

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461145

研究課題名(和文) 内皮細胞におけるNox4による低酸素応答増強メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanisms underlying Nox4-mediated enhancement of hypoxic responses in endothelial cells

研究代表者

吾郷 哲朗 (Ago, Tetsuro)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：30514202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中、心筋梗塞、閉塞性動脈硬化症(下肢虚血)は、克服すべき代表的成人血管病である。血管には様々なサイズのもの存在するが、すべての血管内腔面は一層の内皮細胞によって覆われている。酸素は動脈血中に豊富に含まれるため、内皮細胞では活性酸素が容易に産生され血管病の発症・進展に寄与する。内皮における活性酸素産生機構の解明は血管病の克服に不可欠であり、本研究では内皮に存在する活性酸素産生酵素Nox4の虚血(低酸素)応答と病態における役割を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：Stroke, myocardial infarction, and arteriosclerosis obliterans are representative adult vascular diseases to be overcome. Although there are many sizes of vascular vessels, endothelial cells cover intraluminal sides of any vascular vessels. Because there is abundant molecular oxygen within the arteries, reactive oxygen species (ROS) can be easily produced in endothelial cells and be associated with the development and progression of the vascular diseases. Thus, it is indispensable for overcoming of the vascular diseases to understand well the mechanisms by which ROS are produced and regulated in endothelial cells. In the present study, I elucidate ischemic/hypoxic responses and pathological roles mediated by ROS-producing Nox4 in endothelial cells.

研究分野：脳卒中学、血管病学、分子細胞生物学

キーワード：NADPH oxidase 活性酸素種 内皮細胞 周皮細胞 低酸素 脳梗塞 動脈硬化 下肢虚血

## 1. 研究開始当初の背景

活性酸素種は種々のタンパク質を酸化し、酵素活性や細胞内シグナル伝達を修飾することで細胞機能さらには生体機能を制御しうる。研究代表者は、1996年以降一貫して活性酸素種産生酵素 NADPH oxidase の制御機構と生体における役割についての研究を行っている。従来 NADPH oxidase は好中球・単球のような食細胞にのみ発現し活性酸素種産生により殺菌を担う酵素と考えられてきた (Ago, JBC 1999, BBRC 2001, PNAS 2003)。1999年以降そのファミリー・タンパク質が次々と同定され、心血管病・がんなど酸化ストレスが関与しうる種々の病態においても、何らかの役割を果たすと考えられるようになった。

我々は NADPH oxidase ファミリー・タンパク質の一つである Nox4 を同定し (JBC 2001)、Nox4 が心血管系細胞 (とくに内皮細胞) に強く発現していることを世界に先駆けて報告した (Ago, Circulation 2004, Stroke 2005)。以後、心血管系細胞における NADPH oxidase Nox4 の役割について、分子細胞生物学的手法および遺伝子改変動物を用いた病態モデルにより継続的に検討している (Ago, Circ Res 2010, Circ J 2011; Kuroda, Ago, PNAS 2010)。

Nox4 は体内の様々な細胞・組織に発現しうるがその後の研究で明らかとなったが、少なくとも培養細胞レベルでは内皮細胞において最も発現が高い。また、肺より取り込まれた酸素は動脈血を通して全身の細胞に供給されるため、酸素濃度は動脈血中で高度である。ゆえに全身血管の血液接触面に一層の細胞層として存在する内皮細胞において活性酸素種が産生されやすい環境下にあることは想像に難くない。内皮細胞特異的に活性酸素種・消去酵素 (EC-SOD) が存在するという事実もこれを支持する。内皮細胞もしくはその近傍における過剰な活性酸素種の産生は内皮細胞機能を障害する可能性がある。では何のために活性酸素種産生タンパク質である Nox4 が内皮細胞にわざわざ存在する必要があるのか？まずその意義を明らかにした上で、病態における役割を考える必要がある。

正常組織において、内皮細胞における Nox4 の発現は低く抑えられているようであり、低酸素環境や低栄養下において強く発現が誘導される (Ago, Circulation 2004, Circ J 2012)。例えば、マウス脳梗塞モデルにおいても、脳梗塞巣とその周囲領域の微小血管 (内皮細胞と周皮細胞) に Nox4 の発現が強く誘導されることを我々は見出した。おそらく、Nox4 は虚血組織における低酸素環境下で微小血管・内皮細胞 (および周皮細胞) に発現誘導され、細胞内シグナル伝達・細胞機能を修飾し、種々の血管病の発症・進展に対して影響を及ぼすものと考えられる。

