

酸化ストレスと心筋障害

筒井 裕之*

はじめに

心不全は、心筋梗塞、高血圧、弁膜症、心筋症などすべての器質的心疾患の末期像である。高血圧、糖尿病、高脂血症などのリスクファクターから心疾患を発症し、心不全から最終的には死に至る。心不全に陥った心筋では、リモデリングとよばれる心筋の構築・機能変化がみとめられるが、その形成・進展には交感神経系やレニン-アンジオテンシン系などの神経体液性因子の活性化が重要な役割を担っている。さらに TNF α などのサイトカインも密接に関与している。近年、従来から知られている虚血再灌流傷害ばかりでなく、不全心筋においてスーパーオキシド($\cdot O_2^-$)やヒドロキシラジカル($\cdot OH$)などの活性酸素が増加することが明らかにされ、心筋リモデリング・心不全の形成・進展メカニズムとして注目されている。本稿では、心筋障害における酸化ストレスの役割について概説する。

心不全における活性酸素の生成

心不全においては、心筋における活性酸素の産生が亢進する。スピントラップ剤である DMPO によって $\cdot O_2^-$ を捕捉し、電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いてそのシグナルを検出することにより、 $\cdot O_2^-$ を直接定量することが可能である。この方法を用いて心筋のミトコンドリアでの $\cdot O_2^-$ 産生を測定すると、不全心筋では $\cdot O_2^-$ 産生が有意に増加している。一方、ミクロソーム分画での $\cdot O_2^-$ 産生には差がなく、細胞質分画では $\cdot O_2^-$ 産生は検出されない。したがって、心筋における活性酸素の産生源には、ミトコンドリア電子伝達系、NADPH

オキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼなどがあるが、不全心における活性酸素の主要な産生源はミトコンドリア電子伝達系であると考えられる¹⁾。ミトコンドリア由来の $\cdot O_2^-$ は、SOD により過酸化水素に還元され、 $\cdot O_2^-$ と過酸化水素から Harber-Weiss 反応や Fenton 反応を介して $\cdot OH$ が生成される²⁾。

心不全における活性酸素によるミトコンドリア DNA 傷害

ミトコンドリア DNA (mtDNA) は、2 つの rRNA 遺伝子 (12S と 16S)、22 個の tRNA 遺伝子、および電子伝達系を構成するサブユニットのうち 13 個の蛋白質遺伝子をコードしている。これらのサブユニットの内訳は、複合体 I (NADH ユビキノン酸化還元酵素) が 7 種類 (ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6)、複合体 III (ユビキノールチトクローム c 酸化還元酵素) が 1 種類 (Cytb)、複合体 IV (チトクローム c 酸化還元酵素) が 3 種類 (COI, COII, COIII)、複合体 V (ATP 合成酵素) が 2 種類 (ATPase 6, ATPase 8) である。これらはすべてミトコンドリアの酸化的リン酸化に関与している。一方、複合体 II (コハク酸ユビキノン酸化還元酵素) は、すべて核 DNA によってコードされている。したがって、ミトコンドリアは独自の遺伝情報と蛋白合成システムを有している。しかしながら、mtDNA でコードされているのは 37 個の遺伝子に過ぎず、他は核 DNA でコードされている。このため、ミトコンドリアは核 DNA と協調しながら、独立して DNA 複製、転写、蛋白質合成を行っている。mtDNA は、核 DNA のようなヒストンで保護されたクロマチン構造がなく 16kb という小さな環状 2 本鎖 DNA である。mtDNA は、個々のミトコンドリア内に数コピー存在しているが、1 個の細胞に

