

**図① eNOS の動脈硬化における二面性 (われわれの仮説)**  
 高脂血症・動脈硬化では補酵素  $BH_4$  の含有量低下により eNOS uncoupling が生じる。eNOS は NO のみならず  $O_2^-$  も産生し、NO の抗動脈硬化作用を阻害するとともに、場合によっては動脈硬化の悪化に関与する可能性がある。  
 (Kawashima S *et al* : *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 : 998-1005, 2004 より引用改変)

その後の追跡冠動脈造影でアセチルコリンにより血管が拡張せずに収縮した部位、すなわち内皮が傷害され EDR が減弱している部位に、器質的狭窄病変が出現したと述べられている。そして、内皮機能のうち最も重要なものが eNOS 由来の NO 産生であることより、これら一連の臨床研究の結果は、eNOS 由来 NO が、動脈硬化の防止・抑制にはたらいていることを示唆する所見と理解される。

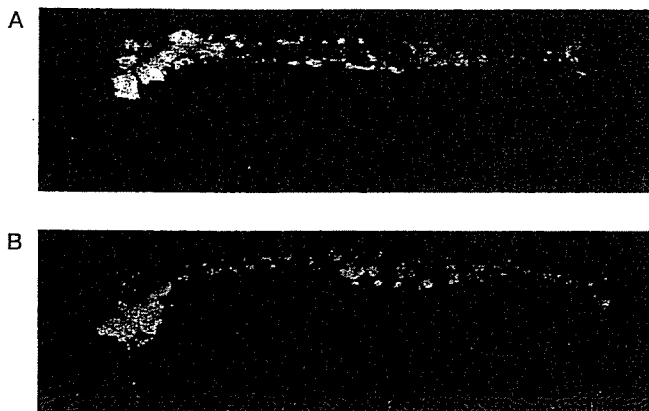
### 🌐 動脈硬化に対して eNOS は抑制作用をもたらすだけなのか？

すでに NOS の遺伝子操作マウスの項で述べたように、eNOS 遺伝子の欠損が逆に動脈硬化の抑制をもたらすとの報告<sup>14)</sup>も存在する。この報告は何を意味するのだろうか？ この報告ではその機序について明記はしていないものの、コントロールマウスでは内皮細胞による LDL 酸化が生じており、それは NOS 阻害薬でブロック

されるのに対し、eNOS 遺伝子欠損マウスの内皮細胞による LDL 酸化は軽度で、しかも NOS 阻害薬でブロックできなかったと報告されている。これは eNOS が LDL の酸化に関与していることを示唆するものである。

この数年 NOS 研究において“NOS uncoupling (機能異常)”という現象が注目されている<sup>22)23)</sup>。これは NOS がある種の条件下では、NO よりむしろ  $O_2^-$  を産生するということを意味する。すなわち、NOS が NO 産生酵素として正常に作用するには、補酵素であるテトラヒドロピオプテリン ( $BH_4$ ) の存在が必須であり、 $BH_4$  の不足下では NOS はダイマー化できず不安定となり、NOS のリダクターゼ領域で産生された電子が、オキシゲナーゼ領域において L-アルギニンよりむしろ酸素に供与される結果、 $O_2^-$  が産生される<sup>24)</sup>。

生体においても、この NOS uncoupling はまず糖尿病における内皮機能障害に関係していることが報告され<sup>25)26)</sup> 注目された。その後、2001 年に動脈硬化血管においても



図② apoE 遺伝子欠損マウスでは eNOS 過剰発現により奇異性に動脈硬化病変が増強する (16 週齢での大動脈における検討)  
A: 通常の apoE 遺伝子欠損マウスの動脈硬化病変,  
B: eNOS を過剰発現した apoE 遺伝子欠損マウスの動脈硬化病変。

(Ozaki M *et al*, 2002<sup>29</sup>) より引用)

同様の現象が生じており、動脈硬化血管における EDR の減弱に関与していることがはじめて報告された<sup>27)</sup> (図①)。

同時期に、われわれは内皮細胞に eNOS が過剰発現するトランスジェニックマウス (eNOS-Tg)<sup>28)</sup> と、動脈硬化易発症モデルである apoE 遺伝子欠損マウス (apoE-KO) との交配実験をおこなっており、その結果、当初の予想に反し、eNOS を過剰発現させた apoE 遺伝子欠損マウス (apoE-KO/eNOS-Tg) では、apoE-KO にくらべ動脈硬化病変は減少しておらず、逆に増強していることを見出していた (図②)。

そこでわれわれ<sup>29)</sup>は、この奇異性の動脈硬化病変増強の機序として、eNOS の uncoupling による内皮からの  $O_2^-$  産生の増加が関係すると考え、更なる検討をおこなった。そして内皮での eNOS 過剰発現の結果、血管壁、とくに内皮からの  $O_2^-$  産生が増加していること、そして血管における  $BH_4$  濃度が低下していることを見出した。この動脈硬化血管における  $BH_4$  濃度の低下は、 $BH_4$  合成の減少と  $BH_4$  が酸化され  $BH_2$  に変化するものの 2 つの機序が関係する。そこで合成  $BH_4$  の長期経口投与をおこなうと、血管壁の  $BH_4$  濃度の増加とともに、eNOS 過剰発現により増強した動脈硬化病変が、ほぼ通常の apoE 遺伝子欠損マウスの病変レベルまで軽減することを見出し

た。また、さらに内因性の  $BH_4$  濃度を増加させるため、 $BH_4$  産生の律速酵素である GTPCH-1 (GTP cyclohydrolase-1) が内皮に過剰発現した遺伝子操作マウスとの交配実験をおこない、GTPCH-1 が過剰発現した apoE-KO/eNOS-Tg (apoE-KO/eNOS-Tg/GTPCH-Tg) を作製した。その結果、apoE-KO/eNOS-Tg/GTPCH-Tg では、血管壁の  $BH_4$  濃度の増加とともに、血管壁からの  $O_2^-$  産生が低下し、動脈硬化病変が軽減することを見出した。

以上の一連の研究より、高脂血症・動脈硬化では補酵素  $BH_4$  の低下のため、過剰発現させた eNOS には uncoupling が生じており、eNOS は NO よりむしろ  $O_2^-$  を産生していること、この増加した  $O_2^-$  により動脈硬化が増強したものと考えられた。また、通常の apoE 遺伝子欠損マウスにおいても eNOS uncoupling が生じており、この uncoupling を  $BH_4$  を増加させることにより是正すると、動脈硬化病変が軽減することも報告された<sup>30)</sup>。その後の研究により、内皮細胞において eNOS が NO 産生酵素として最も効率的にはたらくためには、至適な eNOS と  $BH_4$  のバランスが存在しており、そのバランスが少しでも  $BH_4$  の相対的不足に傾くと、NO 産生酵素としての活性が低下することも明らかになりつつある<sup>31)</sup>。以上をふまえてわれわれは現在、eNOS 過剰発現マウスで見出した動脈硬化病変の増強は、特殊な条件下の研究であるものの、eNOS uncoupling が、本来の eNOS/NO 系の抗動脈硬化作用を減弱させているという現象は、おそらくヒトの動脈硬化の進展プロセスにおいても生じているのではないかと考えている。

このような観点に立つと、動脈硬化を eNOS/NO 系から防止、治療しようと考えるとき、単に eNOS 発現を増強させるだけでなく、eNOS の NO 産生酵素としての作用を最大限に引き出すため、並行して内皮細胞における  $BH_4$  濃度を増加させるような治療法が望まれることになる。 $BH_4$  の内皮細胞での代謝経路やその産生を規定する因子に関しては詳細はまだ明らかでない。同様に  $BH_4$  の主たる産生酵素 GTPCH-1 の活性や発現の調節因子にも不明な点が多い。一方、動脈硬化の抑制効果が確立しているスタチンに、GTPCH-1 の発現増加、 $BH_4$  の産生増

加作用があることが明らかになっている<sup>32)</sup>。この意味においても、高脂血症・動脈硬化においてスタチンを投与することは非常に合目的であり、他の薬剤のBH<sub>4</sub>に対する影響に関しての知見を広げるとともに、BH<sub>4</sub>を効率的に増加させる薬剤の開発が望まれる。

## おわりに

このように eNOS により産生される NO は抗動脈硬化分子としてはたらくと考えられるが、eNOS が必ずしも NO のみを産生するのではなく、そのカウンター分子である O<sub>2</sub><sup>-</sup>をも産生することとは、eNOS/NO 系を用いた動脈硬化の治療法を考えるうえで留意すべきことである。また他の NOS, すなわち iNOS あるいは nNOS により産生される NO が、生体において実際にどのように動脈硬化と関係しているかに関してはまだ不明な点も多く、更なる今後の研究が望まれる。



