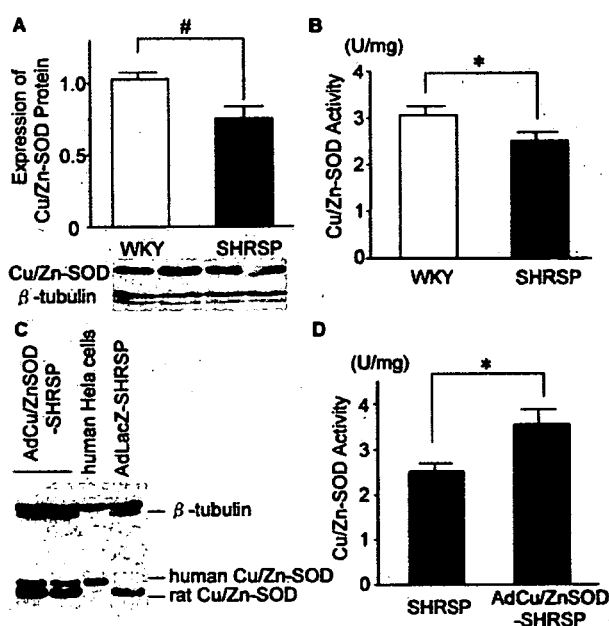
### Discussion

The major findings of the present study are that inhibition of Rac1 expression in the NTS decreased blood pressure, HR, and urinary norepinephrine excretion in awake SHRSPs. These effects were not observed in normotensive WKYs. Rac1 activity was increased in the NTS of SHRSPs compared with WKYs. Subsequent activation of NAD(P)H oxidase and ROS production in the NTS were also increased in SHRSPs compared with those in WKYs. These results indicate that activation of Rac1 in the NTS leads to ROS generation via NAD(P)H oxidase activation in awake SHRSPs. The present study provides the first evidence that Rac1 is activated in the NTS of SHRSPs and results in enhanced NAD(P)H oxidase activity. More importantly, the subsequent ROS generation leads to increases in blood pressure and HR via the sympathetic nervous system in awake SHRSPs.

Transfection of AdN17Rac1 into the NTS successfully decreased Rac1 activity and NAD(P)H oxidase activity in the NTS of SHRSPs. It also attenuated the subsequent ROS generation, as evaluated by the DHE staining and TBARS levels. In addition, transfection of Cu/Zn-SOD into the NTS, which scavenges ROS generation, decreased blood pressure, HR, and urinary norepinephrine excretion. Taken together, these results suggest that activation of Rac1 in the NTS leads to ROS generation via NAD(P)H oxidase activity, and this mechanism contributes to the neural mechanisms of hypertension in SHRSPs.

Recent studies demonstrated the importance of ROS generation in the NTS.<sup>7,23</sup> Nox2-containing NAD(P)H oxidase in the NTS is the source of the Ang II-induced ROS generation *in vitro*.<sup>23</sup> Consistent with those studies, our results indicate that the Rac1/NAD(P)H pathway is involved in neuronal activation in the NTS and further indicate that activation of this pathway and the subsequent ROS generation in the NTS occur in the NTS of SHRSPs. More importantly, we demonstrated that the inhibition of Rac1 or overexpression of Cu/Zn-SOD in the NTS decreased blood pressure and HR in SHRSPs but not in WKYs. Localized human Cu/Zn-SOD or  $\beta$ -galactosidase gene expression in the NTS after gene transfer was confirmed by immunohistochemical staining. Gene transfer of either AdN17Rac1 or human Cu/Zn-SOD in adjacent regions not involved in cardiovascular regulation (anteroposterior angle  $10^\circ$ , 2.5-mm lateral, 2.5-mm deeper, to the calamus scriptorius) did not elicit any changes in MBP or HR (data not shown). The time course of these changes was similar to those induced by transgene expression, as shown using Western blot analysis, and was consistent with the results of our previous studies using adenovirus-mediated gene transfer.<sup>3,10,11</sup> These results confirmed successful gene transfer into the NTS in the present study.

