
厚生労働科学研究研究費補助金

循環器疾患等総合研究事業

各種高脂血症治療薬の糖尿病性心血管進展予防効果の

総合的研究（臨床研究実施チームの整備）

平成 16 年度 総括研究報告書

研究者 川嶋 成乃亮

平成 17 (2005) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告

各種高脂血症治療薬の糖尿病性心血管進展予防効果の総合的研究

報告書	1
報告資料	2

厚生労働科学研究費補助金（循環器等総合研究事業）
分担研究報告書

各種高脂血症治療薬の糖尿病性血管病予防効果の総合的研究（臨床研究実施チームの整備）

分担研究者 川嶋成乃亮 神戸大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨 糖尿病、耐糖能異常の有無が薬剤溶出ステントの挿入後の再狭窄、および冠動脈以外の血管での動脈硬化の進展に及ぼす影響を検討する目的で、今年度は7名の患者の登録を行った。来年度において、ステント挿入6ヶ月後の判定を行う予定である。

A. 採択された研究事業での研究概要
糖尿病、耐糖能異常は心血管病進展の、重要な因子であり、PTCA後の再狭窄にも深く関係している。本研究では糖尿病、耐糖能異常の有無が、薬剤溶出ステント挿入後の再狭窄、冠動脈以外の血管での動脈硬化の進展に及ぼす影響を検討する。また、再狭窄並びに動脈硬化進展と血清バイオマーカーとの関係を検討する。

B. 採択された研究事業での研究実績
神戸大学医学部附属病院に入院した、85歳以下の冠動脈疾患患者において、シロリムス溶出ステント挿入6ヶ月後にCAGを行い、糖尿病ならびに耐糖能異常を有す患者と有さない患者における、再狭窄の出現頻度の差を検討する。また、ステント後再狭窄の出現と他の部位での動脈硬化病変の進行、および血清バイオマーカーとの間の関係を検討する。

測定バイオマーカーとして、CRP、IL-6、TLR-4などを測定し、他の部位の冠動脈以外の部位での動脈硬化病変の進行は、頸動脈エコーならびにPWVにて判定する。

現在までに7名の患者よりインフォームドコンセント取得の上、登録を行った。ステント挿入前後のバイオマーカー、および、頸動脈エコー、PWVを記録し、6ヶ月後に判定する予定である。

（倫理面からの配慮）すべての患者にインフォームドコンセントを得てから本研究を行う。また本施設の倫理委員会での承認を得ている。

C. 考察

本研究はまだ開始したばかりで結果が得られるのには、後2年かかる。しかしながら、糖尿病は、欧米の大規模研究ではシロリムス溶出ステントの再狭窄を増加させることが判明しており、本邦でも同じ様な結果が推察される。一方、耐糖能異常に関しては、十分なデータの蓄積がなされておらず、本研究で得られる結果は有意義と考えられる。さらに、冠動脈以外の血管の動脈硬化の進展と、ステント挿入後の再狭窄過程との関連が、明らかになれば、前もって再狭窄のリスクの高い患者の判別に役立つ可能性がある。

D. 健康危険情報

該当なし

E. その他実施した臨床研究・治験の概要
および実績

治験：

高脂血症治験1件（EPA、市販後 11例）

慢性心不全治験1件（T0-90-3N 2例）

臨床研究：

冠動脈疾患の新しいバイオマーカーの同定

炎症細胞表面に発現するtoll-like receptor (TLR) がCRPとは独立した冠動脈疾患のバイオマーカーになりうることを見出した。

研究成果一覧

学会発表

○第39回 日本循環管理協議会総会・日本循環器病予防学会
シンポジウムー酸化ストレスー

川嶋成乃亮：動脈硬化と酸化ストレス

○第77回日本薬理学会年会

シンポジウム：生活習慣病における血管機能障害と調節系異常

川嶋成乃亮、横山光宏： 高脂血症・動脈硬化における eNOS/NO 系

第77回米国心臓協会年次集会：

○Bendall JK, Alp NJ, Nicoli TK, Rockett KA, Kawashima S, Yokoyama M, Channon KM. Endothelial targeted GTP cyclohydrase 1 overexpression increases endothelial tetrahydrobiopterin levels and preserves eNOS uncoupling in eNOS overexpressing mice.

○Takaya T, Kawashima S, Yamashita T, Shinohara M, Hirata K, Inoue N, Channon KM, Yokoyama M. Increased GTP-cyclohydrase 1 expression but not vitamin c treatment restored accelerated atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein e-deficient mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase.

第69回日本循環器学会学術集会

○Shiraki R, Inoue N, Honjo T, Otsui K, Ejiri J, Kobayashi S, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M.

Toll-like receptor 4 expression on peripheral blood monocytes predicts the occurrence of coronary artery disease with low C-reactive protein patients.

○乙井一典、井上信孝、白木里織、本庄友行、高橋玄倫、平田健一、川嶋成乃亮、横山光宏。

Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries-Role of inflammatory cytokines.

○Takaya T, Kawashima S, Yamashita T, Shinohara M, Hirata K, Inoue N, Hirata K, Channon KM, Yokoyama M. Increased GTP-cyclohydrase 1 expression but not vitamin c treatment restored accelerated atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein e-deficient mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase.

発表論文

総説

1. 川嶋成乃亮。酸化ストレスと動脈硬化
日本循環器予防学会誌 40 巻 41-49 頁、2005
2. 柏原直樹、川嶋成乃亮、林晃一、南学正臣。動脈硬化による腎障害
Nephrology Frontier 3 巻、165-174 頁、2004
3. Seinosuke Kawashima. The two faces of endothelial nitric oxide synthase in the pathophysiology of atherosclerosis. *Endothelium* 11: 99-107, 2004
4. Seinosuke Kawashima, Mitsuhiro Yokoyama. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 24: 998-1005, 2004

原著

1. Shiraki R, Inoue N, Kawasaki S, Takei A, Kadotani M, Ohnishi Y, Ejiri J, Kobayashi S, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M. Expression of Toll-like receptors on human platelets. *Thrombosis Res.* 113: 379-385, 2004

総説

酸化ストレスと動脈硬化

川嶋成乃亮

日本循環器病予防学会誌
Vol.40 No.1 Jan. 2005



総説

酸化ストレスと動脈硬化

川嶋成乃亮*

生体においては、酸化物質として活性酸素種があり、その一方、様々な抗酸化物質が存在し、その両者がバランスをとって存在する。そしてそのバランスが破綻し、酸化側に傾いた状態が酸化ストレスである。活性酸素種とは、大気中に存在する分子状酸素に比べ活性化された酸素分子種であり、フリーラジカルであるスーパーオキシド($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシラジカル($\cdot OH$)、および非ラジカルである過酸化水素(H_2O_2)などからなる。近年、種々の病態形成において、酸化ストレスの重要性が注目されているが、循環器領域においても同様であり、特に虚血性心疾患などの血管病の基盤となる動脈硬化において、酸化ストレスがその発症・進展に深く関係していることが明らかになってきている。以下に我々の研究成果を中心に、酸化ストレス、特にその中心となるスーパーオキシドの動脈硬化における産生増加の機序、そして動脈硬化の進展に及ぼす役割について述べる。

