

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

芳原成美,^{*a} 合田光寛,^b 吉田菜三夏,^b 橋川直也,^a 川崎博己^b

Regeneration of Perivascular Nerve and Role of Angiotensin Receptors

Narumi HOBARA,^{*a} Mitsuhiro GODA,^b Namika YOSHIDA,^b
Naoya HASHIKAWA,^a and Hiromu KAWASAKI^b^aDepartment of Life Science, Okayama University of Science, 1-1 Ridai-cho, Kita-ku, Okayama 700-0005, Japan, and ^bDepartment of Clinical Pharmaceutical Science, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan

(Received March 31, 2010)

The present study was designed to investigate involvement of angiotensin (Ang) II type 2 receptors (AT2R) in restoration of perivascular nerve innervation injured by topical phenol treatment. Male Wistar rats underwent *in vivo* topical application of 10% phenol around the superior mesenteric artery to induce nerve injury. Phenol treatment markedly reduced densities of both calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactivity (LI)- and neuropeptide Y (NPY)-LI-containing fibers. NGF restored densities of both nerve fibers to the Sham control level. Coadministration of Ang II and losartan (AT1R antagonist) significantly increased the density of CGRP-LI-fibers but not NPY-LI-fibers compared with saline control. The increase of the density of CGRP-LI-fibers by coadministration of Ang II and losartan was suppressed by adding PD123319 (AT2R antagonist). Furthermore, NGF-induced CGRP-LI nerve regeneration was inhibited by PD123319 treatment. NGF-induced increase of AT2R mRNA level was significantly suppressed by AT1R antagonist treatment in phenol treated rats dorsal root ganglia. These results suggest that selective stimulation of AT2R by Ang II facilitates reinnervation of mesenteric perivascular CGRP-containing nerves injured by topical phenol application in the rat.

Key words—angiotensin II type 2 receptor; nerve growth factor (NGF); calcitonin gene-related peptide (CGRP); nerve regeneration

1. はじめに

血管周囲神経は血管緊張を維持し、血圧の調節・維持に重要な役割を果たしているが、その調節異常は高血圧発症の要因と考えられている。われわれはこれまでに高血圧自然発症ラット (SHR) において、血管拡張性神経であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 含有神経の分布量と機能が加齢に従って減少する血管周囲神経リモデリング説を提唱し、高血圧の進展維持に関与している可能性を示唆している。¹⁾ さらに、SHR に ACE 阻害薬 (temocapril) あるいは AT1 受容体拮抗薬 (losartan) を長期間投与することによって、血管拡張性神経であ

る CGRP 含有神経分布量、及び脊髄後根神経節における CGRP mRNA 量が増加することを明らかにしてきた。^{1,2)} この神経分布量の増加は、hydralazine 投与群ではみられなかったことから、単なる血圧の低下が神経分布促進を起こすわけではなく、レニン-アンジオテンシン系が関与する可能性が考えられる。Angiotensin II (Ang II) 受容体には type 1 receptor (AT1R) と type 2 receptor (AT2R) が存在するが、AT2R は細胞増殖や神経再生に関与していることが明らかとなっている。そこでわれわれは、SHR の加齢に伴う CGRP 含有神経の分布減少に AT2R の関与があると推察した。ラットを長期間飼育し、加齢による神経の分布減少を観察するのは時間・労力ともに困難なため、人為的に神経分布の減少を起こす血管周囲神経リモデリングモデルラットを作製し、このモデルラットを用いて抵抗血管周囲神経の分布再生に対する AT2R の役割について検

^a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), ^b岡山大学大学院医歯薬総合研究科臨床薬学 (〒700-8530 岡山市北区津島中 1-1-1)