The degree of oxidative stress is determined by the balance between ROS generation and antioxidant enzymatic activity. NAD(P)H oxidase has a crucial role in generating ROS in the brain.<sup>2</sup> In particular, most studies have been performed using Ang II infusion models to examine the role of NAD(P)H oxidase and the subsequent ROS generation in the brain and blood vessels.<sup>2,7,23</sup> We used SHRSPs as a hypertensive model that resembles human essential hypertension with enhanced



**Figure 6.** Cu/Zn-SOD expression and activity is reduced in SHRSPs. **A**, Western blot analysis of Cu/Zn-SOD protein levels in the NTS. Data are expressed as the relative ratio to control (WKYs), which were assigned a value of 1. Cu/Zn-SOD protein expression in the NTS of SHRSPs was significantly lower than that of WKYs ( $n=6$  for each;  $\#P<0.01$ ). **B**, Cu/Zn-SOD activity in the NTS of SHRSPs was significantly lower than that of WKYs ( $n=5$  for each;  $*P<0.05$ ). **C**, Western blot analysis of Cu/Zn-SOD on day 7 after gene transfer. The human Cu/Zn-SOD gene, which was used in the present study, produces an  $\approx 19$ -kDa isoform of human Cu/Zn-SOD protein. The NTS tissues from AdCu/ZnSOD-transfected SHRSPs on day 7 after transfection had a clear band representing human Cu/Zn-SOD. Human HeLa cells served as a positive control. The bands representing the expression of endogenous Cu/Zn-SOD at  $\approx 17$  kDa were also identical in AdCu/ZnSOD-transfected SHRSPs. AdLacZ-transfected SHRSPs did not produce human Cu/Zn-SOD protein. We examined 5 individual AdCu/ZnSOD-transfected SHRSPs, and the figure shows representative images. **D**, Cu/Zn-SOD activity in the NTS of AdCu/ZnSOD-transfected SHRSPs was significantly higher than that of nontransfected SHRSPs ( $n=5$  for each;  $*P<0.05$ ).

sympathetic nerve activity.<sup>1,24</sup> Interestingly, we found that Cu/Zn-SOD activity in the NTS was also decreased in SHRSPs compared with WKYs, which indicates that antioxidant enzymatic activity is attenuated in the NTS of SHRSPs. One might expect that antioxidant activity would increase to compensate for the ROS generation. We do not have a clear explanation for the decreased antioxidant activity based on the results of the present study, though we reported previously that Mn-SOD activity is decreased in the rostral ventrolateral medulla of SHRSPs compared with WKYs.<sup>1</sup>

Adenovirus with the cytomegalovirus promoter has relatively poor neuronal selectivity.<sup>25,26</sup> Therefore, we performed double immunohistochemical staining for  $\beta$ -galactosidase and a NeuN (Figure 2D). The transfected  $\beta$ -galactosidase gene was expressed in almost all cell types, including neurons. Therefore, we believe that neurons, as well as glia, in the NTS were transfected with the adenovirus gene. Because Nox2 is present in the NTS neurons,<sup>7,23,27</sup> it is conceivable that transfection of AdN17Rac1 inhibits the NAD(P)H oxidase activity in those neurons.

Some studies examined the role of glia in cardiovascular regulation.<sup>26,28</sup> Indeed, in the NTS, NADPH oxidase subunits are also present in astrocytes<sup>27</sup>; therefore, we cannot exclude the possibility that inhibition of Rac1/NAD(P)H oxidase in glia also decreased blood pressure in the present study. The precise role of glia in cardiovascular regulation is unknown.<sup>29</sup> ROS, such as NO produced by neurons, as well as glial cells, are diffusive gaseous molecules and are thereby considered to influence surrounding cells. The present study did not differentiate whether the ROS was produced by neurons or glia. Further studies using neuron-specific or glia-specific gene transfer techniques are required for this specific purpose.

We did not address the precise mechanisms by which ROS in the NTS alter blood pressure via the sympathetic nervous system. Extensive evidence supports the idea that Ang II signaling mediates ROS generation,<sup>2,5,30</sup> and the NTS contains a high density of Ang II subtype 1 receptors located on both vagal and carotid sinus afferent terminals presynaptically and on neurons postsynaptically.<sup>13,31</sup> The role of Ang II in the NTS, however, is complicated. Depending on the dose, microinjection of Ang II into the NTS elicits an increase or decrease in blood pressure.<sup>32–34</sup> Although those studies were performed under anesthesia, there might be a connection between the renin–angiotensin system and ROS in the NTS.<sup>35</sup> Another possibility is that reduced availability of NO is involved in the mechanisms. In the NTS, an increase in NO elicits sympathoinhibition by facilitating the release of excitatory amino acids, such as L-glutamate.<sup>10,36–39</sup>

