

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19500699

研究課題名（和文）塩分過剰摂取による脳血管脆弱化の機序解明

研究課題名（英文）Mechanism involved in brain vessel impairments caused by salt over intake

研究代表者

東野 英明（HIGASHINO HIDEAKI）

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：40122098

研究成果の概要（和文）：

0.2%の M-SHRSP 低塩群で、脳卒中の発症や致死率と脳病変変化が高食塩群よりも抑制されていた。3%トリクロロメチアジド（TCM）の M-SHRSP への投与は、脳卒中発症抑制、eNOS, nNOS mRNA 発現上昇、Nox1, p22phox mRNA 発現低下、白血球での superoxide 産生低下、腎内動脈線維化抑制作用を示した。4.0%食塩負荷で増加した遺伝子に KS, Sgnc1, Hspa9a, Srpr が、低下したものに gi in PPAR signaling passway, complete cds.[AY539885]があり、何れもシグナル伝達に必須の遺伝子で、総じて食塩過剰摂取は血管機能に悪影響を与えることを示した。

研究成果の概要（英文）：

M-SHRSP given the food containing 0.2% sodium chloride showed lower incidences of brain stroke, lower fatal rates, lighter pathological changes in cerebral vessel than those of the rats feed foods containing much salt. M-SHRSP given 3.0% trichloro-methiazide (TCM) were inhibited the incidence of brain stroke. The expressions of eNOS, and nNOS mRNAs were elevated, and NOx1 and p22phox RNAs, superoxide production and fibrous changes in the kidney were inhibited by dosing of TCM. KS, Sgnc1 mRNAs were increased at the cortex of kidney in 6- and 9-week-old WKY and SHRSP given 4.0% sodium chloride for 2 days. New knowledge regarding unfavorable salt effects was obtained as above.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活

1. 研究開始当初の背景

これまでの疫学的研究や臨床研究などの

結果から、塩分の摂取量と脳血管障害との間に有意な相関がみられることが示されて

いた(Stroke 26; 783-789, 1995, Stroke 35: 1543-1547, 2004)。また、Perry らは、塩分の過剰摂取は、血圧と無関係に脳血管障害のリスクを高める可能性を報告した(J Hum Hypertens 6; 23-25, 1992)。従来、塩分の過剰摂取は、循環血液量の増加による脳血管へのシェアストレスの増大が血管の変性や壊死を誘導し、血管の破綻へと導くと考えられていた。しかし、それらが脳血管の脆弱化や破綻に直接結びつく明確な機序は解明されていなかった。我々のこれまでの研究から、脳卒中を発症する高血圧ラット SHRSP に高塩分食を与えると、(1)脳血管でのスーパーオキシド産生の亢進、(2)脳血管周囲の著明なマクロファージの浸潤、(3)マクロファージ浸潤部位でのマトリックス・メタロプロテアーゼ(MMP)の活性亢進、(4)脳微小血管の中膜菲薄化などが明らかとなっていた(第 79 回日本薬理学会年会[横浜, 2006])。また、食塩感受性高血圧ラットを用いた他のグループの研究でも、高塩分餌を与えると、大動脈や脳血管でのスーパーオキシド産生が亢進し、内皮型 NO 合成酵素(eNOS)の発現や活性が低下するため、血管における酸化ストレスが増大することが報告されていた(Am J Physiol 279; H7-H14, 2000, Br J Pharmacol 134; 737-744, 2001)。これらの事実から、塩分の過剰摂取が脳血管での酸化ストレスを増大させ、炎症性変化を誘導することにより、脳血管を脆弱化させている可能性が示唆されていた。そこで、塩分過剰摂取による脳血管の炎症性変化や脆弱化につながる新たな分子病態機構を明らかにすることができれば、脳卒中における塩分制限の重要性の科学的理解、標的分子治療の開発などにつながり、より選択的かつ強力な脳卒中の予防あるいは治療につながるものと期待できた。

2. 研究の目的

上述のように、塩分の過剰摂取による脳血管での酸化ストレスの増大が、脳血管でのスーパーオキシド産生亢進や内皮型 NO 合成酵素の活性低下につながるのかのメカニズムは未だ解明されていない。近年、Sanders が、血管へのシェアストレスが高まると内皮細胞内の p38 MAPK や p42/44 MAPK などの MAP キナーゼが活性化すると報告しており(Hypertension 43; 142-146, 2004)、そうした細胞内シグナル伝達系分子の関与も示唆される。しかし、現在明らかになっている細胞内シグナル伝達系分子は多種多岐にわたっているため、従来の生化学的研究手