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

本総説は、平成 21 年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

討した。

2. 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の作製

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、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 (Fig. 1)。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。術後7日目において、摘出腸間膜動脈灌流標本の血管周囲神経経壁電気刺激 (PNS) による交感神経性収縮反応とノルエピネフリン遊離量の減少及びCGRP神経を介する拡張反応の減弱が生じた。³⁾ これは神経の分布減少による神経機能減弱が起こったためと考えられる。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 (Fig. 2)。以上の結果より、血管周囲神経の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投与により血管周囲神経のリモデリング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。

3. 血管周囲神経の再分布とAT2Rの役割

血管収縮作用やカテコールアミン促進作用など、よく知られているアンジオテンシンIIの生理作用のほとんどはAT1Rを介したものである。AT2Rは胎児期に多く発現がみられ、生後数日で減少する。生理作用はAT1Rと相反し、血管拡張作用、アポトーシス誘導、神経分化促進作用が報告されている。

われわれはSHRにおいて、腸間膜動脈血管周囲CGRP神経の分布量減少が加齢とともに起こり、これがSHRにおける高血圧発症に関与していること、また加齢によるCGRP神経分布量減少がアンジオテンシン受容体拮抗薬であるlosartan (AT1R antagonist) 投与により抑制されることから、CGRP神経の再分布作用にAT2Rが関与しているのではないかと仮説を立てた。そこで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Ang II, losartan, PD123319 (AT2R antagonist)

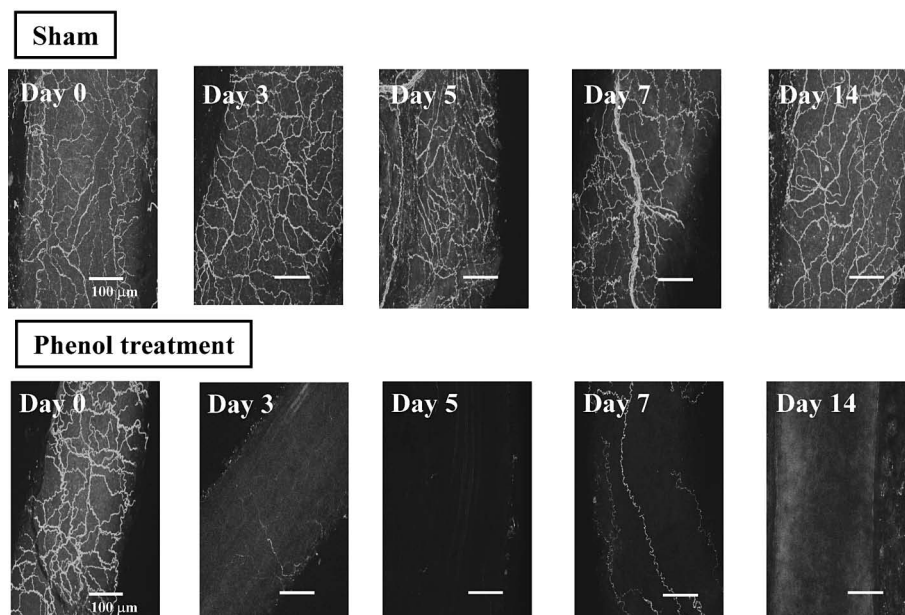


Fig. 1. Effects of Topical Phenol Treatment in Rat Superior Mesenteric Arteries

Representative confocal laser micrographs showing changes in the density of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-like immunoreactive (LI)-containing nerve fibers in mesenteric arteries after topical phenol treatment of the superior mesenteric arteries. Upper and lower images show arteries isolated from Sham-operated rats and phenol treatment rats, respectively. The scale bar indicates 100 μ m.