## 文献

- 1) Moncada S, Higgs A : The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329 : 2002-2012, 1993
- 2) De Caterina R, Libby P, Peng HB *et al* : Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96 : 60-68, 1995
- 3) Lloyd-Jones DM, Bloch KD : The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med* 47 : 365-375, 1996
- 4) Qian H, Neplioueva V, Shetty GA *et al* : Nitric oxide synthase gene therapy rapidly reduces adhesion molecule expression and inflammatory cell infiltration in carotid arteries of cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 99 : 2979-2982, 1999
- 5) Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M *et al* : Endothelial NO synthase overexpression inhibits lesion formation in mouse model of vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21 : 201-207, 2001
- 6) Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S *et al* : Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 154 : 87-96, 2001
- 7) Drexler H : Endothelial dysfunction : clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 39 : 287-324, 1997
- 8) Cai H, Harrison DG : Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases : the role of oxidant stress. *Circ Res* 87 : 840-844, 2000
- 9) Kanazawa K, Kawashima S, Mikami S *et al* : Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation. *Am J Pathol* 148 : 1949-1956, 1996
- 10) Melicher VO, Behr-Roussel D, Zabel U *et al* : Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 : 16671-16676, 2004
- 11) Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL *et al* : Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 : 2479-2488, 1997
- 12) Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC *et al* : Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS (-/-) ApoE (-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* 105 : 451-458, 2000
- 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* 104 : 448-454, 2001
- 14) Shi W, Wang X, Shih DM *et al* : Paradoxical reduction of fatty streak formation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 105 : 2078-2082, 2002
- 15) Detmers PA, Hernandez M, Mudgett J *et al* : Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol* 165 : 3430-3435, 2000
- 16) Niu XL, Yang X, Hoshiai K *et al* : Inducible nitric oxide synthase deficiency does not affect the susceptibility of mice to atherosclerosis but increases collagen content in lesions. *Circulation* 103 : 1115-1120, 2001
- 17) Hoetten S, Hu K, Widder J *et al* : Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* 108 : IV-40 (abstract), 2003
- 18) Muller S, Konig I, Meyer W *et al* : Inhibition of vascular oxidative stress in hypercholesterolemia by eccentric isosorbide mononitrate. *J Am Coll Cardiol* 44 : 624-631, 2004

- 19) Halcox JP, Schenke WH, Zalos G *et al* : Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* 106 : 653-658, 2002
- 20) Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM : Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101 : 1899-1906, 2000
- 21) Quyyumi AA : Prognostic value of endothelial function. *Am J Cardiol* 91 : H19-H24, 2003
- 22) Cosentino F, Luscher TF : Tetrahydrobiopterin and endothelial nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* 43 : 274-278, 1999
- 23) Katusic ZS : Vascular endothelial dysfunction : does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281 : H981-H986, 2001
- 24) Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P *et al* : Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase : the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 : 9220-9225, 1998
- 25) Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y *et al* : Abnormal biop-  
terin metabolism is a major cause of impaired endotheli-  
um-dependent relaxation through nitric oxide/O<sub>2</sub><sup>-</sup> imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes* 48 : 2437-  
2445, 1999
- 26) Alp NJ, Channon KM : Regulation of endothelial nitric  
oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 : 413-420, 2004
- 27) Laursen JB, Somers M, Kurz S *et al* : Endothelial regula-  
tion of vasomotion in apoE-deficient mice : implications  
for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobio-  
pterin. *Circulation* 103 : 1282-1288, 2001
- 28) 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* 102 : 2061-2071, 1998
- 29) Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T *et al* : Overexpres-  
sion of endothelial nitric oxide synthase accelerates athe-  
rosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin  
Invest* 110 : 331-340, 2002
- 30) Alp NJ, McAteer MA, Khoo J *et al* : Increased endothelial  
tetrahydrobiopterin synthesis by targeted transgenic GTP-  
cyclohydrolase I overexpression reduces endothelial dys-  
function and atherosclerosis in ApoE-knockout mice. *Arte-  
rioscler Thromb Vasc Biol* 24 : 445-450, 2004
- 31) Bendall JK, Alp NJ, Kawashima S *et al* : Stoichiometric  
relationships between endothelial tetrahydrobiopterin,  
eNOS activity and eNOS coupling in vivo : insights from  
transgenic mice with endothelial-targeted GTPCH-1 and  
eNOS overexpression. *Circ Res* 97 : 864-871, 2005
- 32) Hattori Y, Nakanishi N, Akimoto K *et al* : HMG-CoA  
reductase inhibitor increases GTP cyclohydrolase 1  
mRNA and tetrahydrobiopterin in vascular endothelial  
cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 : 176-182, 2003

川嶋 成乃亮 (かわしま・せいのみつ)

神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学助教授

1952年 大阪府生まれ。

1977年 神戸大学医学部卒業。

1982年 ボストン大学、ロチェスター大学留学。

1985年 兵庫医科大学内科学第一講座助手。

1992年 神戸大学医学部内科学第一講座助手。

同講師を経て、2000年より現職。

専門：循環器内科。

研究テーマ：虚血性心疾患の分子機序、一酸化窒素の心  
血管系における役割の解明。

# 心不全と内皮機能障害

Endothelial dysfunction in heart failure



川嶋成乃亮(写真) 横山光宏

Seinosuke KAWASHIMA<sup>1</sup> and Mitsuhiro YOKOYAMA<sup>2</sup>

大阪府済生会中津病院総合診療内科<sup>1</sup>, 神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学<sup>2</sup>

◎血管内皮は種々の物質を産生・放出し血管機能調節を行うとともに、血管構築に深く関与している。血管内皮が産生する代表的因子が内皮型 NO 合成酵素(eNOS)により産生される一酸化窒素(NO)であり、内皮依存性血管弛緩・拡張反応(EDR)をもたらす。心不全においては EDR が低下しており、その機序としては、血流の慢性的低下による血管壁 eNOS 発現の低下などによる NO 産生の減少に加え、酸化ストレス・スーパーオキシドの産生増加による NO 作用の減弱が大きく関与する。EDR の低下はすなわち内皮障害が存在することを示唆し、実際に心不全患者の末梢血において内皮障害マーカーは増加している。EDR の低下の程度と心不全の予後とが関係するということが明らかになってきており、一方においてアンジオテンシンをブロックする薬剤により心不全を治療すると、減弱していた EDR も改善する。心不全における内皮障害の病態的意義としては、骨格筋での EDR 低下が運動時の血流障害により運動耐容能の低下をもたらす可能性や、全身においては心不全での易血栓・炎症性に関与している可能性があり、心不全の治療戦略において内皮機能改善という観点も視野に入れる必要がある。



心不全, 血管内皮, 内皮依存性血管弛緩・拡張反応

今日、血管内皮細胞が種々の物質を産生・放出し血管機能調節を行い、また血管構築に深く関与していることは広く理解されている。内皮細胞が産生する物質のなかでもっとも重要なのが一酸化窒素(NO)である。NO は内皮細胞をはじめとするさまざまな細胞において L-アルギニンを基質として NO 合成酵素により産生される。その詳細は他書を参考にされたいが<sup>1)</sup>、NO 合成酵素には 3 つのアイソフォームがあり、血管内皮においては内皮型 NO 合成酵素(eNOS)が恒常的に発現しており、血流のずり応力や、インスリン、ブラジキニン、アセチルコリンなどのアゴニストにより活性化され、NO を産生する。産生された NO は内皮由来血管弛緩因子(EDRF)として拡散により血管平滑筋細胞に達し、グアニル酸シクラーゼを活性化させ、その結果、サイクリック GMP(cGMP)が産生され、平滑筋が弛緩・拡張する。この現象が内皮依存性血管弛緩・拡張反応(EDR)であり、生体に

においては主としてずり応力による EDR が血流量調整における最大因子となっている。そして、EDR の減弱は内皮機能の障害を表すと考えられる。循環器領域において内皮障害が注目されたのはまず、動脈硬化、高脂血症、糖尿病、高血圧などにおける EDR の減弱という現象を通じてである。その後、心不全に関しても EDR が低下していることが明らかになり、内皮障害が心不全における病態形成に及ぼす役割が注目されるようになった<sup>2-4)</sup>。心不全は心臓のみが関係する病態ではなく、全身の臓器機能不全がその病態を形成している。なかでも血管は心臓から送りだされた血液を全身の臓器に供給する役割を担っており、内皮障害は心不全の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられるようになってきている。



## 心不全におけるEDRの減弱

1989年にKaiserらが最初に心不全モデル犬で

下肢大腿動脈での EDR の低下を報告し、その後すぐさまに心不全患者においても骨格筋の抵抗血管および太い血管レベルでの EDR が低下していることが数多くの施設により明らかにされた<sup>2-4)</sup>。臨床においての EDR の評価法としては、当初は下腿動脈内にドプラー血流計を挿入した検討なども認められたが、前腕動脈を一過性に駆血・解除した後の反応性充血による血流増加時の前腕動脈内径の変化をエコー法で観察する方法がよく用いられるようになり、心不全ではこの前腕の EDR が低下していることも明らかになった。EDR が低下しているということは、その血管における eNOS により産生される NO の量的低下、あるいは細胞生物作用の減弱を意味する。すなわち、eNOS の活性化機構が障害されている場合と、eNOS から NO は産生されているが、スーパーオキシドにより NO の不活性化が亢進している場合とがあり、心不全においてはこの両者が関係していると考えられる。

eNOS の活性化機構が障害されていることを示すデータとして心不全患者にて L-[<sup>15</sup>N]アルギニン を静脈内投与し尿中の [<sup>15</sup>N]nitrate を測定した検討

サイド  
メモ

### 臓器としての血管内皮

1980 年に Furchgott らが家兎の摘出大動脈において、血管内皮が存在する場合はアセチルコリンに対して血管は拡張するが、内皮を除去すると逆に収縮することより、内皮細胞から産生放出される内皮由来血管弛緩因子(EDRF)の存在を報告した。その後、EDRF が NO であるということが明らかになり、EDRF/NO の発見により血管内皮が種々の分子を産生・放出し、血管機能調節を行うとともに血管構築に深く関与するひとつの臓器であるとの認識がなされるようになった。血管内皮細胞は、NO 以外にもスーパーオキシド、プロスタサイクリン、アンジオテンシン II、エンドセリンなどの生理活性物質、また接着分子や、MCP-1 などのケモカイン、さらには von Willebrand 因子(WWF)、組織型プラスミノゲン・アクチベーター(tPA)、トロンボモデュリンなどの凝固線溶系因子も産生する。それゆえ、心血管病の病態や治療法を考えるうえで血管内皮は非常に重要である。