動脈硬化血管における酸化ストレスの増加

組織局所において酸化ストレスが増加しているかどうかの判定には色々な方法があるが、血管局所での判定にはスーパーオキシドの産生を測定することが一般に行われている。既に20年以上前から動脈硬化血管ではスーパーオキシド産生が増加していることが示唆されており¹⁾、まずは動脈硬化層に存在する炎症細胞より産生されるスーパーオキシドが注目され、その後90年代になり、局所におけるスーパーオキシド産生量の測定法の進歩と共に、炎症細胞のみならず内皮細胞や、平滑筋細胞、あるいは線維芽細胞などの血管細胞自身がスーパーオキシドを産生することが明らかとなり、動脈硬化の病態における役割に対する研究が進んだ。

図1に遺伝性高脂血症家兎(WHHL rabbits)における大動脈からのスーパーオキシド産生を示す。図からも明らかのように、はっきりとは粥腫が存

在しない部位からもスーパーオキシドが産生されていることがわかる。生体におけるスーパーオキシド産生系としては、1) ミトコンドリア電子伝達系、2) キサンチンオキシダーゼ、3) リポキシゲナーゼ、4) シクロオキシゲナーゼ、5) NO合成酵素(NOS)、そして6) NAD(P)H オキシダーゼ等があげられる。これらの酵素のうち、血管細胞においてもっともスーパーオキシド産生に関与していると考えられるのはNAD(P)H オキシダーゼである²⁾。動脈硬化血管においても、このNAD(P)H オキシダーゼが、増加しているスーパーオキシド産生の中心的役割を担っていることは、動脈硬化血管をNAD(P)H オキシダーゼの特異的阻害薬であるdiphenylene iodonium (DPI)やapocyninにより処置することで、スーパーオキシド産生量が著明に減少することより明らかである³⁾。

正常血管では、NAD(P)H オキシダーゼは主として、外膜の線維芽細胞に存在する。これに対し、動脈硬化血管では、内皮細胞を除去するとスーパーオキシド産生が低下することより、主として内皮細胞でのNAD(P)H オキシダーゼが関与していることが示されている³⁾。しかしながら動脈硬化が進展すると粥腫形成が著明となり、そのような血管においては、粥腫内に浸潤した炎症細胞・食細胞

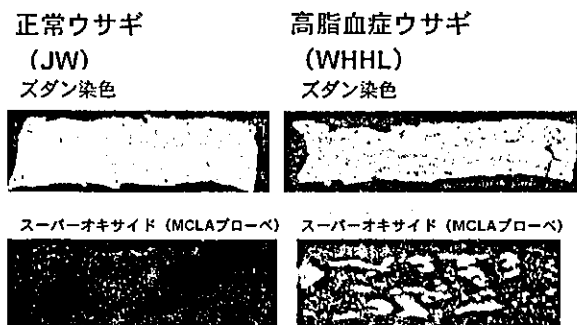


図1 遺伝性高脂血症家兎(WHHL rabbits)における大動脈からのスーパーオキシド産生(MCLA法における検討)

WHHL家兎の摘出大動脈におけるin situのスーパーオキシド産生を蛍光プローブMCLAを用いて判定した。又スダンIIIによる脂肪染色を上段に示す。動脈硬化を有すWHHL家兎の大動脈ではスーパーオキシドの産生が増加している。

*神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学

(〒650-0017 神戸市中央区楠町7-5-2)

受付・受理日 2004年9月2日

でのNAD(P)H オキシダーゼが主たるスーパーオキシド産生酵素となっているものと考えられる²⁾。そしてこのNAD(P)H オキシダーゼの活性化には、様々の増殖因子、G蛋白受容体活性化アゴニスト、サイトカイン、あるいは機械的刺激（伸展刺激、ズリ応力）等が関係する。

動脈硬化の発症進展とスーパーオキシド

さて、このように産生されたスーパーオキシドは動脈硬化の発症進展に重要な役割を果たしている。動脈硬化はRossらが提唱した障害反応仮説を中心にその発症機序が考えられており、内皮細胞の障害・活性化、単球の内皮への接着および内皮下への侵入、単球より分化したマクロファージが変性LDLを取り込むことによる泡沫化の各ステップが必須である。

このそれぞれのステップに対しスーパーオキシドが促進性に働いている。すなわちそれ自身が、あるいはペルオキシナイトライトのような活性酸素種となることにより、内皮を直接傷害すると共に、細胞内の情報伝達物質として、NFκBなどのレドックス感受性転写因子を活性化し、ICAM-1やVCAM-1等の接着因子の発現を増加させる。さらには炎症性サイトカインであるIL-1やTNFαなどのサイトカイン、単球走化因子MCP-1の産生、分泌を亢進させる。またスーパーオキシドやペルオキシナイトライトはLDLを酸化させる。また、マクロファージとならび動脈硬化の主要な構成細胞である血管平滑筋細胞の遊走、増殖をもたらし、このような多彩な作用により、スーパーオキシドは動脈硬化惹起性、あるいは促進性の分子であると考えられる³⁾。

動脈硬化とNAD(P)H オキシダーゼ

血管系細胞でのNAD(P)H オキシダーゼの全容はまだ明らかではないが、食細胞と同様に6つのサブコンポーネントから構成されているものと理解される。すなわち膜分画に存在するp22 phoxとgp91 phox、および細胞質分画に存在するp67 phox、p47 phox、p40phox、および低分子量G蛋白質であるRacから構成されている。p91 phoxに関しては様々なホモログがクローニングされNoxファミリーを構成している。我々は、動脈硬化性疾患における酸化ストレスの役割を明らかにする目的にて、NAD(P)H オキシダーゼのサブコンポーネントのうちp22 phoxに着目して以下の研究を行ってきた。

1. p22 phox 遺伝子多型と冠動脈疾患

p22phoxの遺伝子多型と冠動脈疾患発症の関係を、冠動脈造影にて病変が確認された患者群と、年齢、性別をマッチさせた対照群、それぞれ201

名において検討した。その結果C242Tの遺伝子多型において、T アレルが虚血性心疾患発症に対してprotectiveに働くことを見出した⁴⁾。その後、摘出したヒト大動脈静脈を用いた検討にて、T アレルを有している場合はCCホモ接合体に比べ、血管からのスーパーオキシド産生が減少していることが報告され、C242Tの遺伝子多型の機能的重要性が立証されている⁵⁾。

2. ヒト冠動脈におけるp22 phox発現

それでは、ヒトの冠動脈病変部位でNAD(P)H オキシダーゼの発現がどうなっているかを検討する目的にて、剖検心を用いた検討を行った。p22 phoxは内膜肥厚を伴うだけの正常冠動脈では外膜線維芽細胞に発現を認めるが、動脈硬化病変が明らかになってくると、血管壁全層にわたりp22 phoxが著明となってくる。また、その発現は浸潤している炎症細胞に加え、内皮細胞、血管平滑筋細胞においても認められた⁶⁾。

