◆ 総 説 ◆

酸化ストレス制御による心血管疾患の治療戦略

井手友美^{*1}, 筒井裕之^{*2}

New strategy of cardiovascular disease by redox regulation

Tomomi IDE^{*1}, Hiroyuki TSUTSUI^{*2}

Key words: Oxidative stress, atherosclerosis, NADH/NADPH oxidase, heart failure, mitochondria

井手友美

1995年 九州大学医学部卒業
1997年 九州大学大学院循環器内科学研究生
2001年 米国ペンシルバニア大学医学部博士
研究員
2004年より現在 九州大学大学院循環器内科学
特別研究員

研究テーマ：
・心血管におけるミトコンドリア由来の酸化
ストレスの役割
・心不全における活性酸素の役割

はじめに

生物の進化の過程において、酸素を利用してエネルギーを産生し、生命現象を営む好気性生物が登場して以降、われわれの祖先である生物は大きな変換期を迎えた。なぜなら、生体は、酸素を還元してATPを産生することが可能となった一方で、その課程でスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルといった活性酸素を生じ、それらの活性酸素に対する細胞障害の危険にさらされているからである。生体内のレドックス状態は、活性酸素産生系とその消去系の均衡により決定される。よって、このバランスが活性酸素産生系に傾くことが、さまざまな病態のメカニズムに関わっていると示唆されている。近年、動脈硬化、虚血再灌流、高血圧、さらには心肥大、心不全といった種々の心血管疾患に酸化ストレスが重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。

本稿では、動脈硬化をはじめとする心血管病

の発症進展における酸化ストレスの役割、およびレドックス制御によるこれらの疾患の治療戦略について概説する。

生体における酸化ストレス産生源

生体内で生じる活性酸素の再生経路を図1に示す。生体における酸化ストレス産生源としては、主に、好中球、マクロファージのNADPH oxidase、血管内皮細胞由来のキサンチンオキシダーゼ、ミトコンドリアの電子伝達系、血管内皮型NO合成酵素(eNOS)、ヘムオキシダーゼが知られている。これらの産生源から局所で産生されたスーパーオキシドは、SODによって過酸化水素となり、鉄や銅イオンの存在下に組織障害性の高いヒドロキシルラジカルが産生される。また、一部には脂質ラジカル(LOO[•])の産生や脂質過酸化を生じることで、不可逆性の組織障害を生じる。また、NO[•]は、血管拡張作用や血小板凝集抑制作用、平滑筋増殖抑制

^{*1} 九州大学大学院循環器内科学〔〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1〕

Department of Cardiovascular Medicine, Kyushu University Graduate School of Medicine, [3-1-1, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, Japan 812-8582]

Tel: 092-642-5360 Fax: 092-642-5379 e-mail:

^{*2} 北海道大学大学院循環器内科学〔〒060-8638 札幌市北区北15条西7丁目〕

Department of Cardiovascular Medicine, Hokkaido University Graduate School of Medicine, [Kita 15, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan]

図1 活性酸素の主な産生源

作用，単球付着抑制などのさまざまな抗動脈硬化作用を有するが，スーパーオキシドと素早く反応することで，強い細胞障害性を有する peroxynitrite (ONOO⁻) を産生させる。peroxynitrite は，脂質過酸化を引き起こし，蛋白のニトロソ化を生じることで，動脈硬化の進展に深く関与していると考えられている。

動脈硬化における酸化ストレスの役割

動脈硬化の発症進展は，さまざまなファクターが種々の要因で相互作用を及ぼしながら進展すると考えられている。血管内皮の傷害から，傷害部位での血小板の凝集，付着，単球の接着，内皮下層への移動，種々のサイトカインの動員，マクロファージからの泡沫細胞の形成，平滑筋細胞への遊走，平滑筋細胞の増殖といった過程を経て，動脈硬化層は形成される。このような動脈硬化の形成，進展において，酸化ストレスが重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。

1989年にSteinbergらは，Low density lipoprotein (LDL) が酸化修飾を受けた後にマクロファージに取り込まれ，泡沫細胞化し，動脈硬化病変の形成に寄与しているという“酸化 LDL

仮説”を提唱した¹⁾。酸化 LDL は，血管内皮細胞の傷害や炎症性細胞の集積などを通じて，動脈硬化プラークの発症・進展のみならず，プラーク不安定性にも関与していることが示唆されており，酸化 LDL の冠動脈プラークの破綻，破裂における関連性も注目されている。動脈硬化病変形成においては，酸化変性をうけた LDL は，マクロファージや血管平滑筋のスカベンジャー受容体を介して取り込まれ，泡沫化，動脈硬化病変の形成に寄与している。したがって，レドックス制御によって LDL の酸化変性を効率よく防ぐことで，動脈硬化形成を抑制できる可能性があると考えられる。