においても心不全患者では健常人と比べて L-アルギニンからの NO 産生量が減弱していることが報告されている<sup>5)</sup>。この機序としてはまず、内皮細胞での eNOS 発現の低下があげられる。すなわち、心拍出量の低下に基づく慢性的な血管壁への血流不調による心筋の減弱や、心不全患者において血中濃度が増加しているサイトカイン腫瘍壊死因子(TNF)  $\alpha$  による eNOS mRNA、蛋白の発現減少が考えられる<sup>6)</sup>。また、eNOS が NO 産生酵素として作用するために必須な補酵素であるテトラヒドロビオプテリン(BH<sub>4</sub>)の相対的欠乏による eNOS 機能異常(uncoupled eNOS)という現象が生じていることを推察している報告、さらには内因性の NOS 阻害物質である NG,NG-dimethyl-L-arginine(ADMA)の血管内蓄積が関係するとの報告もある。

一方、心不全では NO の産生量は低下しておらずむしろ増加しているにもかかわらず、スーパーオキシドによる不活性化が亢進しているため、EDR は低下しているとの考えがしだいに有力となってきた。ヒトにおいてスーパーオキシド産生量を測定することは困難であるが、間接的には、心不全患者における種々の酸化ストレスマーカー、たとえば酸化 LDL 濃度、8-iso-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  の血中濃度などが上昇していることから、スーパーオキシド産生が増加していることが推察される。さらに、心不全患者に対し抗酸化薬であるビタミン C を投与すると減弱していた EDR が改善することもスーパーオキシドによる NO 不活性化を支持する所見である<sup>7)</sup>。動物実験では低下した EDR がスーパーオキシド消去薬により改善することが報告されており、また高頻度ペーシングによる心不全モデル犬を用いた Takayama らの検討では血管からのスーパーオキシド産生の増加が示されている<sup>8)</sup>。さて、この増加したスーパーオキシドの産生酵素であると考えられ、Takayama らの報告でも心不全モデル犬の大血管での NAD(P)H oxidase 活性が上昇しており、かつその発現も増加していることが報告されている。それではどのような機序が働き心不全において NAD(P)H oxidase の活性化が生じているかであるが、その鍵となる因子はアンジオテンシン II (Ang II) であると考えられる。Ang II は強

力な NAD(P)H oxidase 活性化因子であるだけでなく、NAD(P)H oxidase のおもなコンポーネント分子の発現をも増加させる。そして周知のように心不全ではレニン-アンジオテンシン系の活性化が生じている。また、同じく心不全において血中濃度が増加するエンドセリン-1 やアルドステロンにも NAD(P)H oxidase 活性化作用があり、これらの因子が血管壁での NAD(P)H oxidase を活性化させ、スーパーオキシド産生の亢進が生じているものと考えられる。

一方、血管壁でのスーパーオキシド産生酵素としては、前述の機能異常を生じた eNOS、すなわち uncoupled eNOS もまた重要であり、心不全においてもこの系が関与している可能性もある。冠動脈疾患、高血圧、糖尿病、喫煙など多くの EDR が低下した病態ではビタミン C が EDR を改善することが報告されている。ところが、心不全においてはビタミン C は虚血性心不全の EDR 改善には有効であるが、拡張型心筋症での EDR 改善には有効でないということが、著者らの施設をはじめ複数の施設より報告されている<sup>9)</sup>(図 1)。最近では、抗酸化薬であるビタミン C は単にスーパーオキシドをトラップするだけではなく、uncoupled eNOS の機能改善をもたらすことにより作用するとの考え方が支配的になりつつある。虚血性心不全と拡張型心不全でのビタミン C の効果の違いは、両者での EDR 低下における uncoupled eNOS の関与の違いを示唆するものかもしれない。

### EDRの減弱と心不全の病態

このような EDR の減弱が心不全の病態に及ぼす意義であるが、まず臓器血流の低下、とくに骨格筋への血流低下をもたらすことが考えられる。臓器血流の低下は、臓器血管抵抗の上昇を招き、その結果、心臓への後負荷増加をもたらす、不全心のさらなる心機能低下につながる。さらに、骨格筋での抵抗血管の EDR が減弱すると運動時の骨格筋への血流増加が制限され、その結果、運動耐容能が低下するとの仮説がなされている<sup>10)</sup>。このことを支持するものとして心不全患者に対してアンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬を長期投与すると、運動耐容能が増

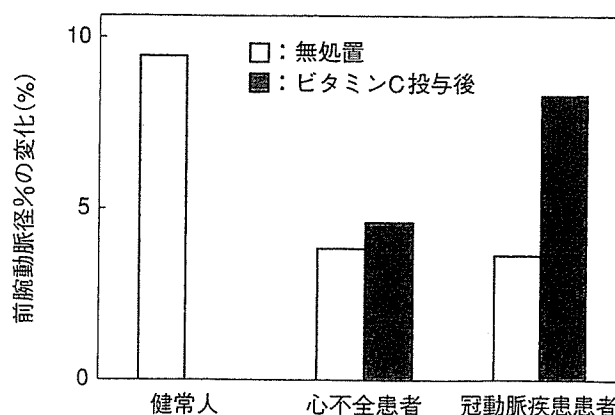


図 1 拡張型心筋症による心不全患者、ならびに冠動脈疾患患者における前腕の血流依存性拡張反応の減弱とビタミンC静注の効果(文献<sup>9)</sup>より改変)

加するが、その際には骨格筋での EDR も改善していることがあげられる。しかし、骨格筋が心不全における運動耐容能を規定しているということは広く認められているが、骨格筋への血流がそれを規定しているかどうかに関しては異論も多いのが現状であり<sup>11)</sup>、むしろ骨格筋自身の障害が運動耐容能低下のおもな要因との考えも多い。一方、心不全での EDR の低下は骨格筋よりもむしろ肺循環に及ぼす影響が大きく、換気血流ミスマッチになるとの指摘もなされている。

一方、運動は骨格筋 EDR を改善させる<sup>12)</sup>。これは、健康人、心不全患者に共通の現象であり、そのおもな機序としては、運動による血流量増加の結果、ずり応力が増大し、内皮細胞に直接作用し eNOS 発現を増加させることが考えられる。また、同じくずり応力がスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) などの抗酸化物質の発現を増加させることによりスーパーオキシドによる NO の活性化を減弱させていることも関係する。

### 内皮障害マーカーと心不全

EDR の減弱は単に組織血流の低下を意味するだけではない。その基盤にあるのは内皮機能障害であり、内皮が本来有しているさまざまな機能の障害があると考えられるべきである。実際に、心不全患者では末梢血液中に内皮障害をあらわすと考えられる種々のマーカーの増加がみられる。そのおもなものとして可溶性の ICAM-1、VCAM-1 などの接着分子、Von Willebrand 因子 (vWF) や、内皮細胞

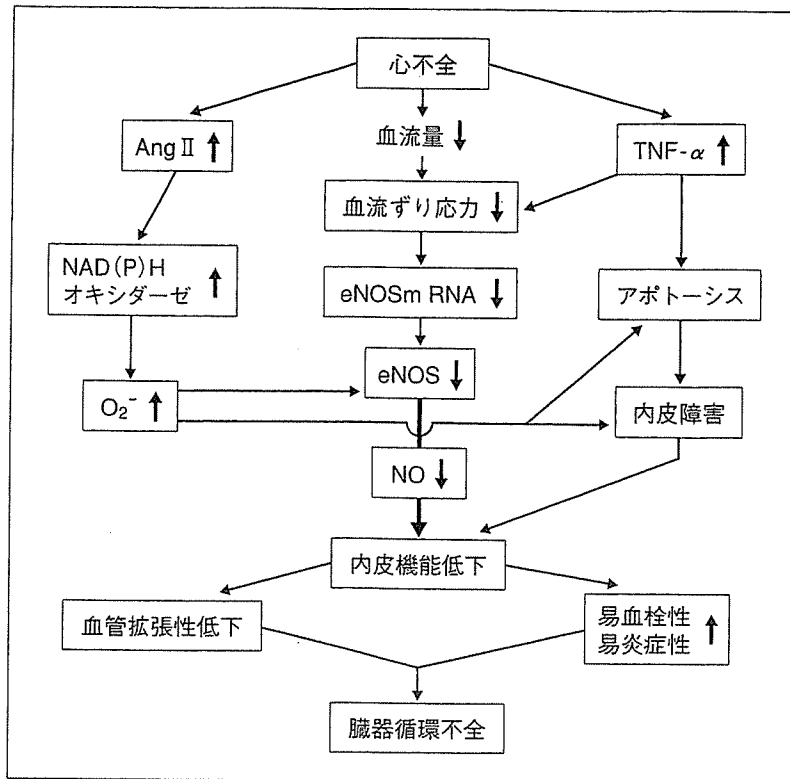


図 2 心不全の病態形成における内皮機能障害の役割(著者の仮説)

