

全身性炎症反応症候群における 活性酸素種の病態修飾機構

松田直之*

Key words : 全身性炎症反応症候群, 活性酸素,
NADPH, NOX

はじめに

活性酸素種(ROS: reactive oxygen species)の存在が分子レベルで報告されたのは1954年である¹⁾。

まさにパンドラの箱として発見されたROSも、現在までの54年の歳月を経て、老化、腫瘍、糖尿病、動脈硬化、慢性関節リウマチなどの細胞機能制御因子として詳細な検討が行われてきた。

急性期管理医学領域のターゲットとする全身性炎症や虚血性病態においても、ROSで酸化された蛋白、脂質、DNAが主要臓器機能に影響を与えることが注目されてきた。傷害組織では、浸潤する単球や好中球などの貪食細胞からROSが多量に放出されることに加えて、組織を構成する様々な細胞が独自にROSを産生する。正常生体内ではROSは微量の調節により細胞分化、細胞増殖、免疫反応、炎症反応、酸素センサーとして機能しているが、近年特に病態時における調節機構としてNADPHオキシダーゼ(NOX)のROS産生機構の研究が進んできた。ROSには、スーパーオキシド($O_2 \cdot^-$)、過酸化水素(H_2O_2)、ヒドロキシラジカル

($\cdot OH$)、次亜塩素酸($HOCl$)、一重酸素(1O_2)、ペルオキシラジカル($RO_2 \cdot$)、アルコキシラジカル($RO \cdot$)などが含まれるが、この産生の根底として、NOXの発現が注目されている。

このようなROS産生に対して、生体内ではビタミンC、ビタミンE、 β -カロチン、グルタチオン、尿酸、ビリルビンなどの生体内物質や、superoxide dismutase(SOD)、カタラーゼ、ペルオキシダーゼ、ヘムオキシダーゼなどの抗酸化酵素が、抗酸化分子としてROSの作用に拮抗している。しかし、ROSが過剰に産生される病態においては、これらの抗酸化作用を凌駕して、ROSによる細胞機能障害が進行する。本稿では、生体内におけるROSの過剰産生機構を、重症患者管理における全身性炎症反応症候群の病態に照らして論じる。

全身性炎症反応症候群

全身性炎症反応症候群(SIRS: systemic inflammatory response syndrome)は、1992年に米国集中治療医学会と米国胸部疾患学会により提唱された症候群であり、体温、心拍数、呼吸数、白血球数の4つのクライテリア(表1)のうち、2つ以上を満たす病態と定義されている²⁾。外傷、手術、広範囲熱傷、急性膵炎、敗血症(sepsis)、長期絶食、虚血、

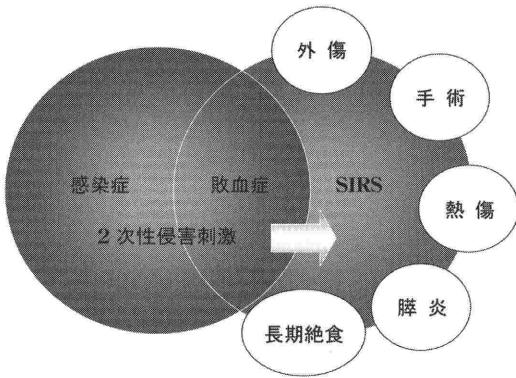
表1 SIRS診断のための4項目

□ 体温	>38°Cあるいは<36°C
□ 心拍数	>90/分
□ 呼吸数	>20/分あるいはPaCO ₂ <32mmHg
□ 白血球数	>12,000/mm ³ あるいは<4,000/mm ³ あるいは幼若球数>10%

以上の4項目のうち2つ以上を満たす場合、SIRSと診断する。

*京都大学大学院医学研究科初期診療・救急医学分野
准教授

全身性炎症反応症候群 (SIRS)



重症敗血症：ショック，多臓器不全，DICの合併

図1 全身性炎症反応症候群と敗血症

全身性炎症反応症候群 (SIRS: systemic inflammatory response syndrome) は、外傷、手術、広範囲熱傷、急性膵炎、敗血症 (sepsis)、長期絶食などの基礎疾患において、炎症性サイトカインの産生が高まった病態である。これらの基礎疾患において、感染症は2次性侵害刺激として働き、ショック、多臓器不全、播種性血管内凝固症候群 (DIC) を合併した重症敗血症 (severe sepsis) を導きやすい。このような SIRS 重症化に対して、活性酸素種も一役を担うと考えられている。

ショックなどの基礎疾患において、炎症性サイトカインの産生が高まると、SIRS の病相が出現する。また、これらの基礎病態において、感染症は2次性侵害刺激として SIRS を重篤化しやすく、多臓器不全を合併した重症敗血症 (severe sepsis)²⁾ を導きやすい(図1)。このような病態では、急性肺障害、ショック、急性腎不全、播種性血管内凝固症候群 (DIC: disseminated intravascular coagulation) などを同時に合併し、死亡率が高まる。

主要臓器の様々な細胞には、Toll-like 受容体 (TLR), tumor necrosis factor (TNF) 受容体、Interleukin (IL) 受容体などの炎症性受容体が存在し、SIRS を進展させることが確認できる³⁻⁵⁾。このような SIRS 病態において、ROS が過剰産生され、炎症やアポトーシスが進行することが確認されている⁶⁻⁸⁾。集中治療管理を必要とする重症敗血症⁹⁾、心原性ショック¹⁰⁾、急性肺傷害¹¹⁾ などにおいても、様々な臓器で抗酸化分子が低下しているばかりか、ROS 産生自体が亢進していることが検証されている。