*北海道大学大学院医学研究科循環病態内科学

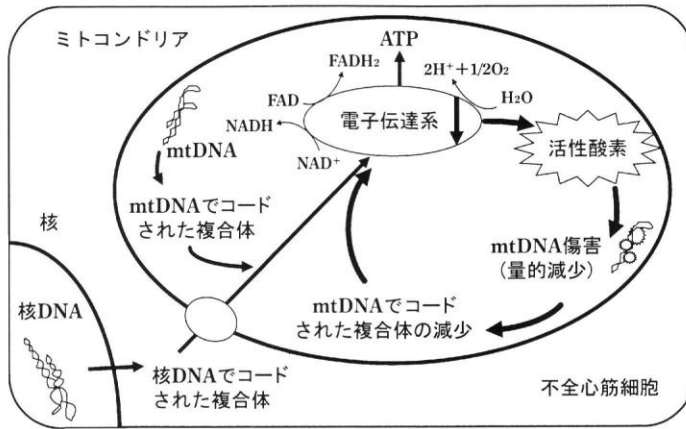


図1 ミトコンドリアにおける活性酸素の産生と mtDNA・機能障害の関係を示す模式図(文献3より改変引用)

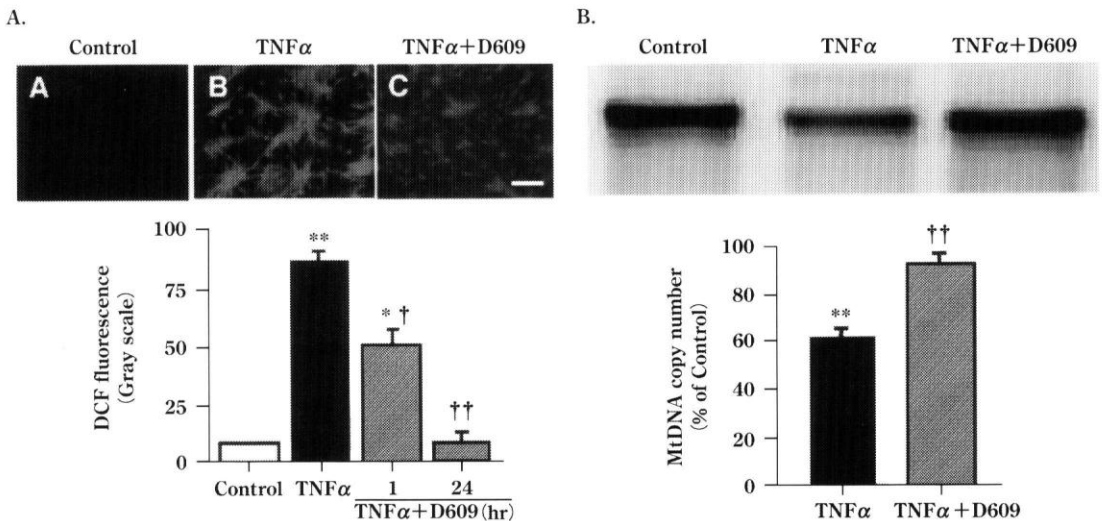


図2 培養心筋細胞における TNF α による活性酸素産生(A)とミトコンドリア DNA コピー数の変化(B)
D609: ceramide 合成阻害薬. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 対コントロール. †† $p < 0.01$ 対 TNF α (文献4より改変引用).

ミトコンドリアは1000個ぐらい存在するため、1個の個体には膨大な mtDNA のコピーが存在している。mtDNA は、電子伝達系の近くに存在しており、ヒストン構造を欠くため酸化損傷を受けやすい。

不全心筋のミトコンドリアで産生された活性酸素は、心筋細胞のミトコンドリア自身、特に mtDNA をターゲットとして、その損傷を惹き起こす可能性がある。mtDNA コピー数をサザンプロットにより定量すると、不全心筋では mtDNA コピー数が減少しており、さらに mtDNA でコードされた電子伝達系の複合体サブユニットの mRNA の低下、および複合体酵素活性の低下をみとめた³⁾。

ミトコンドリア電子伝達系の複合体酵素の活性低下は、電子の伝達障害を来し、さらなる活性酸素の産生をもたらすため、悪循環を形成し、ミトコンドリアでの酸化ストレスをさらに亢進させると予想される(図1)。

