

論文の内容の要旨

論文題目：動脈硬化における活性酸素種産生を介した **Angiotensin II**
と **Tumor necrosis factor- α** の相互作用に関する検討

指導教官：永井 良三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成14年4月入学

医学博士課程 内科学専攻

氏名：高橋 政夫

背景及び目的

動脈硬化の進展には様々な因子が関与し、それらが複雑に絡み合いながら進展する。**renin-angiotensin system (RAS)**は動脈硬化や血管形成術後の再狭窄などの成因において重要な役割を演じていることは広く知られている。特に血管機能における様々な過程でのシグナル伝達として重要な位置を占めている。動物での血管傷害モデルで、**angiotensin-converting enzyme (ACE)**阻害剤は新生内膜形成を有意に抑制するとの多くの報告がある。これらは、**RAS**は新生内膜形成で重要な位置をしめていることを示唆している。

しかし、ヒトにおいて**ACE**阻害剤は血管形成術後の新生内膜形成を十分に抑制できなかったとの報告もある。これらの報告によると**RAS**を抑制することで、新生内膜形成抑制において必ずしも十分な効果が得られないことが言える。こ

の原因として、サイトカインなどの因子によっても新生内膜増殖が進み、そのため **RAS** 単独抑制が十分な抗動脈硬化作用をもたらさない可能性が考えられる。サイトカインである **tumor necrosis factor- α** (**TNF- α**) は動脈硬化などの進展に寄与し、血管再狭窄部位によく発現していることも示されている。それゆえ **TNF- α** は **RAS** 同様に新生内膜の形成のシグナル伝達において重要な役割を演じていると考えられる。本研究では **TNF- α** に注目し、**RAS** および **TNF- α** を抑制することで新生内膜形成を十分に抑制できるかを検討した。

RAS のシグナル伝達において、活性酸素種 (**reactive oxygen species ; ROS**) の産生は重要な位置を占めている。**ROS** は酸化ストレスを通して、血管機能障害と **remodeling** に寄与し、動脈硬化を促進する。

ROS を産生する経路は様々に存在し、特に血管炎症に関連している酵素は **vascular NADPH oxidase** がよく知られている。その他にも **mitochondrial respiratory chain** などがあり、**Mitochondrial system** での **ROS** 産生は、アポトーシスに関連しているとされている。

新生内膜の形成や血管炎症において **monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)** は重要な位置を占めている。**MCP-1** は血管壁に単球やマクロファージの浸潤を促し、血管形成術後の再狭窄などにおいて関与することが報告されている。

血管炎症において **MCP-1** は重要な因子であるため、本研究では **MCP-1** の発現を一つの指標として、どのように **RAS** と **TNF- α** による炎症が促進するかを特

に ROS の関与を中心に検討した。

研究方法

6週令オス Wistar ラット胸部大動脈より採取した平滑筋細胞 (rVSMCs) に、**angiotensin II(Ang II)**と **TNF- α** で刺激し、細胞内 ROS 産生を蛍光プローブである **DCFH-DA** にて測定した。ROS 阻害剤である **N-acetylcystein (NAC)**、**NADPH** 阻害剤である **apocynin**、そして **mitochondrial respiratory chain** 阻害剤の **rotenone** の効果を、ROS 産生において検討した。また同様の条件で、**MCP-1** と **GAPDH** の発現を **real time PCR** 法により解析した。**Ang II** と **TNF- α** による **MCP-1** の発現において、**angiotensin II type 1** 受容体の拮抗薬である **valsartan (Val)** と **TNF- α receptor** に対する **dominant negative mutant** を発現する **adenovirus(AdTNFR Δ C)**の効果も検討した。

内因性 **Ang II** 及び **TNF- α** の作用を検討するため、**Wistar** ラットの大腿動脈に **wire** 傷害を施行し、内因性 **Ang II** を抑制するため **Val** を投与した。また、**TNF- α** のシグナルを抑制するため、**AdTNFR Δ C** を感染させた。対照群として **GFP** を発現する **adenovirus (AdGFP)** の感染も行った。これら的大腿動脈傷害モデルは 3 日後に **MCP-1** の発現を **real time PCR** で評価し、14 日後には組織学的検討を行い、マクロファージの浸潤は **ED-1** 染色にて検討した。

