

酸化ストレスと循環器疾患

八木 秀 介*, 佐 田 政 隆*

はじめに

スーパーオキシド(O_2^-)などの活性酸素種(ROS; Reactive Oxygen Species)は、通常生体内の消去系で消去されるが、レニン・アンジオテンシン系(RAS)活性化などの病態においては、消去系能力を超えるROSが産生される。このROS産生系と消去系のバランスが破綻し酸化に傾いている状態を酸化ストレスという。酸素の1電子還元で生じる O_2^- 、これにより派生する過酸化水素、ヒドロキシラジカル、および励起状態の酸素である1重項酸素が狭義のROSに含まれる。過剰に産生されたROSが生体構成物質である蛋白質、糖質、脂質、核酸などを攻撃し細胞障害をもたらす。その一方でROSは細胞内Ca応答、リン酸化、転写因子の活性化などのレドックス細胞応答における細胞内情報伝達機構や生体防御機構において重要な役割を果たす。近年の様々な研究から酸化ストレスが関与していない疾患はほとんど無いと言ってよく、酸化ストレス抑制が新たな治療標的となっている。循環器疾患においても、高血圧、脂質異常症、糖尿病、メタボリック症候群、喫煙などの冠危険因子は、酸化ストレスを亢進させることが明らかにされている。

血管リモデリングとラジカル

動脈硬化危険因子により、ROSが産生され、血管リモデリングが進行し、プラーク破裂という最終イベントに結びつく。動脈硬化の成因として、Russell Rossが指摘した下記の傷害反応説¹⁾による考えかたが現在でも受け入れられている。つまり、

動脈硬化危険因子により血管内皮障害因子が存在すると、LDLが内皮下に浸潤し、酸化変性を受け、障害を受けた血管内皮細胞に接着因子が発現し、血中の単球が接着因子により捕捉され血管内皮下へと侵入し、酸化LDLを貪食することにより泡沫化マクロファージへと変化する。この泡沫化マクロファージが増殖性因子・サイトカインを分泌し、平滑筋細胞の遊走・増殖を惹き起こし、壊死物質の上に線維性被膜が形成される。次にマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)がコラーゲン細胞間物質を分解することで被膜の脆弱化を来とし、プラークが破裂する。この炎症反応である動脈硬化形成のすべての過程で下記のように酸化ストレスが関与している。

A. 内皮細胞機能障害

高血圧・高脂血症・糖尿病などのストレスにより内皮細胞が障害され、NADPHオキシダーゼ活性化により、ROSが産生される。ROSによりMAPキナーゼが活性化され、NF- κ BやAP-1などのレドックス感受性転写因子を介して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などの蛋白が発現する(図1)。

B. 泡沫細胞形成

内皮下ではLDLの酸化が重要である。酸化LDLはスカベンジャー受容体であるSR-A, CD36, LOX-1などを介してマクロファージや平滑筋細胞に取り込まれ動脈硬化層に蓄積し、マクロファージを活性化しプラークを形成する。

C. 平滑筋と線維芽細胞の増殖

酸化ストレスは血管平滑筋や線維芽細胞に対しても肥大や増殖を誘導し血管のリモデリングを惹き起こす。プラーク内部における平滑筋の増殖機序については従来中膜に存在する平滑筋が酸化ストレス、炎症を契機に形質転換をして内皮下に移

*徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
循環器内科学

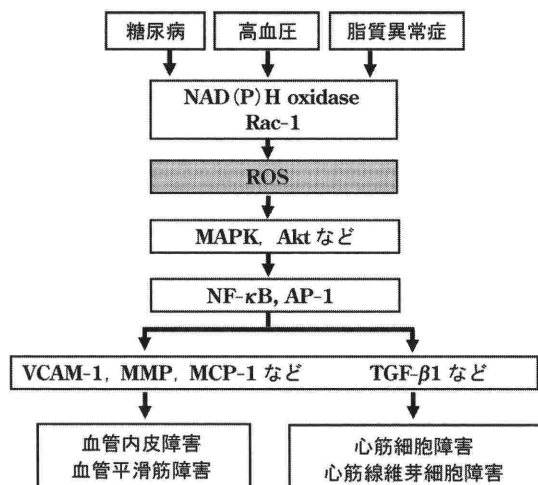


図1 活性酸素種による細胞情報伝達と心血管障害

動して増殖すると考えられていたが、近年プラーク内の存在する平滑筋様細胞は骨髄由来の前駆細胞が内皮下に進入した後、機械的・液性因子に反応して平滑筋様細胞に分化していることが明らかとなった²⁾。