由来マイクロパーティクルなどがあげられる。そして、これらの因子が増加していることは、内皮障害の結果、内皮が活性化されており、血管が向炎症、向血栓性に傾いていることを意味し、心不全患者における血栓形成に深く関与していると推定される<sup>13)</sup>。

さらに、最近では末梢血液中に存在する内皮細胞数が心不全患者において増加を示す報告があり、このことは末梢血管において内皮の剥離が生じていることを示唆するものとしている<sup>14)</sup>。はたして実際に、心不全において実際に血管内皮の剥離が生じているかどうかはもうすこしデータの蓄積が望まれるが、一方において末梢血液中の内皮前駆細胞は軽症心不全では増加することが報告されている<sup>15)</sup>。このことは内皮の障害に対応して骨髄から末梢へ内皮前駆細胞が動員されているものと理解できよう。さらに、同じ論文において心不全が重症化すると、この末梢血中の内皮前駆細胞は逆に減少するとしている。冠動脈疾患では冠動脈危険因子の蓄積があるほど、末梢血液中の内皮前駆細胞は低下することが明らかになっている。同様のことが心不全でも起こっているようであり、その機序として心不全の重症化に伴い上昇した TNF-

αによる骨髄抑制が考えられると報告されている。

いずれにせよ、心不全での末梢血液中の内皮細胞、あるいは内皮前駆細胞の上昇という所見は内皮が強く傷害されていることを示唆する所見であり、心不全患者の血管では内皮のアポトーシスが認められるとの報告と合わせて考えると興味深い。

### 心不全の予後規定因子としての内皮依存性血管拡張反応の減弱

すでに述べてきたような理由で、心不全の病態形成に内皮機能の低下は大きく関与しているが(図2)、一方において内皮機能が心不全患者の予後の規定因子あるいは予知因子となることも明らかになってきている。疾患と内皮機能の関係ではまず、2000年に Schachinger らにより初回解析時の冠動脈病変の有無にかかわらず、冠動脈血管におけるアセチルコリン投与時の拡張反応の程度が、その後の心血管イベント発症の予知因子となりうることが報告された<sup>16)</sup>。さらには冠動脈患者疾患患者においては前腕での血流依存性血管拡張反応(FMD)もまた、心筋梗塞発症、心血管死の予知因子となりうることも明らかになってきた。このことはおそらく、冠動脈疾患の基盤にある動脈硬化の進展、



そして動脈硬化粥種の不安定化というものに血管内皮障害が深く関与していることを意味すると理解される。一方、心不全患者における検討も2005年になり、はじめてほぼ同時期に複数の施設より報告された<sup>17-19)</sup>。KatzらはNHYA II～III度の心不全患者を平均840日間フォローし、心不全死亡の予知因子として前腕のFMDが有効であることを明らかにした<sup>17)</sup>。一方、心不全の悪化の予知因子としてはBNPが有用であることは広く認められている。このBNPと前腕のFMDが相関するとの報告は多くなされており、同時期になされたMeyerらの報告においてもFMDとBNPを組み合わせることで、それぞれ単独よりもさらにが予後予知因子として有用であることが示されている<sup>18)</sup>。このような報告の意義としては冠動脈疾患の場合と異なり、おそらく内皮障害は病態の重症度を反映しているのにすぎないのではないかと著者は考えている。

### 心不全治療のターゲットとしてのEDR

このように心不全では内皮機能が障害され、その結果、EDRが減弱している。すでに述べたように、心不全治療の標準薬となっているアンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬の長期投与により心不全の病態の改善とともに、EDRもまた改善する<sup>20)</sup>。骨格筋でのこのEDRの改善は運動耐容能の増加につながる可能性があり、また、不全心へのafterloadを軽減し、心機能増加につながると考えられる。さらには、心不全における易血栓性、炎症状態を軽減し、心不全の病態そのものをも改善することが考えられる。また、慢性心不全患者に対する運動療法の有効性が明らかになっているが、この機序にも運動による内皮機能の改善の関与が推定される。

アンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬によるEDRの改善は、心不全自身が軽快したため生じた二次的な要因と、これらの薬剤の血管内皮への直接作用の両者が関係していると考えられる。両薬剤はともにAng IIの作用をブロックしスーパーオキシド産生を低下させるとともに、eNOSを活性化させ直接的にもNO産生を増加させる。それでは血管内皮に焦点を当てた治療はどうかというと、心不全において減弱

したEDRを改善することが明らかになっている。ビタミンCには心不全の病態改善作用はないようである。これに対し近年高コレステロール治療薬であるHMG-CoA還元酵素阻害薬(スタチン)が、遺伝子レベルでeNOS発現を増加させ内皮からのNO産生を増加させることが明らかになっている。このスタチンが心不全に有効であるとの報告も散見されてきており、いわゆるpleiotropic作用が関係していると考えられる<sup>21)</sup>。なかでもeNOS由来のNO産生増加、さらには抗炎症作用といったスタチンによる血管内皮に対する作用の関与が示唆されている。

### おわりに

近年多くの心血管病において血管内皮保護の観点からの治療戦略の必要性が叫ばれている。心不全に関してもおそらく同様であるとは、考えられるものの、内皮を保護することが心不全の病態改善とどのように結びつくかに関してのエビデンスは少ないのが現状であり、今後さらなる知識の蓄積が重要である。

### 文献

- 1) 川嶋成乃亮, 横山光宏: 循環器疾患とNO. *In*: NOの生理作用と疾患(谷口直之, 鈴木敬一郎編). 羊土社, 1999, pp.46-52.
- 2) Kaiser, L. et al.: *Am. J. Physiol.*, **256**: H962-H967, 1989.
- 3) Ueno, M. et al.: *Jpn. Circ. J.*, **58**: 778-786, 1994.
- 4) Kubo, S. H. et al.: *Circulation*, **84**: 1589-1596, 1991.
- 5) Katz, S. D. et al.: *Circulation*, **99**: 2113-2117, 1999.
- 6) Smith, C. J. et al.: *Circ. Res.*, **78**: 58-64, 1996.
- 7) Hornig, B. et al.: *Circulation*, **97**: 363-368, 1998.
- 8) Takayama, T. et al.: *Circ. J.*, **68**: 1067-1075, 2004.
- 9) Ito, K. et al.: *Am. J. Cardiol.*, **82**: 762-767, 1998.
- 10) Lopes-Ferre, A. et al.: *J. Am. Coll. Cardiol.*, **28**: 1092-1102, 1996.
- 11) Horning, B. H. et al.: *Circulation*, **32**: 210-214, 1996.
- 12) Tousoulis, D. et al.: *Am. Heart J.*, **141**: 277-280, 2001.
- 13) Chong, A. Y. et al.: *Circulation*, **110**: 1794-1798, 2004.
- 14) Valgimini, M. et al.: *Circulation*, **110**: 1209-1212, 2004.
- 15) Schachinger, V. et al.: *Circulation*, **101**: 1899-1906, 2000.
- 16) Katz, S. D. et al.: *Circulation*, **111**: 310-314, 2005.
- 17) Meyer, B. et al.: *J. Am. Coll. Cardiol.*, **6**: 1011-1018, 2005.
- 18) Heitzer, T. et al.: *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, **25**: 1174-1179, 2005.
- 19) Varin, R. et al.: *Circulation*, **102**: 351-354, 2000.
- 20) Node, K. et al.: *Circulation*, **108**: 839-843, 2003.

### III. 発症機序

## メタボリックシンドローム発症にかかわる 血管内皮細胞機能障害

Endothelial dysfunction as a mechanistic factor for metabolic syndrome

川嶋成乃亮

**Key words** : メタボリックシンドローム, 血管内皮細胞, インスリン抵抗性, アディポサイトカイン

#### はじめに

血管内皮細胞は数多くの分子を産生・分泌することにより, 血管の緊張性の調節のみならず, 血管壁の恒常性の維持, 更には血液の凝固・線溶調節などの多彩な機能を有す。そして, 血管内皮細胞の障害が種々の血管病の病態形成に深く関係しており, 特に動脈硬化の発症・進展に必須な要因となることは広く認められている。

近年, 動脈硬化発症の基盤としてメタボリックシンドロームの存在が注目を浴びており, メタボリックシンドロームにおいては, 内皮機能が障害されていることが明らかになっている<sup>1)</sup>。メタボリックシンドロームを構成する高血圧, 糖尿病, 脂質代謝異常のいずれもが単独においても内皮機能障害をもたらすが, メタボリックシンドロームの中心にあると考えられるインスリン抵抗性そのものもまた, 内皮機能を減弱すると考えられている<sup>2,3)</sup>。一方, メタボリックシンドロームの病態は, ①内臓脂肪蓄積, ②インスリン抵抗性, ③脂質代謝異常, ④高血圧, ⑤易血栓状態, ⑥易炎症状態から形成されており, 内皮機能障害の存在はこれらの病態に深く関与していることが想定される。

本稿においては, メタボリックシンドロームにおける内皮機能障害の意義, およびその機序

について解説するとともに, 内皮細胞機能障害の存在がどのように, メタボリックシンドロームの病態形成に関与しているかについて考察する。

#### 1. メタボリックシンドロームにおける 内皮機能障害

臨床において内皮機能障害の有無は, 内皮依存性の血管弛緩・拡張反応(EDR)を測定することで一般的にその判定がなされており, EDRの低下があれば, 内皮機能が障害されていると考える。EDRは血流のずり応力や種々のアゴニスト刺激により, 内皮細胞に存在する内皮型NO合成酵素(eNOS)が活性化され, その結果NOが産生され, 拡散により血管平滑筋に達したNOがcGMP依存性に血管平滑筋を弛緩・拡張させる現象である。