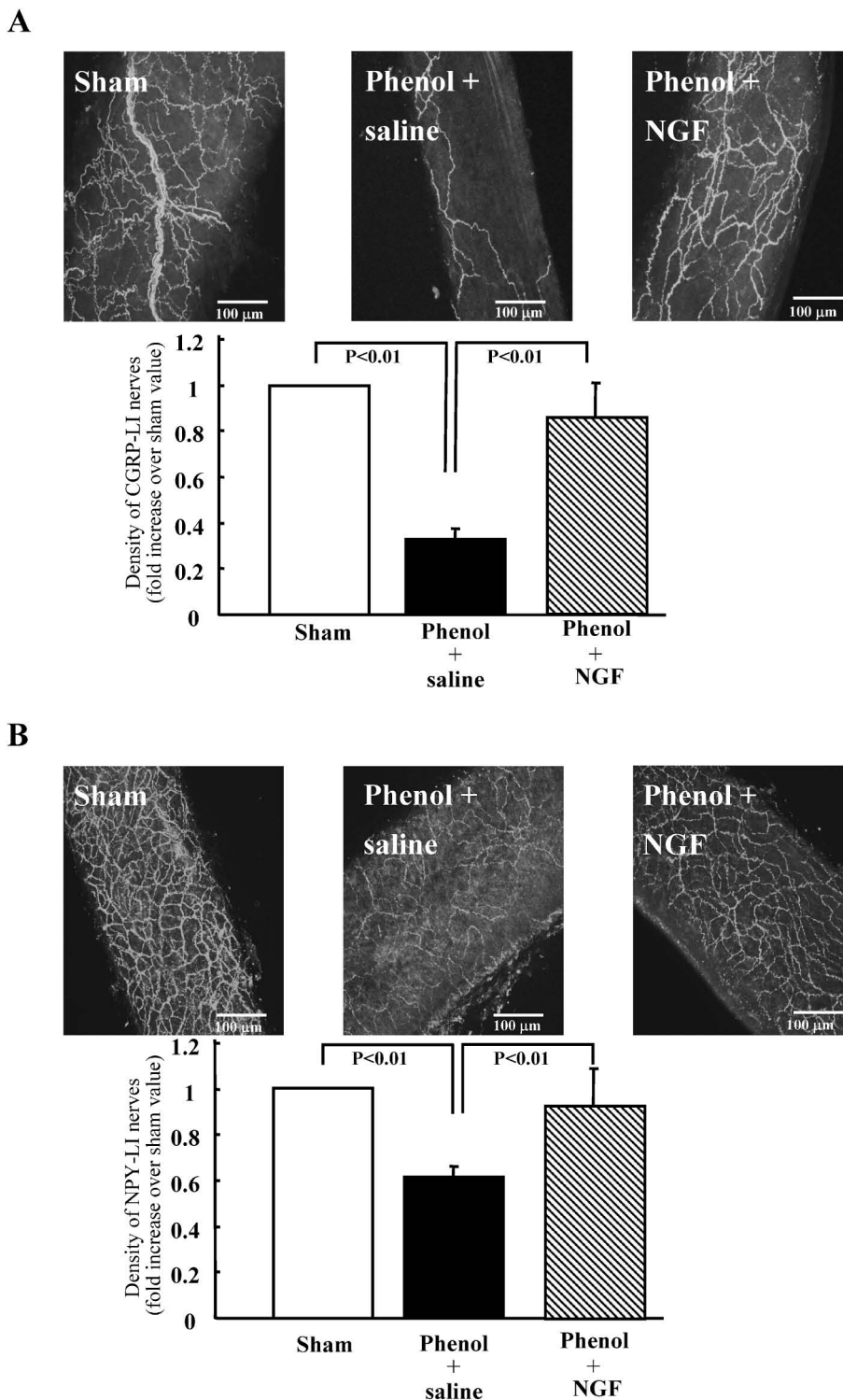


Fig. 2. Effects of NGF Treatment to Phenol-treated Rats in Perivascular Nerves

Typical images and bar graph showing the effect of NGF treatment for 7 days on the density of CGRP-LI (A) and NPY-LI (B) containing nerve fibers after topical phenol treatment of the superior mesenteric artery.