D. プラーク破裂

活性化された泡沫化マクロファージは MMP を分泌し線維性被膜を分解し、プラークを破裂させる。この MMP の分泌は炎症や ROS によって制御されている。

心筋リモデリングとラジカル

高血圧、弁膜症などの力学的負荷増大、心筋梗塞など収縮単位の喪失などから心臓は病的肥大、線維化を来す。病的な心肥大では、心機能低下を伴わない代償性心肥大から代償しきれず心機能低下を伴う非代償性心肥大へと進行していく。その病態には、RAS、エンドセリン、ノルエピネフリンなどの神経体液因子、TNF- α などのサイトカインの増加から ROS が過剰に産生され、細胞内情報伝達が活性化されることが関与している。ROS は、心筋細胞肥大、細胞死、心線維芽細胞増殖と線維化、虚血再灌流障害などの心筋リモデリングに深く関与している。

A. 心筋細胞肥大

1998 年にはじめてアンジオテンシン II、および TNF- α による心筋細胞肥大を ROS が媒介していることが証明され、ROS がセカンドメッセンジャ

ーとして心筋細胞肥大のシグナル伝達に関与することが示唆された³⁾。ROS による細胞肥大には PKC やストレス応答 MAP キナーゼ (p38, JNK) が関与する。

B. 細胞死

心筋細胞においては、過酸化水素を負荷することにより細胞にアポトーシスがみられることが示されており、心筋細胞に対して酸化ストレスは細胞死を誘導するとされていた⁴⁾。近年 ROS によるアポトーシスやネクローシスという心筋細胞死の誘導にミトコンドリアの破綻が中心的な役割を果たし、MAPKKK である ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) が重要であることが明らかにされた⁵⁾。

C. 虚血再灌流障害

心筋梗塞発症後早期再灌流療法の施行にも拘らず、心筋壊死、心筋スタニング、再灌流性不整脈、no-reflow 減少の病態が認識されるようになった。これらの虚血再灌流障害には活性酸素産生や Ca^{2+} の過負荷などが関与している。心筋虚血再灌流後では、キサンチンヒドロキシラーゼがキサンチンオキシダーゼに変化することや、ATP 分解で生じたヒポキサンチンによる O_2^- 産生とさらに活性化好中球の NADPH オキシダーゼによる大量の O_2^- 産生が生じ心筋細胞障害に働く。また ROS はミトコンドリアの蛋白、DNA、膜脂質を障害し mitochondrial permeability transition pore (PTP) の Ca^{2+} 感受性を亢進させることで PTP を開口させミトコンドリアの膨化、膜電位消失、アポトーシスなどの細胞死を惹起する⁶⁾。

活性酸素の産生系

活性酸素は、大気汚染、放射線、紫外線、薬剤、タバコなどの外部環境から生成されるものと生体内から生成されるものがある。生体内では、心血管系で生成される ROS のほとんどは、血管内皮細胞や平滑筋細胞における NADPH オキシダーゼによる O_2^- 産生であり、これらが心血管細胞障害を惹起している。また内皮細胞においては eNOS uncoupling が重要である。