また，酸化ストレスは，LDL の酸化のみならず，プラーク破綻に関わる MMP，単球の血管壁への接着および浸潤に関わる VCAM-1，ICAM-1，MCP-1 といったレドックス感受性遺伝子を発現させることが知られており，シグナル伝達因子としての役割を担っているとも考えられる。

酸化ストレス産生源としての NADH/NADPH oxidase とミトコンドリア

活性酸素の産生源としては，さきに述べたよ

うにキサンチンオキシダーゼ, 内皮依存型 NO 合成酵素, NADPH オキシダーゼなどがあげられる。NADH/NADPH オキシダーゼは, 元来, 好中球やマクロファージなど貪食細胞におけるスーパーオキシド産生酵素として, 生体防御的に働いていることが知られていた。Grindling らは, 培養血管平滑筋細胞から, アンギオテンシン II (ATII) 刺激によって NADH/NADPH 依存性にスーパーオキシドが産生され, 血管平滑筋にも NADH/NADPH oxidase 活性が存在していることを示した²⁾。そして近年, 動脈硬化において血管平滑筋, 内皮細胞, および外膜線維芽細胞などの血管壁においては, NADH オキシダーゼが主要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。

血管平滑筋細胞において動脈硬化促進因子であるアンギオテンシン II は, AT1 受容体を介して NADPH を活性化させ, 産生された H_2O_2 がシグナル伝達因子として, EGF 受容体のチロシンリン酸化および cSrc, MAP キナーゼおよび Akt などの活性化を引き起こす^{3) 4)}。

血管細胞における NADH/NADPH oxidase と白血球の NADH/NADPH oxidase の間では酵素活性, 活性調節機構に違いが認められ, これらの差異に関しては, 完全に明らかにされたわけではない。しかし, NADH/NADPH oxidase の細胞膜に存在する p22phox のアンチセンスオリゴヌクレオチドを導入することにより, ATII による培養血管平滑筋細胞のスーパーオキシド産生が減少するため, p22 phox は, 血管系, 白血球の共通したコンポーネントである可能性が高い⁵⁾。今後, NADH/NADPH オキシダーゼをターゲットとした酸化ストレス制御が動脈硬化抑制への新たな治療法として期待される。

一方で, 心不全においても酸化ストレスが重要な役割を果たしていることが明らかとされているが, 心筋においては活性酸素の産生源はミトコンドリア電子伝達系と考えられている。われわれは, 頻脈ペーシングによる犬の心不全モデルおよびマウス梗塞後心不全において酸化ス

トレスが増大していること, 不全心筋ではミトコンドリア DNA の量が低下し, 電子伝達系の複合体の活性が低下し, さらなる活性酸素の産生を生じるという悪循環を形成していることを示した。従って, 心筋では, ミトコンドリアをターゲットとした新たな心不全治療の可能性が示唆されている^{6) 8)}。

レドックス制御により心血管病の治療

1) 抗酸化酵素による抑制

酸化ストレスが増悪因子と考えられる心血管病においては, 抗酸化酵素の過剰発現によって, 治療効果が得られると考えられる。ただ, SOD に関しては, スーパーオキシドから H_2O_2 が産生されるが, そこに鉄が媒体するとさらに細胞障害性の高いヒドロキシラジカルが産生されるため, 単純には良い結果が得られないことは, 以前から報告されている。例えば, Cu/Zn-SOD の過剰発現は, 動脈硬化抑制作用がない, という報告⁹⁾ もあれば, 増悪させる, という報告¹⁰⁾ があり, これらは H_2O_2 が過剰に産生されることによるペルオキシダーゼ活性による可能性が考えられる。Yang らは, カタラーゼと SOD にカタラーゼを組み合わせることで過剰発現さえることによって, ApoE 欠損マウスにおける著明な動脈硬化の減少させることに成功した⁹⁾。

一方で, 心筋に関しても, ミトコンドリアで産生された H_2O_2 を消去するために, グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) を過剰発現させると, マウス心筋梗塞後のリモデリングを抑制し, 予後を改善した¹¹⁾。

2) 抗酸化剤投与による抑制

抗酸化剤の投与による血管病, 特に冠動脈疾患の予防が期待され, これまでに多くの研究が報告されている。強力な抗酸化剤であるプロボコールは, 冠動脈形成術後の再狭窄を有意に減少されることが報告されている¹²⁾。抗酸化ビタミンのうちビタミン E は LDL 中に存在し, カ

