2. 動脈硬化と酸化ストレス

下澤 達雄¹⁾ 金子 知代³⁾ 上竹勇三郎³⁾ 宮本 有成²⁾ 松井 宏光³⁾
 王 紅³⁾ 穆 勝宇³⁾ 斎藤 りか³⁾ 小倉彩世子³⁾ 矢富 裕¹⁾
 藤田 敏郎³⁾

Key words : アドレノメデュリン, 白金ナノコロイド, Apo E, Lox-1

(日老医誌 2008 ; 45 : 287-290)

酸化ストレスとは生体内の活性酸素種 (ROS) の量によって規定されるが, ROS は細胞内より産生され, 同時に細胞内には ROS の消去物質が存在している. この産生系の亢進, 消去系の低下のいずれにより活性酸素は増大に傾く. 1956 年に Denham Harman により活性酸素による老化の促進が提唱されて以来多くの研究がなされてきた. また, 最近では高血圧, 糖尿病, 喫煙などの生活習慣病においても酸化ストレスの増加が認められており, 酸化ストレスの増加が血管障害を引き起こすことが, 近年数多く報告されている. しかしながら, 酸化ストレスをターゲットにした治療の有効性はヒトの検討では明らかになっていない. 本シンポジウムでは酸化ストレスをターゲットにした治療についても我々の最近のデータを紹介した.

酸化ストレスの産生と消去

ROS とは不対電子をもつフリーラジカルをもつ酸素のことである. ROS は狭義にはラジカルであるスーパーオキシドアニオン (superoxide anion : O_2^-) ハイドロキシラジカル (hydroxyl radical $HO^\cdot$) とラジカルではないไฮドロゲンペルオキシド (Hydrogen peroxide : H_2O_2) と一重項酸素 (1O_2) である. 広義にはパーオキシナイトライト (Peroxynitrite : $ONOO^-$), リピッドラジカル (lipid radical) などがある¹⁾. 生理的にはミトコ

ンドリアなどの細胞内小器官の膜内で種々の活性酸素種が定常的に産生されている. ROS はさまざまな酵素によって産生されており, ミトコンドリアの電子伝達系だけでなく, 細胞膜, 細胞質にもキサンチンオキシダーゼ, シクロオキシゲナーゼ, リポキシゲナーゼ, NO 合成酵素, ヘムオキシゲナーゼ, ペルオキシゲナーゼ, ヘム蛋白, NADPH オキシダーゼなどの酵素が存在する. 血管壁においては, ①膜で産生される NADH/NADPH oxidase, ②細胞質で産生されるキサンチンオキシターゼ (Xanthine Oxidase) が活性酸素の産生源として重要と考えられている. 血管における酸化ストレスの産生刺激として重要であるアンギオテンシン II やトロンビン, 血小板由来増殖因子 (PDGF), 腫瘍増殖因子 α (TNF- α) は NADPH オキシダーゼ活性を上昇させ酸化ストレスを産生する^{2)~4)}.

キサンチンオキシダーゼはプリン体の代謝過程におい

表 1 一般的な酸化ストレスの測定方法

1. 酸化ストレスがあったことの証明
a. 脂質
TBA, Isoprostane, HNE
b. タンパク
3-nitrotyrosine
c. DNA
8-OHdG
2. 酸化ストレスの直接測定
電子スピン共鳴法
3. 酸化ストレスの間接測定
Lucigenin ($O_2^{\cdot-}$)
NO プローブ DAF-2, DAF-4, DAMBO, DAC など
一重項酸素プローブ DPAX-1, DMAX-1
DCFH-DA (H_2O_2)
HPF, APF

Atherosclerosis and oxidative stress

1) Tatsuo Shimosawa, Yutaka Yatomi : 東京大学医学部附属病院検査部

2) Yusei Miyamoto : 東京大学新領域創成科学研究科

3) Tomoyo Kaneko, Hiromitsu Matsui, Yusaburo Uetake, Hong Wang, Shengyu Mu, Rika Saito, Sayoko Ogura, Toshiro Fujita : 同 大学院医学系研究科内科

AアンジオテンシンII負荷による冠動脈病変

B低酸素刺激による肺動脈病変

Cカフモデルによる末梢血管病変 (EVG染色)

図1 アドレノメデュリン欠損マウスを用いた酸化ストレスと血管病変の報告
(A: 文献9より改変, B: 文献10より改変, C: 文献11より改変)