A. NADPH オキシダーゼ

NADPH オキシダーゼは、好中球やマクロファージなどの貪食細胞における活性細胞産生系とし

て同定され、生体防御、免疫機構として重要な役割を担っている。1994年に培養平滑筋細胞をアンジオテンシン II にて刺激すると NADPH オキシダーゼ依存性に活性酸素が産生されることが示され、貪食細胞における NADPH オキシダーゼと同様の系が内皮細胞、血管平滑筋、外膜線維芽細胞においても重要な役割を果たしていることが明らかにされた⁷⁾。NADPH オキシダーゼは細胞質の NADPH から電子を受け取り、酸素分子を 1 電子還元して O_2^- を産生する(図2)。貪食細胞の NADPH オキシダーゼは、細胞膜コンポーネントである p22^{phox}, gp91^{phox}, 細胞質コンポーネントである p67^{phox}, p47^{phox} などから構成される。この NADPH オキシダーゼは細胞質コンポーネントである small G 蛋白の Rac1 のよって調節を受け、そのリン酸化による活性化に伴い p47^{phox} が PKC もしくは Akt によるリン酸化を受ける。それにより p47^{phox} が p22^{phox} と結合する。Rac1 は活性化により p67^{phox} と結合し Rac-p67^{phox} 複合体が gp91^{phox} を活性化する。この結果 O_2^- が産生される。

この NADPH オキシダーゼによる ROS 産生に最も重要な働きをしているのが Rac1 である。Rac は Rho ファミリーの GTPase の一つであり、細胞の形態、骨格形成に関与しているのと同時に NADPH オキシダーゼの細胞質サブユニットとして知られ

ている。Rac1 の活性化により心筋細胞肥大が起こり、また心筋特異的に Rac1 を欠損させたノックアウトマウスでの研究ではアンジオテンシン II の持続投与による心肥大が ROS 産生の抑制を介して抑制されることが明らかとなった^{8,9)}。

また近年、細胞膜コンポーネントである gp91^{phox} もホモログがクローニングされ NOX (NADPH Oxidase) と DUOX (Dual oxidase) として注目されている。これまで NOX1 と NOX5 までの 5 つの NOX ファミリーと、DUOX1, 2 の 2 つの DUOX ファミリーが同定されている。gp91^{phox} は NOX2 として分類されている。特に NOX1, NOX4 は細胞増殖、細胞肥大、アポトーシス、細胞外マトリックス代謝など多彩な細胞機能との関連があり、心血管病との関連が深い。また細胞質コンポーネントである p47^{phox}, p67^{phox} のホモログとして p41^{nox}, p51^{nox} が同定され、それぞれ NOX Organizer (NOXO1), NOX Activator (NOXA1) と呼ばれており注目されている。

B. eNOS uncoupling

内皮細胞においては、一酸化窒素 (NO) は内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) からアルギニンを器質として合成される。eNOS により産生される NO は ROS を消去することで抗酸化薬として働く。しかしながら eNOS は病的条件下では NO だけでな

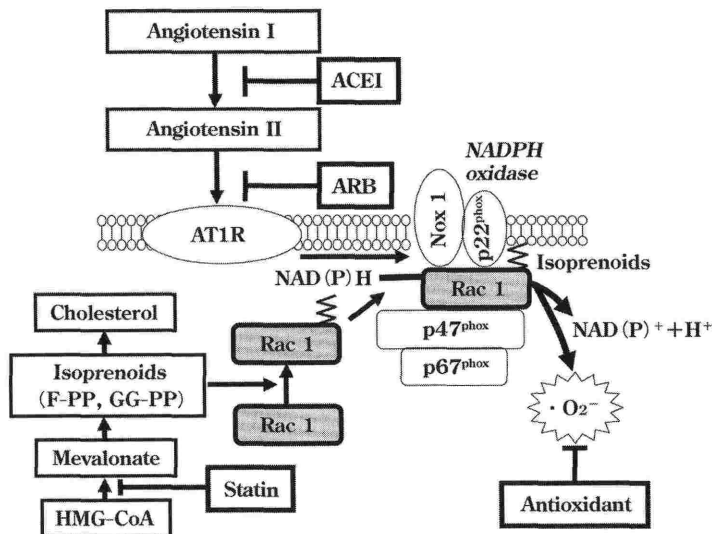


図2 Rac1 による活性酸素産生の機序と抗酸化薬の作用機序

アンジオテンシン II 刺激により、Rac1 はリン酸化を受け活性化し、細胞膜へ移動する。また Rac1 はイソプレノイドであるファルネシルピロリン酸 (F-PP) やゲラニルゲラニルピロリン酸 (GG-PP) の脂質修飾をうけ、細胞膜へアンカリングされる。スタチンはこれらを抑制することにより ROS 産生抑制効果を示す。