今日, メタボリックシンドロームの中心をなすのは内臓肥満と考えられている。肥満は多くの場合, 高血圧, 糖尿病, 脂質代謝異常などの他のメタボリックシンドロームの構成要因を合併しており, それら自身が内皮機能の障害要因であるため, 肥満そのものの影響を判定することは困難である。一方, これらの明らかな要因を除外しても肥満に伴いEDRが減弱するとの報告も散見されるが, この場合は恐らく肥満そ

表1 メタボリックシンドロームにおける  
内皮機能低下の機序

1. 酸化ストレスの増加
2. 内皮におけるインスリン抵抗性
3. アディポサイトカインの作用  
血管に対する直接作用  
内皮細胞内におけるインスリンシグナルの修飾
4. 増加した遊離脂肪酸の影響

のものというより、肥満の下流にあると考えられるインスリン抵抗性が原因と考えられる<sup>3)</sup>。このような考え方を支持するものとして、Lteifらは、メタボリックシンドロームの患者において、下腿動脈で測定したEDRと、メタボリックシンドロームの5つの要因、すなわちウエスト周囲径、中性脂肪値、HDLコレステロール値、血圧、血糖値との関係を検討し、EDRの減弱と関係するのはウエスト周囲径と血圧であること、更にウエスト周囲径のEDRへの影響はインスリン抵抗性の指標であるHOMA-Rにより規定されているということを報告している<sup>4)</sup>。

## 2. メタボリックシンドロームにおける 内皮機能低下の機序

それでは、メタボリックシンドローム/インスリン抵抗性における内皮機能の低下には表1に示すような種々の機序の関与が考えられる<sup>2)</sup>。

まずは、内皮障害を生じる種々の病態に共通の機序として、酸化ストレスの亢進があげられる。メタボリックシンドロームを構成する高血圧、糖尿病、脂質代謝異常などにおいてはスーパーオキシドの産生が亢進しており、その結果NOの不活性化が生じている。高血圧は、機械的刺激やアンジオテンシンIIなどを介し、血管におけるスーパーオキシドの主要な産生酵素であるNAD(P)H oxidaseを活性化させ、スーパーオキシドを産生する。高血糖は、ポリオール代謝系を亢進させることによるNAD(P)H oxidaseの活性化、ならびにミトコンドリア内の電子伝達系に働きスーパーオキシド産生をもたらす。また高脂血症、高血糖においては、eNOS機能に必須な補酵素であるテトラヒドロピオプテリン(BH<sub>4</sub>)が酸化などにより組織濃度

が低下する一方、BH<sub>4</sub>の作用に拮抗するBH<sub>2</sub>が増加することにより、eNOSの機能異常(アンカップリング)が生じ、その結果eNOSがスーパーオキシドを産生するようになっている<sup>5,6)</sup>。酸化ストレスがメタボリックシンドロームにおける内皮機能障害に関与していることは、抗酸化薬であるビタミンCにより内皮機能が改善することからも示される<sup>7)</sup>。

一方、メタボリックシンドロームに特徴的な機序として、まずインスリンそのものの、内皮細胞のeNOS/NO系に対する作用の減弱があげられる。インスリンによる血管拡張には、交感神経を介する間接的な作用と、eNOSに作用しNOを産生することによる内皮依存性の直接作用とがある。インスリンは内皮のインスリン受容体と結合した後、PI3 kinase/Akt経路を介しeNOSのSer1177をリン酸化しeNOSを活性化させる。また、インスリンはeNOS mRNAを増加させることも明らかとなっている<sup>8)</sup>。そして、インスリン抵抗性を伴う肥満患者は、痩身者に比べ、血管に内皮細胞のインスリンに対する血管拡張反応が減弱していることが示されている<sup>9)</sup>。NOが内皮保護因子として作用していることを考えると、このインスリンによるNO産生の減弱は、単に血管拡張性の減弱のみならず、広く内皮機能障害と結びつくものと考えられる。メタボリックシンドロームにおけるこのインスリンの内皮におけるシグナル伝達の障害の機序としては、アディポサイトカインの分泌異常が関係していることが示唆されている。

また、インスリン抵抗性の上流に存在する内臓肥満をもたらす脂肪細胞により産生される様々な生理活性物質、すなわちアディポサイトカインの分泌異常もまた、内皮機能障害に関与しているものと考えられる。代表的なアディポサイトカインであるアディポネクチンの血中濃度はメタボリックシンドロームで低下している。アディポネクチンには抗炎症作用、抗動脈硬化作用があるが、その機序の一つとして内皮保護作用が重要である。アディポネクチンはEDRをもたらすが、これはAMPK(AMP-activated protein kinase)を介した経路およびAktを介し

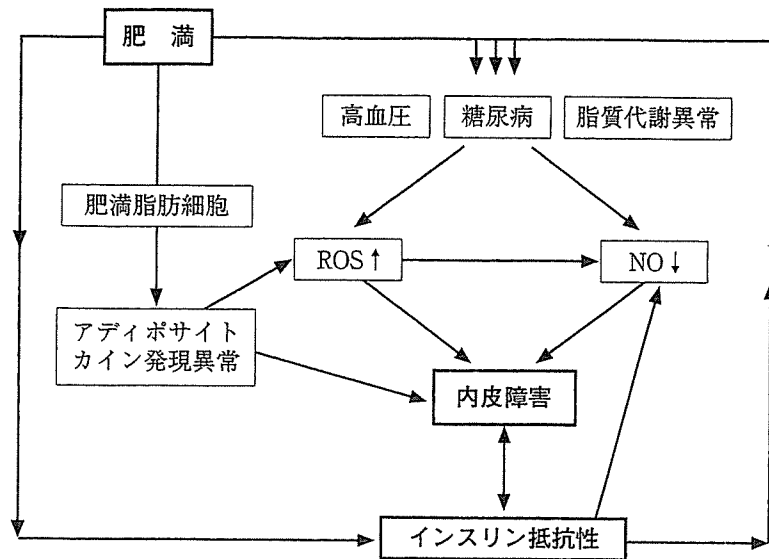


図1 メタボリックシンドロームにおける内皮障害の成立機構

た経路により、eNOSをリン酸化し活性化させNOを産生することによる<sup>10)</sup>。また後ほど述べるように、アディポネクチンは内皮細胞における接着因子発現を抑制している。一方、メタボリックシンドロームで増加しているTNF $\alpha$ やレジスチンは内皮の障害因子として働く<sup>11)</sup>。TNF $\alpha$ にはeNOS発現の抑制作用があり、TNF $\alpha$ 、レジスチンには血管収縮因子であるET(エンドセリン)-1の発現の増強作用がある。このように、内皮保護因子であるアディポネクチンが低下し、障害因子であるTNF $\alpha$ やレジスチンが増加していることが、メタボリックシンドロームにおける内皮機能障害に働いていると考えられる(図1)。

### 3. 内皮障害がメタボリックシンドロームの病態形成に及ぼす役割

近年、動脈硬化を慢性炎症性疾患ととらえる考え方が広まりつつある。その意味において、メタボリックシンドロームにおいて認められる易炎症性、そして易血栓性はメタボリックシンドロームが動脈硬化の発症基盤となるうえで重要である。メタボリックシンドロームでは前述のようにアンジオテンシンIIやエンドセリン、更に高血圧といった機械的因子の影響でスーパーオキシドの産生が増加し酸化ストレスが増大している。酸化ストレスは内皮を障害・活性化

し、炎症を惹起する。その作用機序として特に重要なのは転写因子NF $\kappa$ Bを活性化することであり、その結果VCAM-1、ICAM-1のような接着因子、更にはマクロファージ走化因子であるMCP-1、そしてmatrix metalloproteinases(MMPs)などの動脈硬化発症・進展の必須遺伝子を誘導する。更にこれらに加え、メタボリックシンドロームにおいて脂肪細胞から産生されるTNF $\alpha$ もまた、VCAM-1などの接着分子の発現、あるいはMCP-1の発現を増加させ、炎症惹起性に作用する<sup>12)</sup>。これに対し、内皮細胞より産生されるNOはスーパーオキシドの作用と拮抗し、炎症抑制に作用する。この主たる機序はNF $\kappa$ Bの活性化の抑制によるものであり、NOにより接着因子発現が抑制され、そして内皮細胞-単球・炎症細胞接着の抑制が生じる。更にMCP-1やMCSFといった動脈硬化惹起性分子の発現も抑制する<sup>13)</sup>。

一方、メタボリックシンドロームのもう一つの病態である易血栓性に関してであるが、この場合も酸化ストレスの増大が関係する。酸化ストレスにより内皮細胞ではNF $\kappa$ Bの活性化を通じてプラスミノゲン・アクチベーターインヒビター-1(plasminogen activator inhibitor-1: PAI-1)の発現が誘導され、一方において血液凝固の外因性のイニシエーターである組織因子(tissue factor: TF)の発現が増加する。更に血中のPAI

-1 濃度が上昇しており、これは内臓脂肪細胞からの産生・分泌が主として関与する<sup>14)</sup>。他方、内皮細胞からは抗血小板凝集・粘着因子でもある NO やプロスタサイクリンをはじめ、アンチトロンビン、組織型プラスミノゲン・アクチベータ (t-PA)、更には外因経路阻害因子 (tissue factor pathway inhibitor: TFPI) などの様々な抗凝固・血栓形成因子が産生されている。

