

## 論文の内容の要旨

論文題目 肥満高血圧における中枢性昇圧機序

—脳内酸化ストレスを介した交感神経活動の関与の検討—

指導教員 藤田敏郎 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 永江 愛

### 1. 序論

近年、欧米はもとより本邦においても、過食や運動不足などを反映して肥満が急増し、社会問題になっている。さらに肥満によって生じる高血圧、高脂血症、糖尿病の合併はメタボリックシンドロームと呼ばれ、動脈硬化性疾患のリスクとして注目されている。しかし、メタボリックシンドロームの基盤である内臓肥満によって高血圧を生じる機序については、交感神経活動亢進状態、活性酸素種（ROS）産生増大、インスリン抵抗性に基づく高インスリン血症、レニン-アンジオテンシン系（RAS）の亢進などが挙げられ、互いに関連しあって高血圧以外の病態も含めたメタボリックシンドローム全体を形成していると推測されているが、その詳細は十分には明らかされていない。

これらの病態の中で、私は特に交感神経系と酸化ストレスの役割に注目した。高血圧の発症維持において中枢交感神経系が重要な役割を果たしていることは、私の所属研究室を始めとするいくつかの

研究室から肥満以外の高血圧モデルにおいて報告されており、近年になって、脳内酸化ストレス亢進がこの交感神経亢進に重要な役割を果たしている可能性が推測されるようになってきている。しかし、肥満ラットにおける脳内の酸化ストレス亢進に関する報告はわずかであり、さらに交感神経活動と関連付けた報告は皆無である。私は、「肥満ラットの脳内において、NADPH oxidase 活性亢進を介して ROS 産生が上昇しており、それが交感神経系亢進を来たして血圧上昇を引き起こす」という仮説をたてた。本研究では、この仮説を検証する目的で、この仮説を検証する目的で本研究を行なった。

## 2. 実験方法

4 週齢のオス Sprague-Dawley (SD) ラットに 45% の高脂肪食を負荷して肥満モデルを作成し、普通食 (10% 脂肪食) を投与したオス SD ラットを対照として実験を行なった。高脂肪食負荷の影響をみるために①各週で体重、収縮期血圧 (SBP) 測定、②負荷終了時、無麻酔下で大腿動脈カテーテルを用いた観血的な血圧測定、③負荷終了後にメタボリックパラメーター (空腹時血糖、インスリン、レプチン、総コレステロール [TC]、中性脂肪 [TG]、遊離脂肪酸 [FFA]) を評価、④内臓脂肪重量を測定した。次に肥満高血圧モデルにおいて、交感神経活動亢進の有無を検討する目的で、2 週毎に尿中カテコラミン排泄量測定、交感神経節遮断薬であるヘキサメソニウムを経静脈的に投与した際の血圧変化を評価した。さらに、膜透過性 superoxide dismutase (SOD) 様物質 tempol および NADPH oxidase 阻害剤である diphenyleneiodonium (DPI) をウレタン麻酔下かつ人工呼吸下でラットの側脳室内に投与した際の、平均血圧 (MAP)、心拍数 (HR)、腎交感神経活動 (RSNA) の反応の程度を比較検討した。また、lucigenin 化学蛍光発光法により、摘出した脳視床下部における NADPH 添加時の活性酸素の産生 (NADPH oxidase 活性) を測定し

た。さらにreal-time polymerase chain reaction (PCR) 法にて脳視床下部におけるNADPH oxidaseコンポーネントの発現の定量を行い、2群間で比較検討した。

