

## 血管周囲神経リモデリングにおけるアンジオテンシン受容体の役割

芳原成美,<sup>\*,a</sup> 合田光寛,<sup>b</sup> 橋川直也,<sup>a</sup> 金 鑫,<sup>b</sup>  
座間味義人,<sup>c</sup> 高取真吾,<sup>b</sup> 川崎博己<sup>b</sup>

## Role of Angiotensin Receptors on Remodeling Perivascular Nerves

Narumi HOBARA,<sup>\*,a</sup> Mitsuhiro GODA,<sup>b</sup> Naoya HASHIKAWA,<sup>a</sup> Xin JIN,<sup>b</sup>  
Yoshito ZAMAMI,<sup>c</sup> Shingo TAKATORI,<sup>b</sup> and Hiromu KAWASAKI<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Life Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan, <sup>b</sup>Department of Clinical Pharmaceutical Science, and <sup>c</sup>Department of Molecular Design of Medicine, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan

(Received June 15, 2010)

The aim of this study was to investigate age-related changes in the density of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve fibers in spontaneously hypertensive rats (SHR) and the effects of long-term inhibition of the renin-angiotensin system on these changes. An age-related decrease in the density of CGRP-like immunoreactive (LI)-containing nerve fibers but not neuropeptide Y (NPY)-LI-containing sympathetic nerve fibers was found in the mesenteric artery of SHR but not Wistar-Kyoto rats (WKY). The density of NPY-LI-containing nerve fibers was significantly greater in SHR than in WKY. SHR were treated for 7 weeks with angiotensin-converting enzyme inhibitor (0.005% temocapril), angiotensin II type-1 (AT1) receptor antagonist (0.025% losartan), or vasodilator (0.01% hydralazine) in their drinking water. Each drug treatment significantly lowered the systolic blood pressure measured using the tail-cuff method. Long-term treatment of SHR with temocapril and losartan significantly increased the density of CGRP-LI-containing nerve fibers in mesenteric arteries. Furthermore, to clarify the effect of the angiotensin II type-2 (AT2) receptor in the restoration of perivascular nerve innervation, we used the phenol-injured rat model, in which the perivascular nerves are markedly reduced by the topical application of phenol. Activation of AT2R significantly restored CGRP-LI innervation in phenol-injured rats. These results suggest that selective stimulation of AT2 receptors facilitates reinnervation of mesenteric perivascular CGRP-containing nerves.

**Key words**—hypertension; angiotensin II type 2 receptor; renin-angiotensin system; calcitonin gene-related peptide; nerve regeneration

## 1. はじめに

高血圧症の大部分を占める本態性高血圧は末梢血管抵抗の異常緊張に基づくと考えられているが、その原因はいまだ不明である。血管はその緊張を変化させて生体の臓器機能を支える重要な要素である臓器血流量を調節している。血管周囲神経にはノルアドレナリンを伝達物質とする血管収縮性の交感神経が主に分布し、アセチルコリンを伝達物質とする副

交感神経はほとんど分布していない。しかし近年、血管に非アドレナリン・非コリン性 (nonadrenergic noncholinergic; NANC) 神経が分布し、血管緊張度調節に関与していることが明らかにされている。<sup>1)</sup> NANC 神経には、交感神経や副交感神経においてノルアドレナリンやアセチルコリンの co-transmitter として共存すると考えられている物質を伝達物質とするものや、知覚神経に含まれる遠心性機能を有すると考えられているものが含まれる。

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide; CGRP) は主に脊髄後根神経節 (dorsal root ganglia; DRG) で産生され、カプサイシン感受性の知覚神経に含まれる。CGRP 含有神経は終末で遊離され、血管平滑筋上に存在する

<sup>a</sup>岡山理科大学理学部臨床生命科学科 (〒700-0005 岡山市北区理大町 1-1), <sup>b</sup>岡山大学大学院医歯薬総合研究科臨床薬学, <sup>c</sup>同医薬分子設計学 (〒700-8530 岡山市北区津島中 1-1-1)

\*e-mail: hobara@dls.ous.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S52 で発表したものを中心に記述したものである。

CGRP 受容体を介して強力な血管拡張作用を示し、交感神経との相反作用による抵抗血管の緊張調節に関与していることが報告されている。

高血圧自然発症モデルラット (spontaneously hypertensive rats; SHR) は加齢とともに高血圧を自然発症する本態性高血圧の優れたモデルラットである。そこで本研究において SHR を用いて CGRP 含有神経と交感神経分布の加齢による変化を検討し、また降圧薬長期投与における影響についても検討を行った。さらに人為的に血管周囲神経を損傷させる phenol による神経障害モデルラットを作製し、CGRP 神経再分布作用についてアンジオテンシン受容体に着目して検討を行った。