不全心筋で増加するサイトカインのひとつである TNF α は、複合体の酵素活性を低下させることが知られており、活性酸素の産生を増加させる可能性がある。培養心筋細胞に、TNF α を添加すると、心筋細胞内でミトコンドリア由来の活性酸素が増加し、直接心筋細胞の mtDNA のコピー数を減少させた(図2)⁴⁾。一方、アンジオテンシン II は、

心筋細胞内の活性酸素を増加させるものの、心筋細胞の mtDNA のコピー数には影響しなかった。したがって、ミトコンドリアを舞台にした活性酸素とサイトカインのクロストークが、酸化ストレスの亢進に重要な役割を果たしていると考えられる。このようなミトコンドリア機能障害は、従来から報告されているミトコンドリア遺伝子病といったごく一部の特殊な疾患の発症ばかりでなく、種々の器質的心疾患による心不全の発症に広く関与している可能性がある⁵⁾。

mtDNA とミトコンドリア転写因子

ミトコンドリア転写因子 A (TFAM) は、核 DNA にコードされた蛋白で、軽鎖および重鎖プロモーターの上流に結合することで、mtDNA の転写を制御する。近年、TFAM は、mtDNA の複製および維持においても重要な役割を果たしていることが示唆されている。TFAM 遺伝子欠損マウスではミトコンドリア DNA が消失し、ミトコンドリア DNA にコードされた蛋白を持たないため、高度のミトコンドリア呼吸鎖の機能不全を生じる。興味深いことに、心筋特異的に TFAM 遺伝子をノックアウトすると、拡張型心筋症を生じて、心不全を来すことが報告されている^{6,7)}。すなわち、TFAM は、ミトコンドリア DNA コピー数の制御および機能の維持を司っており、その量的減少は mtDNA の減少をもたらす。ミトコンドリア呼吸鎖の機能低下から、心機能低下に至ると考えられる。さらに、マウスの心筋梗塞後の不全心筋においても、ミトコンドリア DNA のコピー数の減少に伴い TFAM 蛋白量が減少している³⁾。

心不全における mtDNA の酸化損傷とその修復機構

活性酸素は、DNA の量的欠乏ばかりでなく、塩基修飾などの DNA の酸化損傷を惹き起こす。その代表は、8-オキソグアニンである。また、遊離ヌクレオチドの酸化としては、8-オキソ dGTP が知られている。酸化ヌクレオチドは DNA 複製時に DNA ポリメラーゼの基質として DNA に取り込まれる。このような DNA 上に作られた塩基損傷は、DNA の不安定性をもたらす細胞死の原因になると考えられる。

一方、細胞は、塩基修飾の修復や酸化ヌクレオチドの DNA 取り込みによるゲノム傷害を抑制する機構も合わせ持っている。このような DNA 酸化損傷の防御・修復機構としては、大腸菌で MutM (8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼ)、MutY (アデニン DNA グリコシラーゼ)、MutT (8-オキソ dGTPase) 蛋白質が知られている⁸⁾。MutT 蛋白質は遊離ヌクレオチド 8-オキソ dGTP を 8-オキソ dGMP に加水分解する。8-オキソ dGMP は、DNA ポリメラーゼの基質とならないため、ゲノムに取り込まれることはない。MutT は、ほ乳類の細胞にも広く存在し、そのヒトホモログである hMTH1 (mutT homolog 1) 蛋白は、細胞質とミトコンドリアに局在している。ミトコンドリアは独立したヌクレオチドプールをもち mtDNA を維持しているが、mtDNA は核 DNA よりも酸化傷害を受けやすいため、ミトコンドリアに存在する hMTH1 蛋白は、mtDNA の酸化傷害に対して極めて重要な役割を果たしていると予想される。マウスの梗塞後不全心筋においては、8-オキソグアニンが増加しており、hMTH1 蛋白も心筋細胞ミトコンドリア分画で増加した(図3)⁹⁾。したがって、不全心筋では、ミトコンドリアでの活性酸素の増加に対して、酸化的 DNA 損傷の防御機構はむしろ活性化されている。しかし、生体は DNA の酸化損傷に対する防御・修復機構をいくつも有しており、これらが心不全の発症・進展の分子機構においてどのような役割を果たしているのかは明らかでなく、今後の重要な研究課題である。

