

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591115

研究課題名(和文) 先天免疫に関連した酸化ストレス消去酵素による新たな臓器障害抑制機序解明

研究課題名(英文) New mechanisms for organ damage elucidated by oxidative stress associated with innate immunity

研究代表者

梅本 誠治 (UMEMOTO, Seiji)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：90263772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：アンジオテンシンII(Ang II)により酸化ストレス(ROS)消去系酵素extracellular superoxide dismutase(ecSOD)が抑制され、ROSがより増加し臓器障害も進行し、さらにecSOD活性が先天免疫に關与するToll-like receptor 4(TLR4)欠損でさらに増加した。一方、Ang IIはROS産生酵素NADPH oxidaseを活性化して臓器内のROSを増加し、炎症を惹起したことから、Ang IIはTLR4を介してNADPH oxidaseを活性化させるだけでなく、ecSODを抑制しROSを増加させ、臓器障害を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the relationships among Toll-like receptor 4 (TLR4), angiotensin II (AngII), NADPH oxidase-derived oxidative stress, antioxidant enzyme extracellular superoxide dismutase (ecSOD), and inflammation in organ damage in AngII-induced hypertension. We demonstrated that TLR4 plays a pivotal role in regulating AngII-induced oxidative stress levels by inhibiting the expression and activity of the antioxidant enzyme ecSOD, as well as by activating NADPH oxidase, which enhances inflammation induced by monocyte/macrophage infiltration to facilitate selectively activated MCP-1 and the progression of organ damage seen in AngII-induced hypertension.

研究分野：循環器内科 分子血管病態学

キーワード：hypertension Toll-like receptor 4 organ damage ecSOD angiotensin inflammation

## 1. 研究開始当初の背景

アンジオテンシン II (AngII) は、銅イオントランスポーターMenkes ATPase (ATP7A) を介して酸化ストレス消去系酵素 extracellular superoxide dismutase (ecSOD) を亢進させて血管壁の酸化ストレスを増加し、血管再構築や臓器障害に関与する。(Hypertension 2008; 52:945) 我々のこれまでの研究の結果、ATP7A と ecSOD は先天免疫に関与する Toll-like receptor 4 (TLR4) 系にも制御され、AngII 存在下で主に血管再構築と臓器障害に関与する可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、AngII 負荷高血圧における酸化ストレス消去系と TLR4 の関係に着目して、酸化ストレスによる臓器障害の新たな進展調節機序を、特に、ケモカインと酸化ストレス消去酵素 ecSOD に着目して解明することである。

## 3. 研究の方法

AT1受容体、TLR4とecSODの関係を検討するために以下の実験を行った。

### (1) 実験モデル

Fukaiらの方法に従い(Circ Res 1999;85:23), 全身麻酔下にOsmotic mini-pump(Alzet)を用いてコントロールマウス(WT)とTLR4を欠損したマウス(TLR4<sup>lps-d</sup>)に、生理食塩水を投与する群、AngIIを投与する群、AngIIに加えて血圧に影響を及ぼさない低用量あるいは血圧を低下させる高用量のAT1受容体拮抗薬(イルベサルタン; IRB)を併用投与する群、さらに単に血圧上昇作用のみを持つノルエピネフリン(NE)を投与する群をそれぞれ作成し、各薬剤を14日間持続皮下投与した。血圧と脈拍はtail-cuff法で投与前、投与後7、14日にそれぞれ測定した。

### (2) 左心機能の評価

全身麻酔下で心臓の左室機能について、各薬剤投与14日後、経胸壁心エコーを用いて各薬

剤投与群間で比較検討した。

各薬剤を14日間投与後、マウスの心臓と腹部大動脈を摘出・計量し、それぞれの群で以下の項目について各薬剤群間で比較検討した。

### (3) 心筋および腹部大動脈の組織学的検討

心筋と腹部大動脈の薄切切片を作成し、心筋内細動脈と腹部大動脈の壁厚/内腔比(W/L比)と血管周囲線維化率を算出した。

### (4) 組織内酸化ストレスの評価

心筋と腹部大動脈の凍結切片を用いてジヒドロエチジウム(DHE)染色した薄切切片を用いて心臓及び腹部大動脈の局所酸化ストレスの指標である活性酸素種( $\cdot O_2$ )含量を共焦点レーザー顕微鏡とマルチカラー/コンピューター画像解析システムを用いてそれぞれ定量化し、各薬剤投与群間で比較検討した。