In the present study, HR was decreased in SHRSPs after transfection of AdNRac1 or AdCu/ZnSOD. There was also a decrease in urinary norepinephrine excretion. Therefore, we suggest that the effects of gene transfer-induced ROS inhibition are mediated by inhibition of the sympathetic nervous system. We cannot, however, exclude the possibility that vagal outflow is also modulated. We did not examine baroreflex control of HR and vagal outflow to the heart in the present study. It would be interesting to examine whether the bradycardic response induced by gene transfer is atropine sensitive. Further studies are needed to clarify these issues.

In conclusion, our findings indicate that inhibition of Rac1-derived ROS in the NTS decreases blood pressure, HR, and urinary norepinephrine excretion in awake SHRSPs. Activation of the Rac1/NAD(P)H oxidase pathway in the NTS might contribute to ROS generation and thereby enhanced sympathetic drive in SHRSPs.

### Perspectives

The NTS regulates the baroreflex and chemoreflex functions and has an important role in cardiovascular regulation.<sup>12,16</sup> ROS in the brain are thought to contribute to the neuropathogenesis of hypertension by enhancing sympathetic nervous system activity. NAD(P)H oxidase is the source of ROS in the brain. The present study demonstrated that the inhibition of Rac1, which is a key component of NAD(P)H oxidase, decreased sympathetic nerve activity in a rat model of hypertension. These findings have broad implications for the development of therapeutics for human essential hypertension.

### Acknowledgments

We thank Drs Donald D. Heistad and Beverly L. Davidson (University of Iowa Gene Transfer Vector Core, supported by National Institutes of Health Grants and the Carver Foundation) for providing the vectors.

### Sources of Funding

This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Japan Society for the Promotion of Science (S18100006 and C17590745) and, in part, by the Health and Labor Sciences Research Grant for Comprehensive Research in Aging and Health Labor and Welfare of Japan.

### Disclosures

None.