酸化ストレスと心筋リモデリング・心不全

ミトコンドリアで過剰に産生された活性酸素は、心筋収縮機能を低下させるとともに、心筋細胞死をもたらす¹⁰⁾。心筋細胞で SOD を抑制し活性酸素をわずかに増加させると、心筋細胞の肥大とアポトーシスが誘導される。一方、高濃度の活性酸素は、壊死やアポトーシスにより心筋細胞死をもたらすことが報告されている¹¹⁾。さらに細胞外マトリックスの分解・修飾に関する matrix metalloproteinase (MMP) を活性化することが知られている。梗塞後心不全モデルにおいて、心筋では活性酸素の産生とともに、MMP-2 活性が亢進した¹²⁾。OH・消去剤であるジメチルチオウレアを慢性投与

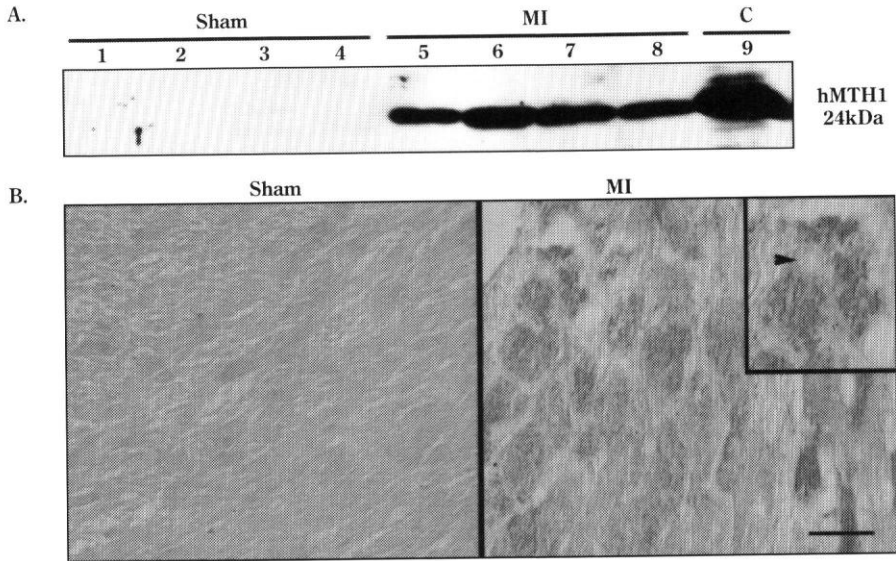


図3

(A) 正常心筋(Sham)と不全心筋(MI)の8-oxo-dGTPase(hMTH1)のウエスタンブロット : CはヒトJurkat細胞より精製したpositive control. (B)心筋組織の免疫染色: スケールバーは20 μ m. 強拡大で, hMTH1は細胞質に局在する. 矢印は核を示す(文献9より改変引用).

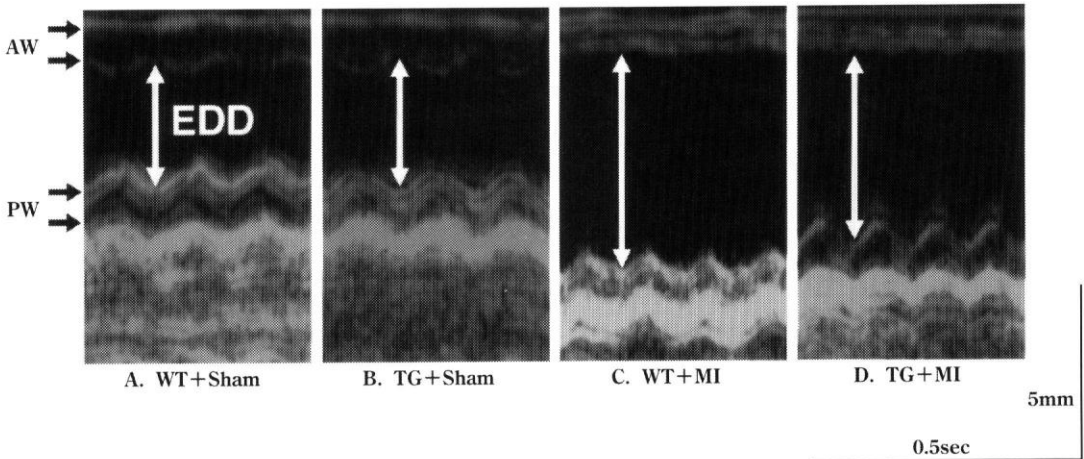


図4 心エコー(文献14より改変引用)