メタボリックシンドロームにおいては、易炎症因子、易血栓形成因子が増加するとともに、内皮細胞が障害されていることにより、NO をはじめとした抗炎症因子、抗血栓形成因子が低下しているため、血管壁での炎症機転が惹起され、更に易血栓性となっていると考えられる。

このように内皮細胞機能障害の存在は、メタボリックシンドロームの病態形成に深く関与しているが、一方において内皮機能の障害が、メタボリックシンドローム発症そのものにかかわっている可能性も考えられる。すなわちメタボリックシンドロームの病態の中心に位置するインスリン抵抗性を内皮細胞機能障害が増悪させることが考えられる<sup>15)</sup>。ACE 阻害薬、およびアンジオテンシン受容体拮抗薬は、高血圧の治療薬として用いられるが、大規模臨床試験を通じてこれらの薬剤が II 型糖尿病の発症を防止することが明らかになった<sup>16)</sup>。そしてこれらの薬剤が低下した EDR を改善することより、インスリン抵抗性の出現から糖尿病発症に至る過程における、NO/内皮機能の役割が注目されるようになった。インスリンによるグルコース取り込みの 40% が血流依存性であり、NO/内皮機能の低下は、インスリンによるグルコース取り込みの障害をもたらすと考えられる<sup>17)</sup>。また、動物実験にて、NO 合成酵素阻害薬である L-NMMA の長期投与によりインスリン抵抗性が出現することや、内皮型 NO 合成酵素の遺伝子欠損マウスでも、インスリン抵抗性が存在することが報告されている<sup>18)</sup>。

このように、インスリン抵抗性を基盤とするメタボリックシンドロームは内皮機能を障害し、一方、内皮機能障害は更にインスリン抵抗性を増強させるという一種の悪循環が存在すると想

定される。

#### 4. メタボリックシンドロームにおける内皮機能障害の改善

冠動脈の内皮機能障害の程度が高度の患者では、軽度の患者に比べ、その後の心血管イベントの発症が多いというプロスペクティブ研究からも明らかのように、内皮機能の障害は、血管病、特に動脈硬化の発症・進展に深く関与する。そして当然なことであるが、メタボリックシンドロームにおける、動脈硬化の進展、心血管イベントの発症においても、内皮機能の低下・障害が重要な役割を果たす。それゆえに内皮機能障害の改善を目指した治療戦略が重要となる。

メタボリックシンドロームの発症は生活習慣と深く関係しているため、生活習慣を改善することが重要であるが、生活習慣への介入により、高血圧、糖尿病、脂質代謝異常が改善することが内皮機能の改善に結びつくことはもとより、肥満の改善もまた独自に内皮機能の改善に関与する可能性も指摘されている。

ACE 阻害薬やアンジオテンシン受容体拮抗薬は、高血圧、心不全、高脂血症などの種々の病態における減弱した EDR を改善し、内皮保護に働く。これらの薬剤は、メタボリックシンドロームにおいても同様に、内皮保護に働くことが明らかになっている<sup>19)</sup>。更に、これらの薬剤はインスリン抵抗性を改善することも報告されている。このことは、メタボリックシンドロームにおける内皮機能障害、そしてインスリン抵抗性そのものにも、アンジオテンシン II およびアンジオテンシン II により産生されるスーパーオキシドが関与していることを示唆する。一方、インスリン抵抗性を改善する薬剤が、メタボリックシンドロームにおいて、内皮保護に働くことが判明しつつある。なかでも PPAR $\gamma$  アゴニストであるチアゾリジン誘導体は、メタボリックシンドロームにおいて血中のアディポネクチン濃度を増加させ、一方 TNF $\alpha$  濃度は低下させる。更に、内皮細胞には PPAR $\gamma$  が発現しており、その刺激により eNOS 発現の増加、

eNOSの活性化が生じることも明らかになっている。チアゾリジン誘導体は糖代謝改善作用に加えてこのような多彩な作用により、内皮機能を改善する。またメトホルミンも、インスリン抵抗性を改善するとともに前腕の抵抗血管における内皮機能の改善を伴うことが報告されている。

### おわりに

このように、メタボリックシンドロームにお

いて亢進した酸化ストレスや、あるいは内皮細胞自身のインスリン抵抗性によって内皮障害がもたらされるが、内皮障害の存在がまた、メタボリックシンドロームの病態を悪化させ、その最大合併症である動脈硬化病変の進展へと結びつける。メタボリックシンドロームの治療においては、内皮障害防止の観点に立った治療戦略が重要と考えられる。

### 参考文献

- 1) Fornoni A, Raji L: Metabolic syndrome and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep* 7: 88-95, 2005.
- 2) de Jongh RT, et al: Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated microangiopathy, hypertension, and insulin resistance. *Circulation* 109: 2529-2535, 2004.
- 3) Steinberg HO, et al: Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest* 97: 2601-2610, 1996.
- 4) Lteif AA, et al: Obesity, insulin resistance, and the metabolic syndrome: determinant of endothelial dysfunction in whites and blacks. *Circulation* 112: 32-38, 2005.
- 5) Kawashima S, Yokoyama M: Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 998-1005, 2004.
- 6) Cai S, et al: Endothelial nitric oxide synthase dysfunction in diabetic mice: importance of tetrahydrobiopterin in eNOS dimerisation. *Diabetologia* 48: 1933-1940, 2005.
- 7) Perticone F, et al: Obesity and body fat distribution induce endothelial dysfunction by oxidative stress: protective effect of vitamin C. *Diabetes* 50: 159-165, 2001.
- 8) Montagnani M, et al: Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of  $Ca^{2+}$  but requires phosphorylation by Akt at Ser(1179). *J Biol Chem* 276: 30392-30398, 2001.
- 9) Joseph LJ, et al: Body fat distribution and flow-mediated endothelium-dependent vasodilation in older men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26: 663-669, 2002.
- 10) Chen H, et al: Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 278: 45021-45026, 2003.
- 11) Moller DE, Kaufman KD: Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med* 56: 45-62, 2005.
- 12) Branen L, et al: Inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 2137-2142, 2004.
- 13) Zeiher AM, et al: Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 76: 980-986, 1995.
- 14) Shimomura I, et al: Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med* 2: 800-803, 1996.
- 15) Yusuf S, 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* 342: 145-153, 2000.
- 16) Abuissa H, et al: Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 46: 821-826, 2005.
- 17) Mather K, et al: Evidence for physiological coupling of insulin-mediated glucose metabolism and limb blood flow. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E1264-1270, 2000.
- 18) Shankar RR, et al: Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase

# 血管内皮機能検査

The ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation

高谷 具史 Tomofumi Takaya ・ 川嶋 成乃亮\* Seinosuke Kawashima

大阪府済生会中津病院循環器内科  
大阪府済生会中津病院副院長\* / 総合診療内科部長\*

## Summary

血管内皮細胞は一酸化窒素(nitric oxide ; NO)などを産生することで血管構造を保持し、抗動脈硬化的に機能する。動脈硬化の危険因子の影響で血管内皮細胞が障害されると、NOなどの血管保護因子の作用が減弱し、動脈硬化は促進する。血管内皮機能の不全状態の判定には内皮依存性血管拡張反応(endothelium dependent relaxation ; EDR)を用いた検討が一般的で、なかでも上腕動脈の血流依存性の血管拡張反応(flow-mediated vasodilation ; FMD)を観察する方法は非侵襲的であり、ある程度全身の血管の内皮機能を表すと考えられる。EDR(FMD)の測定は、動脈硬化の初期段階での評価、薬剤の効果および生命予後への影響を評価できる可能性がある。そのため、より広く臨床の場で用いられるべきであると考えられるが、この測定系は検査施行者の能力に依存する点が大きく、より正確かつ簡便な測定装置の開発ならびに測定方法の標準化が必要である。

## Key words

- 動脈硬化
- 内皮機能
- 内皮依存性血管拡張反応
- 血流依存性血管拡張反応
- 血管超音波

## はじめに

血管内皮細胞は血管の最内側を一層で構成しており、血管の恒常性を維持する役割を果たしている。血管内皮細胞からは一酸化窒素(nitric oxide ; NO)が産生されるが、NOは多彩な血管保護的作用によって血管構造を保持し、抗動脈硬化的に作用している。さまざまな動脈硬化の危険因子の影響で血管内皮細胞が傷害されると、NOをはじめとした血管保護因子の作用が減弱し、動脈硬化が促進すると考えられている。この血管内皮機能の不全状態の程度を判定することは、動脈硬化の初期段階での評価、薬剤の血管内皮機能や動脈硬化に対する効果および薬剤の生命予後への影響を評価できる可能性があると報告され、注目が集まっている。本稿ではヒトにおける血管内皮機能の具体的な測定方法を示し、血管内皮機能と動脈硬化の危険因子や生命予後との関連などについてのこれまでの報告をまとめ、臨床の場におけるその測定意義などについて述べる。