を投与し、血管周囲神経分布変化を検討した。⁴⁾ その結果 CGRP 含有神経分布量は Ang II + losartan 群において saline 投与群と比べて有意な増加がみられた (Fig. 3)。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 AT2R 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

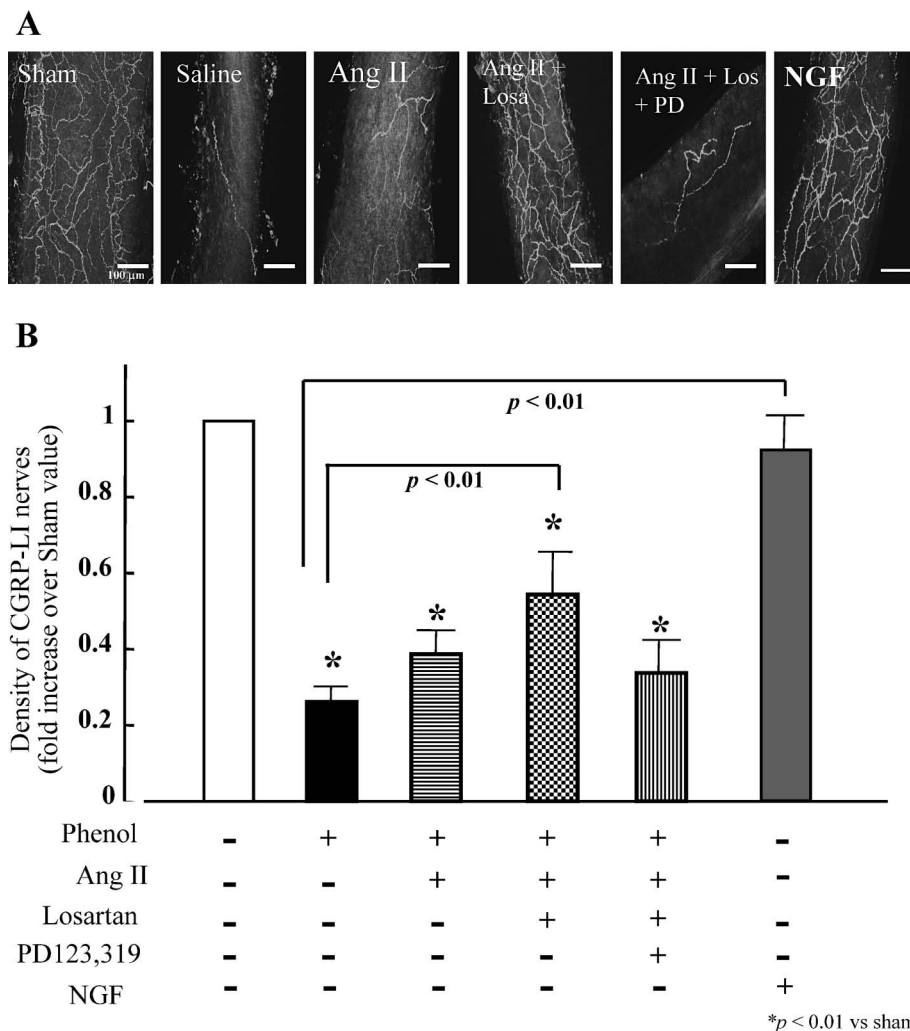


Fig. 3. Effects of Angiotensin II Receptors Activation in CGRP-LI Nerve Fibers Density of Phenol-treated Rats

A: Representative confocal laser micrographs showing changes in the density of CGRP-LI-containing nerve fibers in mesenteric arteries 7 days after topical phenol treatment and administration of saline (saline), angiotensin II (Ang II), co-administration of angiotensin II with losartan (Ang II+Los), co-administration of angiotensin II with losartan and PD123319 (Ang II+Los+PD) or nerve growth factor (NGF). The horizontal bar in the right lower corner of each panel indicates 100 μ m. B: Changes in density of CGRP-containing nerve fibers in distal mesenteric arteries after topical phenol treatment of the superior mesenteric artery. * $p < 0.01$ vs. Sham control. Each bar indicates mean \pm S.E.M.