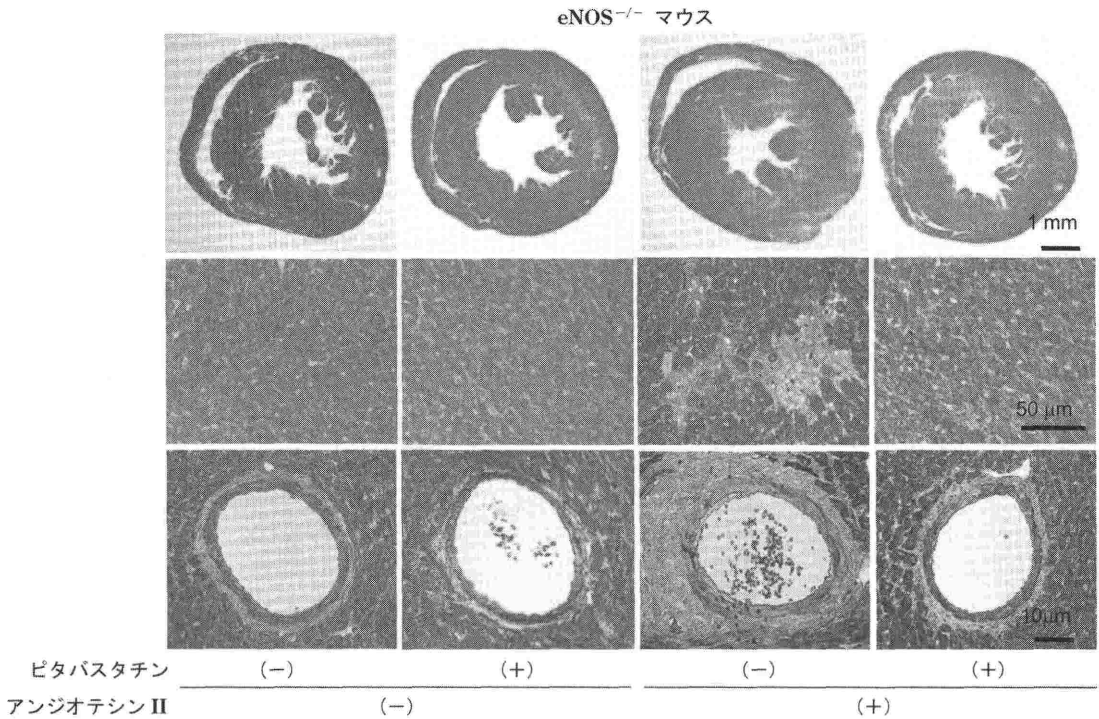


図3 ピタバスタチンのアンジオテンシン II による心血管障害抑制効果(文献12より改変)

ピタバスタチンは野生型マウスのみならず eNOS ノックアウトマウスにおいてもアンジオテンシン II による心血管リモデリング(心筋線維化, 心筋細胞肥大, 冠動脈周囲の線維化, 冠動脈中膜肥厚)を抑制する。

く、 O_2^- を産生する。eNOS は NO を産生する際には、補酵素としてテトラヒドロピオプテリン(BH₄)を必要とする。通常 eNOS は 2 量体を形成しているが BH₄ が低下すると eNOS の 2 量体形成が不十分となり、ドメイン間の電子伝達が障害され NO だけでなく O_2^- を産生する。この現象を uncoupling という。動脈硬化病変では BH₄ の欠乏が生じており eNOS uncoupling によって O_2^- が産生され、eNOS がむしろ ROS の産生系として働く。

C. その他

ミトコンドリア電子伝達系, キサンチンオキシダーゼ系, ミエロペルオキシダーゼ系なども ROS 産生系として心血管病の発症・進展に深く関わっている。

心血管病治療と活性酸素

アップストリーム治療としては、高血圧, 糖尿病, 脂質異常症, 喫煙などのリスク管理が最も有効であると考えられる。ダウンストリーム治療としてはビタミン群, RAS 阻害薬, β遮断薬, スタチンなどが挙げられる。

A. 抗酸化薬

ROS を捕捉するビタミン C やリポ蛋白に含まれる脂質の酸化抑制作用をもつビタミン E などのビタミン群については、局所における血管拡張能改善効果について多数報告されているが大規模臨床研究結果からは心血管イベント抑制効果は確立されていない。心血管イベントを抑制した CHAOS study, SPACE study や抑制しなかった HOPE Study, Heart Protection Study が報告されている。