## 1 血管内皮機能とNO

血管は外膜、中膜、内膜からなる三層構造で成り立っているが、そのうちの内膜を構成している血管内皮細胞は、血管構造の中で最も内側に存在し、一層の列を形成して絶えず循環している血流と接し隔壁として作用している。血管内皮細胞はあらゆる血管に存在しており、ある意味では体内で最大の臓器器官であるともいえる。また、さまざまな生理活性物質を産生、分泌することができるという内分泌臓器としての一面も持っているが、この作用により血管の機能や恒常性を保つ作用がある。さらには流血中のさまざまな因子の影響から血管を保護している。この血管の恒常性を保つ役割を担っているのがNO、プロスタグランジン、内皮由来過分極因子などである。なかでもNOは、アセチルコリンやブラジキニン、インスリンなどの化学的な刺激やずり応力などの物理的な刺激によって内皮型NO合成酵素(eNOS)から産生され、近傍の血管平滑筋に作用して内皮依存性血管拡張反応(endothelium-dependent relaxation; EDR)が生じる。すなわち、血管内皮細胞から生成されたNOが拡散により近傍の血管平滑筋に達し、可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化してcGMPを上昇させることにより、細胞内カルシウム濃度を減少させる。その結果、血管が弛緩・拡張するのである。NOは血管拡張作用以外にも、血小板凝集抑制、血管平滑筋細胞増殖抑制、スーパーオキシドの消去、接着因子の発現抑制や細胞接着の抑制などさまざまな作用をもっており、血管の恒常性を保ち抗動脈硬化的に作用することが知られている<sup>1)</sup>。

生体においてNOによるこのEDRを主に調節しているのは、血流によるずり応力である。ずり応力が急速に変化する場合には、その増加によりカルシウムactivatedカリウムチャンネルが内皮細胞の過分極をきたし、カルシウムを細胞内に流入させることでeNOSが活性化される。一方、ずり応力の慢性的な増加は、カルシウム非依存性にAkt/PKBを介したeNOSのリン酸化により、その活性化をもたらすことが明らかにされている。

## 2 血管内皮機能と動脈硬化

高脂血症、高血圧症、糖尿病、喫煙などさまざまな動脈硬化の危険因子の影響によって血管内皮細胞が傷害を受けると血管内皮機能は低下するため、それを調べることで動脈硬化病変の進展を初期の段階から把握できる。実際、冠動脈のEDRが冠動脈疾患やその危険因子と相関があるという報告がなされて<sup>2)</sup>。一方で、冠動脈のEDRが上腕動脈のEDRと強い相関があるということも報告されている<sup>3)</sup>。eNOSにより産生されるNOが上述のようにさまざまな動脈硬化病変形成に関連する要素を抑制する一方で、eNOSは基質であるL-アルギニンや補酵素であるBH4が不足する状況下ではアンカップリングをきたし、NOよりもむしろスーパーオキシドを産生することが知られている<sup>4)</sup>。血管内皮細胞でスーパーオキシドが産生されると、LDLの酸化が促進して動脈硬化病変形成は促進する。さらに、NOはスーパーオキシドと反応するとパーオキシナイトライトとなるが、このラジカルとしての作用はスーパーオキシドよりも強力であることが知られている。血管内皮機能不全をきたしてNOの作用が低下した血管においては血管の恒常性の維持が困難となり、動脈硬化は促進していくものと考えられている<sup>5)</sup>。

## 3 血管内皮機能の評価方法

血管内皮機能の評価方法として、これまでにさまざまな方法が報告されている。最も簡便なのは血中に存在するさまざまな物質(因子)を測定することにより、血管内皮障害の有無、あるいはその程度を判定することである。現在までに、内皮特異的な凝固因子であるvon Willebrand factor、あるいは可溶性の接着因子マーカー(ICAM-1, VCAM-1)、流血中の内皮細胞由来のmicroparticleなどの測定が有用であると報告されている。また、われわれは最近になりeNOSの補酵素であるBH4の酸化の状態が血管内皮機能障害の程度を反映することを見出している<sup>6)</sup>。ただ、これらの因子の測定により血管内皮機能障害を推定することは可能であるが、その正常値や、どの値で血管内皮機能障害の有無を判定すればよいかに関しては、基準値があるわ



けではなく一般化していないのが現状である。

これに対し、血管のEDRを測定することでその内皮機能を評価する方法は20年も前から広く行われており、現在血管内皮機能を判定する手法のゴールドスタンダードとなっている。われわれも、後述の上腕動脈における血流依存性血管拡張反応 (flow-mediated vasodilation; FMD) の程度が血中のBH4とその酸化物BH2との比 (BH4/BH2比) とよく相関することから、血中BH4/BH2比が血管内皮機能障害を示すマーカーになりうると考えている (図1)。

ヒトにおけるEDRを用いた血管内皮機能の判定は、まず1986年にLudmerらが冠動脈疾患の患者の冠動脈において、血管内皮機能が低下していることを証明したことに始まる<sup>6)</sup>。これは健常血管ではアセチルコリン投与にて拡張反応を呈するが、内皮障害をきたした血管においてはかえって収縮反応を呈するという現象を用いたものである。この報告以来、EDRの測定は薬剤を直接血管内に投与する方法が用いられてきた。冠動脈を例にとると、カテーテルを用いてアセチルコリン、サブスタンスP、セロトニンなどを冠動脈内に投与し、冠動脈の血管径を血管造影の所見から計測することで、太い血管レベルでのEDRの測定を行うことができる。この血管径の測定にはコンピューターが用いられ、定量化が可能である。細い血管レベルでの検討としては、カテ先ドブラ血流計を用いて薬剤による

冠血流量の変化を測定することにより、冠動脈抵抗血管レベルでのEDRが測定できる。その後、次項で述べるような薬剤による血管反応を観察する代わりに、血流増加に伴う太い血管レベルでの血管拡張反応を観察する方法が一般化してきた<sup>7)</sup>。FMDは、血流増加に伴うずり応力の増大によりeNOSからNOが産生されて生じる現象であり、非侵襲的であるため繰り返し行うことが可能であるという利点がある。

#### 4 ヒトにおける血管内皮機能の測定方法

FMDを用いた血管内皮機能の測定は、その簡便さから上腕動脈での検討が広く行われている。上腕動脈における内皮機能障害の程度は、全身の血管の内皮機能障害をある程度反映しているものと考えられ、実際冠動脈のEDRの測定による障害の程度と上腕動脈のEDRの測定による障害の程度とが相関するという報告がある<sup>8)</sup>。このことは、血管内皮機能障害をきたす要因が血管局所の要因というよりむしろ全身性の要因により規定されているということを表すものと理解される。

前腕を含めた末梢の抵抗血管のEDRの測定としては血管内ドブラ法を用いる方法もあるが侵襲的であるため、よく用いられるのはプレチスモグラフィによる方法である。すなわち、ストレインゲージを使って前腕の容積変化を調べ、これで抵抗血管の血流の増加を検討する方法である。この方法については本稿では詳細を省略し、上腕動脈、すなわち太い血管(導管)での血管内皮機能の評価方法について述べる。詳しくはCorrettiらのガイドラインを参照いただきたい<sup>9)</sup>。

FMDは周囲の温度や交感神経系、食事や薬剤といったものの影響を大変受けやすいので早朝の検査施行が望ましいとされている。準備段階として検査の8時間前より絶食、4～6時間前からは禁煙しておき、カフェインや抗酸化剤の摂取も控えておく。可能であれば、血管拡張薬も薬剤の半減期の4倍の期間中止しておく。検査は温度が一定に調節された静かな部屋で、15分程度の安静臥床の後に開始する。使用する超音波装置のプロブとしては7 MHz以上の周波数をもつニア型が推奨されていて、測定時には心電図を同期して

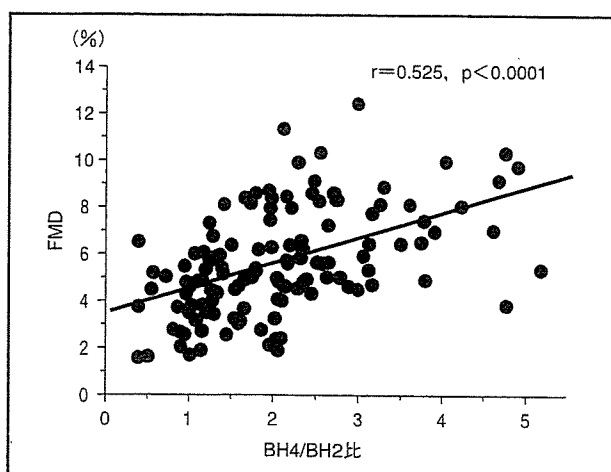


図1 血中BH4/BH2比とFMDとの相関

記録できる装置が望ましい。可能であればビデオで記録しておく(図2)。

最初にヒトの上腕動脈にエコーを当てて動脈の血管径を測定する。部位としては前壁、後壁ともはっきり描出が可能な血管を選ぶことが重要である。次に血圧測定用のカフを前腕(あるいは上腕)に巻いて(これについては前腕のほうがより有用であるという報告もある)、250mmHg(あるいは収縮期血圧+30~50mmHg程度)までカフを膨らませて5分間そのまま駆血を続ける。続いてその駆血を急速に解除すると、血流の再開に伴ってずり応力による反応性充血という血流量の増加が起こり、続いてFMDが起こるので、解除の15秒後に反応性充血に基づく最大血流速度と血管径を求めて血流増加量を測定する。

次に解除の45秒後から、マーキングしておいた同じ場所で、心電図を同期させておいたうえでエコーを用いて最大拡張血管径を拡張末期に合わせて3秒おきに測定し、最大拡張をきたしているタイミングの血管径を評価する。その2回の血管径の測定値の変化量を、FMDの指標とする。安静時の血管径に対する駆血を解除した後の血管径増加率を%FMDとして評価するが、この際の血管の拡張度が血管内皮機能を反映するとされている。健康な正常人における%FMDは7~10%程度であり、一方で冠動脈疾患の患者などではこれが0~5%にまで低下しているという報告が多い。