### References

- Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A. Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation*. 2004;109:2357–2362.
- Zimmerman MC, Dunlay RP, Lazartigues E, Zhang Y, Sharma RV, Engelhardt JF, Davisson RL. Requirement for Rac1-dependent NADPH oxidase in the cardiovascular and dipsogenic actions of angiotensin II in the brain. *Circ Res*. 2004;95:532–539.
- Kimura Y, Hirooka Y, Sagara Y, Ito K, Kishi T, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa K. Overexpression of inducible nitric oxide synthase in rostral ventrolateral medulla causes hypertension and sympathoexcitation via an increase in oxidative stress. *Circ Res*. 2005;96:252–260.
- Lindley TE, Doobay MF, Sharma RV, Davisson RL. Superoxide is involved in the central nervous system activation and sympathoexcitation of myocardial infarction-induced heart failure. *Circ Res*. 2004;94:402–409.
- Gao L, Wang W, Li YL, Schultz HD, Liu D, Cornish KG, Zucker IH. Superoxide mediates sympathoexcitation in heart failure: roles of angiotensin II and NAD(P)H oxidase. *Circ Res*. 2004;95:937–944.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87:840–844.
- Wang G, Anrather J, Huang J, Speth RC, Pickel VM, Iadecola C. NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius. *J Neurosci*. 2004;24:5516–5524.
- Vecchione C, Aretini A, Marino G, Bettarini U, Poulet R, Maffei A, Sbroglio M, Pastore L, Gentile MT, Notte A, Iorio L, Hirsch E, Tarone G, Lembo G. Selective Rac-1 inhibition protects from diabetes-induced vascular injury. *Circ Res*. 2006;98:218–225.
- Abo A, Pick E, Hall A, Totty N, Teahan CG, Segal AW. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature*. 1991;353:668–670.
- Sakai K, Hirooka Y, Matsuo I, Eshima K, Shigematsu H, Shimokawa H, Takeshita A. Overexpression of eNOS in NTS causes hypotension and bradycardia in vivo. *Hypertension*. 2000;36:1023–1028.
- Ito K, Hirooka Y, Sakai K, Kishi T, Kaibuchi K, Shimokawa H, Takeshita A. Rho/Rho-kinase pathway in brain stem contributes to blood pressure regulation via sympathetic nervous system: possible involvement in neural mechanisms of hypertension. *Circ Res*. 2003;92:1337–1343.
- Weston M, Wang H, Stornetta RL, Sevigny CP, Guyenet PG. Fos expression by glutamatergic neurons of the solitary tract nucleus after phenylephrine-induced hypertension in rats. *J Comp Neurol*. 2003;460:525–541.
- Healy DP, Rettig R, Nguyen T, Printz MP. Quantitative autoradiography of angiotensin II receptors in the rat solitary-vagal area: effects of nodose ganglionectomy or sinoaortic denervation. *Brain Res*. 1989;484:1–12.
- Gutkind JS, Kurihara M, Castren E, Saavedra JM. Increased concentration of angiotensin II binding sites in selected brain areas of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 1988;6:79–84.
- Sato AM, Vanderlei Menani J, Ubriaco Lopes O, Colombari E. Lesions of the commissural nucleus of the solitary tract reduce arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2001;38:560–564.
- Wong LF, Polson JW, Murphy D, Paton JF, Kasparov S. Genetic and pharmacological dissection of pathways involved in the angiotensin II-mediated depression of baroreflex function. *FASEB J*. 2002;16:1595–1601.
- Loewy AD, McKellar S. The neuroanatomical basis of central cardiovascular control. *Fed Proc*. 1980;39:2495–2503.
- Tanaka M, Umemoto S, Kawahara S, Kubo M, Itoh S, Umeji K, Matsuzaki M. Angiotensin II type I receptor antagonist and angiotensin-converting enzyme inhibitor altered the activation of Cu/Zn-containing superoxide dismutase in the heart of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2005;28:67–77.
- Miller FJ Jr, Griendling KK. Functional evaluation of nonphagocytic NAD(P)H oxidases. *Methods Enzymol*. 2002;353:220–233.
- Zwacka RM, Dudus L, Epperly MW, Greenberger JS, Engelhardt JF. Redox gene therapy protects human IB-3 lung epithelial cells against ionizing radiation-induced apoptosis. *Hum Gene Ther*. 1998;9:1381–1386.
- Lehmann TG, Wheeler MD, Schwabe RF, Connor HD, Schoonhoven R, Bunzendorf H, Brenner DA, Jude Samulski R, Zhong Z, Thurman RG. Gene delivery of Cu/Zn-superoxide dismutase improves graft function after transplantation of fatty livers in the rat. *Hepatology*. 2000;32:1255–1264.
- Korzhevskii DE, Gilerovich EG, Zin'kova NN, Grigor'ev IP, Otellin VA. Immunocytochemical detection of brain neurons using the selective marker NeuN. *Neurosci Behav Physiol*. 2006;36:857–859.
- Wang G, Anrather J, Glass MJ, Tarsitano MJ, Zhou P, Frys KA, Pickel VM, Iadecola C. Nox2, Ca<sup>2+</sup>, and protein kinase C play a role in angiotensin II-induced free radical production in nucleus tractus solitarius. *Hypertension*. 2006;48:482–489.
- Kishi T, Hirooka Y, Ito K, Sakai K, Shimokawa H, Takeshita A. Cardiovascular effects of overexpression of endothelial nitric oxide synthase in the rostral ventrolateral medulla in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2002;39:264–268.
- Li HW, Gao YX, Matsuura T, Martynyuk A, Raizada MK, Summers C. Adenoviral-mediated neuron specific transduction of angiotensin II type 2 receptors. *Regul Pept*. 2005;126:213–222.
- Allen AM, Dossanj J, Dassanayake S, Tan G, Thomas WG. Baroreceptor reflex stimulation does not induce cytomegalovirus promoter-driven transgene expression in the ventrolateral medulla in vivo. *Auton Neurosci*. 2006;126–127:150–155.
- Glass MJ, Huang J, Oselkin M, Tarsitano MJ, Wang G, Iadecola C, Pickel VM. Subcellular localization of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunits in neurons and astroglia of the rat medial nucleus tractus solitarius: relationship with tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons. *Neuroscience*. 2006;143:547–564.
- Sakai K, Chappelle MW, Morimoto S, Cassell MD, Sigmund CD. Differential modulation of baroreflex control of heart rate by neuron- vs. glia-derived angiotensin II. *Physiol Genomics*. 2004;20:66–72.
- Dampney RA. Angiotensin type IA receptors on glial cells in rostral ventrolateral medulla and hypertension. *Hypertension*. 2006;47:1052–1053.
- Zimmerman MC, Lazartigues E, Sharma RV, Davisson RL. Hypertension caused by angiotensin II infusion involves increased superoxide production in the central nervous system. *Circ Res*. 2004;95:210–216.
- Gehlert DR, Gackenheim SL, Schober DA. Autoradiographic localization of subtypes of angiotensin II antagonist binding in the rat brain. *Neuroscience*. 1991;44:501–514.
- Diz DI, Barnes KL, Ferrario CM. Hypotensive actions of microinjections of angiotensin II into the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Hypertens*. 1984;2(suppl):S53–S56.
- Fow JE, Averill DB, Barnes KL. Mechanisms of angiotensin-induced hypertension and bradycardia in the medial solitary tract nucleus. *Am J Physiol*. 1994;267:H259–H266.
- Rettig R, Healy DP, Printz MP. Cardiovascular effects of microinjections of angiotensin II into the nucleus tractus solitarius. *Brain Res*. 1986;364:233–240.
- Chen Y, Chen H, Hoffmann A, Cool DR, Diz DI, Chappell MC, Chen AF, Morris M. Adenovirus-mediated small-interference RNA for in vivo silencing of angiotensin AT1a receptors in mouse brain. *Hypertension*. 2006;47:230–237.
- Zanzinger J. Role of nitric oxide in the neural control of cardiovascular function. *Cardiovasc Res*. 1999;43:639–649.
- Dias AC, Vitela M, Colombari E, Mifflin SW. Nitric oxide modulation of glutamatergic, baroreflex, and cardiopulmonary transmission in the nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H256–H262.
- Hirooka Y, Sakai K, Kishi T, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A. Enhanced depressor response to endothelial nitric oxide synthase gene transfer into the nucleus tractus solitarius of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2003;26:325–331.
- Matsuo I, Hirooka Y, Hironaga K, Eshima K, Shigematsu H, Shihara M, Sakai K, Takeshita A. Glutamate release via NO production evoked by NMDA in the NTS enhances hypotension and bradycardia in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280:R1285–R1291.