は得られなかった。⁴⁾ 本実験において NPY 含有神経分布量の変化に有意な差がみられなかった原因として、交感神経の分布量は CGRP 含有神経分布量に比べ密であり、差が出にくかった可能性が考えられる。さらに Ang II 投与により交感神経上の AT1R を介して神経伝達を強めるものの、AT2R を介してはその作用を起こさないという報告もあり、⁵⁾ AT2R 刺激により交感神経と CGRP 含有神経においてそれぞれ異なった神経再生変化を示したのは、神経における AT2R の分布が異なるためと考えられる。以上の結果より AT2R 刺激は交感神経の分布に影響を及ぼさず、CGRP 神経の再分布に関与すると考えられる。

4. NGF による神経伸長反応と AT2R の関与

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を用いて、NGF 投与により CGRP 神経の再分布が起こること、また CGRP 神経の再分布には AT2R の働きが重要であることを明らかにしてきた。そこで次にわれわれは NGF による神経伸長反応に AT2R が関与するかどうかを検討するため、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 NGF を投与し、さらに losartan, PD123319 を同時に投与することで NGF による CGRP 神経再分布量の変化における AT1R, AT2R の関与を検討した。さらに脊髄後根神経節における AT2R mRNA 量を測定し、神経

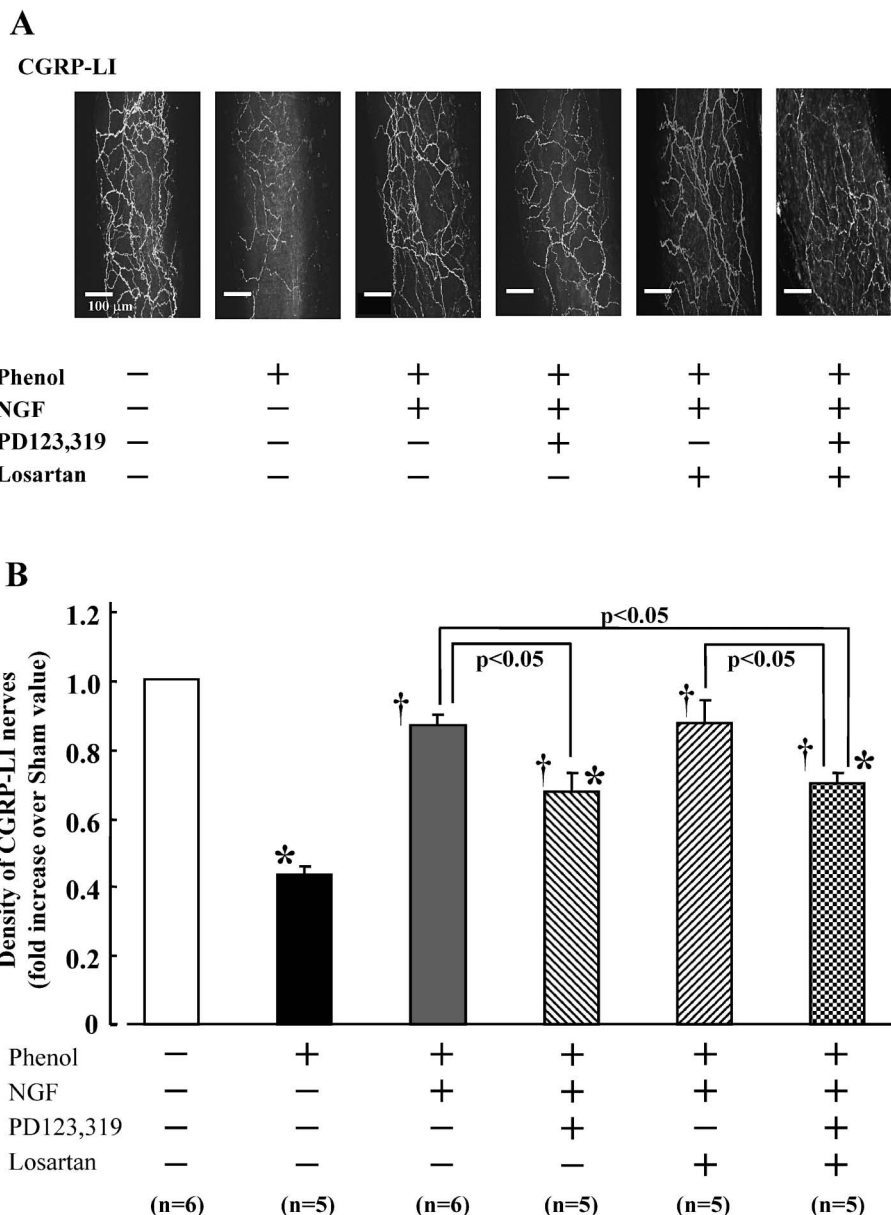


Fig. 4. Effects of NGF Treatment and Angiotensin II Receptors Activation in the Density of CGRP-LI Nerve Fibers
 A: Representative confocal laser micrographs showing changes in the density of CGRP-LI-containing nerve fibers in mesenteric arteries 7 days after topical phenol