さらにFMDによる測定の対照として、狭心症治療薬であるニトログリセリン300mgの舌下投与による内皮



図2 実際のFMDの測定風景

非依存性血管拡張反応も調べる必要がある。これは内皮非依存性に血管拡張反応を示す血管平滑筋の機能を反映していて、血管拡張反応の最大値を測定するために行う。最初のFMDの計測が終了してから少なくとも10分は間隔をあけて検査を行う。ニトログリセリンの舌下投与後3~4分後に最大血管拡張が起こるので、その前後においてFMDの測定と同様に継続的に血管径などを計測する。

上腕動脈を用いた血管内皮機能検査は次の項で述べるようなさまざまな情報をもたらすにもかかわらず、これまでその利用は限られてきた。それは、このような手動の方法では同じ部位で血管を確保することが困難であり、計測精度や再現性のためには熟練した検査者による施行が必要であったことが関係する。最近になり、この問題を解決すべく半自動追尾型でリアルタイムに血管径をモニタリングできる装置(UNEXEF18G:ユニクス製)が発売された(図3)。この装置には探触子が固定されており、その結果、上に述べたような手動によるブレが少なく、またリアルタイムで最大血管径がモニターできる利点を有しており、今後利用が広まっていくことと考えられる。

## 5 血管内皮機能と危険因子

これまでに血管内皮機能とさまざまな動脈硬化の危険因子との関係についての検証が施行されている。具体的には高脂血症、高血圧症、糖尿病、喫煙などについて血管内皮機能との相関が報告されている。そのほかにも加齢や性差、性周期などと血管内皮機能との関連を示した報告もある<sup>10)</sup>。それぞれの危険因子をもつ患者におけるEDRの低下の存在は、動脈硬化の初期段階を示すものであると考えられている。また、これらの動脈硬化の危険因子が多いほど、EDRが低下することも明らかになっている。さらに、最近メタボリックシンドロームが動脈硬化の発症・進展に及ぼす役割が注目されているが、メタボリックシンドロームの患者においても著明にEDRが低下しており、さらにその中核をなす肥満においてもEDRが低下することが報告されている<sup>11)</sup>。

一方、これらの危険因子は一般的に酸化ストレスを

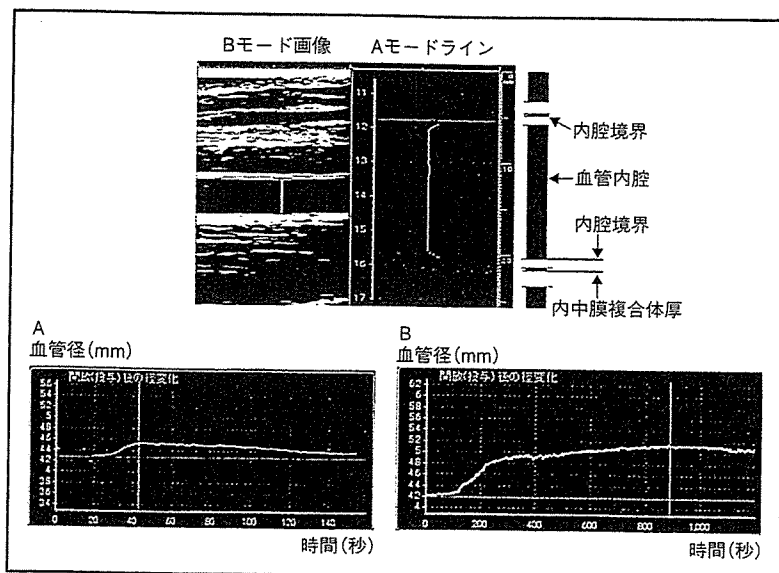


図3 ユネクス製UNEXEF18Gを用いたリアルタイムの血管径変化の測定  
 上段：上腕動脈のBモード画像とAモードラインによって得られた超音波反射鏡面との関係。  
 下段：本装置により得られた5分間前腕駆血後(A)，ならびにニトログリセリン舌下投与後(B)の血管径の経時的変化の1例。

増強する因子であり、EDRは血管における酸化ストレス産生の程度を示す指標と見なすこともできる。また、動脈硬化が血管の慢性炎症によってもたらされるという観点からは、血管内皮機能障害はこれら危険因子による血管の炎症の結果生じたものとも理解でき、実際に血中CRP値とEDRが相関するといった報告も散見される<sup>12)</sup>。

## 6 臨床において 血管内皮機能を測定する意義

このように臨床において血管内皮機能を測定する意義は何であろうか？ 動脈硬化の発症には血管内皮機能障害が必須と考えられることから、すでに述べたように血管内皮機能障害の有無を判定することは、動脈硬化の初期段階を見出すことになると考えられる。動脈硬化の発症・進展における血管内皮機能障害の重要性を示唆する所見として、冠動脈におけるEDRの障害の程度が、その後の心筋梗塞や不安定狭心症などの冠動脈イベント発症に深く関係するという報告がなされている。Halcoxらは7年間の追跡調査により、初回解析時の冠動脈病変の有無にかかわらず、冠動脈抵抗血管におけるアセチルコリン投与時のEDRが、その後の心血管イベント発症の予知因子となりうることを報告

した<sup>13)</sup>。当初は冠動脈での検討であったものがその後、上腕動脈におけるEDR、特にFMDが冠動脈イベント、さらには脳血管障害を含んだ心血管イベントの予知因子となることも報告された。これらの結果は、血管内皮機能障害を判定することがその後の冠動脈イベントや脳血管障害の発症の予知に重要であることを示すとともに、血管内皮機能障害を治療することが動脈硬化の発症・進展ならびに心血管イベントの発症を抑制するとの考え方を導く。実際に、冠動脈造影において有意な狭窄病変を示さない冠動脈の局所の経時的観察において、アセチルコリン投与により血管が拡張せずに収縮した部位、すなわち血管内皮機能が傷害されEDRが低下している部位では、その後の追跡冠動脈造影で基質的狭窄病変が出現したとの報告もなされている<sup>14)</sup>。

また、現在までにさまざまな薬剤の投与が血管内皮機能を改善することが報告されている。その代表が、高脂血症治療薬のスタチン、あるいは高血圧症治療薬であるアンジオテンシン変換酵素阻害薬であり、これらはいずれも心血管イベントの発症を抑制することが判明している<sup>15)</sup>。これらの結果より、動脈硬化の初期段階である血管内皮障害を改善することが、動脈硬化の発症・進展を抑制するのではないかと解釈することができる。しかしながら注意すべきことは、これはあくまで結果をみているにすぎないかもしれないという

点である。すなわち、危険因子をはじめとした動脈硬化の発症・進展に関係するさまざまな要因をこれらの薬剤が抑制し、動脈硬化の進展が抑えられた結果、血管内皮機能が改善したのかもしれないという疑問が常に残る。血管内皮障害の改善と、心血管イベントの減少との相関を前向きで検討する研究が待たれるところである。

## まとめ

関連性や、非侵襲的に血管内皮機能を検査する方法に関して概説した。もちろんNOを介しているこの系がすべての血管内皮機能を代表しているわけではなく、あくまで指標であるにすぎないことは理解しておかなければならない。頸動脈エコー検査における内膜中膜複合体径や脈波伝導速度などと並んで、非侵襲的に動脈硬化の状態を検査することができるFMDの測定は、冠動脈イベント発症の危険性をスクリーニングするのに有用で、その生命予後の把握にも転用できる可能性があることが明らかとなっている。それゆえ、EDR、特にFMD測定のより広い臨床への応用が期待されるが、検査担当者の能力に依存する点が大きという問題点が残っている。そのため、より簡便で偏差、誤差の少ない測定法の開発が重要である。本稿で紹介したようなFMDの半自動追尾型測定装置の使用はその解決の一助となるであろうし、一方、手動で行う場合はもちろんのこと、測定方法の標準化が必要と考えられる。

## 文献

- 1) Lloyd-Jones DM, Bloch KD : The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annu Rev Med* **47** : 365-375, 1996
- 2) Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, et al : Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* **81** : 491-497, 1990
- 3) Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, et al : Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* **26** : 1235-1241, 1995
- 4) Landmesser U, Dikalov S, Price SR, et al : Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* **111** : 1201-1209, 2003
- 5) Kawashima S, Yokoyama M : Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24** : 998-1005, 2004
- 6) Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, et al : Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* **315** : 1046-1051, 1986
- 7) Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, et al : Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* **340** : 1111-1115, 1992
- 8) Kuvin JT, Patel AR, Sliney KA, et al : Peripheral vascular endothelial function testing as a noninvasive indicator of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* **38** : 1843-1849, 2001
- 9) Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al : Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery ; a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* **39** : 257-265, 2000
- 10) 宮本宣友, 松田康章, 川嶋成乃亮 : 血管内皮機能検査. *臨検* **48** : 1453-1458, 2004
- 11) 川嶋成乃亮 : メタボリックシンドロームにおける血管内皮機能. *内分泌糖尿病* **21** : 427-433, 2005
- 12) Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, et al : Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* **102** : 1000-1006, 2000
- 13) Halcox JP, Schenke WH, Zalos G, et al : Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction. *Circulation* **106** : 653-658, 2002
- 14) Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM : Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* **101** : 1899-1906, 2000
- 15) 川嶋成乃亮, 力武良行, 井上信孝, 他 : 内皮細胞機能を視野に入れた動脈硬化の治療. *動脈硬化* **27** : 287-291, 2000