図2 ビタミンEは、ビタミンCによって再利用されながら抗酸化能を発揮する

図3 ビタミンEを用いた無作為二重盲検試験

ロテノイドとともに脂質ペルオキシラジカルを捕捉することで強い抗酸化作用を持つため、動脈硬化抑制効果がもっとも期待されている。ビタミンEおよびCは、図2に示すようなメカニズムで再利用されることで、抗酸化能を発揮することが知られており、また、*in vitro*では、ビタミンEによる血小板凝集抑制作用および血小板によるプロテインキナーゼCの抑制も示されている¹³⁾。いくつかの前向き研究においても、ビタミンEの摂取量が多いと冠動脈イベント発症率が少ないことが報告され、ビタミンEによる抗動脈硬化抑制作用が期待され

た¹⁴⁾。しかしながら、その後の大規模試験、無作為二重盲検大規模臨床試験の結果からは、抗酸化剤の直接投与による動脈硬化抑制効果に関しては、未だに肯定的な結果が得られていない(図3)。

冠動脈疾患のないボランティアを対象に冠動脈疾患一次予防効果をみたものに、ATBC (Alpha-tocopherol, beta carotene, cancer prevention study)¹⁵⁾があるが、男性喫煙者 29,133人を対象とした本研究では、冠動脈イベントの発症率や冠動脈死に有意差は認めず、さらに脳出血のリスクを増やす結果となった。また、冠動脈疾

表 1

	対 象	人数	Vit.E 量	相対危険度 (95%信頼区間)	観察期間 (年)
Primary					
PPP(2001)	平均年齢 66.4 歳、リスクファクターを有する人	4495	300 mg	1.07(0.74-1.56)	6.3
VEAPS(2002)	LDL コレステロール高値	353	400 IU	心血管イベントに 対して P=0.81	3.6
Secondary					
ATBC(1998)	心筋梗塞の既往のない男性 喫煙者	29133	50 mg	1.03(0.88-1.23)	6.1
CHAOS(1996)	冠動脈疾患患者	2002	400-800 IU	0.60(0.40-0.89)	1.4
GISSI(1999)	心筋梗塞患者	11324	300 mg	0.98(0.87-1.10)	3.5
HOPE(2000)	冠動脈疾患患者など	9541	400 IU	1.05(0.95-1.16)	4.5
HOPE-TOO(2005)	冠動脈疾患患者など	7030	400 IU	1.04(0.96-1.14)	7.0
HPS(2002)	CAD, 糖尿病患者など	20536	600 mg	1.05(0.95-1.15)	5.0
SPACE(2000)	CAD を有する透析患者	196	800 IU	0.3(0.11-0.78)	1.4

患患者に対してビタミン E を投与して, 冠動脈イベントの発症率を検討したものとして, CHAOS (Cambridge Heart Antioxidant Study)¹⁶⁾ GISSI (Gruppo Italiano Per Lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico)¹⁷⁾, HOPE (The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study)¹⁸⁾ などがあり, それぞれの対象者および用いられたビタミン E の服用量は表 1 の通りである。冠動脈造影で冠動脈に狭窄病変をもつ患者 2,002 人を対象としてビタミン E を投与した結果, 心筋梗塞の発症を予防したという CHAOS, および維持透析患者を対象とした SPACE 以外は, いずれもビタミン E の服用によって心血管病が抑制されるという結果は得られていない。最近では, 長期にわたる観察が必要との考え方から, HOPE の被験者に引き続き平均 7 年にわたり 400 IU/ 日のビタミン E を投与した HOPE-TOO (HOPE-The Ongoing Outcomes)¹⁹⁾ が発表されたが, やはり心血管イベントを抑制せず, 心不全による再入院はプラセボ群と比較してむしろ増加させるという結果が得られた。なぜこのように, 一部の観察研究および動物実験によって明らかにされたビタミン E の効果と, ビタミン E をサプリメントとして服用し

た心血管イベントに対する効果の違いが生じるのかは不明であるが, 可能性として, 食物中の他の因子との組み合わせの重要性, サプリメントとしてのビタミン E の副作用, 吸収率の違いなども考えられている。生体内の複雑な酸化還元システムとの相互作用の解明がなされていないため, その原因をつきとめることは極めて困難であることが予想され, 抗酸化ビタミンに関しては, これらの結果をふまえ, 現時点では, 心血管病の予防目的では, その服用は推奨されていない。

3) その他の薬剤による抗酸化治療

他の薬剤で抗酸化能を有するとされているものがいくつかあるが, 中でも, HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) は, 種々の大規模臨床試験において, LDL コレステロールを低下させることにより, 動脈硬化の進展を抑制し, 虚血性心疾患の予防につながる事が明らかとなった。また, スタチンは血管壁 NADPH オキシダーゼを抑制する作用を有することで, 血管壁の酸化ストレスを軽減することも知られている。最近発表された MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering) study では, 急性冠症候群に対して,

図4 マウス心筋梗塞後の生存曲線

ベースラインのLDLコレステロールが124 mg/dlとそれほど高くはないにもかかわらず、4カ月のスタチン服用で冠イベント発生率を低下させる結果を得た。その作用機序として、心血管へのスタチンの直接の抗酸化作用、抗炎症作用が関与している可能性がある。スタチンは現存する治療法の中で、動脈硬化抑制薬として有効性と安全性が確立している薬剤といえよう。