## 2. SHR 及び WKY における CGRP 含有神経分布の加齢に伴う変化

SHR 及び対照として正常血圧ラット (Wistar Kyoto; WKY) を用い、4, 8, 15, 22 週齢時の腸間膜動脈における CGRP 含有神経を免疫染色し検討を行った。また血管収縮作用を示すペプチドである neuropeptide Y (NPY) を交感神経の指標として用いた。SHR 及び WKY の収縮期血圧の変化を Table 1 に示す。SHR の血圧は 4 週齢では WKY と比べて同程度であったが、8 週齢から高い値を示し始め、15, 22 週齢を通して高血圧を維持した。NPY 含有神経及び CGRP 含有神経分布の加齢に伴う変化を Fig. 1 に示す。NPY 含有神経はいずれの週齢においても WKY に比較して SHR において高い値を示した。一方 CGRP 含有神経は高血圧を発症する前の 4 週齢において SHR で分布量の有意な増加を示した。しかしながら加齢とともに減少し、22 週齢においては WKY とほぼ同程度にまで減少がみられた。このことから SHR においては加齢とともに CGRP 含有神経分布量が減少し、これが高血圧の発展と維持に関与している可能性が示唆され

Table 1. Age-related Changes in Systolic Blood Pressure of SHR and WKY

	4 weeks old (n=6) mmHg	8 weeks old (n=6) mmHg	15 weeks old (n=6) mmHg	22 weeks old (n=5) mmHg
SHR	113.0±7.5	172.0±4.9*	197.3±1.5*	201.9±3.6*
WKY	98.7±8.3	100.0±4.7	107.0±3.2	127.3±6.9

Values are mean±S.E.M. \* $p<0.01$  vs. WKY.

た。交感神経と CGRP 神経は相反的に抑制することによって血管の緊張度の調節に関与していると考えられている。したがって、本実験で観察された若い週齢 (4 週齢) の SHR における CGRP 含有神経の分布密度が WKY に比べ著明に高い理由として、遺伝的に増加する交感神経機能を抑制するために起こっている可能性が示唆される。しかし、SHR において CGRP 神経分布は加齢するにしたがって減少するため、加齢に伴って起こる交感神経機能亢進の原因になっていると考えられる。交感神経機能を抑制する CGRP 含有神経の分布減少は高血圧発症進展に重要な役割を担っていると考えられる。以上の結果より、SHR では血管周囲神経分布が変化する神経リモデリングを生じ、これが高血圧進展に寄与していると考えられる。

## 3. SHR における CGRP 及び NPY 含有神経分布に及ぼす降圧薬長期投与による影響

SHR においては加齢とともに CGRP 含有神経の分布量が減少することが明らかとなった。レニン・アンジオテンシン系阻害薬を SHR に長期間投与することによって CGRP 含有神経機能の減弱が改善されることが既に報告されている。<sup>2)</sup>そこで、SHR に ACE 阻害薬である temocapril, AT1 受容体拮抗薬である losartan, 血管拡張薬である hydralazine を 7 週間 SHR に投与し CGRP 含有神経及び NPY 含有神経分布の変化について検討を行った。薬物投

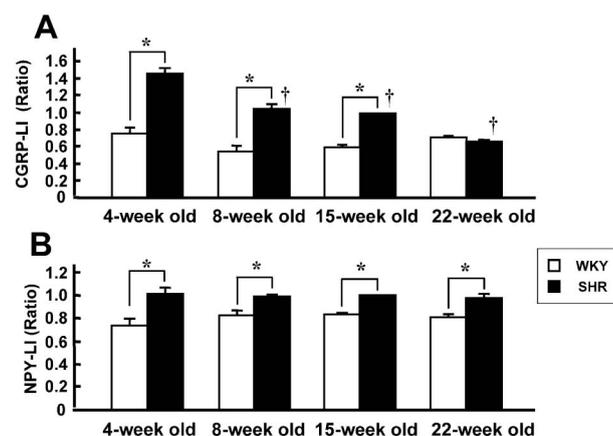


Fig. 1. Age-related Changes in Density of Perivascular Nerve Fibers in WKY and SHR

Bar graphs showing age-related changes in density of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactive (LI)-(A) and neuropeptide-Y (NPY)-LI-(B) containing nerve fibers in the mesenteric arteries of 4, 8, 15, 22 week-old SHR and WKY. The vertical scale indicates the fold increase over the value in the 15-week-old SHR. Each bar indicates mean±S.E.M. of 5-6 rats. \* $p<0.01$  vs. WKY. † $p<0.01$  vs. 4 week-old SHR.