さらに、冠動脈疾患患者のdirectional coronary atherectomy (DCA)標本を用いた検討を行った⁶⁾。局所におけるスーパーオキシド産生はdehydroethidium染色法にて求め、画像処理にて定量化した。DCA標本において強いスーパーオキシド産生が認められ、標本におけるp22 phoxの発現の程度とその産生量とは相関した。また、抗体染色により求めた局所での酸化LDLの発現量と、スーパーオキシド産生量とも相関を認めた。さらに、患者の病態より、安定狭心症と不安定狭心症にわけ検討すると、不安定狭心症患者での責任病変部より得たDCA標本における、p22 phox発現、スーパーオキシド産生量は、安定狭心症での責任病変でのそれぞれの発現、産生量より増加していた（図2）。以上の所見を合わせてみると、NAD(P)H オキシダーゼにより産生されるスーパーオキシドが、血管局所においてLDLの酸化に関与すると共に、粥腫の不安定化をもたらす要因となっていることが示唆された。

3. ヒト大動脈瘤におけるp22 phox発現

次にヒト大動脈瘤におけるp22 phox発現を大動脈瘤の手術時に得た摘出標本を用いて検討した。

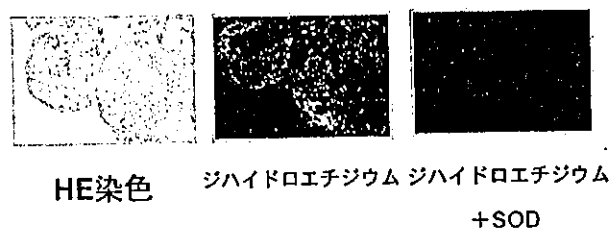


図2 狭心症患者責任病変のDCA標本を用いたスーパーオキシド産生、p22 phox 発現の検討

40名の胸部大動脈瘤患者より得た瘤部の血管標本における、p22 phox発現、ならびにスーパーオキシド産生を検討した。

瘤部におけるスーパーオキシド産生は他の部位に比べて増加しており、単球・マクロファージの浸潤部位に一致してp22phox発現が認められた。さらにp22phox発現部位の近傍には、アンジオテンシン変換酵素やキマーゼといったアンジオテンシン産生酵素の発現が認められた。このことは、局所におけるアンジオテンシン産生の亢進が、NAD(P)Hオキシダーゼの発現増加・活性亢進を介して、局所でのスーパーオキシド産生をもたらしている可能性を示唆した。そして、患者への投与薬剤により、スーパーオキシド産生がどのような影響を受けるかを検討すると、アンジオテンシン受容体拮抗薬ならびにスタチンを投与されていた患者ではp22 phox発現が抑制されているとの結果を得た。

【小活】

以上の一連の臨床研究により、ヒトの動脈硬化血管ではスーパーオキシド産生が増加しており、その産生酵素としてNAD(P)Hオキシダーゼが重要であることが明らかになった。そして産生されたスーパーオキシドは、LDLの酸化や粥腫の不安定に関係していること、さらにはNAD(P)Hオキシダーゼの活性化にはアンジオテンシンが関係していることが示唆された。

NAD(P)Hオキシダーゼ活性化因子としてのアンジオテンシン

AD(P)Hオキシダーゼを活性化する種々の因子のうちで重要なのはアンジオテンシンII (Ang II)である。これまでに、アンジオテンシンの作用をACE阻害薬やAng II受容体拮抗薬により阻害することで動脈硬化が抑制されるとの報告がなされている。しかしながら、これらの薬剤は血圧も低下させるため、その抑制効果が、血管局所でのAng II自身

の作用を阻害したことによるものか、それとも降圧作用を介するものであるかが不明であった。我々は易動脈硬化発症モデルであるapo E 遺伝子欠損マウス(apo E-KO)を用いて、Ang II受容体拮抗薬の血圧非依存性の抗動脈硬化作用を検討した。4週齢のapo E-KOを通常食にて飼育し、同時に2種の量のテルミサルタンを経口投与し、16週齢において屠殺し、大動脈組織を解析すると共に、血液および尿を採取した。

16週齢において血漿コレステロール値は約470mg/dlのレベルに増加していたが、テルミサルタンの投与により脂質プロファイルに変化を見なかった。また、血圧はコントロール群では平均血圧 107 ± 2 mmHgであったが、テルミサルタン1.0mg/kg/day投与群では、 90 ± 2 mmHgへと有意に低下した。しかしながら0.3mg/kg/day投与群では 107 ± 2 mmHgと変化を認めなかった。12週齢での大動脈基部における動脈硬化病変を検討すると、図3に示すように、テルミサルタン投与により容量依存性に、硬化病変領域が減少しており、血圧に影響を与えない0.3mg/kg/day投与群においても有意に動脈硬化病変の抑制が認められた。すなわちAng IIの作用をブロックすることにより血圧に非依存性に動脈硬化病変が抑制されることが判明した。

この動脈硬化抑制作用が酸化ストレスの軽減と関係しているかどうかを検討するために、血管局所におけるスーパーオキシド産生を測定した。まず、既に述べたDHE発光染色法にて、摘出動脈の凍結切片局所におけるスーパーオキシド産生を評価した。図4に示すように、テルミサルタンにより血管局所におけるスーパーオキシド産生が減弱することが判明した。更に全身の酸化ストレスの変化を検討するため、尿中の8-iso-prostaglandin (PG) F₂α (isoprostane)を、enzyme immunoassay (EIA)法にて測定し、尿中のクレアチニンで補正した。その結果、テルミサルタンにより濃度依存性

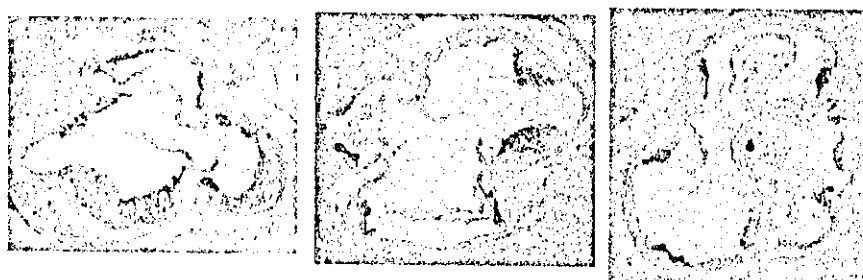


図3 Ang II受容体拮抗薬(テルミサルタン)によるapo E遺伝子欠損マウスでの動脈硬化病変の軽減(ズダン染色による検討)

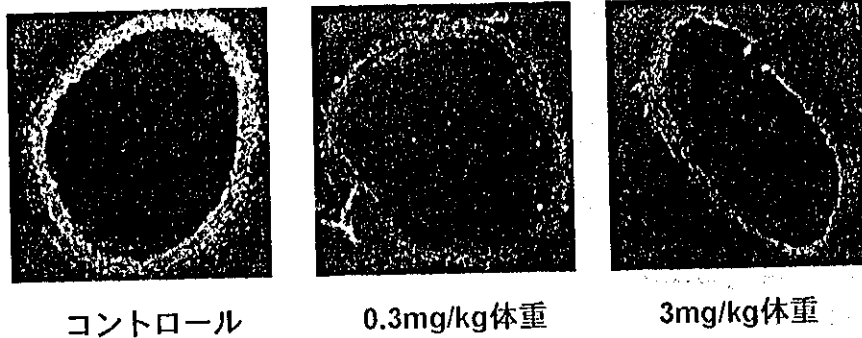


図4 Ang II受容体拮抗薬（テルミサルタン）による動脈硬化血管でのスーパーオキシド産生の低下（ジハイドロエチジウム法を用いた検討）

に尿中の isoprostane が減少する結果を得た。本研究により、テルミサルタンにより血圧非依存性に動脈硬化病変が抑制され、それは血管局所における酸化ストレスの減少を伴うことが判明した。