### (5) 組織内の酸化ストレス関連酵素の検討

腹部大動脈におけるCu/ZnSODとecSODのタンパク発現量をWestern blot法で、またecSOD活性をCon A-Sepharose chromatography(Pharmacia)を用いてそれぞれ測定した。

### (6) 組織における炎症の評価

免疫染色あるいはWestern blot法を用いて、組織の炎症の指標である転写因子NF- $\kappa$ Bとその下流にあるケモカインMCP-1の発現とそれらを発現させる単球/マクロファージの組織内への浸潤についてそれぞれ検討した。

## 4. 研究成果

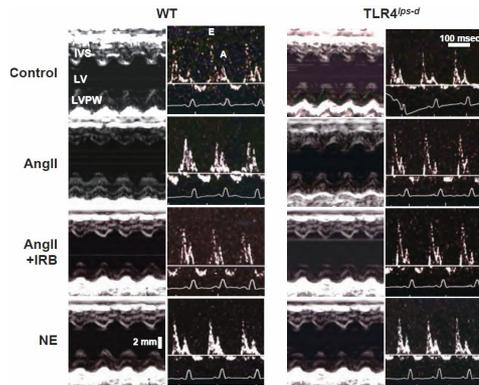
### (1) 体重、血圧、心筋内血管周囲線維化と血管再構築および左室重量の評価

WTとTLR4<sup>lps-d</sup>ともに体重、脈拍に差はなく、AngとNEは同様に収縮期血圧を上昇させた。

AngIIは、WTで左室重量を増加させ、心筋内血管周囲線維化を促進し、心筋内および腹部大動脈のW/L比を増加させたが、TLR4<sup>lps-d</sup>ではこれらの所見はなかった。またWTでは、IRB投与によりAngによるこれらの効果が消失した。NEでは、WTと左室重量、線維化およびW/L比に差はなかった。

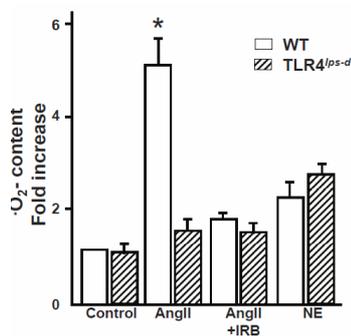
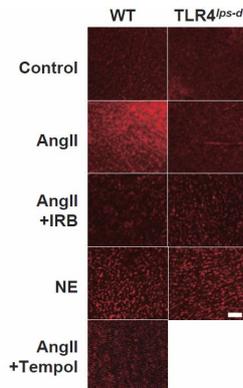
## (2) 経胸壁心エコーによる左室機能評価

経胸壁心エコーによる左室機能の評価では，WT に比べて AngII 群は左室収縮末期径が大きく，左室壁厚も厚くなり，左室拡張能が障害されていた．IRB 併用により，これらは改善され，WT と差はなかった．TLR4<sup>lps-d</sup> ではこれらの所見は見られなかった．NE でも同様に WT と差はなかった．



## (3) 心筋内および腹部大動脈壁内酸化ストレスの評価

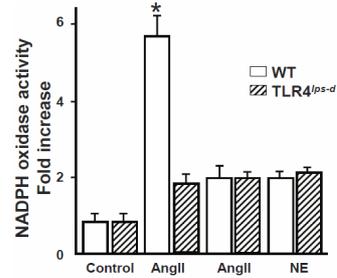
心筋内および腹部大動脈壁内酸化ストレスを $\cdot O_2^-$ 含量を指標に評価（図の赤色シグナル）したところ，WT では AngII により $\cdot O_2^-$ 含量が有意に増加したが，IRB 併用投与によりコントロールまで低下した．TLR4<sup>lps-d</sup> ではこれらの所見は見られなかった．NE では， $\cdot O_2^-$ 含量は WT と比べて軽度増加したが，差はなかった．