B. RAS 抑制薬

アンジオテンシン II は NADPH オキシダーゼの代表的な活性化因子であることから、ACE 阻害薬, AT1 受容体拮抗薬(ARB)は広義の抗酸化薬として期待される。大規模臨床試験のメタ回帰分析からは ACE 阻害薬は降圧とは独立した冠動脈イベント抑制作用がみられたが、ARB ではみられなかったと報告された¹⁰⁾。しかし日本人を対象とした Jikei Heart Study では ARB にても降圧作用には依存せず心血管イベントを抑制することが報告されている。

C. β遮断薬

交感神経刺激が直接的に酸化ストレスを誘導す

る可能性が示されていることにより、 β 遮断薬も抗酸化作用が期待でき、特に心不全に対してエビデンスが豊富であるカルベジロールの酸化ストレス抑制作用が多数報告されている。

D. スタチン(HMG-CoA 還元酵素阻害薬)

近年スタチンが強力な酸化ストレス抑制薬として期待されている。スタチンはメバロン酸カスケードの律速酵素である HMG-CoA 還元酵素を阻害することでコレステロール合成を抑制し、同時にファルネシルピロリン酸(F-PP)やゲラニルゲラニルピロリン酸(GG-PP)というイソプレノイドの産生を抑制する。イソプレノイドはプレニル化という脂質修飾を受けることで細胞膜へのアンカーとなり NADPH オキシダーゼの活性化に関与している。スタチンはイソプレノイド産生を抑制することで Rac1 を介した NADPH オキシダーゼ活性を抑制し、ROS 産生を減少させる。

スタチンの心血管保護効果は NO を介した作用であることが報告されているが¹¹⁾、我々は、ピタバスタチンが、アンジオテンシン II 持続投与マウスにおいて心血管リモデリングと腎障害を eNOS 非依存性に抑制することを eNOS ノックアウトマウスを用いた実験にて明らかにした(図3)¹²⁾。またこられるピタバスタチンの効果は Rac1 活性化を介した酸化ストレス、TGF- β /Smad 経路抑制を介した作用であることがわかった。スタチンは、糖尿病、高血圧、脂質代謝異常などの RAS が活性化している状態、内皮機能障により NO が枯渇している病態に対しても抗酸化薬として心血管・腎保護効果が期待できる。

おわりに

以上酸化ストレスと循環器疾患につき概説した。多くの研究結果から酸化ストレスが心血管病の発症・増悪に重要な役割を果たしていることは明らかである。しかしながら現時点では、ゴールドスタンダードとなる酸化ストレスのマーカーがなく、また抗酸化療法については、議論が残るところである。今後酸化ストレスマーカーや抗酸化療法の臨床応用が期待される。

文 献

- 1) Ross R: Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138 (5 Pt 2): S419-20.
- 2) Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al: Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002; 8: 403-9.
- 3) Nakamura K, Fushimi K, Kouchi H, et al: Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II. *Circulation* 1998; 98: 794-9.
- 4) 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.
- 5) Ichijo H, Nishida E, Irie K, et al: Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 1997; 275 (5296): 90-4.
- 6) Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, et al: The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem* 2001; 276: 12030-4.
- 7) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, et al: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 1141-8.
- 8) Satoh M, Ogita H, Takeshita K, et al: Requirement of Rac1 in the development of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 7432-7.
- 9) Pracyk JB, Tanaka K, Hegland DD, et al: A requirement for the rac1 GTPase in the signal transduction pathway leading to cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest* 1998; 102: 929-37.
- 10) Turnbull F, Neal B, Pfeffer M, et al: Blood pressure-dependent and independent effects of agents that inhibit the renin-angiotensin system. *J Hypertens* 2007; 25: 951-8.
- 11) Laufs U, La Fata V, Plutzky J, et al: Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1129-35.
- 12) Yagi S, Aihara K, Ikeda Y, et al: Pitavastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, exerts eNOS-independent protective actions against angiotensin II induced cardiovascular remodeling and renal insufficiency. *Circ Res* 2008; 102: 68-76.