### 3. 結果

高脂肪食負荷ラットの体重は、負荷3週目より普通食ラットに比較して有意に高値を示した ( $P<0.01$ ) 最終的には高脂肪食負荷ラットが  $436.2\pm 5.8\text{g}$ 、普通食ラットが  $391.8\pm 9.0\text{g}$  であった ( $P<0.01$ )。またSBPも体重と同様に負荷3週目より有意な上昇を認め ( $P<0.01$ )、6週目には普通食ラットの  $129.0\pm 2.7\text{mmHg}$  に対して高脂肪食負荷ラットは  $147.8\pm 2.7\text{mmHg}$  と明らかに高値 ( $P<0.01$ ) を示した。同様に観血的測定においても、MAPは高脂肪食負荷ラットで普通食ラットに比較して有意に上昇していた ( $93.7\pm 7.6$  vs.  $113.1\pm 1.7\text{mmHg}$ ,  $P<0.05$ )。高脂肪食負荷ラットの内臓脂肪重量は、精巣上体周囲脂肪 ( $5.3\pm 0.6$  vs.  $9.0\pm 0.6\text{g}$ ,  $P<0.01$ )、後腹膜脂肪 ( $6.1\pm 0.9$  vs.  $12.4\pm 0.8\text{g}$ ,  $P<0.01$ )、腸間膜脂肪 ( $5.6\pm 0.8$  vs.  $8.5\pm 0.4\text{g}$ ,  $P<0.01$ ) のすべてが普通食負荷ラットに比し、有意に増大していた。メタボリックパラメーターに対する高脂肪食負荷の影響としては、6週間負荷後の血糖値は高脂肪食負荷ラットでは高い傾向 ( $P=0.06$ ) があつたが、有意差はつかなかつた。一方、高脂肪食負荷ラットで有意なインスリン値の上昇を認めた ( $P<0.05$ )。また、血清レプチン値も高脂肪食負荷ラットで有意に上昇していた ( $P<0.001$ )。しかし、TC、TG、FFAについては、両群間で違いはみられなかつた。

交感神経活動の指標として測定した尿中エピネフリンおよび尿中ノルエピネフリンは、高脂肪食負荷ラットにおいて、負荷4、6週目において上昇していた。(尿中エピネフリン4週目： $0.15\pm 0.02$  vs.  $0.21\pm 0.02\ \mu\text{g}/24\text{hour}$ ,  $P<0.05$ 、6週目： $0.16\pm 0.02$  vs.  $0.23\pm 0.01\ \mu\text{g}/24\text{hour}$ ,  $P<0.05$ ) (尿中ノルエピネフリン4週目： $0.68\pm 0.09$  vs.  $1.05$

$\pm 0.09 \mu\text{g}/24\text{hour}$ ,  $P < 0.01$ 、6週目： $1.08 \pm 0.11$  vs.  $1.37 \pm 0.04 \mu\text{g}/24\text{hour}$ ,  $P < 0.05$ ）。さらにヘキサメソニウムの静脈内投与による最大の降圧反応は、高脂肪食負荷ラットで普通食負荷ラットに比し有意に大きく ( $-46 \pm 3.5$  vs.  $-62 \pm 1.5\text{mmHg}$ ,  $P < 0.01$ )、高脂肪食負荷ラットで SNA が亢進していることが示唆された。