【小活】

近年、ACE阻害薬やAng II受容体拮抗薬が、心血管イベントの発症を抑制することが、種々の大規模臨床試験により明らかになってきている¹⁰⁾。これには様々な機序が関与しているが、最も重要なのは動脈硬化病変の進行を抑制することだと考えられる。血圧は動脈硬化の主要な促進要因であるため、これらの薬剤が血圧低下を介し動脈硬化を抑制することが考えられるが、それ以外の機序の関与も推定されている。我々の実験結果より、おそらくその機序の一つとして、血管局所におけるスーパーオキシド産生を抑制することが重要と考えられる。一方、Ang IIは動脈硬化の発症、進展に関わる様々なステップに関係している。既に述べたように、動脈硬化の initial step として単球の内皮への接着は必須であるが、単球の走化に関係する MCP-1 の発現を増加させることによって、Ang II は動脈硬化の発症に関与している。そして、おなじく apoE-KO を用いた検討において、Ang II 受容体拮抗薬イルベサルタンが動脈硬化を減少させると共に、MCP-1 動脈硬化層での発現を抑制させることが報告されている¹¹⁾。MCP-1 の発現は酸化ストレスにより亢進するため、我々の実験系においても Ang II 受容体拮抗薬がスーパーオキシド/MCP-1 経路を抑制し、動脈硬化病変を減少させたことが考えられ、MCP-1 の関与を現在検討中である。

内皮型 NO 合成酵素欠損と動脈硬化

以上述べてきたように、動脈硬化血管ではスーパーオキシドの産生が増加しており、そのことがまた動脈硬化を促進させていると考えられる。一方血管の内皮細胞からは内皮型 NO 合成酵

素(eNOS)により常にNOが産生されている。このeNOS由来のNOは、スーパーオキシドの作用と拮抗し、抗動脈硬化に作用すると考えられてきた。実際に生体においてNOが抗動脈硬化に働くかどうかに関しては、高脂血症食飼育による動脈硬化家兎等を用いた動物実験にて、NOの産生基質であるL-アルギニンの投与が動脈硬化病変を軽減することにより示唆されていたが、近年、eNOS遺伝子欠損マウス(eNOS-KO)を用いた研究の結果が複数の施設より報告された。まず、KnowlesらによりeNOS遺伝子欠損マウスとapoE-KOの交配実験の結果が報告された。その結果、eNOS遺伝子欠損により大動脈の動脈硬化病変が増悪することが明らかになった¹²⁾。さらに彼らは、eNOS遺伝子欠損により生じる血圧の上昇の程度と動脈硬化病変の増加が平行すること、血圧をACE阻害薬にて通常のapoE-KOと同等のレベルまで低下させると、動脈硬化病変も同等になることを示した。そして、eNOS遺伝子欠損による動脈硬化病変の増加の機序としては、eNOSから産生されるNOが欠如していることが、血管局所において、直接的に動脈硬化病変促進に働いたというより、むしろ血圧を増加させることにより動脈硬化を促進させたとしている。これに対しKuhlencordtらは、同様にapoE-KOとeNOS遺伝子欠損マウスの交配実験を行い、やはりeNOS遺伝子欠損により動脈硬化が増悪すること、さらに動脈硬化が進行した結果、大動脈瘤が出現することもあることを報告した¹³⁾。そして、ヒドララジンによりapoE-KOとeNOSのダブル遺伝子欠損マウスの血圧を通常のapoE-KOと同レベルまで下げても、動脈硬化病変はやはり増悪したままであったことより、eNOS遺伝子欠損は、血圧に非依存性に、すなわちeNOS由来のNOが本来有している血管局所での直接的抗動脈硬化作用が欠如することにより、動脈硬化病変を増悪させたものと解釈している。

このように、血圧の作用かどうかは明らかではないものの、eNOS遺伝子の欠如は動脈硬化を促進させるものと思われる。

スーパーオキシド産生酵素としての内皮型NO合成酵素

一方NO合成酵素がNOを産生するばかりではなく、ある種の条件下ではスーパーオキシド産生酵素としても作用することが、1990年代の半ば頃より次第に明らかになってきた。この現象はまず化学の領域で明らかになり、最初に脳神経型NO合成酵素において注目され、その後eNOSにも同様の現象がおこることが明らかになった¹³⁾。NO合成酵素は、C末端のreductase domain ならびにヘム結合部位を有すN末端のoxygenase domainより構成されており、還元酵素であると共に酸化酵素としての特性を有すユニークな酵素である。そしてC末端に結合したNADPHより産生された電子がN末端のoxygenase domainに結合する産生基質であるL-アルギニンに供与され、その過程でNOが産生される。L-アルギニンおよび補酵素であるテトラヒドロbiopterin(BH₄)が充分量存在する場合には、NO合成酵素はNOを主として産生するが、これらが欠如したり、不足した条件下では、NOよりもむしろスーパーオキシドを産生する。特に、eNOSに関しては、BH₄はNO合成酵素としての酵素活性に必須であり、L-アルギニンへの電子供与体として働き、不足するとeNOS活性化によりヘム部にてスーパーオキシドが産生される^{13), 14)}。

1990年代の後半になり、このようなeNOSの機能異常(uncoupling)が、生体においても生じていることが明らかになってきた。すなわち種々の病態において、eNOSの機能異常に基づくスーパーオキシド産生が示唆されるようになった。特に糖尿病においてはその研究が進んでおり、種々の糖尿病モデル動物や、あるいは2型糖尿病患者において、低下している内皮依存性血管弛緩・拡張の機序としてeNOS機能異常が関係することが示されている。そしてそれには血管におけるBH₄含有量の低下、ならびにBH₄が酸化され形成される7,8-BH₂ + biopterinの含有量が増加していることも明らかにされている¹⁵⁾。

一方、高脂血症・動脈硬化においても、eNOSの機能異常に基づくスーパーオキシド産生が生じていることを示す報告がなされだしてきてきた。まず、ヒトや動物モデルにおいて、動脈硬化血管での内皮依存性血管弛緩・拡張反応の低下が

