

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 20日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390243

研究課題名（和文） レドックスによる血管内皮細胞機能制御に関する研究

研究課題名（英文） Redox-mediated regulation of endothelial function

研究代表者

吾郷 哲朗（AGO TETSURO）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30514202

研究成果の概要（和文）：200文字

心血管病の発生や進展に活性酸素種は重要な役割を果たす。今回、血管内皮細胞に発現する活性酸素種産生酵素 Nox4 に注目した検討を行った。Nox4 は正常成人個体でその発現は抑制されるが、虚血組織細小血管において高度に誘導され、低酸素応答を増強させるとともに、血管新生・炎症誘導分子の産生を増加させた。Nox4 の生理的役割は血管新生誘導作用と考えられるが、急激な Nox4 誘導により脳虚血など特定の病態下では不利に働く場合があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Reactive oxygen species (ROS) play an important role in the development and progression of cardiovascular diseases. In the present study, we focused on the ROS-producing enzyme Nox4 expressed in endothelial cells. While the expression of Nox4 was suppressed under normal conditions, it was highly induced in micro-vessels in ischemic tissues, reinforced hypoxic responses, and increased the production of angiogenic and inflammatory molecules. The physiological role of Nox4 may be angiogenesis; however, the angiogenic responses induced by rapid induction of Nox4 may rather worsen the disease state under particular conditions, such as brain ischemia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2012年度	2,900,000	870,000	3,770,000
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：酸化ストレス，レドックス，Nox4，NADPH oxidase，内皮細胞，脳虚血，血管新生，ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管壁における酸化ストレスの亢進(抗酸化タンパク質の作用に対する活性酸素種産生の相対的増加)は、脳梗塞、心筋梗塞など、動脈硬化性・虚血性疾患の発症に関与す

ることが知られている。

(2) 活性酸素種はATP産生の副産物としてミトコンドリアから受動的に産生されると長らく考えられてきたが、活性酸素種産生を能

動的に行う 7 つの NADPH oxidase ファミリー・タンパク質 (Nox1-Nox5, Duox1, 2) が 2000 年以降に同定され、種々の病態で様々な役割を果たしている可能性が示唆されるようになった。

(3) 血管内皮細胞は血管壁内面を覆う一層の細胞集団であるが、内皮細胞より産生される活性酸素種は、動脈硬化の発生・進展において特に重要であると考えられてきた。我々は、NADPH oxidase タンパク質の一つである Nox4 が血管内皮細胞に発現し、活性酸素種の重要な産生源であることを世界で最初に報告した (Ago et al. Circulation 2004)。

(4) 血管内皮細胞における Nox4 に関する研究は細胞実験に限定され、動物を用いた研究はほとんど報告されていなかった。故に、個体における Nox4 の生理的・病的意義は不明のままであった。

(5) 血管内皮細胞において、Nox4 により産生される活性酸素種が、一酸化窒素 (NO) 消去作用以外にどのような作用を有しているのか、全く不明であった。

2. 研究の目的

(1) Nox4 を介した活性酸素種産生量は、その発現量によって制御されることから、Nox4 の発現がどのように制御されているか、培養環境下および個体内各々で明らかにする。

(2) Nox4 の生体内における生理的・病的意義を明らかにする。

(3) Nox4 によって酸化還元 (レドックス) 制御され、細胞機能において重要な役割を果たすタンパク質群を同定する。

3. 研究の方法

(1) 細胞の培養

ヒト培養脳微小血管内皮細胞 (Cell Systems Corporation) を購入し、通常培養ならびに低酸素下 (1% O₂) での培養を行った。

(2) アデノウイルスを用いてヒト Nox4 を脳微小血管内皮細胞に過剰発現させ、細胞内シグナル伝達の変化やタンパク質の発現変化について、定量 PCR や Western blot (WB) により検討した。また、DNA microarray を行うことにより遺伝子発現変化を網羅的に解析した。また、タンパク質の細胞内局在については、免疫細胞染色を行い評価した。