4) 活性酸素の産生そのものを抑制することによる治療

先に述べたように、心筋における活性酸素の産生源はミトコンドリアであると考えられるが、われわれは、ミトコンドリアDNAにおいて保護的に働いていることが示唆されている mitochondrial transcriptional factor A (TFAM) を過剰発現したマウスを作成した。TFAM 過剰発現マウスでは、心筋梗塞後における心筋におけるミトコンドリアDNAの減少が抑制され、心筋での酸化ストレスが減少し、心筋梗塞後のリモデリングを抑制、さらに心筋梗塞後4週間以内の死亡を劇的に抑制した²⁰⁾ (図4)。今後、酸化ストレスの産生源であるミトコンドリアをターゲットとした新たな治療戦略が期待される。

おわりに

心血管病における活性酸素の役割およびレドックス制御による治療・予防に関する知見をま

とめた。病態の発症、進展に、酸化ストレスが重要な役割を果たしていることは、多くの研究から明らかにされているが、その分子メカニズムは未だ不明な点が多い。多くの動物実験、基礎実験では、血管病において酸化ストレスが重要な役割を果たしていることはすでに確立された考え方であるが、無作為二重盲検試験で抗酸化剤の効果があるという結果は得られていないのが現実である。発生したラジカルを消去するだけでなく、過剰な酸素ラジカルの産生そのものを抑制する治療法の開発によって、今後より効果的な治療への指針が見いだせるかもしれない。心臓および血管における活性酸素産生機構および抗酸化システムとの相互作用、その分子メカニズムがさらに明らかにされることで、レドックス制御による種々の心血管疾患の予防そして治療への展望が今後広がることを期待する。

文 献

- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. **320** : 915-924, 1989.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **74** : 1141-1148, 1994.
- Taniyama Y, Ushio-Fukai M, Hitomi H, Rocic P, Kingsley MJ, Pfahnl C, Weber DS, Alexander RW, Griendling KK: Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **287** : C494-499, 2004.
- Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW: Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res*. **91** : 1160-1167, 2002.
- Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T, Ishizaka N, Griendling KK: p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **271** : 23317-23321, 1996.
- Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, Utsumi H, Machida Y, Egashira K, Takeshita A: Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res* **86** : 152-157, 2000.
- Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A: Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction.

- Circ Res **88** : 529–35, 2001.
- 8) Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K, Takeshita A: Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. Circ Res **85** : 357–363, 1999.
 - 9) Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, Zhou LC, Ballard BR, Richardson A, Guo ZM: Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. Circ Res **95** : 1075–1081, 2004.
 - 10) Tribble DL, Gong EL, Leeuwenburgh C, Heinecke JW, Carlson EL, Verstuyft JG, Epstein CJ: Fatty streak formation in fat-fed mice expressing human copper-zinc superoxide dismutase. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **17** : 1734–1740, 1997.
 - 11) Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, Wen J, Kubota T, Utsumi H, Takeshita A: Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. Circulation **109** : 544–549, 2004.
 - 12) Tardif JC, Cote G, Lesperance J, Bourassa M, Lambert J, Doucet S, Bilodeau L, Nattel S, de Guise P: Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. Multivitamins and Probucol Study Group. N Engl J Med **337** : 365–372, 1997.
 - 13) Freedman JE, Farhat JH, Loscalzo J, Keaney JF, Jr: alpha-tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. Circulation **94** : 2434–2440, 1996.
 - 14) Motoyama T, Kawano H, Kugiyama K, Hirashima O, Ohgushi M, Tsunoda R, Moriyama Y, Miyao Y, Yoshimura M, Ogawa H, Yasue H: Vitamin E administration improves impairment of endothelium-dependent vasodilation in patients with coronary spastic angina. J Am Coll Cardiol. **32** : 1672–1679, 1998.
 - 15) The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. N Engl J Med. **330** : 1029–1035, 1994.
 - 16) Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ: Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). Lancet **347** : 781–786, 1996.
 - 17) Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico. Lancet **354** : 447–455, 1999.
 - 18) Yusuf S, Dagenais G, Pogue J, Bosch J, Sleight P: Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. N Engl J Med. **342** : 154–160, 2000.
 - 19) Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, Pogue J, Arnold JM, Ross C, Arnold A, Sleight P, Probstfield J, Dagenais GR: Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. Jama. **293** : 1338–1347, 2005.
 - 20) Ikeuchi M, Matsusaka H, Kang D, Matsushima S, Ide T, Kubota T, Fujiwara T, hamasaki N, Takeshita A, Sunagawa K, Tsutsui H: Overexpression of mitochondrial transfactor A ameliorate mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction. Circulation 2005, in press.