SIRS 病態では、炎症性血球細胞の浸潤に加えて、

様々な組織の基幹細胞で独自に炎症とアポトーシスが進行する⁴⁾。この機序として、組織一群に炎症性受容体を持つ見張り番のような Alert 細胞 (警笛細胞)^{4,5)} が関与する。末梢組織では、同種の細胞といえどもすべての細胞が炎症性反応を惹起するわけではなく、炎症の狼煙を上げるのは一群に存在する一部の細胞に過ぎない。SIRS 病態における主要臓器の Alert 細胞は、転写因子 nuclear factor- κ B (NF- κ B), activator protein-1 (AP-1), cyclic AMP response element binding protein (CREB)/activating transcription factor (ATF), signal transducer and activator of transcription (STAT), interferon regulatory factor (IRF), hypoxia inducible transcriptional factor (HIF) などの様々な転写因子を活性化させ、ケモカイン、接着分子、炎症性物質の転写を高める^{4,5,12)}。さらに、Alert 細胞では、炎症性シグナルとして mitogen-activated protein kinase (MAPK) やプロテインキナーゼ C (PKC) などのリン酸化酵素の活性化も認められる。SIRS 病態では、このような細胞内情報伝達シグナルを介して Alert 細胞で ROS が過剰産生され、重症度が高められる。さらに、動員された貪食細胞は、同様の細胞内シグナルを介して極めて高量の ROS を放出し、組織細胞障害を広範化させる。

活性酸素種と NADPH オキシダーゼ

ROS は、好中球、好酸球、単球、マクロファージなどの貪食細胞では細胞内で μ M ~ mM レベルに増加し、殺菌作用をもたらすことが知られている¹³⁾。一方、主要臓器の基幹細胞や血管内皮細胞や血管平滑筋細胞でも ROS は産生されるが、正常時は nM ~ μ M レベルの低濃度に維持されている¹³⁾。ROS を産生する細胞内器官は、ミトコンドリア、小胞体、核膜、プロテアソーム、細胞膜などと様々であり、ROS はミトコンドリア電子伝達系に加えて、NOX, シクロオキシゲナーゼ, リポキシゲナーゼ, チトクローム p450, キサンチンオキシダーゼ, ペルオキシダーゼなどの酵素により産生される。このうち特に、NOX は ROS 産生の中心であり、スーパーオキシドの産生に重要な役割を担う。主要臓器の基幹細胞の ROS 産生においても、NOX が主要な役割を担うと考えられている^{13,14)}。

現在、NOX は、NOX1~NOX5, DUOX1~2 の7つ

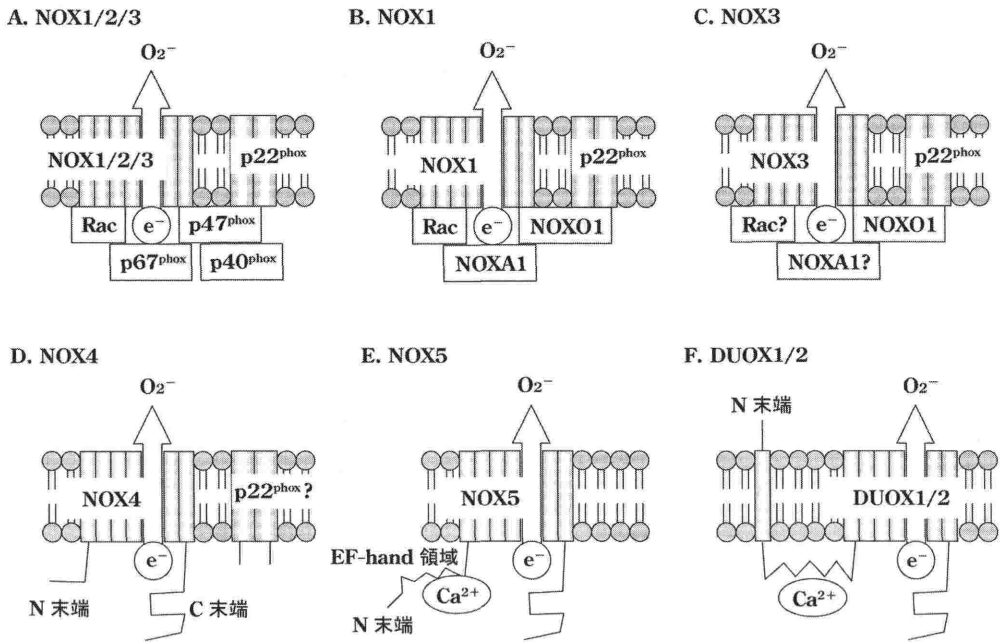


図2 NOXファミリーの活性化機構

のアイソフォームが同定され、さらにNOX作用を高める因子として、NOXと恒常的に会合しているp22^{phox}、2つのオーガナイザー因子(p47^{phox}、NOXO1)、2つの活性化因子(p67^{phox}、NOXA1)およびp40^{phox}、2つのDUOX特異的成熟因子(DUOXA1、DUOXA2)が同定されている。細胞膜上に固定化されるNOX1～NOX5は6回膜貫通型蛋白として、DUOX1/2の2つのアイソフォームは7回膜貫通型膜蛋白として、それぞれの活性化調節因子との連動によりNADPHよりスーパーオキシドを産生する。