法では解析が困難である。そのため、DNA マイクロアレイを用いて、塩分の過剰摂取により脳血管で発現が強く誘導され、血管での酸化ストレス増大や炎症・脆弱化につながる遺伝子の探索を行い、詳細なメカニズムの解明につなげたい。

3. 研究の方法

(1) 食塩負荷が生体に及ぼす影響の観察

ヒトでの結果と比肩できる結果を得るために、低塩群 0.2%、普通塩群 0.4%、高塩群 0.8%として日本クレア社製ラット粉末飼料(0.2%NaCl)に食塩を添加して、脳卒中意発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)よりも高血圧や脳卒中が早期にそして高度に発症する悪性 SHRSP (M-SHRSP) に 6 週間の慢性経口負荷実験を実施した。

(2) サイアザイド系利尿薬トリクロルメチアジド(TCM)の血管保護作用に関する研究

M-SHRSP を対照群(n=16): 船橋 SP 粉末飼料投与、0.3%TCM 混餌群(n=17)、3.0%TCM 混餌群(n=16)の 3 群に分け、5 週齢時より 7 週間投与した。血圧(尾カフ法)を毎週測定し、脳卒中発症を推定するため体重を毎日測定し、脳卒中発症時にみられる神経症状(四肢の麻痺、過敏性、興奮性など)を観察した。死亡時や屠殺時に臓器重量の測定、剖検を行い、その際に胸部大動脈を摘出して total RNA を抽出し、一酸化窒素合成酵素(eNOS, iNOS, nNOS)および NADPH oxidase サブユニット(Nox1, Nox2, Nox4, p22phox, p47phox)の mRNA を RT-PCR 法にて測定した。好中球・単球の細胞内 superoxide 産生量をヒドロキシエチジンの酸化を指標に FACScan を用いて測定した。

(3) 食塩負荷が遺伝子発現に及ぼす影響の観察

6 週齢と 9 週齢の SHRSP と WKY に 0.2%と 4.0%食塩含有食を 2 日間給餌した後に腎を摘出し、腎皮質から抽出した mRNA 分画を用いて、ラット全遺伝子 DNA アレイ(Agilent 社製 x44k)を用いて低塩食群と高塩食群との間で特異的に発現している遺伝子を抽出した。

4. 研究成果

(1) 血圧、心拍数、体重、血中アルドステロン値には各群間で差異を生じなかったが、脳卒中の発症や致死率が低塩群で抑制された(図 1)が、高塩群では普通塩群と差異が無かった。塩負荷量にともない、白血球増

多、赤血球減少傾向が観察された。また、塩負荷量に伴い、屠殺時の脳、心、腎重量増加が観察された（図 2）。低塩食群では脳内血管壊死を含む脳病変変化が抑制されていた。したがって、0.4%の普通塩群でも塩の良くない作用が生体に及ぶことが明らかとなった。

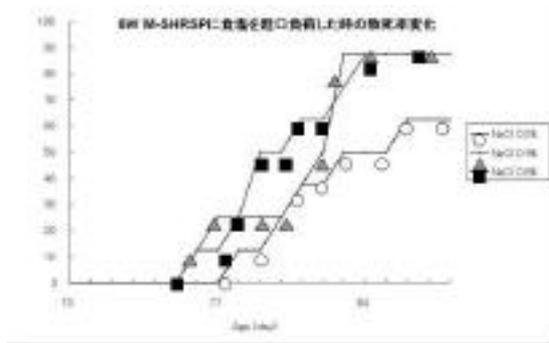


図 1. 負荷食塩増減による致死率への影響

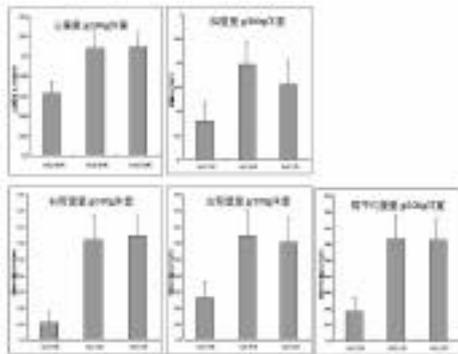


図 2. 死亡、屠殺時の心、脳、腎重量

(2) TCM 高用量投与群では投与 2 週間後より対照群に比し、血圧を低下させ、脳卒中発症を抑制した（図 3）。胸部大動脈の eNOS, nNOS mRNA 発現を濃度依存的に上昇させ、Nox1, p22phox mRNA 発現を濃度依存的に低下させ、また、好中球・単球の superoxide 産生能を低下させた。動脈硬化の進展を示す腎内動脈の線維化（ワンギーソン染色）は顕著に抑制された（図 4）。したがって、TCM は、臓器や血球における酸化ストレスの抑制を介して臓器保護を図ることが明らかとなった。