Tempol を 10 分間かけて脳室内投与したところ、MAP、RSNA および HR の低下を認めた。すべてのラットにおいて、tempol 脳室内投与による MAP、RSNA および HR の抑制反応は用量依存性であったが、その抑制反応は、高脂肪食負荷ラットで有意に大きかった。それぞれの変化率の平均値を算出すると、高脂肪食負荷ラットにおける MAP ( $53 \mu\text{mol/kg}$ ： $-5.5 \pm 2.0$  vs.  $-13.3 \pm 2.1\%$ ,  $P < 0.05$ 、 $105 \mu\text{mol/kg}$ ： $-13.4 \pm 2.4$  vs.  $-32.7 \pm 3.0\%$ ,  $P < 0.01$ )、RSNA ( $53 \mu\text{mol/kg}$ ： $-1.9 \pm 0.5$  vs.  $-8.8 \pm 2.4\%$ ,  $P < 0.05$ 、 $105 \mu\text{mol/kg}$ ： $-5.1 \pm 1.0$  vs.  $-13.4 \pm 1.7\%$ ,  $P < 0.01$ )、ならびに HR の抑制反応 ( $53 \mu\text{mol/kg}$ ： $-0.8 \pm 1.7$  vs.  $-7.9 \pm 1.8\%$ ,  $P < 0.05$ 、 $105 \mu\text{mol/kg}$ ： $-4.5 \pm 0.6$  vs.  $-13.4 \pm 3.1\%$ ,  $P < 0.05$ ) いずれもが普通食負荷ラットに比し有意に大きかった。また、NADPH oxidase 阻害剤である DPI の脳室内投与に対して普通食負荷ラットでは MAP、RSNA および HR は有意の変化を示さなかったが、高脂肪食負荷ラットではこれらのパラメーターの抑制反応を認めた。実際、DPI 脳室内投与による MAP と RSNA の反応は、両群で有意の差異を認めた (MAP： $-0.04 \pm 0.15$  vs.  $-22.8 \pm 3.82\%$ ,  $P < 0.01$ 、RSNA： $-0.01 \pm 1.71$  vs.  $-7.16 \pm 1.06\%$ ,  $P < 0.05$ )。しかし、HR の反応は、高脂肪食負荷ラットで大きい傾向はあるものの、個体差が大きく有意差は認められなかった ( $-0.62 \pm 0.83$  vs.  $-2.32 \pm 0.74\%$ )。

視床下部における NADPH oxidase 活性は、高脂肪食負荷ラットにおいて有意に亢進していた ( $2.20 \pm 0.11 \times 10^6$  vs.  $3.30 \pm 0.18 \times 10^6\text{RLU}/10\text{min.}/\text{g}$ ;  $P < 0.01$ )。

さらに、NADPH oxidase コンポーネントである  $p22^{\text{phox}}$  ( $P < 0.05$ )、

p47<sup>phox</sup> (P<0.05) および gp91<sup>phox</sup> (P<0.01) の視床下部における mRNA 発現は、高脂肪食負荷ラットにおいて有意の上昇を認めた。

#### 4. 考察

高脂肪食を負荷したラットは、肥満と軽度の血圧上昇を認め、血中インスリンとレプチンの上昇を伴い、肥満高血圧モデルと考えられた。さらに、高脂肪食負荷ラットにおいて、尿中エピネフリンおよび尿中ノルエピネフリンの上昇を認め、ヘキサメソニウムの静脈内投与による降圧反応は、高脂肪食負荷ラットで普通食負荷ラットに比し有意に大きかったことより、本実験の肥満高血圧ラットの交感神経活動は亢進していることが示唆された。

また、tempol の脳室内投与により、MAP、HR、RSNA のいずれも、用量依存性に抑制され、その反応の程度は高脂肪食ラットにおいて普通食ラットに比べ有意に大きかった。DPI の脳室内投与に対して普通食負荷ラットでは血圧、RSNA および HR は有意の変化を示さなかったが、高脂肪食負荷ラットではこれらのパラメーターの抑制反応を認めた。さらに視床下部における活性酸素産生は、高脂肪食負荷ラットにおいて有意に亢進しており、NADPH oxidase コンポーネントである p22<sup>phox</sup>、p47<sup>phox</sup>、gp91<sup>phox</sup> の mRNA 発現も高脂肪食ラットで有意な亢進を認めた。

以上の結果より、高脂肪食負荷により内臓肥満を来したラットでは、脳内の NADPH oxidase 由来の酸化ストレスが上昇し、このため中枢性交感神経活動亢進を生じて高血圧を来している可能性が示唆された。このように、肥満高血圧モデルにおいて中枢性血圧調節機構として重要な視床下部における酸化ストレスレベルに注目し交感神経系との関係を明らかにしたのは本研究がはじめてである。