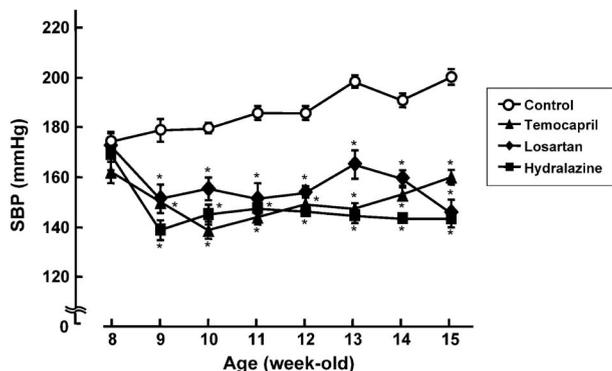


Fig. 2. Changes in Systolic Blood Pressure

Changes in systolic blood pressure (SBP) after 7-week treatment with various anti-hypertensive drugs in SHR. Each point indicates the mean  $\pm$  S.E.M. of 5 rats. \* $p < 0.01$  vs. non-treated SHR (Control).

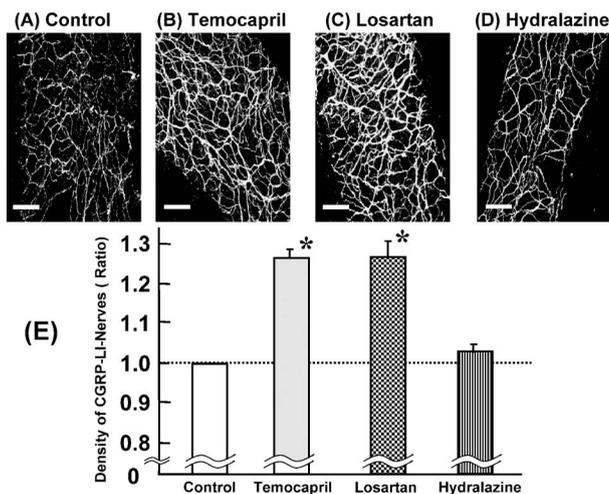


Fig. 3. Changes in Density of CGRP-LI Nerve Fibers

Effect of 7-week treatment with temocapril (B), losartan (C) or hydralazine (D) on the density of CGRP-like immunoreactive (LI)-containing nerve fibers in the mesenteric arteries of SHR. A horizontal bar in the left lower corner of each panel indicates 100  $\mu$ m. In E, the vertical scale indicates the fold increase over the value in non-treated SHR. Each bar indicates the mean  $\pm$  S.E.M. of 5 experiments. \* $p < 0.01$  vs. non-treated SHR (Control, A).

与後 1 週間目において、control 群と比べ、薬物投与群において有意な血圧の低下がみられた (Fig. 2)。薬物投与 7 週間後において NPY 含有神経分布はいずれの薬物投与によっても変化がみられなかった。しかしながら CGRP 含有神経分布は temocapril 及び losartan 投与群において有意な分布量の増加がみられた。一方 hydralazine では変化がみられなかったこと (Fig. 3) から単なる血圧の低下が CGRP 含有神経に影響を及ぼしたのではなく、レニン・アンジオテンシン系が関与している可能性が示唆された。これらの結果より、レニン・アンジオ

テンシン系の長期抑制は、CGRP 含有神経分布密度を増加させる可能性が示唆された。

#### 4. Phenol を用いた血管周囲神経損傷モデルラットの作製

高血圧の発症に血管周囲神経のリモデリングが関与する可能性は示唆されたが、リモデリングを抑制する薬物の探索を行うにあたって、SHR を長期間飼育し実験を行うのは、時間と労力ともに負担が大きくなる。そこで実験的に血管周囲神経のリモデリングを起こす方法の開発を試みた。神経を変性させる物質としてタンパク変性剤である phenol を用いた。8 週齢の Wistar 系雄性ラットをペントバルビタール麻酔下にて開腹し、腹部大動脈と上腸間膜動脈の分岐部に 10% phenol 溶液を塗布し (Fig. 4)、閉腹した。手術 3-14 日後に麻酔下にて開腹し、phenol 塗布部から遠位の腸管付近の小動脈を摘出固定し、血管周囲神経分布を免疫組織化学的に定量化した。その結果、術後 3 日目から血管拡張性神経である CGRP 含有神経の分布が Sham ラットに比べ有意に減少していた。また、交感神経に含まれるニューロペプチド Y (NPY) 含有神経分布量は術後 5 日目に有意な減少がみられた。これら神経の分布減少は術後 14 日まで持続してみられた (Fig. 5)。さらに、同モデルに神経成長因子 (NGF) を Phenol 塗布術後 7 日間持続投与した結果、CGRP 神経及び NPY 神経は Sham 群と同様のレベルまで回復し、血管周囲神経が再分布することが明らかとなった。<sup>3)</sup> 以上の結果より血管周囲神経リモデリングを実験的に起こすことに成功し、なおかつ NGF 投与により神経分布が正常レベルにまで回復したことから、本モデルは新たな血管周囲神経伸長作用を有す薬物を探索するのに有効な実験モデルであると考えられる。