外因性のBH₄により改善することが示され、動脈硬化・高脂血症におけるBH₄欠乏に基づくeNOS機能異常の存在を示唆するものと考えられた¹⁶⁾。ただし、BH₄にはそれ自身に抗酸化作用があるために、BH₄の投与により血管反応が改善したことがすなわち、BH₄欠乏に基づくeNOS機能異常が存在することを意味するものではない。2001年にLaursenらはapoE-KOの摘出血管ではスーパーオキシド産生が増加しており、内皮を除去すると著減すること、さらにはBH₄の前駆体であるセピアプテリンで血管を処置することによってスーパーオキシド産生が低下することから、動脈硬化血管ではeNOSの"uncoupling"が生じており、その結果内皮からのスーパーオキシド産生が増加していることを報告した¹⁷⁾。

eNOS過剰発現マウスにおける動脈硬化病変の増強とeNOS由来スーパーオキシド

以上のようなことを背景に我々は、高脂血症の存在下にeNOSを過剰発現させると動脈硬化病変はどのようになるかを検討した。我々の研究室で開発した血管内皮にeNOSが過剰発現するトランスジェニックマウス(eNOS-Tg)とapo E-KOの交配実験を行った。またbackcrossを少なくとも6回以上行いC57BL/6Jのbackgroundとして、C57BL/6Jのコントロールマウスと比較検討した。このeNOS-Tgは、prepro-endothelin-1のプロモーターを用い、主として血管内皮にウシeNOSが過剰発現するようにしたマウスであり、大動脈ホモゲネートでのeNOS活性は野生マウスと比べ約8倍に増加している²⁰⁾。4週齢において1.25%コレステロール含有の高コレステロール食にての飼育を開始し、12週齢および16週齢で屠殺し、病理的解析を行い、野生型C57BL/6Jマウス、通常のapo E-KO、およびeNOSを過剰発現したapo E-KO (apo E-KO/eNOS-Tg)間で比較検討した²¹⁾。高コレステロール食飼育により血清コレステロール値はapoE-KO、apo E-KO/eNOS-Tg群共に約1800 mg/dlのレベルまで増加したが、両群間に差はなかった。血圧はeNOSが過剰発現することにより約15mmHg、apo E-KO/eNOS-Tgでapo E-KOより低下していた。血圧はapoE-KOでの主要な動脈硬化の進展の決定因子であるため、apo E-KO/eNOS-Tgでは動脈硬化病変が軽減することが予想された。しかしながら予想に反し、動脈硬化はapo E-KO/eNOS-Tgにおいて増強していた。図5に12週齢で検討した大動脈洞レベルでの動脈硬化病変を示す。雄、雌ともに動脈硬

化領域は、apo E-KO/eNOS-Tgにおいてapo E-KOよりも有意に増加していた、また、16週齢にて検討した大動脈弓での動脈硬化病変も、同様に、apo E-KO/eNOS-Tgにおいて増加していた。我々はこの動脈硬化病変の奇異性増加の機序としてeNOS機能異常によるスーパーオキシド産生の増加を考えた。そこで、摘出大動脈からのNO産生をin situで検討するために、摘出血管をDAF-2Aと反応させ、また同じくスーパーオキシドの産生判定のためは、MCLAと反応させ、ルミノグラフにより解析した。これらの方法により、血管の局所におけるNOとスーパーオキシドの産生分布、およびその量が可視化できた。そして、コンピューターシステムにより約0.01-0.02 cm²の領域を10カ所ランダムに抽出し、その平均蛍光度を求めることにより、NOおよびスーパーオキシドそれぞれの産生量の定量化を行った。apo E-KO/eNOS-Tgにおいては、apo E-KOよりも、血管からのNO産生は増加していたが、その程度は軽度であった。

これに対し、スーパーオキシドの産生は、動脈硬化に伴いapo E-KOにおいてコントロールマウスよりも増加したが、apo E-KO/eNOS-Tgでは、更に増加しており、しかも非粥腫領域で著増していた(図6)。また、この非粥腫領域でのスーパーオキシドの産生は、血管内皮を除去することにより減少した。以上よりこのapo E-KO/eNOS-Tgでは、eNOS機能異常が生じており、その結果eNOSよりスーパーオキシドが産生され、そのことが動脈硬化病変を増強させることにつながったものと考えた。

**Apo E-Ko および apo E-KO/eNOS-Tg における
ビオプテリン代謝**

次にこのようなeNOSの機能異常を引き起こす基盤となると考えられる、血管壁におけるBH4 およびその酸化産物をHPLC法を用いて測定した。その結果、大動脈におけるBH4濃度は、野生型マウス：5.13 ± 0.01 pmol/mg protein に比べapo E-KO：2.56 ± 0.01 pmol/mg protein、apo E-KO/eNOS-Tg：2.48 ± 0.01 pmol/mg protein とそれぞれ有意に低下していた。またBH4の酸化産物である7,8- BH₂ と biopterinの総計は増加しており、その結果7,8- BH₂ + biopterin/BH4の比率が上昇していた。以上より、高脂血症下では、血管壁とくに内皮細胞におけるBH4濃度が低下し、その結果eNOS機能異常が出現しているものと考えた。

図7に組織におけるBH4産生の模式図を示す。BH4は、容易に酸化され、quinonoid BH₂、さらに7,8- BH₂に変化する。そしてこれらの酸化産物はeNOSとBH4の結合を阻害することが報告されている²³⁾。apoE-KOおよびapo E-KO/eNOS-TgにおいてBH4濃度が低下していた機序として、おそらく酸化ストレスの亢進により、組織内のBH4が酸

ApoE欠損マウス (12週齢)



ApoE欠損
eNOS過剰発現マウス (12週齢)

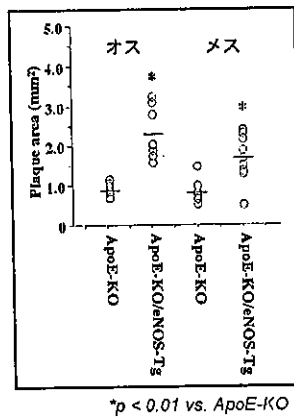


図5 eNOS過剰発現によるapo E遺伝子欠損マウスの動脈硬化病変の増加 (大動脈洞レベル)

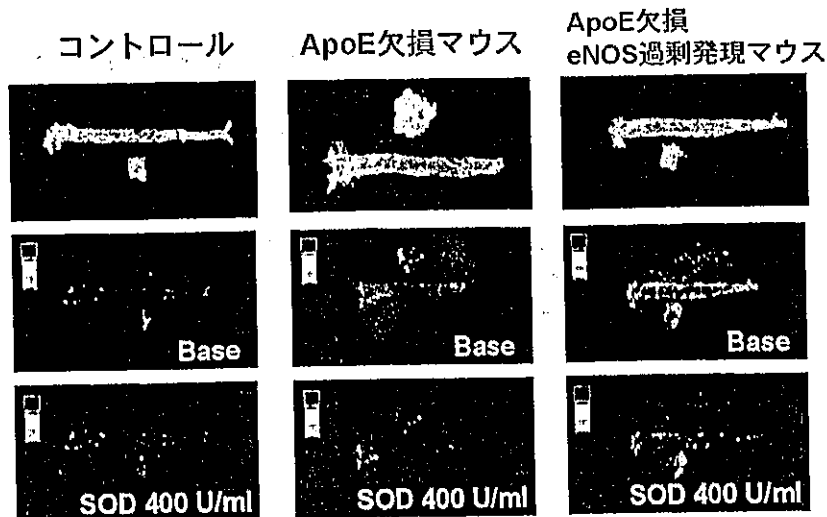


図6 eNOS過剰発現によるapo E遺伝子欠損マウスの大動脈からのスーパーオキシド産生の増加 (MCLA法)

化されることが関係しているものと思われる。また、それとともに、その機序は不明であるが、BH4産生の律速酵素であるGTPCH 1の活性も約60%に低下していたことも関係すると考えられた。機能異常のeNOSより産生されたスーパーオキシドは、NOと反応し強い酸化力を持つペルオキシナイトライドとなり、BH4を酸化させ、さらにeNOS機能異常を増悪させる。このような一種の悪循環により、スーパーオキシドのeNOSからの産生が増加していくものと思われる。