(3) Tie2 プロモーターを用いて、血管内皮細

胞特異的ヒト Nox4 過剰発現マウス (野生型 (Tg-EC-Nox4)、ならびに、そのネガティブコントロールとして活性酸素種の産生ができないアミノ酸置換 (P437H) を有する変異型 (Tg-EC-Nox4 (P437H))) を作製した。

(4) 脳における Nox4 の発現やこれに関連するタンパク質の発現変化や局在について、免疫組織染色、蛍光免疫組織染色によって評価した。また定量評価のために、ホモジネートを用いた定量 PCR や WB を行った。

(5) 脳梗塞モデルの作製

マウス脳梗塞について、二つの方法を用いて検討した。1) ローゼンベンガル色素を経静脈的に注入後、クリプトンレーザーで中大脳動脈を照射し、血液を凝固させ血管を閉塞させる中大脳動脈永久閉塞モデル (permanent MCAO (pMCAO))、2) ナイロン糸を総頸動脈より挿入後、中大脳動脈まで進めて 90 分間一過性に閉塞させる (transient MCAO (tMCAO))、虚血再還流モデル。2つのモデルを用いて、脳梗塞サイズ、BBB 破綻の程度などを評価した。免疫組織染色を行うとともに、組織ホモジネートを用いて mRNA やタンパク質の発現変化についても検討した。

(5) 下肢虚血モデルの作製

左大腿動脈・静脈を結紮し、その遠位端～膝下動脈分岐部までを切断した。右側はコントロールとした。Laser Doppler により 10, 21, 28 日目に下肢血流を測定した。

4. 研究成果

(1) Nox4 の発現調節メカニズムについて検討した。高血圧・糖尿病動物モデルにおいて血管壁 Nox4 の発現が増加することが報告されているが、培養内皮細胞に対する Angiotensin II や高血糖刺激では Nox4 の発現変化は認められなかった。我々が試した限り、Nox4 の発現を増加させた刺激は低酸素負荷 (1% O₂) のみであった。

(2) 低酸素負荷によって活性化される代表的転写因子 hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) と Nox4 の関連について検討した。siRNA を用いて HIF-1 α をノックダウンし、低酸素負荷を行ったが Nox4 の発現上昇は抑制されなかった。逆に Nox4 を過剰発現させると、HIF-1 α タンパク質が増加した。Nox4 は低酸素負荷により HIF-1 α 非依存性に発現が誘導され、HIF-1 α を安定化することが示唆された。

さらにそのメカニズムについて検討を行い、Nox4 過剰発現により HIF-1 α の分解に関与する Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 (PHD2) の発現が有意に抑制さ

れることを見いだした。

(3) Nox4 の脳微小血管内皮細胞における細胞内局在を免疫細胞染色で検討した。核周囲細胞内小器官が染色され、ミトコンドリア・マーカー(mitotracker)と共染されることから、Nox4 はミトコンドリアに局在していることが示唆された。ミトコンドリア分画を回収し、NADPH/NADH 依存性の活性酸素種産生を測定すると、Nox4 過剰発現により活性酸素種の産生は増加し、siRNA を用いて Nox4 の発現を抑制すると活性酸素種の産生は低下した。さらに、JC-1 と呼ばれる試薬を用いてミトコンドリア膜電位の観察を行うと、Nox4 過剰発現により膜電位の低下が観察され、permeability transition pore(PTP)の開口が示唆された。さらに Nox4 過剰発現により PTP 開口に関与する Cyclophilin D の発現が有意に増加することを見いだしている。

Nox4 はミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアにおける活性酸素種の産生を直接的に増加させるとともに、ミトコンドリア機能を(ミトコンドリア・タンパク質の酸化により)抑制することで、ミトコンドリアからの活性酸素種産生を間接的にも増幅させているという仮説を我々は提唱している(ROS-induced ROS release)。

(4) アデノウイルスを用いて脳微小血管内皮細胞に Nox4 を過剰発現させ、microarray を行って遺伝子発現変化を網羅的に検索した。Interleukin-1 β , Interleukin-8(炎症性サイトカイン), Angiopoietin-2(Ang-2)(周皮細胞との接着を阻害する分子), MMP-10(細胞外マトリックス分解酵素), 解糖系酵素(Phosphofruktokinase-1), 血液凝固関連分子(Tissue factor, Plasminogen activator inhibitor-1)などの分子の有意な発現増加を認めた。これらの分子の発現変化については定量 PCR で確認した。これらの分子の多くは低酸素刺激によって増加することが知られており、Nox4 による HIF-1 α 安定化のデータともよく一致した。