#### 5. 血管周囲神経の再分布とアンジオテンシン受容体の役割

Angiotensin II (Ang II) は強力な血管収縮作用、交感神経亢進作用、細胞増殖作用などを示すペプチドで、その作用発現には Angiotensin II type 1 receptor (AT1R) と Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) という 2 つの主なサブタイプ受容体を介する。Ang II の代表的なほとんどの作用は AT1R を介する。一方、AT2R は血管弛緩作用、Na 排泄促進、細胞増殖抑制といった作用を介し、AT1R の

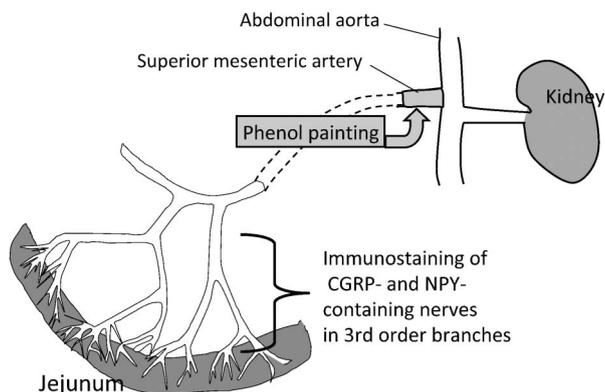


Fig. 4. Phenol Treatment Protocol

Illustrating shows phenol treatment protocol. Briefly, under anesthesia with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), an abdominal midline incision was made in the animals, and the superior mesenteric artery proximal to bifurcation from the abdominal aorta was carefully exposed and topically painted with 10% phenol solution (in 90% alcohol-saline) using a cotton bud. To examine the influence of the operation, sham-operated rats underwent the same surgical procedures but with painting with vehicle (saline or 90% alcohol without including phenol) instead of phenol solution.

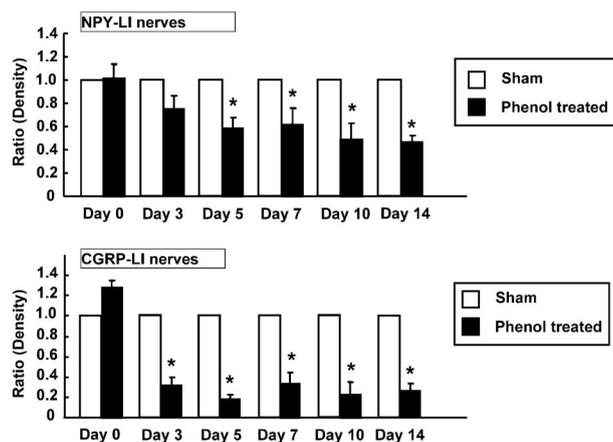


Fig. 5. Changes in Density of Perivascular nerve Fibers by Phenol Treatment

Bar graphs showing changes in the density of NPY-LI- and CGRP-LI-containing nerve fibers in distal mesenteric arteries after topical phenol treatment of the superior mesenteric artery. The vertical scale indicates the fold increase over the value in the sham control. Each bar indicates mean  $\pm$  S.E.M. of five to eight experiments. \* $p < 0.05$  vs. sham control.

作用に対して相反的な役割を示すことが明らかにされている<sup>4-6</sup>。SHR にレニン・アンジオテンシン系阻害薬を長期間投与することで加齢による CGRP 神経リモデリングが抑制されることは既に述べた。そこで次に phenol 局所塗布ラットを用いてラット腸間膜動脈における AT<sub>2</sub> 受容体を介した神経再生作用について検討を行った。本実験においては、losartan 投与下 (AT<sub>1</sub>R 遮断下) に angiotensin II を投与し、AT<sub>2</sub>R を刺激した。また、AT<sub>2</sub>R の関与を

確認するために AT<sub>2</sub>R 拮抗薬である PD123319 を用い、phenol 局所塗布法による血管周囲神経リモデリングモデルラットに投与を行った。