treatment and administration of saline, NGF, co-administration of NGF with PD123319, co-administration of NGF with losartan or NGF with PD123319 and losartan. The horizontal bar in the right lower corner of each panel indicates 100 μ m. B: Changes in the density of CGRP-containing nerve fibers in distal mesenteric arteries after topical phenol treatment of the superior mesenteric artery. Each bar indicates mean \pm S.E.M. * p <0.05 vs. Sham control. † p <0.05 vs. phenol-saline.

細胞体における受容体 mRNA 発現量がどのように変化するか検討を行った。NGF + losartan 群では NGF による CGRP 神経再分布量に変化を示さなかったが、NGF + PD123319 群及び NGF + losartan + PD123319 群においては、有意に NGF による CGRP 神経再分布作用を抑制した (Fig. 4)。このことは NGF による CGRP 神経伸長作用に AT1R ではなく、AT2R が関与していることを示唆する。また AT2R mRNA 量は NGF 投与群で著明な増加

がみられた。この NGF による AT2R mRNA 量増加は losartan 投与により抑制されたが、PD123319 投与によっては変化を示さなかった (Fig. 5)。神経細胞体の AT2R mRNA レベルは AT1R 遮断により減少することが示唆される。Ang II をラットに投与した実験においても、AT2R mRNA 量は増加したが、AngII + valsartan (AT1R antagonist) 投与群では AT2R mRNA 量が減少したという報告⁶⁾もあり、本実験結果を支持する。以上の結果より