## Atorvastatin Reduces Oxidative Stress in the Rostral Ventrolateral Medulla of Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats

TAKUYA KISHI, YOSHITAKA HIROOKA,  
HIROAKI SHIMOKAWA, AKIRA TAKESHITA, AND  
KENJI SUNAGAWA

Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Graduate School of  
Medical Sciences, Fukuoka, Japan

*Previously, we demonstrated that atorvastatin has sympatho-inhibitory effects with the upregulation of nitric oxide synthase in the brain in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHRSP), and that reactive oxygen species in the rostral ventrolateral medulla (RVLM), where the vasomotor center is located, mediate the sympatho-excitatory effect. The aim of the present study was to determine if atorvastatin reduces oxidative stress in the RVLM of SHRSP along with the sympatho-inhibitory effect. SHRSP and Wistar-Kyoto (WKY) rats received standard feed with atorvastatin (50mg/kg per day) or standard feed for 30 days. Systolic blood pressure and heart rate were evaluated using the tail-cuff method. Urinary norepinephrine excretion was measured for 24 hours. After 30 days in SHRSP, blood pressure and urinary norepinephrine excretion were significantly lower in the atorvastatin group than in the control group. Thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) levels in the RVLM tissue obtained using the micropunch technique were used as measures of oxidative stress. Prior to the treatment, TBARS levels in the RVLM of SHRSP were significantly higher than those of WKY. After 30 days, TBARS levels in the RVLM of SHRSP were significantly lower in the atorvastatin group than in the control group. After 30 days in WKY, however, there were no differences in blood pressure, urinary norepinephrine excretion, and TBARS levels between the atorvastatin and control groups. These results suggest that atorvastatin reduces oxidative stress in the RVLM of SHRSP, which might contribute to the sympatho-inhibitory effects of atorvastatin in SHRSP.*

**Keywords** statin, hypertension, brain, oxidative stress, sympathetic nervous system

Submitted July 16, 2005; accepted February 27, 2007.

Address correspondence to Yoshitaka Hirooka, M.D., Ph.D., Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan; E-mail: hyoshi@cardiol.med.kyushu-u.ac.jp