血管におけるBH4濃度増加による
動脈硬化病変の軽減

そこで、血管、特に内皮細胞におけるBH4濃度を増加させることにより、apo E-KO/eNOS-Tgにおいて認められた増強した動脈硬化病変を軽減できないかどうかを考え、以下の検討を行った。

1. 外因性BH4の慢性投与

合成BH4を(10mg/kg/day)にて摂取するようにした高コレステロール含有食による飼育を、4週齢

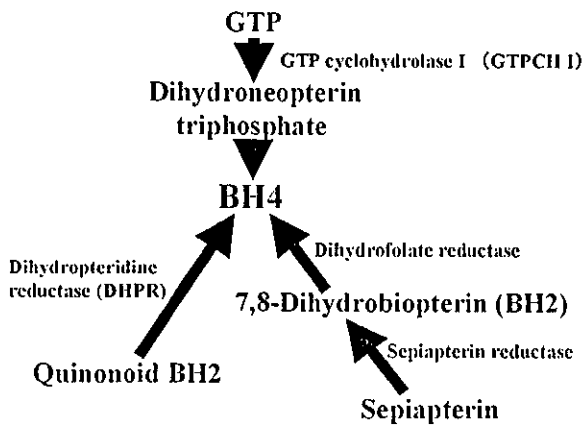


図7 組織におけるBH4産生の模式図

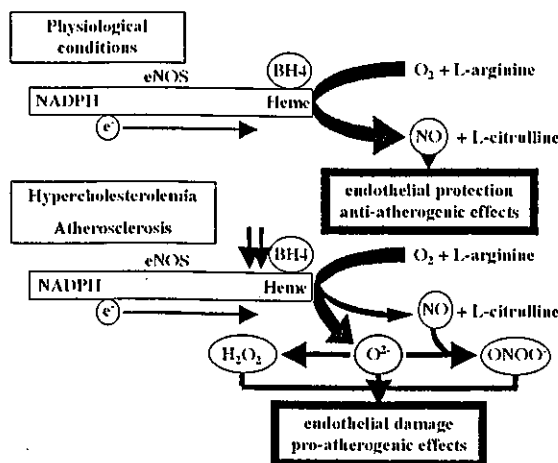


図8 動脈硬化におけるeNOSの役割の2面性(仮説)

末より開始し、12週齢末にて動脈硬化病変の解析を行った。外因性BH4の投与により、動脈硬化血管でのBH4濃度はほぼ野生型マウスと同等のレベルまで増加し、それとともに内皮からのNO産生の増加とスーパーオキシド産生の減少が認められた。このような変化と共に、apo E-KO/eNOS-Tgでの動脈硬化病変はapo E-KOと同レベルまで軽減した

2. 内因性BH4の増加

BH4産生の律速酵素であるGTPCH 1を血管内皮に過剰発現したトランスジェニックとapo E-KOとを交配して作成したC57BL/6J backgroundのマウス(apo E-KO/GTPCH-Tg)と、さらにapo E-KO/eNOS-Tgを交配し、apo E-KO/eNOS-Tg/GTPCH-Tgを作成した。このマウスに関しては普通食にて飼育し、おなじく普通食で飼育した通常のapo E-KO、およびapo E-KO/eNOS-Tgとの間において、動脈硬化病変の比較を12週齢末にて行った。通常食での飼育条件下(血清コレステロール値:約480mg/dl)でもやはりapo E-KO/eNOS-Tgにおける動脈硬化病変はapo E-KOよりも増加しており、apo E-KO/eNOS-Tg/GTPCH-Tgにおいては、動脈硬化病変はapo E-KOと差を認めないレベルまで減少した。

【小活】

eNOSは本来NOを産生し、スーパーオキシドの作用に拮抗して抗動脈硬化に働く酵素であるが、高脂血症などにおいては、むしろスーパーオキシド産生酵素として、動脈硬化の促進に働く可能性も考えられる。図8に我々が考えている高脂血症・動脈硬化におけるeNOSの役割についての仮説の模式図を示す²⁹⁾。この図はあくまで理論的なものであり、実際にこのような現象がヒトにおいても起こりうるかの検討が必要と考えている。

(本論文の要旨は、第39回日本循環器病予防学会・日本循環器管理研究協議会総会：シンポジウムII「循環器病と酸化ストレス」において発表された)

文 献

- 1) Tagawa H, Tomoike H, Nakamura M. Putative mechanisms of the impairment of endothelium-dependent relaxation of the aorta with atheromatous plaque in heritable hyperlipidemic rabbits. *Circ Res* 1991; 68: 330-337.
- 2) Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844.
- 3) Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, et al. Increased NADH-oxidase-mediated superoxide

- production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 1999 ; 99 : 2027-2033.
- 4) Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B, et al. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 ; 20 : 2175-2183.
 - 5) Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, et al. Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1998 ; 97 : 135-137.
 - 6) Guzik TJ, West NE, Black E, et al. Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis. *Circulation* 2000 ; 102 : 1744-1747.
 - 7) Azumi H, Inoue N, Kawashima S, et al. Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation* 1999 ; 100 : 1494-1498.
 - 8) Azumi H, Inoue N, Ohashi Y, et al. Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002 ; 22 : 1838-1844.
 - 9) Ejiri J, Inoue N, Tsukube T, et al. Oxidative stress in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm: protective role of statin and angiotensin II type I receptor blocker. *Cardiovasc Res* 2003 ; 59 : 988-996.
 - 10) Yusuf S, Sleight P, Pogue J, et al. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* 2000 ; 42 : 145-153.
 - 11) Dol F, Martin G, Staels B, et al. Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan decreases lesion size, chemokine expression, and macrophage accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001 ; 38 : 395-405.
 - 12) Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, et al. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apo E(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* 2000 ; 105 : 451-458.
 - 13) Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* 2001 ; 104 : 448-454.
 - 14) Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 ; 95 : 9220-9225.
 - 15) Xia Y, Tsai AL, Berka V, et al. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 25804-25808.
 - 16) Katusic ZS. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 ; 281 : H981-H986.
 - 17) Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, et al. Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂⁻ imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes* 1999 ; 48 : 2437-2445.
 - 18) Stroes, E, Kastelein J, Cosentino F, et al. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 1997 ; 99 : 41-46.
 - 19) Laursen JB, Somers M, Kurz S, et al. Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 2000 ; 103 : 1282-1288.
 - 20) Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K, et al. Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1998 ; 102 : 2061-2071.
 - 21) Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2002 ; 110 : 331-340.
 - 22) Klatt P, Schmid M, Leopold E, et al. The pteridine binding site of brain nitric oxide synthase. Tetrahydrobiopterin binding kinetics, specificity, and allosteric interaction with the substrate domain. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 13861-13866.
 - 23) Kawashima S, Yokoyama M. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 ; 24 : 998-1005.