## (4) 腹部大動脈壁内の酸化ストレス関連酵素の検討

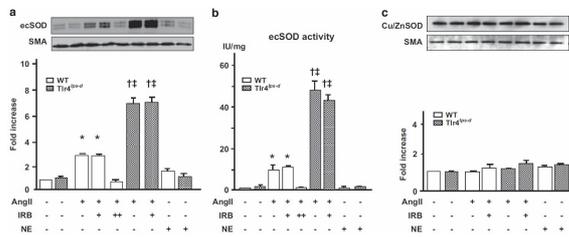
### 酸化ストレス産生酵素 NADPH oxidase 活性

酸化ストレス産生酵素 NADPH oxidase 活性は，WT では AngII 投与により有意に上昇したが，IRB 併用投与にて NADPH oxidase 活性はコントロールレベルまで低下した．TLR4<sup>lps-d</sup> では NADPH oxidase 活性はこれらの薬物投与で変化はなかった．また，NE でも NADPH oxidase 活性に差はなかった．



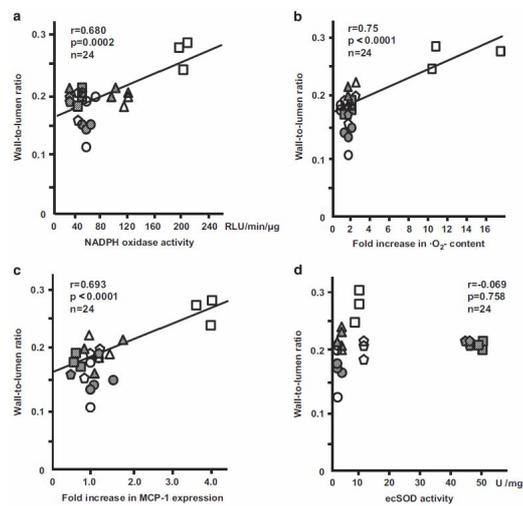
### 腹部大動脈壁における酸化ストレス消去酵素 Cu/ZnSOD と ecSOD の発現と ecSOD 活性の検討

腹部大動脈壁における Cu/ZnSOD と ecSOD の発現について検討した結果，WT では AngII により ecSOD が有意に増加したが，IRB 併用投与ではコントロールレベルまで低下していた．一方，TLR4<sup>lps-d</sup> では ecSOD の発現が WT よりもさらに増加し，この AngII による効果は IRB でも阻害できなかった．NE ではこれらの変化は確認できなかった．また，Cu/ZnSOD の発現は WT，TLR4<sup>lps-d</sup> とともにこれらの介入による発現に変化はなかった．そこでさらに ecSOD について活性を測定したところ，ecSOD 活性は蛋白発現と同様に，WT では AngII により ecSOD 活性が有意に増加したが，IRB 併用投与ではコントロールレベルまで低下していた．一方，TLR4<sup>lps-d</sup> では ecSOD 活性は AngII により有意に上昇し，WT よりもさらに増加していた．この AngII による効果は IRB でも阻害できなかった．



(6) W/L 比と・O<sub>2</sub> 含量, NADPH oxidase 活性, MCP-1 の発現と ecSOD 活性の関係

W/L 比と酸化ストレス, MCP-1, NADPH oxidase 活性と ecSOD の関係をみたところ, W/L 比は酸化ストレス, 炎症ならびに酸化ストレス産生酵素と正の相関があり, ecSOD ではこの関係がなかった.



以上から, AngII は ecSOD を亢進させて血管壁の酸化ストレスを増加し, 血管再構築や臓器障害に関与することが明らかになった.

5. 主な発表論文等

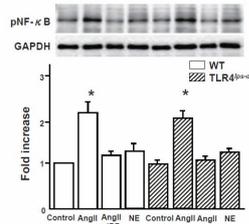
[雑誌論文](計3件)

- 1 Nakashima T, Umemoto S, Yoshimura K, Matsuda S, Itoh S, Murata T, Fukai T, Matsuzaki M. TLR4 is a Critical Regulator of Angiotensin II-induced Vascular Remodeling: Role of Extracellular SOD and NADPH Oxidase. *Hypertens Res*, 査読有, 2015 *in press*. doi: 10.1038/hr.2015.55.
- 2 Matsuda S, Umemoto S, Yoshimura K, Itoh S, Murata T, Fukai T, Matsuzaki M. Angiotensin II Activates MCP-1 and