A. NOX2

NOX2は、gp91^{phox}やb-245として1986年にRoyer-Pokoraら¹⁵⁾や1987年にTeahanら¹⁶⁾によりはじめて同定されたNOXである。6回膜貫通型蛋白としてN末端とC末端が細胞質内に位置するように細胞膜上に固定されるが、その活性化にはp22^{phox}との会合に加えて、p47^{phox}の細胞膜への移動が必要とされる(図2A)¹⁷⁾。p47^{phox}の細胞膜移動により、次にp47^{phox}をターゲットとしてp67^{phox}やp40^{phox}の細胞膜移動が生じ、最終的にはRacがp67^{phox}と連動してNOX2を活性化させる¹⁸⁾。Racは現在3種類が同定されているsmall GTPaseであり、Rac1は主に末梢組織に、Rac2は主に骨髄系細胞に、Rac3は主に中枢神経に分布している。

NOX2は発見当初、好中球やマクロファージなどの貪食細胞に局在するものと考えられていた。確かにNOX2は貪食細胞に高発現しているものの、神経細胞や腸管、さらには心筋細胞、血管内皮細胞などの心血管系にも比較的高密度に発現している^{19～21)}。このような組織では、p47^{phox}の細胞膜移動をトリガーとして、スーパーオキシドが産生される。

このNOX2をコードするNOX2遺伝子は、X染色体q21.1に存在する。NOX2遺伝子のプロモーター領域には、NF- κ B、AP-1、IRF1、IRF2、PU.1(myeloid-specific transcriptional factor)、Elf-1、YY1が結合し、NOX2の転写を高めることができる。虚血、外傷、感染症などにおいては、傷害部位でNF- κ BやAP-1やIRFの活性が高まるため¹²⁾、NOX2発現が高まりやすい。このように炎症局所では、ROSの産生が高まりやすい。これに加えて、心血管系領域ではアンジオテンシンIIにより翻訳レベルでNOX2発現が高まることも報告されている²²⁾。

B. NOX1

NOX1は、NOX2の次に1999年に同定されたNOX2の相同体であり、当初はMox1、NOH1と呼ばれていた^{23,24)}。NOX1も他のNOXと同様に単独ではROSを産生する能力は極めて低い。NOX1は、

NOX2 と同様に p22^{phox} との連動が必要であり、さらに NOXO1/NOXOA1 (図2B) あるいは p47^{phox}/p67^{phox} (図2A) との会合により活性化され、最終的には Rac により活性化される^{25,26}。NOX1 は腸管上皮、肺、腎臓に多く存在するが、血管平滑筋細胞や血管内皮細胞にも発現しており^{21,23}、特に血管平滑筋における NOX の主体は NOX1 である。

ヒト NOX1 遺伝子は NOX2 と同様に、X 染色体上 (Xq22) に存在する。プロモーター領域には、NF- κ B, AP-1, IRF, CREB, STAT, CBP/p300, GATA との結合領域があり、これらにより NOX1 は転写が高められる。虚血や炎症で活性が高まる NF- κ B や、IL-6 シグナルにより活性化される STAT3 により、NOX1 の発現は転写段階で高められる。血管系では、PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) 刺激による PKC 活性や PKC- δ により、NOX1 発現が高まることも報告されている²⁷。このように SIRS 病態では、炎症局所で NOX2 に加えて NOX1 の発現が高まり、ROS の産生が増加すると考えられる。

C. NOX3

NOX3 は、2000 年に菊池らによりヒト腸管上皮細胞で同定された²⁸。内耳に高密度に発現し、脳や胎児の腎臓などにも発現を認めるが、心血管系における発現は乏しく、当研究室においてもヒト血管における発現を検出できていない。NOX1 や NOX2 と同様の活性化分子を介して ROS を産生するが、その中でも p22^{phox} および NOXO1 の関与が大きい。しかし、Rac が NOX3 を活性化させるかどうかに関しては、2008 年までの段階で結論が出ていない。現在、NOX3 の活性化において、NOXO1 存在下では Rac の会合は不必要であり、p47^{phox} 存在下では Rac を必要とするとの考えが一般的である (図2A)。NOX3 は、NOXO1 存在下でヒト腸管上皮細胞で恒常的にスーパーオキシドを産生していると考えられている (図2C)。

D. NOX4

NOX4 は、2000 年に腎臓と甲状腺で同定された^{29,30}。腎臓だけではなく、心血管系の小胞体や核膜に強く発現することが知られている。NOX4 が他の NOX と異なる点は、免疫沈降では NOX4 と p22^{phox} との結合を確認できるが、必ずしも細胞膜での p22^{phox} との会合を必要としないことにある

(図2D)。NOX4 の活性化には p22^{phox} が関与すると報告があるが、NOX4 の活性化は p22^{phox} 欠損においても保たれる。また、NOX4 の活性化には、他の p47^{phox} や NOXO1/NOXOA1 の細胞膜移動や Rac の活性化などを必要としないことも報告されている³¹。このように、NOX4 は他の NOX と異なり、その膜発現量で ROS 産生を制御していると考えられている。