ABSTRACT

Oxidative stress and atherosclerosis

Seinosuke Kawashima*†

*† Kobe University Postgraduate School of Medicine

Division of Cardiovascular and Respiratory Medicine

Superoxide plays important roles in vascular function and structure. In atherosclerotic vessels, superoxide production is increased and it is revealed that NAD(P)H oxidase plays a central role in its production in vessels. We showed that superoxide production is increased in association with augmented expression of p22Phox, a subcomponent of NAD(P)H oxidase, in atheromatous plaques of coronary arteries obtained from autopsy patients and also in samples obtained by directional coronary atherectomy (DCA). Interestingly, superoxide production is higher in samples from patients from unstable angina compared with those from stable angina. We also revealed the importance of angiotensin II as the activator of superoxide production in atherosclerotic vessels. In apo E knockout mice (apo E-KO), chronic treatment with telmisartan reduced atherosclerotic lesion size independently of its action on blood pressure. This effect was associated with reduced superoxide production.

Recently endothelial NO synthase (eNOS) has attracted attention as a superoxide producing enzyme. It is revealed that eNOS becomes dysfunctional and produces superoxide rather than NO under conditions in which vascular tissue levels of BH4, a co-factor for eNOS, are deficient or lacking. Experimental studies in vitro have revealed that NO from eNOS functions as an anti-atherogenic molecule. In eNOS-knockout mice, eNOS deficiency augments atherosclerotic lesion formation, although the effects may be partly due to associated hypertension. We crossed eNOS-transgenic mice (eNOS-Tg) overexpressing eNOS in the endothelium with apo E-KO, and demonstrated that under hypercholesterolemia eNOS overexpression accelerated atherosclerotic lesion formation in association with increased superoxide production from vessels compared with apo E-KO mice. In these mice, vascular tissue levels of BH4 were reduced and BH2, an oxidized form, levels were increased. Chronic administration of exogenous BH4 or overexpression of GTPCH-1, a rate limiting enzyme for BH4 synthesis, restored the lesion to the levels comparable to apoE-KO mice. Therefore, under hypercholesterolemia the overexpressed eNOS became dysfunctional and produced superoxide, which accelerated atherogenesis. eNOS may have 2 faces in the pathophysiology of atherosclerosis depending on tissue BH4 levels.

Key Words : *Oxidative stress, superoxide, nitric oxide, atherosclerosis, eNOS*

Received · Accepted Sep. 2, 2004.

(JJCDP 40:41-49, 2005)

Nephrology Frontier

別冊 2004年9月号 第3巻第3号

メディカルレビュー社

本社：〒541-0046 大阪府中央区平野町1-7-3 吉田ビル TEL 06-6223-1468
東京本社：〒113-0034 東京都文京区湯島3-19-11 イトーピア湯島ビル TEL 03-3835-3041

特集 動脈硬化による腎障害

○ Round Table Discussion ○

「動脈硬化による腎障害」

○ 論文 ○

1. 動脈硬化による腎障害の病理像
2. 動脈硬化による腎循環障害
3. 腎血管障害における NO と superoxide
4. 血管リモデリングの分子機構

特集にあたって

末期腎不全の患者数は依然増加している。原因疾患として、糖尿病性腎症と腎硬化症の増加に負うところが大きい。後者の成因は単一ではないが、高血圧、動脈硬化が関与する腎内の血管病変が主因と考えられる。さらに糖尿病患者においても、典型的な糖尿病による変化に加えて、あるいは独立して動脈硬化性腎障害の組織像に遭遇することも多い。糖尿病、高血圧といった生活習慣病に起因する血管病変による腎機能障害が増加し重症化している状況を反映していると考えられる。糖尿病性腎症、腎硬化症は透析導入後の生命予後も不良であるが、これは両疾患が全身の血管病変の一部をなすことを示している。我が国の腎不全患者の増加は、生活習慣病の増加とそれに起因する臓器障害の重症化を背景にしているといえよう。

本特集では血管疾患の視点から動脈硬化と腎障害との関連に焦点をあてたい。腎血管病変がいかんして腎機能の荒廃へと至るのか、病態形成に重要な役割を果たす因子は何なのか、治療法はどのような考えに依拠すればよいのかといった諸点について、この領域の第一人者である気鋭の臨床研究者に最新の知見をご紹介頂いた。

川崎医科大学腎臓内科 教授 柏原 直樹

動脈硬化による腎障害

近年、我が国における末期腎不全の原疾患の特徴として、糖尿病腎症の増加だけでなく、腎硬化症の増加があげられる。食生活の欧米化に伴い、糖尿病あるいは動脈硬化を基盤とした腎障害、つまり生活習慣病に起因した腎障害が増加していると言っても過言ではない。本特集では動脈硬化あるいは動脈硬化による腎障害の病態形成のメカニズムから、その病態形成に基づいた治療への展望まで、第一線でご活躍中の先生方からご意見をお伺いした。

出席者（発言順、敬称略）

柏原 直樹 Naoki KASHIHARA

川崎医科大学腎臓内科 教授

川嶋成乃亮 Seinosuke KAWASHIMA

神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学 助教授

林 晃一 Koichi HAYASHI

慶應義塾大学医学部内科学 講師

南学 正臣 Masaomi NANGAKU

東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科 助手

柏原（司会）——本日はお忙しいなかお集まり頂き、ありがとうございます。

腎不全に至る原疾患には2つの疾患が増えているように思います。1998年以降は糖尿病の増加を背景とした糖尿病性腎症が末期腎不全の第1位の原因疾患となりましたし、腎動脈硬化症も確実に増加しています。また、米国においては、糖尿病性腎症の増加率よりも腎硬化症の増加率が高いというデータもあります。腎硬化症の正確な定義は難しいかもしれませんが、大部分は腎内の細動脈レベルの動脈硬化に起因すると考えてよいのではないかと思います。

本日の座談会では動脈硬化と動脈硬化による腎障害の病態形成、その病態形成の理解に基づいた治療への展望についてお話し頂きたいと思います。

I

動脈硬化における血管病変形成の機序

柏原——まず川嶋先生から動脈硬化の成因について、そのなかでも活性酸素、酸化ストレス、あるいはNOといったレドックスの調節異常の視点から、そのメカニズムと重要性についてご解説頂きます。

川嶋——ご存じのように、動脈硬化は粥状硬化症

と細小動脈硬化症に分類され、現在、動脈硬化の機序は粥状硬化症を中心に研究が進められています。その基盤となるのが障害反応仮説で、動脈硬化の発症を促すような種々の危険因子に反応して血管内皮細胞が障害あるいは活性化され、これを引き金として動脈硬化が始まるという説です。血流中の白血球や単球が内皮細胞に接着し、その後、内皮下に侵入し、そこで単球はマクロファージに形質転換すると同時に、変性したLDLを取り込んで泡沫細胞化します。それとほぼ平行して起こるのが中膜における平滑筋細胞の遊走と内膜への侵入、そして増殖です。また、血小板の活性化や凝集が非常に重要な働きをし、活性化された血小板から様々な増殖因子が放出されて動脈硬化病変が形成されると考えられています。

我々の生体内は常に酸化ストレスに対して、それを進める方向と抑制する方向の2つの因子が出ており、スーパーオキシドや過酸化水素といった物質が様々な動脈硬化病変を促進する作用を有しています。これらは内皮細胞の障害活性化の物質としても重要です。動脈硬化を進展させるLDLの酸化にも関係します。また、平滑筋細胞の遊走や増殖に対しても重要な働きを有しています。