Nox4 を過剰発現させた細胞で WB を行うと、NF κ B のリン酸化(=活性化)が観察された。Nox4 を介したミトコンドリア PTP 開口と NF κ B 活性化に関しては、活性酸素種による炎症反応誘導の起点となっている可能性があり、大変興味深く更なる検討を行っている。

一方で、Nox4 が与える eNOS 活性への影響についてもタンパク質レベルで検討したところ、eNOS 活性化に必須な Ser-1177 リン酸化が有意に抑制されていた。さらに eNOS リン酸化の上流酵素である Akt(Ser-473)のリン酸化も有意に抑制されていた。このことは Nox4 が産生するスーパーオキシドにより一酸化窒素(NO)の bioavailability を低下させ

るだけでなく、eNOS 活性を低下させることにより NO 産生そのものを低下させている可能性を示唆している。

(5) つぎに個体における Nox4 の発現について免疫組織染色を用いて検討した。まず血管組織が豊富で、観察が比較的容易な脳を用いた。成人個体・健常状態では、脳血管壁とくに微小血管内皮細胞に Nox4 は発現していたが、その程度はかなり微弱であった。中大脳動脈閉塞モデル(pMCAO)により脳梗塞を作製すると、脳梗塞巣および脳梗塞巣周囲領域の微小血管内皮細胞および周皮細胞に Nox4 が強く発現誘導されることを確認した。脳虚血後の Nox4 の発現増加は 7 日目頃をピークに少なくとも 14 日以上持続していた。脳組織における Nox4 mRNA の発現変化を調べたところ、虚血半球特異的に Nox4 の有意な発現上昇を認めた。これらの結果は細胞実験において Nox4 が低酸素刺激によって発現増加することともよく一致していた。

(6) Tie2 プロモーターを用いて、血管内皮細胞特異的ヒト Nox4 の野生型(Tg-EC-Nox4), ならびに、ネガティブコントロールとして活性酸素種の産生ができないアミノ酸置換(P437H)変異型過剰発現マウス(Tg-EC-Nox4(P437H))を複数ラインずつ作製した。これらのマウスでは、少なくとも実験に使用した月齢(3-4ヶ月齢まで)では、体重、血圧(有意差ないがやや低下傾向)・脈拍、脳血流量などに有意な変動はなく、その他明らかな表現型変化は認めなかった。

(7) これらのマウスを用いて、pMCAO および tMCAO の両者による脳梗塞を作製した。脳梗塞発症後 1 日目の脳梗塞サイズの検討を行ったところ、どちらのモデルにおいても、Tg-EC-Nox4 で梗塞サイズは有意に増大し、Tg-EC-Nox4(P437H)では梗塞サイズはむしろ縮小傾向を示していた。Evans blue(EB)を用いて(Blood-brain barrier: BBB)の破綻を評価すると、Tg-EC-Nox4 で有意な EB の漏出増加を認めた。

(8) 脳梗塞において eNOS 活性の低下は梗塞サイズの拡大に関連することが知られている。脳・免疫染色ならびに homogenate を用いた WB にて、Tg-EC-Nox4 では、脳組織内において eNOS(Ser-1177)のリン酸化の有意な抑制(=有意な機能低下)があることを確認した。また、定量 PCR において脳梗塞巣・周囲組織における Ang-2 の有意な発現増加を認めた。Nox4 発現増加により内皮細胞より分泌増加する Ang-2 が、Ang-1 と拮抗し、脳血管内皮細胞における Akt/eNOS のリン酸化を有意に抑制するとともに、周皮細胞との相互作用を