一方、ヒト NOX4 遺伝子は 11q14.2-q21 に存在し、NOX4 発現は TNF- α 、アンジオテンシン II シグナル、PKC 活性、高血糖により高められることが確認されている。NOX4 は SIRS 病態の心血管系で発現が高められる可能性がある。このような状況において、Toll-like 受容体 4 (TLR4) と NOX4 は結合することが確認されており、グラム陰性桿菌感染症では TLR4 シグナルが直接に NOX4 を活性化させ、ROS を産生させる可能性が示唆されている^{32,33}。

E. NOX5

NOX5 は、2001 年に脾臓や精巣で同定された^{34,35}。NOX5 は、脾臓やリンパ組織に高密度で存在するが、心血管系にも確認でき、成熟段階のリンパ球には存在するが、血中のリンパ球には存在しないことが知られている。NOX5 は NOX1~3 と異なり、その活性化には p47^{phox} や NOXO1/NOXOA1 の細胞膜移動や Rac の活性化などを必要としない。NOX5 は、N 末端の細胞内領域が長く保存されているのが特徴であり、EF-hand 領域と呼ばれている (図2E)。この EF-hand 領域には Ca²⁺ が結合することが知られており³⁶、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇により NOX5 は構造変化を起こし、NADPH よりスーパーオキシドを産生すると考えられている³⁶。NOX5 の発現調節については、今後の詳細な検討が待たれる。

F. DUOX1/2

DUOX1/2 は、1999 年に甲状腺より同定された^{30,37}。甲状腺以外には、気管支上皮細胞や Langerhans 島に存在するが、心血管系には同定できない。他の NOX と異なり、7 回膜貫通型蛋白であり、N 末端領域が細胞外に位置する。DUOX1/2 も NOX5 と同様に、細胞内に Ca²⁺ 結合部位を持つ。甲状腺上皮細胞では、細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇により DUOX1/2 を活性化させ、スーパーオキシドを産生する。

G. p22^{phox}

p22^{phox}は、NOXに機能を補助する分子として、極めて重要な役割を担う。このp22^{phox}の主な機能は、①NOXの細胞膜上での安定化、②p47^{phox}とNOXO1との結合の2つにある。一般にNOXの細胞膜分画のウェスタンブロット解析を行う際に、そのバンド検出蛋白重量にばらつきやスミアが生じやすい理由のひとつとして、NOXとp22^{phox}の恒常的会合や糖鎖修飾があげられる。NOXとp22^{phox}は、細胞膜上で1:1の比率で会合しており³⁸⁾、NOXやp22^{phox}が会合せずに単体で存在する場合には、これらは細胞質内に陥入し、プロテアソームにより分解されやすい³⁹⁾。そして第2の役割として、C末端のプロリンリッチ流域(PRR)を介して、p22^{phox}はp47^{phox}やNOXO1のSH3ドメイン(Src homology 3 domain)と結合できる。このように、p22^{phox}は、NOXとオーガナイザー因子(p47^{phox}, NOXO1)を橋渡しする足場蛋白としての役割を担っている。

H. NOXオーガナイザー因子(p47^{phox}, NOXO1)

p47^{phox}(NOXO2)とNOXO1の役割は、p22^{phox}との結合の後にNOX活性化因子(p67^{phox}, NOXA1)を細胞膜に動員させることにある。p67^{phox}とNOXA1は共に、N末端領域にphoxドメイン(PXD)を保持しており、このPXDにより細胞膜リン脂質と結合できる。さらにC末端のPRRを介して、p47^{phox}はp67^{phox}と、NOXO1はNOXA1と結合できる。p47^{phox}とNOXO1には、PXDとPRRの間にSH3ドメインがあり、p22^{phox}と結合する⁴⁰⁾。この2つのオーガナイザー因子のうち、心血管系に豊富なのはp47^{phox}であり、NOXO1は腸管、肝臓、腎臓、膵臓などに高密度で発現している。

p47^{phox}とNOXO1の違いは、p47^{phox}は活性化抑制領域(AIR: autoinhibitory region)を持つ点にある。また、NOXO1は主に細胞膜上のホスホチジルイノシトール1リン酸に結合するのに対して、p47^{phox}はPI3キナーゼにより細胞膜で変化を受けた3'-ホスホチジルイノシトールとPXDで結合するが特徴がある⁴¹⁾。炎症病態の貪食細胞や血小板ではPI3キナーゼの細胞膜移動が亢進し、p47^{phox}の細胞膜接着が高まりやすい。さらに、虚血や炎症の過程でNF- κ B活性などによりp47^{phox}とNOXO1の産生が高まることが知られている。このような量的活性化調節に加えて、p47^{phox}は即時型活性化調節を

受ける。

p47^{phox}のAIRは、その3次構造の特徴より立体的にp22^{phox}との結合領域であるSH3ドメインを遮蔽している(図3)。現在、p47^{phox}のAIRにおいて特に、Pro299, Pro300, Arg301, Arg302, Ser303, Ser304, Ser328, Ser345, Ser359, Ser370, Ser379などが機能的アミノ酸として重要と考えられている。p47^{phox}が構造変化を起こし、p22^{phox}と結合できるようになるためには、Ser303からSer379までのいずれかのリン酸化が必要であり、特にSer379とSer345の単独リン酸化や、Ser303+Ser304あるいはSer359+Ser370の重複リン酸化が必須となる^{42,43)}。このように、p47^{phox}はNOXO1と異なり、AIRのリン酸化により細胞膜上のp22^{phox}との結合を高める特徴がある。p47^{phox}のAIRのリン酸化は、TNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカイン、リポポリサッカライドなどのTLR刺激、G-SF, GM-CSF, PAFなどにより、MAPキナーゼ(p38MAPK, ERK1/2)やPKCの活性化を介して生じることが確認されている⁴⁴⁾。