実験結果

rVSMCs での **Ang II** と **TNF- α** による **MCP-1** の発現の影響

Ang II は用量依存的に **MCP-1** の発現を促進し、**Ang II** 投与下 (10^{-7} mol/L) で

の MCP-1 の発現は Val 前投与にて抑制された。TNF- α も同様に MCP-1 発現を用量依存的に促進し、TNF- α (10 ng/ml) による MCP-1 の発現は AdTNFR Δ C を感染させておくとき有意に抑制された。低濃度の Ang II (10^{-9} mol/L) と TNF- α (10 ng/ml) 同時投与すると MCP-1 の発現は、TNF- α (10 ng/ml) 単独投与と比較して著しく増加を認めた。さらに Ang II (10^{-7} mol/L) による MCP-1 発現は、低濃度の TNF- α (0.1 ng/ml) 前投与により、Ang II 単独投与と比べ著明に増強された。

rVSMCs での Ang II と TNF- α による MCP-1 発現における ROS 阻害剤の効果

NAC (500 μ mol/L) を前投与した上で Ang II と TNF- α による MCP-1 発現は有意に抑制されたが、その抑制の程度は control と同等までは抑制しなかった。また apocynin (30 μ mol/L) あるいは、rotenone (10 μ mol/L) をそれぞれ前投与すると有意に Ang II と TNF- α による MCP-1 発現を抑制した。そしてこの apocynin と rotenone を同時に投与すると、NAC 前投与と同程度に MCP-1 発現を抑制した。

rVSMCs での Ang II と TNF- α による ROS 産生における ROS 阻害剤の効果

rVSMCs において Ang II と TNF- α はそれぞれ単独で ROS 産生を増加させ、Ang II と TNF- α 同時刺激を行うと、ROS 産生は単独刺激より強く誘発された。apocynin と rotenone をそれぞれ別に前投与しておくとき、Ang II と TNF- α による

ROS 産生を抑制した。NAC 前投与も ROS 産生を抑制し、無刺激の control 群とほぼ同等の ROS 産生にまで低下した。rVSMCs に apocynin と rotenone を同時に前投与すると、ROS の産生は NAC と同程度に抑制された。

動脈傷害モデルでの新生内膜形成とマクロファージ浸潤、及び MCP-1 の発現に対する内因性 Ang II と TNF- α 抑制の効果

大腿動脈傷害モデルにおける新生内膜の形成及びマクロファージの浸潤は control に比較して、Val 投与(3mg/kg/day)で有意に抑制された。AdGFP 感染は control 群と比較して有意な差は認めなかったが、AdTNFR Δ C 感染では新生内膜の形成、及びマクロファージの浸潤は有意に抑制された。Val 投与と AdTNFR Δ C 感染を同ラットに行うと、新生内膜形成及びマクロファージの浸潤はより著明に抑制された。NAC 投与(200mg/kg/day)も同様に有意に抑制された。ラットの血圧はいずれも血圧に有意な差は認められなかった。大腿動脈の MCP-1 の発現は、control と比べ Val 投与、NAC 投与で有意に抑制された。また、AdTNFR Δ C 感染は MCP-1 の発現において有意な抑制を認めた。また、val 投与と AdTNFR Δ C 感染を同ラットに行うと、MCP-1 の発現は単独投与、または感染に比べ有意に低下した。

考察

動脈硬化の進展や血管形成術後の再狭窄などの病因において、RAS は中心的な位置を占めているが、RAS 単独抑制では、血管形成術後の再狭窄などの十分な抑制が得られないとの報告が多い。我々は、rVSMCs において Ang II と TNF- α

は、協調的に ROS 産生と MCP-1 の発現を促すことを確認した。MCP-1 発現誘導には ROS を介する可能性が示唆された。

本研究では Ang II と TNF- α による MCP-1 発現において ROS はその経路に関与し、NADPH oxidase と mitochondrial respiratory chain は Ang II と TNF- α 刺激による ROS 産生の主要な source であると考えられた。

今回使用した濃度での NAC 前投与は、ほぼ無刺激な状態の ROS 産生まで抑制したが、MCP-1 発現に関しては無刺激な状態にまでは抑制しなかった。これらの結果より、MCP-1 発現における Ang II と TNF- α の協調的な作用には ROS 以外の細胞内伝達経路が存在することが示唆された。

大腿動脈の wire 傷害での新生内膜形成とマクロファージの浸潤、及び MCP-1 の発現は、NAC 前投与により抑制され、この結果は新生内膜の形成において、ROS が関与している報告と合致している。Ang II と TNF- α の両者の抑制では単独抑制と比べ有意に MCP-1 の発現が軽減された。以上より内因性の Ang II と TNF- α は血管炎症を協調的に増強し、少なくとも一部は ROS 産生、MCP-1 の発現そしてマクロファージの浸潤を介していることが考察された。

RAS を抑制することは血管炎症を抑えることにおいて重要であるが、さらに心血管イベントの罹患率や死亡率を減少させるためには、一つの選択肢として抗炎症サイトカイン療法が重要であると考えられた。

結論

Ang II と TNF- α は、少なくとも一部は ROS 産生と MCP-1 の発現を介して血管炎症を促進する。Ang II、TNF- α 単独での作用に比べ、両者の存在では相乗的

に作用し、血管炎症を協調的に促進する。