減弱化することで、BBB を脆弱化していると考えられた。

また、血管内皮細胞から分泌される炎症性サイトカイン、細胞外マトリックス分解酵素、血液凝固因子なども、梗塞を増大させる一因となっていると考えられた。

これらの因子の発現制御に、HIF-1 α のみならず、class II HDAC(histone deacetylase)の酸化還元による細胞内局在の変化(Ago, Cell 2008)が関与している可能性についても明らかにしている。

(9) 一方、Nox4 により発現増加を認める分子群は血管新生誘導物質が多く含まれるため、これらのマウスを用いた下肢虚血モデルによる血管新生の観察を行った。day 21 以降、Nox4 過剰発現マウスで、血管新生が良好に誘導され、有意な血流の増加を認めた。我々の研究と並行して、VE-cadherin promoter を用いた内皮細胞特異的 Nox4 過剰発現マウスにおいて、Nox4 が血管新生に有利に働くことを示唆する論文が他のグループから報告された(Craige SM, Circulation 2011)。

以上の検討から、Nox4 の発現は①微小血管内皮に強く、②その発現増加は低酸素によって誘導され、③低酸素応答を増強し、④血管新生・炎症関連物質の産生を増大させることが判明した。これらのことから、Nox4 の生理的な役割は血管新生に関連したものであることが予想される。下肢虚血の動物実験モデルこれを支持する。しかしながら、脳虚血における急激な血管新生誘導はBBBの破綻をむしろ助長させることとなり、病態を悪化させる。BBB という脳組織固有の特性によるものと考えられる。一方で慢性虚血では、脳においても Nox4 の発現増加が血管新生を誘導し、有利に働く可能性があると考えられる。

血管内皮に発現する Nox4 は虚血応答・血管新生の重要な mediator であるが、成人個体への効果は、虚血の強度や時間、虚血臓器の種類などによっても左右されることが今回の研究で明らかになった。

Nox4 は、酸化ストレスと血管新生・炎症を結ぶ重要な分子であることが示唆され、本検討のような心血管病の発症・進展のみならず、がん領域でも重要な分子になると考えられ、継続的な研究が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Ago T, Kuroda J, Pain J, Fu C, Li H, Sadoshima J: Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes

apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res* 106 (7): 1253-1264, 2010 (査読有)
DOI:10.1161/CIRCRESAHA.109.213116.

- ② Ago T, Yang Y, Zhai P, Sadoshima J: Nifedipine Inhibits Cardiac Hypertrophy and Left Ventricular Dysfunction in Response to Pressure Overload. *J Cardiovasc Transl Res* 3 (4): 304-313, 2010 (査読有)
DOI: 10.1007/s12265-010-9182-x.
- ③ Ago T, Matsushima S, Kuroda J, Zablocki D, Kitazono T, Sadoshima J. The NADPH oxidase Nox4 and aging in the heart. *Aging* 2 (12): 1012-1016, 2010(査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21212466>
- ④ Kuroda J, Ago T, Matsushima S, Zhai P, Schneider MD, Sadoshima J: NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (35): 15565-15570, 2010 (査読有)
DOI: 10.1073/pnas.1002178107.
- ⑤ Ago T, Kuroda J, Kamouchi M, Sadoshima J, Kitazono T. Pathophysiological roles of NADPH oxidase/nox family proteins in the vascular system. -Review and perspective-. *Circ J* 75 (8): 1791-1800, 2011 (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673456>
- ⑥ Arimura K, Ago T, Kamouchi M, Nakamura K, Ishitsuka K, Kuroda J, Sugimori H, Ooboshi H, Sasaki T, Kitazono T: PDGF Receptor β Signaling in Pericytes Following Ischemic Brain Injury. *Curr Neurovasc Res* 9 (1): 1-9, 2012(査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22272762>
- ⑦ Ishitsuka K, Ago T, Arimura K, Nakamura K, Tokami H, Makihara N, Kuroda J, Kamouchi M, Kitazono T. Neurotrophin production in brain pericytes during hypoxia: a role of pericytes for neuroprotection. *Microvasc Res* 83 (3): 352-359, 2012 (査読有)
DOI: 10.1016/j.mvr.2012.02.009.
- ⑧ Nakamura K, Kamouchi M, Arimura K, Nishimura A, Kuroda J, Ishitsuka K, Tokami H, Sugimori H, Ago T, Kitazono T. Extracellular acidification activates cAMP responsive element binding protein via Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1-mediated Ca²⁺ oscillation in central nervous system pericytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32 (11):