WT: wild-type. TG: GSHPx 遺伝子過剰発現マウス. MI: 心筋梗塞. AW: 左室前壁. PW: 左室後壁. EDD: 拡張末期径

すると, 心筋の OH \cdot 量の増加が抑制され, 左室の拡張および収縮機能不全が抑制され, MMP 活性化も抑制された. さらに, MMP-2 遺伝子欠損マウスでは, 梗塞後リモデリングが抑制された¹³⁾.

酸化ストレス制御による心不全治療

心筋リモデリング・心不全の形成・進展において活性酸素が重要な役割を果たしていることより活性酸素の産生抑制は, 新たな心不全治療法となる可能性がある. グルタチオンペルオキシダーゼ

(GSHPx)は, SOD やカタラーゼとともに主要な抗酸化酵素のひとつであり, 過酸化水素とヒドロペルオキシドを消去するが, 細胞質ばかりでなくミトコンドリアに局在することから, SOD やカタラーゼに比し酸化傷害に対する保護作用が強いことが知られている. GSHPx 遺伝子過剰発現マウスに心筋梗塞を作成すると, 梗塞サイズや血圧や心拍数等の血行動態には影響せずに, 梗塞後リモデリング・心不全が抑制され, 生存率が改善した(図4, 5)¹⁴⁾. 同時に, GSHPx 遺伝子過剰発現マウスでは

A. WT+MI

B. TG+MI

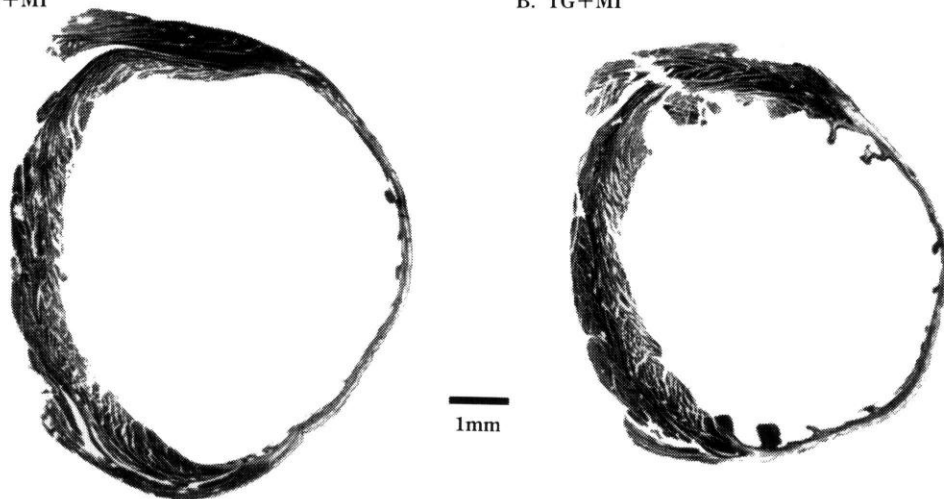


図5 左室心筋横断標本(文献 14 より改変引用)
マッソントリクローム染色. WT: wild-type, TG: GSHPx 遺伝子過剰発現マウス, MI: 心筋梗塞