柏原——粥状硬化症には早期から内皮細胞の活性

化や機能異常があり、同時進行で酸化ストレス亢進と、恐らく NO の bioavailability 低下があるということですね。酸化ストレスの亢進は内皮機能異常の上位に位置すると考えてよろしいでしょうか。

川嶋——恐らく内皮機能を障害するもの上位に酸化ストレスが位置すると思います。ただ、どちらが先に起こっているのか判断することは難しいのですが、いったん酸化ストレスが亢進するとそれ自身が内皮を障害して活性化するという、ある種の vicious cycle が回り出します。

柏原——生体内の活性酸素産生経路にはキサンチンオキシダーゼ経路やミトコンドリアの呼吸鎖経路、NAD(P)H オキシダーゼ経路など、複数の経路が存在しますが、粥状硬化症の成因で特に重要なのはどの経路でしょうか。

川嶋——血管においては、NAD(P)H オキシダーゼ系と、最近注目されている内皮型の NO 合成酵素の 2 つが重要ではないかと考えられます。近年、NAD(P)H オキシダーゼの遺伝子レベルでの解析が進んで分子機構が明らかになり、その活性化にはアンジオテンシン II が重要な役割を果たしていることがわかりました。また、ずり応力や血管の拡張作用も NAD(P)H オキシダーゼを活性化することがわかっています。

柏原——糖尿病でも NAD(P)H オキシダーゼの活性化が報告されていますが、その際に高血糖自体からジアシルグリセロールを介したプロテインキナーゼ C の活性化もあると言われていますね。

川嶋——プロテインキナーゼ C の活性化も NAD(P)H オキシダーゼ活性化の機構として重要だと思います。

一方、NO 合成酵素から活性酸素が産生し得ることも最近になり明らかになってきました。NO 合成酵素の活性化には様々な補酵素が存在し、そのなかでも特にテトラヒドロビオプテリン (BH4) が必須であることがわかっています。血管細胞内、特に内皮細胞における BH4 濃度が低下すると eNOS uncoupling という状態が起こって、この場合には NO 合成酵素がスーパーオキ

シドを生成することが *in vitro* の実験系でわかってきました。これが様々な病態 (動脈硬化、糖尿病、高脂血症、喫煙) で、実際に生体内で起こっていることが証明されてきております。

柏原——今先生がおっしゃったような状態が、BH4 が減少、枯渇する状態ということですね。BH4 がジヒドロビオプテリン (BH2) から生成される過程において酸化ストレスが関係するということですか？

川嶋——そうです。BH4 は酸化されて BH2 にも変化します。それで、BH4 の酸化体である BH2 の増加が BH4 と NOS の協調作用を阻害することもわかっています。

柏原——最初は NAD(P)H オキシダーゼ経路を介した酸化ストレス、次いで BH4 の酸化を介して eNOS uncoupling などをきたす。さらに酸化ストレスが亢進して bioavailable な NO が低下するというのが共通した病態ということですね。

このような動脈硬化の早期において、レドックスの制御による治療戦略も考えられると思いますが、いかがでしょうか。

川嶋——レドックスを制御する方法としては 2 つ考えられます。1 つは、レドックスの活性化因子を阻害する、例えばアンジオテンシン II を阻害する方法です。もう 1 つは、実際に起こっている酸化ストレス自身を抑制する方法、これがいわゆる抗酸化療法です。

ただ、現在のところ、ごく少数例を除いて、直接的に抗酸化療法を行ったことによって動脈硬化病変が抑制されたというデータは、少なくとも臨床の大規模スタディではほとんどありません。その理由には有効な抗酸化薬がない、投与量の問題などがあるようです。

これに対して、レドックスの活性化因子を阻害する方法は、特にアンジオテンシン II の抑制による作用が酸化ストレスの抑制効果も有しているということが様々なスタディで証明されています。

以上述べてきましたのは太い血管の粥状硬化形成についてですが、これに対し細動脈や中型の筋系動脈では、泡沫化細胞という要因がなく、恐ら

Round Table Discussion



柏原 直樹 先生

動脈硬化症における透析導入後の生命予後は決して良好ではなく、atherogenicなリスクへの介入が重要になってくるだろう。

くその時の主体となるのは平滑筋細胞の遊走や増殖で、その場合にはやはり酸化ストレスが重要な働きをします。もう1つは間質の問題です。コラーゲンなどが重要な働きをしていて、その制御にも酸化ストレスが関与していると思います。

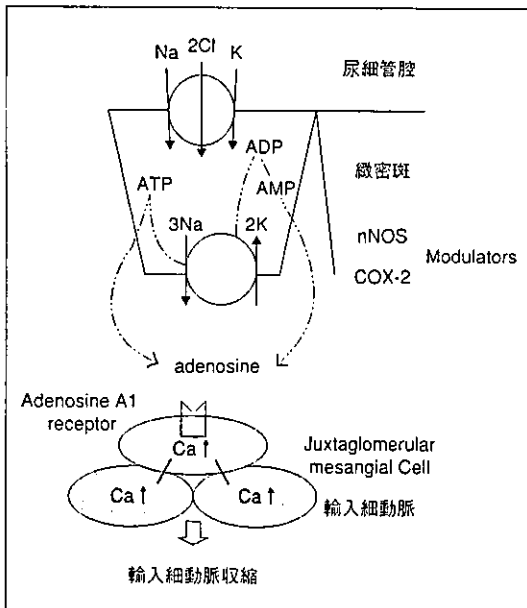


図1 尿細管-糸球体フィードバック (TGF) の機序

II

細動脈レベルの血管病変による腎障害

1. 糸球体血行動態の自動調節能

柏原——糸球体硬化，末期腎不全の進展の共通経路としては腎内の微小循環調節の破綻が認められています。とりわけ糸球体高血圧がその主体ではないかといわれていますが，糸球体の血行動態の自動調節能について林先生からお話し頂きたいと思います。

林——腎臓の自動調節能には筋原性収縮に加えて，尿管-糸球体フィードバック (TGF) という微小な調節を行う2つの経路があり，これが他の臓器と異なる部分です。特に最近の知見としては，TGFではアデノシンがメディエーターとして働いている可能性があるのではないかとされています。

我々はCCDカメラを腎臓内部に挿入して腎臓の血管を見るという方法で，腎臓の灌流圧を上昇させた場合の輸入細動脈の収縮反応を観察しました。輸入細動脈の収縮は有効でしたが，輸出細動脈に関しては我々の詳細な検討などから，灌流圧が上昇すると輸入細動脈が収縮して輸出細動脈が拡張するという，相反する反応が見られることがわかってきました。

実際にそのメディエーターとして，我々はアデノシンの可能性を考えました。アデノシン受容体のノックアウトマウスではTGFがないということも報告されています。我々も腎臓のmicrodialysisという方法を用いて，腎臓の間質におけるアデノシン濃度を測定しましたが，腎臓の灌流圧上昇に伴ってアデノシン濃度も上昇することを確認しました。実際にアデノシンA1受容体ブロッカーを用いると，灌流圧によって収縮した反応が減弱する作用が見られました。

柏原——従来から，遠位尿管ではCl⁻濃度を感知してTGFが発揮されると考えられていますが，このアデノシンはどのシグナル伝達に関係しているのでしょうか。

林——図1が現在想定されている模式図ですが，