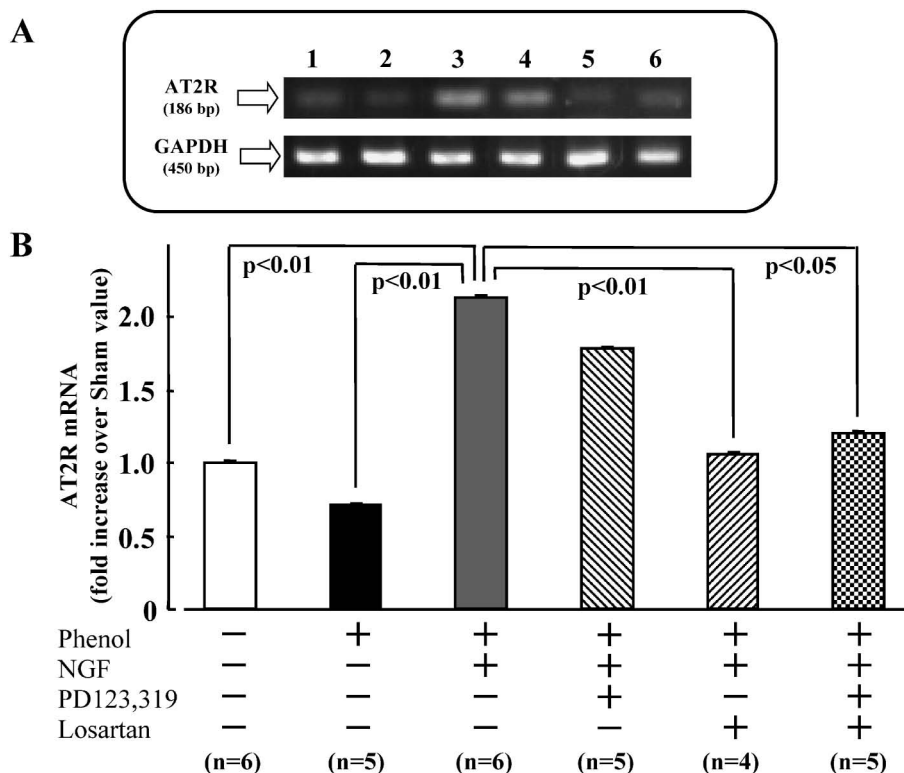


Fig. 5. Effects of NGF Treatment and Angiotensin II Receptors Activation in AT2R mRNA Levels of DRG

A: Typical bands showing expression of the angiotensin II type 2 receptor (AT2R) and GAPDH mRNA in the dorsal root ganglia. (Sham) (lane 1), Phenol+Saline (lane 2), Phenol+NGF (lane 3), Phenol+NGF+PD123319 (lane 4), Phenol+NGF+losartan (lane 5) or Phenol+NGF+PD123319+losartan (lane 6)
B: Quantitative gene expression analysis of AT2R mRNA. Each bar indicates mean \pm S.E.M.

NGFが起こすCGRP神経再分布作用にはAT2Rが関与し、さらにNGF投与により神経節細胞のAT2R mRNA量の著明な増加がlosartanによって抑制されたことから、AT1RもAT2Rの神経再分布機能あるいは発現調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。今後は受容体阻害によりAT2RやAT1Rタンパク発現量が抑制されるのか、NGF投与による神経軸索伸展作用がAT2R遮断時にどのように変化するか、細胞内情報伝達機構に着目して検討を行う予定である。

5. おわりに

Phenol塗布法によって遠位の小動脈の血管周囲神経分布が著減することから、この方法は血管周囲神経の分布再生を検討するのに有用であると考えられる。この方法によって減少した血管周囲神経が神経成長因子によって再分布することが明らかとなった。特に血管拡張性CGRP含有神経の再分布にAT2Rが重要な役割を果たしていることが示唆される。

謝辞 本研究に際して終始御懇篤なる御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., Inaizumi K., Nakamura A., Hobara N., Kurosaki Y., *Hypertens. Res.*, **26**, 257-263 (2003).
- 2) Hobara N., Gessei-Tsutsumi N., Goda M., Takayama F., Akiyama S., Kurosaki Y., Kawasaki H., *Hypertens. Res.*, **28**, 465-474 (2005).
- 3) Hobara N., Goda M., Kitamura Y., Takayama F., Kawasaki H., *Neuroscience*, **141**, 1087-1099 (2006).
- 4) Hobara N., Goda M., Yoshida N., Takatori S., Kitamura Y., Mio M., Kawasaki H., *Neu-*

-
- rosience*, **150**, 730–741 (2007).
- 5) Nap A., Balt J. C., Pfaffendorf M., Zwieten P. A., *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*, **4**, 100–105 (2003).
- 6) Hiyoshi H., Yayama K., Takano M., Okamoto H., *Hypertension*, **45**, 967–973 (2005).