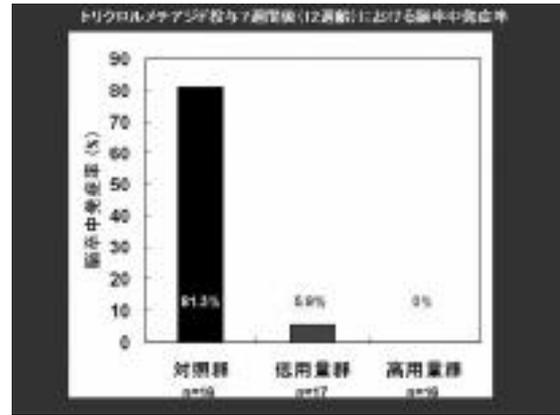


図 3. TCM の脳卒中発症抑制結果

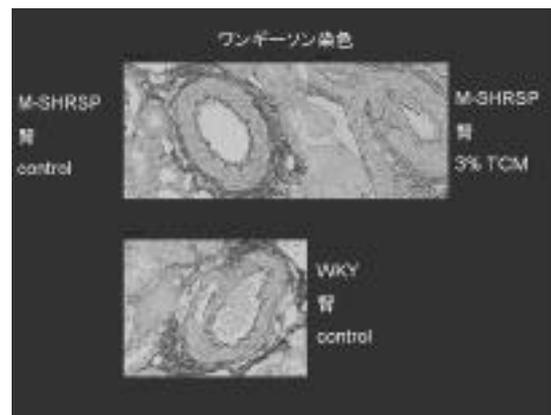


図 4. TCM による腎内動脈線維化抑制

(3) 6 週齢と 9 週齢の双方の WKY で食塩負荷により増大した遺伝子数は 48、低下した遺伝子数は 6、6 週齢と 9 週齢の双方の SHRSP で食塩負荷により増大した遺伝子数は 2,044、低下した遺伝子数は 8 であった。その内、WKY と SHRSP の双方で共通して増加した遺伝子数は 5 で KS (kidney specific protein), Sgne1 (secretory granule neuroendocrine protein 1, Hspa9a (heart shock 70kDa protein 9A), Srpr (signal recognition particle receptor ('docking protein'))が、減少したのは 0 であった。WKY または SHRSP のどちらかで低下した 14 遺伝子の内、機能が明らかになっているものには UI-R-A1-ea-c-06-0-UI 3' similar to gi in PPAR signaling passway, RGIAB40 3' end similar to ribosomal RNA, complete cds.[AY539885]があり、一方、高発現であった遺伝子には、Eef1a1 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1), Bex4 (brain expressed X-linked 4), Art2b (ADP-ribosyltransferase 2b), eEF1A-1 (elongation factor Tu), Deadc1 (deaminase domain containing 1), Polr2d (polymerase

II polypeptide D mRNA), Gng10 (guanine nucleotide binding protein mRNA), Slc2a5 (Solute carrier family 2, member 5)などがあつた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

MS.Ashenagar, M.Tabuchi, K.Kinoshita, K.Ooshima, A.Niwa, Y.Watanabe, M.Yoshida, K.Shimada, T.Yasunaga, H.Yamanishi, H.Higashino, Gene expression in the adrenal glands of three spontaneously hypertensive rat substrains, Molecular Medicine Reports, 査読有、Vol.3, No.2, 2010, pp.213-222.

T.Ishizuka, A.Niwa, M.Tabuchi, K.Ooshima, H.Higashino, Acetylsalicylic acid provides cerebrovascular protection from oxidant damage in salt-loaded stroke-prone rats, Life Science, 査読有、Vol.82, 2008, pp.806-815.

T.Ishizuka, A.Niwa, M.Tabuchi, Y.Nagatani, K.Ooshima, H.Higashino, Involvement of thromboxane A2 receptor in the cerebrovascular damage of salt-loaded, stroke-prone rats, J Hypertens, 査読有、Vol.25, No.4, 2007, pp.861-870.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

東野 英明 (HIGASHINO HIDEAKI)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：40122098

(2)研究分担者

丹羽 淳子 (NIWA ATSUKO)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：60122082

田淵 正樹 (TABUCHI MASAKI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20340771

大島 佳奈 (OOSHIMA KANA)

近畿大学・医学部・助手

研究者番号：60278653