以上のように、炎症病態において厳密に機能調節されているオーガナイザー因子はp47^{phox}であり、SIRS病態ではp47^{phox}で選択的に活性化されるNOX2の調節機構がスーパーオキシドの産生に極めて重要な役割を担うと考えられる。

I. NOX活性化因子(p67^{phox}, NOXA1)とp40^{phox}

p67^{phox}(NOXA2)やNOXA1は、それぞれC末端領域のSH3ドメインでp47^{phox}やNOXO1と結合する。p67^{phox}は、さらにC末端領域にp40^{phox}と結合するPhox/Bem1(PB1)ドメインをもつ。p40^{phox}は、p67^{phox}のNOX活性化作用を強化するが、siRNAを用いた培養細胞における検討などよりNOXの活性化に必要不可欠な分子ではないと考えられている。p67^{phox}やNOXA1は、N末端ではRacと結合し、最終的にRacのGTPase活性を介して、NOXを活性化させる。

このような特徴を持つp67^{phox}は、貪食細胞に加えて、血管内皮⁴⁵⁾や血管平滑筋⁴⁶⁾、腎臓にも発現している。NOXA1は、腸管や肺に加えて、血管平滑筋に恒常的に発現しており、血管平滑筋におけるNOX活性化因子の主体はNOXA1と考えられている。p67^{phox}は、NOX2と同様にIFR1やPU.1などの転写活性で増加すると共に、AP-1により発現

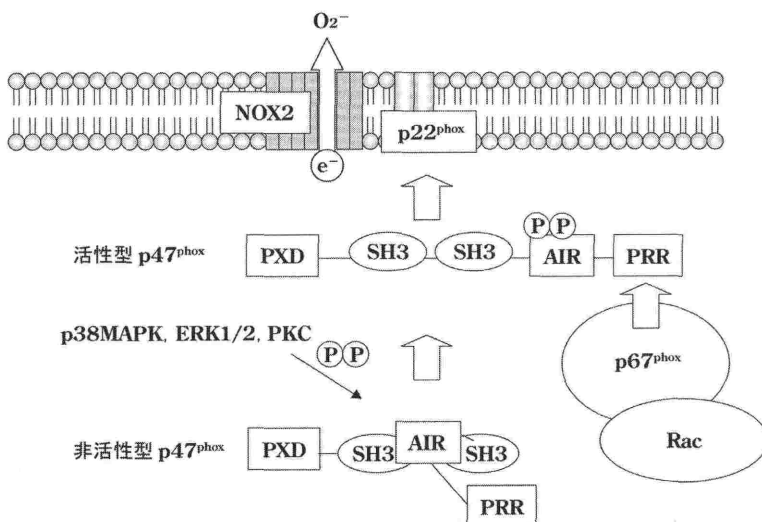


図3 p47^{phox} の活性化機構

p47^{phox} は、細胞膜上で p22^{phox} と結合した NOX2 や NOX1 に対して、p67^{phox} と Rac を会合させる。p47^{phox} は活性化抑制領域 (AIR: autoinhibitory region) を持ち、正常状態では 3 次構造の特徴により立体的に p22^{phox} との結合領域である SH3 ドメイン (Src homology 3 domain) を遮蔽している。炎症性シグナルにより AIR が MAPK や PKC などによりリン酸化を受けると、p47^{phox} に構造変化が生じ、SH3 ドメインが開かれた状態となる。これにより p47^{phox} は p22^{phox} と結合し、さらに NOX1/2 に p67^{phox} と Rac を会合させるようになる。このようにして、SIRS では、MAPK や PKC の活性化により、NOX1/2 を介した ROS の産生が高められる。PXD: phox ドメイン、PRR: プロリンリッチ流域。

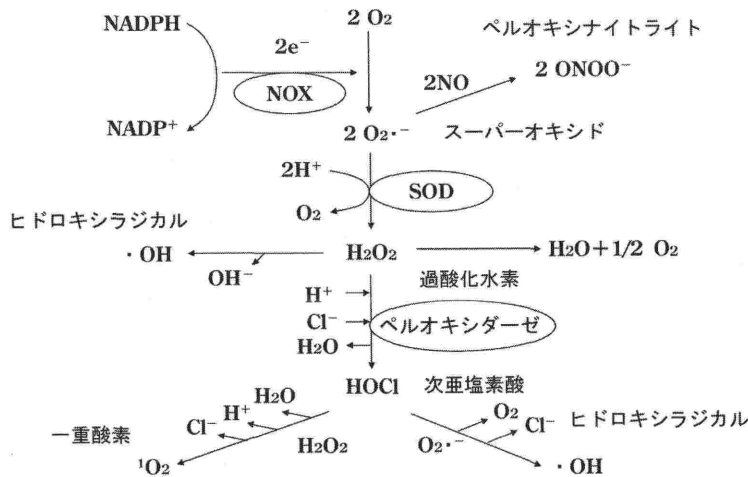


図4 活性酸素種の産生とラジカル反応

が高まることが確認されている⁴⁷⁾。このように、p67^{phox} も他の NOX 活性化因子と同様に、SIRS 病態で転写が高まると評価される。

活性酸素種の病態修飾

ROS が DNA や細胞内情報伝達蛋白に障害を与えることは、これまで多くの研究で明らかとされ

てきた。NADPH は NOX の活性化された細胞において、図4のように、まず、スーパーオキシドに変換される。スーパーオキシドは、次に一酸化窒素 (NO) との反応によりペルオキシナイトライドに変換されるとともに、SOD により過酸化水素に変換される。過酸化水素からは、ヒドロキシラジカルや次亜塩素酸が産生される。