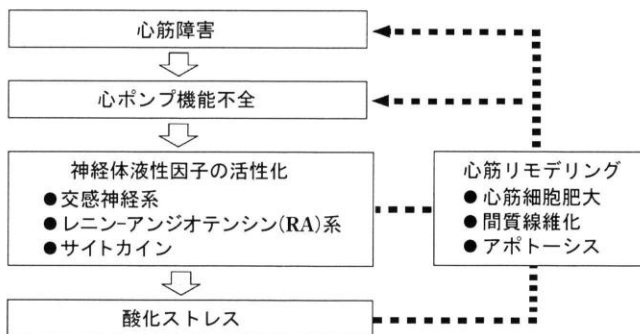


図6 心筋リモデリング・心不全の形成・進展における酸化ストレスの役割

心筋細胞肥大や間質線維化, アポトーシス, MMP 活性化が抑制された. 以上より, 酸化ストレスは, 心筋細胞肥大, 間質線維化やアポトーシスを介して心筋リモデリング・心不全の形成・進展に重要な役割を果たすと考えられる(図6).

1987 年以降, 大規模臨床試験によって, ACE 阻害薬や β 遮断薬が, 心不全患者の症状・運動耐容能を改善するばかりでなく生命予後の改善に有効であることが明らかにされてきた. しかしながら, 重症心不全患者の予後は, なお不良であり, 現在の治療で十分とは言えない. したがって, 酸化ストレス等の新たなターゲットに対する新たな治療法の開発が待たれている. ただし, 現在まで, 心不全患者に酸化ストレス抑制療法が有効かどうか検討した臨床試験はない. また, 我々がヒトに投与可能な抗酸化薬は極めて限られる上, 投与する

抗酸化薬の種類・量・期間・併用薬の選択など酸化ストレスの有効な制御法は確立していない.

おわりに

心不全の病態形成メカニズムとして, 心筋の構築・機能変化, すなわちリモデリングが重要な役割を果たしている. リモデリングに陥った心筋では, 心筋細胞のミトコンドリア電子伝達系における活性酸素の産生が亢進する. ミトコンドリアは, 活性酸素の産生源であると同時に, そのターゲットとなり mtDNA が傷害される. mtDNA の傷害は, 電子伝達系の機能不全をもたらす. ミトコンドリアで生成された活性酸素は, 心筋の収縮機能や構築を障害し, さらに心不全の発症に関与する. したがって, ミトコンドリアは, エネルギー産生やアポトーシスばかりでなく, 活性酸素の発生源と

して極めて重要な細胞内器官である。今後、mtDNAの酸化傷害の分子機序の解明、さらにその抑制による新たな心筋リモデリング・心不全の治療法の開発が期待される。

文 献

- 1) Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, et al: Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 1999; 85: 357-63.
- 2) Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, et al: Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in the failing myocardium. *Circ Res* 2000; 86: 152-7.
- 3) Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, et al: Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res* 2001; 88: 529-35.
- 4) Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, et al: Oxidative stress mediates tumor necrosis factor- α induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation* 2003; 107: 1418-23.
- 5) Williams RS: Canaries in the coal mine: mitochondrial DNA and vascular injury from reactive oxygen species. *Circ Res* 2000; 86: 915-6.
- 6) Wang J, Wilhelmsson H, Graff C, et al: Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat Genet* 1999; 21: 133-7.
- 7) Li H, Wang J, Wilhelmsson H, et al: Genetic modification of survival in tissue-specific knockout mice with mitochondrial cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3467-72.
- 8) Maki H, Sekiguchi M: MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 1992; 355: 273-5.
- 9) Tsutsui H, Ide T, Shiomi T, et al: 8-oxo-dGTPase, which prevents oxidative stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing hearts. *Circulation* 2001; 104: 2883-5.
- 10) Tsutsui H, Ide T, Hayashidani S, et al: Greater susceptibility of failing cardiac myocytes to oxygen free radical-mediated injury. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 103-9.
- 11) Siwik DA, Tzortzis JD, Pimental DR, et al: Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase induces cell growth, hypertrophic phenotype, and apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes in vitro. *Circ Res* 1999; 85: 147-53.
- 12) Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, et al: Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice. Role of oxidative stress. *Circ Res* 2000; 87: 392-8.
- 13) Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, et al: Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H1229-35.
- 14) Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, et al: Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2004; 109: 544-9.