て生じるハイポキサンチンやキサンチンを酸化し、その際に O_2^- や H_2O_2 が産生される。血管内皮においても NO の活性にキサンチンオキシダーゼの活性が関与しているとの報告もある⁵⁾。また血管内皮に発現する eNOS はシトクロム P450 還元酵素様酵素で、基質である L-アルギニンから NO を産生する際に補酵素としてテトラヒオプリテン (BH_4) を介している。L-アルギニンやテトラヒオプリテン (BH_4) が不足する場合に、eNOS が O_2^- や H_2O_2 を産生することが報告されている。このように血管壁においては複数の産生系があり、さまざまな酸化ストレスが産生されている。

これに対し生体にはフリーラジカルや活性酸素による障害にたいする防御としての消去機構が存在する。スーパーオキシドアニオン (O_2^-) を過酸化水素に変換するのが、スーパーオキシディスムターゼ (SOD) であり、この酵素は細胞内の Cu, Zn-SOD (細胞質) と Mn-SOD (ミトコンドリア)、細胞外の extracellular-SOD がある。過酸化水素はそれ自体では遊離電子対をもたず、ラジカルではないが3価の Fe イオンと反応して (Fenton 反応) きわめて反応性に富むヒドロキシラジカル (HO^-) となる。過酸化水素の消去にはカタラーゼとグルタチオンペルオキシターゼ (GPx) 酵素によって過酸化水素は

水と酸素へと変換される。

このような、酸化ストレスの産生、消去系のバランスが崩れることが加齢により酸化ストレスが蓄積するメカニズムとして提唱されてきた。

1) ミトコンドリアの電子伝達系から電子が O_2 に移行し、ROS を産生し、この ROS がさらにミトコンドリアの電子伝達系や DNA を傷害しさらに ROS の産生が高まる⁶⁾。

2) 血管での NADPH oxidase が亢進し酸化ストレスが高まる⁷⁾。

3) SOD などの消去系の活性が低下し、ROS の消去ができなくなる⁸⁾。

酸化ストレスの増加と臓器障害

加齢により増加した酸化ストレスはいかにして損傷を引き起こすのであろうか。ROS は直接脂質、たんぱく質、DNA に損傷を引き起こすだけでなく、酸化ストレスに感受性のあるシグナル経路や転写因子を活性化させアポトーシスなどの細胞障害を引き起こすことが最近わかった。転写因子として NF- κ B や AP-1 といった因子のほかにも apoptosis signal regulation kinase-1 (ASK1) や c-JNK, p38MAPK の活性も制御している。これらの

図2 特発性肺高血圧症患者におけるアドレノメデュリン吸入と血行動態の変化
(文献13より改変)

下流にある細胞増殖あるいはアポトーシスがROSにより制御されるほかにも細胞接着因子(MCP-1, VCAM-1, ICAM-1)や動脈硬化惹起遺伝子: atherogenic genesの発現も誘導される. このような遺伝子発現を介して細胞障害や血管障害が発症する機序が明らかになりつつある.

動物実験では酸化ストレスは表1に示すような方法を用いて評価することができる. 我々は内因性の抗酸化物質であるアドレノメデュリンのノックアウトマウスを用いて, 酸化ストレスと血管病変について検討を重ねた^{9)~11)}. アドレノメデュリンはCSKのリン酸化を介してSrcの活性化を抑制することでNADPH oxidaseの活性化を抑制する¹²⁾. アドレノメデュリン欠損マウスの検討から酸化ストレスが, 動脈硬化発症, 進展に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた(図1). また, 動物実験においてはアドレノメデュリンの投与が血管病変に対し有効であることを示してきた¹⁰⁾¹¹⁾. ヒトにおいては重症肺高血圧症にアドレノメデュリンを投与することが一過性ではあるが, 血行動態を改善させることが報告され, 今後新たな治療方法として期待されている

(図2)¹³⁾.

一方, 酸化ストレスの蓄積は食事の影響を受けることが明らかになっており, 特に脂質, 塩分の摂取や高血糖が酸化ストレスを増加させる因子であるといわれている. 実際, カロリー摂取制限は寿命を延ばす効果があることが示されている. しかし, このような生活習慣の改善は長期に続けることの難しさが言われており, 実現可能な治療法が期待される. 我々はApoEノックアウトマウスに酸化LDL受容体を過剰発現させたマウスを用いて, 高脂肪, 高食塩食負荷による変化を検討した. このマウスでは脂肪と食塩を同時負荷することにより腎臓, 血管において著明な酸化ストレスの増大を認め, さらに, これら臓器において血管リモデリング, 動脈硬化を認めた. 血管病変はアンジオテンシン負荷時に認められた血管周囲の強い線維化やカフ装着モデルで認められた血管内膜の増殖とは異なり, 低酸素で認められたのと同様, 血管平滑筋のリモデリングが主たるものであった. このことは酸化ストレスによる血管病変は多彩であることを示唆するものである. 一方このマウスにテルミ