これらの ROS による DNA 障害は、適切に修復されない限り、アポトーシスを介した細胞死の誘因となる。また、ペルオキシナイトライトは、細胞内情報伝達蛋白のチロシン残基のニトロ化を介して、チロシン残基のリン酸化を障害し、正常な細胞内情報伝達を障害する⁴⁸⁾。次亜塩素酸も極めて強い組織障害を与えることが知られており、これらの ROS はインシュリン受容体の機能障害にも関与し、インスリン抵抗性高血糖の誘引として知られている⁴⁹⁾。その他、以下の ROS を介した転写因子活性化作用が明らかとされており、SIRS 病態を増悪させると評価される。

A. 転写因子 NF- κ B の持続活性化作用

SIRS 病態で炎症性受容体を介して活性化される転写因子 NF- κ B¹²⁾は、上述のように NOX や NOX 活性化関連因子の転写を高め、ROS 産生を誘導する。一方、産生された過酸化水素濃度が μ M レベルに達すると、様々な細胞で NF- κ B 活性を上昇させることが知られている^{49~52)}。この過酸化水素による NF- κ B 活性化の機序としてこれまでに、① I- κ B (inhibitory- κ B) のプロテアソームによる分解を直接に促進させること、② I- κ B キナーゼの活性化を介して I- κ B の分解を間接的に促進させることが確認されている^{51~54)}。通常、NF- κ B 活性は自らが I- κ B の産生を高め、自らの活性に限界を持つが、DNA 障害が生じない初期段階では過酸化水素の局所産生が μ M レベルに高まると I- κ B 発現が抑制され、NF- κ B 活性が持続する⁵⁴⁾。このように、過酸化水素産生が μ M レベルに高まる初期状態では NF- κ B の核内移行が持続的に高められ、炎症性サイトカイン、iNOS や COX2、組織因子などの産生¹²⁾がさらに高められると考えられている。

B. MAPK および AP-1 の活性化作用

MAPK は、extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)、Jun-N-terminal protein kinase (JNK)、p38 MAPK、ERK5/big MAPK1 (BMK1) の 4 つのサブファミリーで構成されるセリン/スレオニンキナーゼである。このうち主に AP-1 領域の活性を高める AP-1 群の直接的な本体は、Jun と Fos である。Jun のホモ 2 量体や、Fos と Jun のヘテロ 2 量体は、リン酸化された状態で DNA 上の AP-1 領域として知られる phorbol 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive element (TPA-responsive element: TRE)

と結合し、COX-2、ICAM-1 などの炎症性マーカー、matrix metalloproteinase (MMP-1, MMP-3, MMP-9) などのプロテアーゼ、アクチンフィラメントの伸展に関与する CapG, Ezrin, Krp-1, Mts-1 などを転写段階で増加させる。SIRS 病態の Alert 細胞で活性化される AP-1 は、セリンあるいはスレオニン残基のリン酸化により活性化された Jun と Fos の 2 量体によりもたらされる¹²⁾。当研究室では、AP-1 活性により TNF 受容体 1, Fas, DR4, DR5 などの Death 受容体の細胞膜発現が高まり、肺や血管系の Alert 細胞のアポトーシスが進行することを確認している^{4,55)}。

このような MAPK および AP-1 活性に関して、スーパーオキシドや過酸化水素は、c-Jun や c-Fos を転写段階で増加させ^{56,57)}、また 100 μ M 以上の濃度高められた過酸化水素は主に JNK を介した Jun ファミリーのリン酸化により AP-1 活性を増加させる⁵⁸⁾。さらに、nM レベルの低濃度の ROS 産生であっても、JNK や p38MAPK はリン酸化活性を受けることが確認されている⁵⁹⁾。一方、ERK1/2 は 1mM を超える極めて高い濃度の過酸化水素においてリン酸化を受け、通常の ROS の産生のレベルでは活性化されないと考えられている⁶⁰⁾。

おわりに

本稿では、SIRS 病態に照らして、ROS 産生における NOX および NOX 関連因子の役割を論じた。SIRS 病態における Alert 細胞では、炎症性受容体を介して活性化された NF- κ B や AP-1 などにより転写段階から NOX および NOX 関連因子の発現が増加し、ROS 産生が高まる。一方、Alert 細胞で産生された ROS は、高濃度状態では近傍の non-Alert 細胞に対しても作用し、non-Alert 細胞に NF- κ B の活性を高め、NOX および NOX 関連因子の発現を誘導する可能性がある。さらに、non-Alert 細胞では、ROS 刺激により活性化された AP-1 を介して炎症性受容体や Death 受容体の細胞膜発現を誘導し、non-Alert 細胞を Alert 細胞に変容する可能性がある。このように、SIRS 病態の主要臓器における細胞間炎症伝播機構に対して、今後より詳細に ROS の関与が明らかにされるであろう。