その結果 CGRP 含有神経分布量は Ang II + losartan 群において saline 投与群 (対照群) と比べて有意な増加がみられた。また、Ang II + losartan + PD123319 群においては Ang II + losartan 群でみられたような神経の増加はみられず、CGRP 神経再分布には AT<sub>2</sub>R が関与していることが示唆された。NPY 含有神経分布量はいずれの薬物投与群でも有意な変化は得られなかった。<sup>7</sup> AT<sub>2</sub>R の細胞内情報伝達系はまだ明らかにされていない部分が多い。MAPK (mitogen-activated protein kinase) を介して、cell survival factor である Bcl-2 のリン酸化反応を抑制して<sup>8</sup> アポトーシスを起こすことが報告されている。この AT<sub>2</sub>R 刺激によりアポトーシスを起こすという報告は神経培養細胞を用いた実験系において数多く報告されている。<sup>8-10</sup> 一方、他の研究においては特に *in vivo* 系研究において、AT<sub>2</sub>R 刺激により神経細胞の増加、再分布が観察されるという報告が多い。<sup>11,12</sup> AT<sub>2</sub>R におけるアポトーシスと神経再分布という正反対の機序については依然として不明であるが、Lucius らは、神経が傷害を受けたとき、最初にアポトーシスと神経再分布が両方同時に働く分子機構が起こることを考察している。<sup>13</sup> 本実験は *in vivo* 系で AT<sub>2</sub>R 刺激により CGRP 含有神経の再生が観察されており、SHR に AT<sub>1</sub>R 拮抗薬を長期間投与することで CGRP 含有神経分布増加が観察された結果とよく一致する。

## 6. おわりに

SHR においては加齢とともに、CGRP 含有神経の分布量減少 (神経リモデリング) が起こっており、これが高血圧の発展・維持に関与していると考えられる。

AT<sub>2</sub>R 刺激においては交感神経の分布量を増加することなく、CGRP 含有神経のみを増加させることが観察された。これらのことから CGRP 含有神経分布量は AT<sub>2</sub>R によって調節されている可能性が示唆された。本実験において、血管周囲神経の再分布を起こす物質が存在することを明らかにしたことは、血管周囲神経リモデリングを改善する作用を併せ持つ、新たな抗高血圧薬の創薬開発に大きな貢献をもたらすと考えられる。

**謝辞** 本研究に際して終始御懇篤なるご指導を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科臨床薬学教室・川崎博己教授，共同研究者の大塚愛二教授，見尾光庸教授，橋川直也講師，堀部正記学士，合田光寛修士，吉田菜三夏修士らの協力により行うことができました。この場を借りて心より御礼申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Kawasaki H., Takasaki K., Saito A., Goto K., *Nature*, **335**, 164–167 (1988).
- 2) Kawasaki H., Takenaga M., Araki H., Futagami K., Gomita Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **284**, 508–515 (1998).
- 3) Hobara N., Goda M., Kitamura Y., Takayama F., Kawasaki H., *Neuroscience*, **141**, 1087–1099 (2006).
- 4) Arima S., Endo Y., Yaoita H., Omata K., Ogawa S., Tsunoda K., Abe M., Takeuchi K., Abe K., Ito S., *J. Clin. Invest.*, **100**, 2816–2823 (1997).
- 5) Nakajima M., Hutchinson H. G., Fujinaga M., Hayashida W., Morishita R., Zhang L., Horiuchi M., Pratt R. E., Dzau V. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 10663–10667 (1995).
- 6) Siragy H. M., Inagami T., Ichiki T., Carey R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6506–6510 (1999).
- 7) Hobara N., Goda M., Yoshida N., Takatori S., Kitamura Y., Mio M., Kawasaki H., *Neuroscience*, **150**, 730–741 (2007).
- 8) Horiuchi M., Hayashida W., Kambe T., Yamada T., Dzau V. J., *J. Biol. Chem.*, **272**, 19022–19026 (1997).
- 9) Yamada T., Horiuchi M., Dzau V. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 156–160 (1996).
- 10) Tanaka M., Ohnishi J., Ozawa Y., Sugimoto M., Usuki S., Naruse M., Murakami K., Miyazaki H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**, 593–598 (1995).
- 11) Nio Y., Matsubara H., Murasawa S., Kanasaki M., Inada M., *J. Clin. Invest.*, **95**, 46–54 (1995).
- 12) Gallinat S., Yu M., Dorst A., Unger T., Herdegen T., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **57**, 111–122 (1998).
- 13) Lucius R., Gallinat S., Rosenstiel P., Herdegen T., Sievers J., Unger T., *J. Exp. Med.*, **188**, 661–670 (1998).