サルタンを投与すると酸化ストレスの軽減と同時に血管病変を抑制することが明らかになった。本モデルでは食塩を負荷しているので、全身でのレニンアンジオテンシン系は抑制されているが、局所でのレニンアンジオテンシン系の亢進がある可能性がある。また、テルミサルタンには AT1 受容体に拮抗するだけでなく PPAR γ を刺激する作用もあるので、このような効果が関連する可能性が考えられる。

我々はさらに新たな抗酸化物質による治療の可能性を探る目的で白金ナノコロイドの可能性を検討している。白金はその触媒作用により強力な抗酸化物質として、工業分野では利用されていたが、今回我々はナノコロイドにすることにより経口投与することが可能になった。白金ナノコロイドもまた、in vitro の検討から、従来のビタミン C などに比べ強力かつ持続的な抗酸化作用をもち、その作用が SOD 様活性とカタラーゼ活性の双方を併せ持つことを確認した。従来 SOD とカタラーゼの過剰発現は、SOD の単独過剰発現と異なり動脈硬化を抑制しうることが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。そこで、この白金ナノコロイドをアンジオテンシン II、食塩負荷によりメタボリックシンドロームの phenotype を呈する ob/ob マウスに投与し、血管病変を評価した。このモデルではアドレノメデュリン欠損マウスと同様冠動脈に強い線維化と酸化ストレスの蓄積が認められる。一方白金ナノコロイドの投与により、これらの変化が軽減されることが確認された。さらに、白金ナノコロイドは血糖、コレステロール値、血圧には影響しないことから、酸化ストレスを軽減することが直接に動脈硬化を抑制していると考えられる。また、白金ナノコロイドは尿中、血中にて検出されたことから消化管から吸収され、全身に作用していると考えられる。今後白金製剤の安全性の確認が必要である。

以上のように我々は動物実験を中心に酸化ストレスの蓄積によりさまざまな血管病変が生じることを明らかにしてきた。また、酸化ストレスをターゲットにした新たな治療法が示唆されてきた。加齢に伴う臓器病変の発症予防における抗酸化治療の有効性についても検討する必要がある。今後ヒトにおける検討が進むことが期待される。

引用文献

- 1) Kunsch C, Medford RM: Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999; 85: 753-766.
- 2) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141-1148.
- 3) Holland JA, O'Donnell RW, Chang MM, Johnson DK, Ziegler LM: Endothelial cell oxidant production: effect of NADPH oxidase inhibitors. *Endothelium* 2000; 7: 109-119.
- 4) Marumo T, Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R: Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 1997; 96: 2361-2367.
- 5) Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Quyyumi AA, Panza JA: Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 1997; 30: 57-63.
- 6) Alexeyev MF, Ledoux SP, Wilson GL: Mitochondrial DNA and aging. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107: 355-364.
- 7) Hamilton CA, Brosnan MJ, McIntyre M, Graham D, Dominiczak AF: Superoxide excess in hypertension and aging: a common cause of endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 37: 529-534.
- 8) Junqueira VB, Barros SB, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, et al: Aging and oxidative stress. *Mol Aspects Med* 2004; 25: 5-16.
- 9) Shimosawa T, Shibagaki Y, Ishibashi K, Kitamura K, Kangawa K, Kato S, et al: Adrenomedullin, an Endogenous Peptide, Counteracts Cardiovascular Damage. *Circulation* 2002; 105: 106-111.
- 10) Matsui H, Shimosawa T, Itakura K, Guanqun X, Ando K, Fujita T: Adrenomedullin Can Protect Against Pulmonary Vascular Remodeling Induced by Hypoxia. *Circulation* 2004; 109: 2246-2251.
- 11) Kawai J, Ando K, Tojo A, Shimosawa T, Takahashi K, Onozato M, et al: Endogenous Adrenomedullin Protects against Vascular Response to Injury in Mice. *Circulation* 2004; 109: 1147-1153.
- 12) Liu J, Shimosawa T, Matsui H, Meng F, Supowit SC, Dipette DJ, et al: Adrenomedullin Inhibits Angiotensin II-Induced Oxidative Stress Via Csk-Mediated Inhibition of Src Activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292: H1714-H1721.
- 13) Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M, Ueno K, Oya H, Nakanishi N, et al: Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2004; 109: 351-356.
- 14) Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, Zhou LC, Ballard BR, Richardson A, et al: Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res* 2004; 95: 1075-1081. Epub 2004 Nov 1074.
- 15) Sentman ML, Brannstrom T, Westerlund S, Laukkanen MO, Yla-Herttuala S, Basu S, et al: Extracellular superoxide dismutase deficiency and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1477-1482.