文 献

- 1) Commoner B, Townsend J, Pake GE: Free radicals in biological materials. *Nature* 1954; 174: 689-91.
- 2) Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-74.
- 3) Matsuda N, Hattori Y: Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): Molecular pathophysiology and gene therapy. *J Pharmacol Sci* 2006; 101: 189-98.
- 4) 松田直之: 敗血症における遺伝子発現変化—主要臓器の警笛細胞を標的とした遺伝子治療—. *麻酔* 2008; 57: 327-40.
- 5) 松田直之: 全身性炎症反応症候群と Toll-like 受容体シグナル—Alert Cell Strategy—. *循環制御* 2004; 25: 276-84.
- 6) Azevedo LC, Janiszewski M, Soriano FG, et al: Redox mechanisms of vascular cell dysfunction in sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006; 6: 159-64.
- 7) Peng T, Lu X, Feng Q: Pivotal role of gp91phox-containing NADH oxidase in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression and myocardial depression. *Circulation* 2005; 111: 1637-44.
- 8) Gujral JS, Hinson JA, Farhood A, et al: NADPH oxidase-derived oxidant stress is critical for neutrophil cytotoxicity during endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G243-52.
- 9) Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, et al: Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2003; 31: 1048-52.
- 10) Biasi F, Chiarotto E, Lanfranco G, et al: Oxidative stress in the development of human ischemic hepatitis during circulatory shock. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 225-33.
- 11) Baldwin SR, Simon RH, Grum CM, et al: Oxidant activity in expired breath of patients with adult respiratory distress syndrome. *Lancet* 1986; 1: 11-4.
- 12) 松田直之: 生体侵襲のメディエーターと転写因子. *救急・集中治療* 2008; 20: 1192-206.
- 13) Ray R, Shah AM: NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)* 2005; 109: 217-26.
- 14) Cave AC, Brewer AC, Narayanapanicker A, et al: NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 691-728.
- 15) Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, et al: Cloning the gene for an inherited human disorder—chronic granulomatous disease—on the basis of its chromosomal location. *Nature* 1986; 322: 32-8.
- 16) Teahan C, Rowe P, Parker P, et al: The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature* 1987; 327: 720-1.
- 17) Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, et al: Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell* 2003; 113: 343-55.
- 18) Lapouge K, Smith SJ, Walker PA, et al: Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac. GTP. *Mol Cell* 2000; 6: 899-907.
- 19) Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, et al: Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 2164-71.
- 20) Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, et al: A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 2000; 87: 26-32.
- 21) Kinoshita H, Matsuda N, Kaba H, et al: Roles of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt and NADPH oxidase in adenosine 5'-triphosphate-sensitive K⁺ channel function impaired by high glucose in the human artery. *Hypertension* 2008; 52: 507-13.
- 22) Touyz RM, Chen X, Tabet F, et al: Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circ Res* 2002; 90: 1205-13.
- 23) Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, et al: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999; 401: 79-82.
- 24) Bánfi B, Maturana A, Jaconi S, et al: A mammalian H⁺ channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science* 2000; 287: 138-42.
- 25) Cheng G, Diebold BA, Hughes Y, et al: Nox1-dependent reactive oxygen generation is regulated by Rac1. *J Biol Chem* 2006; 281: 17718-26.
- 26) Ueyama T, Geiszt M, Leto TL: Involvement of Rac1 in activation of multicomponent Nox1- and Nox3-based NADPH oxidases. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 2160-74.
- 27) Fan CY, Katsuyama M, Yabe-Nishimura C: PKCdelta mediates up-regulation of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase, via transactivation of the EGF receptor: possible involvement of PKCdelta in vascular hypertrophy. *Biochem J* 2005; 390: 761-7.
- 28) Kikuchi H, Hikage M, Miyashita H, et al: NADPH oxidase subunit, gp91 (phox) homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. *Gene* 2000; 254: 237-43.
- 29) Geiszt M, Kopp JB, Várnai P, et al: Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8010-4.
- 30) De Deken X, Wang D, Many MC, et al: Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the