(5) 心筋における転写因子 NF- $\kappa$ B とケモカイン MCP-1 の発現と単球/マクロファージの心筋内への浸潤

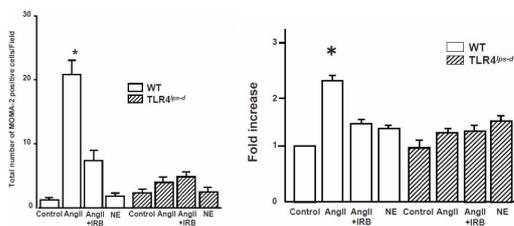
心筋における NF- $\kappa$ B の発現

NF- $\kappa$ B の発現は心筋細胞内の核に一致しており, その発現は WT, Tlr4<sup>Ips-d</sup> とともに AngII により増加し, IRB との併用でコントロールレベルまで低下した. NE ではコントロールレベルと変わらなかった. 心筋細胞内の核に一致しており, その発現は WT, Tlr4<sup>Ips-d</sup> とともに AngII により増加し, IRB との併用でコントロールレベルまで低下した. NE ではコントロールレベルと変わらなかった.



マクロファージの心筋への浸潤

一方, マクロファージの心筋への浸潤数は AngII 投与により WT で有意に増加したが, IRB との併用あるいは NE 投与ではコントロールレベルと変化なく, 増加しなかった.



心筋における MCP-1 の発現

心筋では MCP-1 の発現は, WT では AngII により有意に増加したが, IRB との併用あるいは NE ではコントロールレベルと差がなく, Tlr4<sup>Ips-d</sup> においても同様にこれらの薬剤等では増加しなかった.

Induces Cardiac Hypertrophy and Dysfunction via Toll-like Receptor 4. *J Atheroscler Thromb*, 査読有, 2015 *in press*.

doi.org/10.5551/jat.27292.

3. Umemoto S. Safety and Clinical Outcome in Combination Therapy for High-Risk Elderly Hypertensive Patients. *Hypertens Res*, 査読有, 2015; 38:104-105.

doi: 10.1038/hr.2014.166.

〔学会発表〕(計5件)

1. Matsuda S, Umemoto S, Yoshimura K, Itoh S, Murata T, Fukai T, Matsuzaki M. Angiotensin II activates MCP-1 through the infiltration of monocytes and macrophages into the heart and induces cardiac hypertrophy and dysfunction via Toll-like receptor 4. ESC Congress 2015, Aug 29-Sep 2, London (United Kingdom).
2. 中島忠亮, 梅本誠治, 岡本匡史, 松田晋, 松崎益徳. アンジオテンシン II は Toll-like receptor 4 を介して ecSOD および ATP7A を抑制し, 酸化ストレスを増大させる. 第 60 回日本心臓病学会学術集会, 2012.9.14-16, 石川県立音楽堂(金沢).
3. Nakashima T, Umemoto S, Okamoto T, Matsuda S, Murata T, Yoshimura K, Fukai T, Matsuzaki M. Angiotensin II inhibits ecSOD and ATP7A and upregulates oxidative stress via toll-like receptor 4. ESC Congress 2012, 25-29 Aug 2012, Munich, Germany.
4. Nakashima T, Umemoto S, Okamoto T, Matsuzaki M. Angiotensin Inhibits ecSOD and ATP7A and Upregulates Oxidative Stress through Toll-like

receptor 4. 第 44 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2012.7.19-20, ヒルトン福岡シーホーク(福岡).

5. 岡本匡史, 梅本誠治, 作村俊浩, 中島忠亮, 松田晋, 松崎益徳. アンジオテンシン II は Toll-like receptor 4 存在下で AT1 受容体を介して酸化ストレスを増加し, 炎症を惹起して糸球体硬化をより促進させる. 第四回腎疾患と高血圧研究会, 2012.7.7, 大手町サンケイプラザ(東京).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等:

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~ninai/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

梅本 誠治 (UMEMOTO, Seiji)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 9 0 2 6 3 7 7 2

(2)研究分担者

吉村 耕一 (YOSHIMURA, Koichi)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 0 0 3 2 2 2 4 8