- 2670-2677, 2012 (査読有)
DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.254946.
- ⑨ Matsushima S, Kuroda J, Ago T, Zhai P, Park JY, Xie LH, Tian B, Sadoshima J. Increased oxidative stress in the nucleus caused by Nox4 mediates oxidation of HDAC4 and cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2013; 112 (4): 651-663 (査読有)
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.112.279760.
- ⑩ Matsushima S, Kuroda J, Ago T, Zhai P, Ikeda Y, Oka S, Fong GH, Tian R, Sadoshima J. Broad Suppression of NADPH Oxidase Activity Exacerbates Ischemia/Reperfusion Injury Through Inadvertent Downregulation of Hypoxia-inducible Factor-1 α and Upregulation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- α . *Circ Res* 2013; 112 (8): 1135-1149. (査読有)
DOI:10.1161/CIRCRESAHA.111.300171.
- ⑪ Tokami H, Ago T, Sugimori H, Kuroda J, Awano H, Suzuki K, Kiyohara Y, Kamouchi M, Kitazono T; for the REBIOS Investigators. RANTES has a potential to play a neuroprotective role in an autocrine/paracrine manner after ischemic stroke. *Brain Res* 2013 (in press) (査読有)
DOI:10.1016/j.brainres.2013.04.022

[学会発表] (計 10 件)

- ① Kuroda J, Ago T, Sadoshima J, NAD(P)H oxidase Nox4 in vascular endothelial and smooth muscle cells may be involved in the regulation of basal blood pressure. AHA Scientific Sessions 2009.
2009年11月Orlando, USA
- ② Ago T. Nox4 is a major source of ROS in the failing heart. Gordon Research Conference on Nox family NADPH oxidases 2010 (invited)
2010年6月スイス
- ③ 有村公一, 吾郷哲朗, 他. 脳微小血管内皮細胞における活性酸素種産生酵素Nox4の役割解析. *Stroke* 2011
2011年8月京都
- ④ Arimura K, Ago T, et al. Role of NADPH oxidase 4 in Brain Endothelial Cells after Ischemic Stroke. International Stroke Conference 2012.
2012年2月New Orleans, USA
- ⑤ Ago T. Role of pericytes in neuroprotection during brain ischemia.

- BRI International Symposium 2012 (invited). 2012年3月新潟.
- ⑥ Ago T. Physiological and pathological roles of reactive oxygen species in cerebral blood vessels. 第44回日本動脈硬化学会, 2012 (invited).
2012年7月福岡
- ⑦ Ago T. Neuroprotective role of brain pericytes through PDGFR β after ischemic stroke. Trans Pacific Workshop on Stroke. (invited)
2012年11月New Orleans, USA
- ⑧ Arimura K, Ago T, et al. Endothelial NADPH oxidase 4 worsens ischemic stroke by suppressing eNOS activity. International Stroke Conference 2013
2013年2月Hawaii, USA
- ⑨ 有村公一, 吾郷哲朗, 他. 内皮細胞NADPH oxidase 4の過剰発現は脳虚血を増悪させる. *Stroke* 2013 2013年3月東京
- ⑩ 西村中, 吾郷哲朗, 他. 脳虚血病態におけるペリサイトNADPH oxidase 4の役割. *Stroke* 2013. 2013年3月東京

[その他]

ホームページ

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/stroke/>

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K003518/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吾郷 哲朗 (AGO TETSURO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 30514202

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

佐渡島 純一 (SADOSHIMA JUNICHI)
UMDNJ-New Jersey Medical School.
Department of Cell Biology and Molecular
Medicine, Professor
研究者番号: なし

黒田 淳哉 (KURODA JUNYA)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 70614858

有村 公一 (ARIMURA KOICHI)
九州大学大学院・医学研究院・大学院生
研究者番号: なし

西村 中 (NISHIMURA ATARU)
九州大学大学院・医学研究院・大学院生
研究者番号：なし