- NADPH oxidase family. *J Biol Chem* 2000; 275: 23227-33.
- 31) Martínez-Salgado C, Eleno N, Tavares P, et al: Involvement of reactive oxygen species on gentamicin-induced mesangial cell activation. *Kidney Int* 2002; 62: 1682-92.
 - 32) Park HS, Jung HY, Park EY, et al: Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF- κ B. *J Immunol* 2004; 173: 3589-93.
 - 33) Park HS, Chun JN, Jung HY, et al: Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006; 72: 447-55.
 - 34) Cheng G, Cao Z, Xu X, et al: Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001; 269: 131-40.
 - 35) Bánfi B, Molnár G, Maturana A, et al: A Ca²⁺-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 2001; 276: 37594-601.
 - 36) Bánfi B, Tirone F, Durussel I, et al: Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* 2004; 279: 18583-91.
 - 37) Dupuy C, Ohayon R, Valent A, et al: Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cdnas. *J Biol Chem* 1999; 274: 37265-9.
 - 38) Huang J, Hitt ND, Kleinberg ME: Stoichiometry of p22-phox and gp91-phox in phagocyte cytochrome b558. *Biochemistry* 1995; 34: 16753-7.
 - 39) DeLeo FR, Burritt JB, Yu L, et al: Processing and maturation of flavocytochrome b558 include incorporation of heme as a prerequisite for heterodimer assembly. *J Biol Chem* 2000; 275: 13986-93.
 - 40) Takeya R, Ueno N, Kami K, et al: Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 2003; 278: 25234-46.
 - 41) Hawkins PT, Davidson K, Stephens LR: The role of PI3Ks in the regulation of the neutrophil NADPH oxidase. *Biochem Soc Symp* 2007; 74: 59-67.
 - 42) Faust LR, el Benna J, Babior BM, et al: The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. *J Clin Invest* 1995; 96: 1499-505.
 - 43) Brown GE, Stewart MQ, Bissonnette SA, et al: Distinct ligand-dependent roles for p38 MAPK in priming and activation of the neutrophil NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2004; 279: 27059-68.
 - 44) DeLeo FR, Renee J, McCormick S, et al: Neutrophils exposed to bacterial lipopolysaccharide upregulate NADPH oxidase assembly. *J Clin Invest* 1998; 101: 455-63.
 - 45) Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, et al: Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1996; 271: H1626-34.
 - 46) Manea A, Manea SA, Gafencu AV, et al: AP-1-dependent transcriptional regulation of NADPH oxidase in human aortic smooth muscle cells: role of p22phox subunit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 878-85.
 - 47) Gauss KA, Bunger PL, Quinn MT: AP-1 is essential for p67(phox) promoter activity. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 163-72.
 - 48) Maeda H, Akaike T: Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Mosc)* 1998; 63: 854-65.
 - 49) Hotz-Wagenblatt A, Dröge W: Redox-mediated functional and structural changes in insulin receptor kinase. *Methods Enzymol* 2002; 348: 288-96.
 - 50) Meier B, Radeke HH, Selle S, et al: Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor- α . *Biochem J* 1989; 263: 539-45.
 - 51) Li N, Karin M: Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *FASEB J* 1999; 13: 1137-43.
 - 52) Bowie A, O'Neill LA: Oxidative stress and NF- κ B activation. a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 13-23.
 - 53) Kretz-Remy C, Bates EE, Arrigo AP: Amino acid analogs activate NF- κ B through redox-dependent I κ B- α degradation by the proteasome without apparent I κ B- α phosphorylation. Consequence on HIV-1 long terminal repeat activation. *J Biol Chem* 1998; 273: 3180-91.
 - 54) Hehner SP, Breitkreutz R, Shubinsky G, et al: Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J Immunol* 2000; 165: 4319-28.
 - 55) Matsuda N, Yamamoto S, Shun-ichiro Kageyama, et al: RNA interference targeting Fas-associated death domain (FADD) protects mice from septic lung inflammation and apoptosis. *Am J Res Crit Care* 2009; 79: 806-15.
 - 56) Janssen YM, Matalon S, Mossman BT: Differential induction of c-fos, c-jun, and apoptosis in lung epithelial cells exposed to ROS or RNS. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1997; 273: L789-96.
 - 57) Beiqing L, Chen M, Whisler RL: Sublethal levels of oxidative stress stimulate transcriptional activation of c-jun and suppress IL-2 promoter activation in Jurkat T cells. *J Immunol* 1996; 157: 160-9.
 - 58) Karin M: The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995; 270: 16483-6.

- 59) Hehner SP, Breitzkreutz R, Shubinsky G, et al: Enhancement of T cell receptor signaling by a mild oxidative shift in the intracellular thiol pool. *J Immunol* 2000; 165: 4319-28.
- 60) Griffith CE, Zhang W, Wange RL: ZAP-70-dependent and -independent activation of Erk in Jurkat T cells. Differences in signaling induced by H₂O₂ and Cd3 cross-linking. *J Biol Chem* 1998; 273: 10771-6.

Pathophysiology of Impaired Redox Signaling in Systemic Inflammatory Response Syndrome

Naoyuki Matsuda, MD, PhD*

*Department of Primary Care and Emergency Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

The presence of free radicals in biological materials was discovered less than 50 years ago. An excessive and sustained increase in reactive oxygen species (ROS) production has been implicated in the pathogenesis of many diseases including systemic inflammatory response syndrome (SIRS).

The NADPH oxidase enzymes (NOXs) are a particularly important source of ROS that are implicated in redox signaling. The NOXs are proteins that transfer electrons across biological membranes. NOX 1/2/4 and the organizer subunits (p47^{phox}) can be upregulated in several types of cell of peripheral tissues by activation of transcriptional factors such as NF- κ B and AP-1 in SIRS.

Then, at produced high concentrations of ROS, many types of cell can strongly activate NF- κ B and AP-1 to induce inflammatory burst and multiple organ failure (MOF).

Thus, ROS is activated primarily in NOX-positive inflammatory alert cells to penetrate into NOX-negative non-alert cells and to enhance transcriptional activity of NF- κ B and AP-1 and expression of NOXs in major organs and vasculatures. This article reviews the evidence for an involvement of NOXs and the co-factors in progressing MOF in SIRS. A better understanding of the roles of NOX family may define novel therapeutic targets for the prevention of severe SIRS.

(*Circ Cont* 2009; 30: 72-81.)