## 2. 研究の目的

活性酸素種産生酵素である Nox4 は培養細胞レベルでは内皮細胞において発現が高いことが知られるが、生体内・正常組織でその発現は低く抑えられ、虚血臓器の微小血管において強く発現誘導される。つまり、内皮細胞における Nox4 の発現は恒常的なものではなく種々の病態に関連し、組織内における局在も異なるようである。Nox4 の発現がなぜ内皮細胞 (微小血管) において強く誘導されるのか？内皮細胞機能における役割は何か？活性酸素種が関与すると思われる種々の心血管病において、Nox4 を介して産生される活性酸素種が果たす役割は何なのか？これらの問題を明らかにすることを本研究課題の目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養内皮細胞を用いた検討

培養内皮細胞に Nox4 の過剰発現、ノックダウン、NADPH oxidase 阻害剤などを投与することで、Nox4 を介した細胞内シグナル伝達タンパク質の機能変化、遺伝子発現変化について検討する。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現変化の検討を行うことで、Nox4 により制御される転写因子やタンパク質を探索し、これを定量 PCR や Immunoblot で検証する。Nox4 とミトコンドリア機能との密接な関係も示唆されることから、ミトコンドリア・タンパク質との関連についても検討する。

以下、(2)-(4)のマウス動物実験では、Tie2 プロモーターを用いた内皮細胞 Nox4 過剰発現マウス、Nox4 ノックアウトマウスを用いた検討を行い、個体レベルでの Nox4 の役割を明らかにする。

### (2) 下肢虚血モデル

12-16 週齢マウスを用いて、左大腿動脈・静脈を結紮して下肢虚血モデルを作製する。右側は sham control とする。下肢虚血後の下肢血流の回復を経時的にレーザー Doppler 計で 28 日目 (10 日目, 21 日目) まで測定する。腓腹筋を用いて虚血下肢組織における mRNA・タンパク質の発現変化を検討する。

### (3) 脳梗塞モデル (中大脳動脈永久閉塞モデル, 虚血再灌流モデル)

8-16 週齢マウスを用いて、中大脳動脈遠位部閉塞脳梗塞モデルを作製する。Modified Tamura method により開頭直達手術により永久閉塞、一過性閉塞 (再灌流) を行う。また、ローズベンガル色素を静脈注射後、中大脳動脈遠位部をレーザー照射し、光凝固による血管 (永久) 閉塞を行って脳梗塞を作製する。

### (4) 粥状動脈硬化モデル

12-16 週齢マウスに対して、アメロイド・コンストリクターというドーナツ状カゼインコアの閉鎖具金属を総頸動脈に装着する

ことで、頸動脈を徐々に狭窄させ、Shear stress による粥状硬化病変(新生内膜)の形成過程について観察する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 内皮細胞における Nox4 発現の意義

培養内皮細胞を用いた microarray(網羅的遺伝子発現解析)の結果から Nox4 過剰発現により HIF-1 $\alpha$ , NFkB など複数の転写因子が活性化される可能性を見出した。HIF-1 $\alpha$  の安定化については、これをヒドロキシル化し分解を促進する酵素である PHD2/PHD3 の発現抑制が原因の一つと考えられた。また、Nox4 は低酸素応答を助長、解糖系を亢進しピルビン酸の TCA サイクルへの利用を抑制している可能性が示唆された。このことにより PHD の基質として作用する  $\alpha$ -ケトグルタル酸の供給が抑制されるため、HIF-1 $\alpha$  の安定化に対して協調的に作用すると思われた。また NFkB の活性化については、Nox4 過剰発現細胞において、IKK のリン酸化亢進、I $\kappa$ B の分解亢進、さらに NFkB のリン酸化・活性化亢進が順次生じていることを明らかにした。これらの応答により内皮細胞の生存・増殖が促進されるとともに、炎症性サイトカインの分泌が助長される可能性が示唆された。

また、内皮細胞において、Nox4 により産生される H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は、Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) precursor から TGF $\beta$  active form への conversion を促進させ、さらに TGF $\beta$  が Nox4 の発現を増加させる positive feedback 機構が存在し、血管新生応答を助長する可能性を報告した。実際、内皮細胞特異的 Nox4 過剰発現マウスから取り出した血管では血管新生(増殖)応答が亢進していた。

内皮細胞を用いた Nox4 の細胞免疫染色では、細胞内小器官への集積・mitotracker との共染色が観察され、ミトコンドリアへの局在が示唆された。細胞分画を用いた Immunoblot・活性酸素種測定においても、Nox4 のミトコンドリアへの局在が示唆された。また、Nox4 を過剰発現させるとミトコンドリア PTP が開口し脱分極が生じることを明らかにした。

##### (2) 下肢虚血と内皮細胞 Nox4

培養細胞研究で認められた結果と一致して、下肢虚血マウスモデルにおいて、内皮細胞特異的 Nox4 過剰発現マウスでは、虚血 21 日目以降有意に下肢血流の回復を認めた。非活性化型(P437H 変異)Nox4 を内皮細胞特異的に過剰発現したマウスでは下肢血流の回復遅延を認めた。虚血 28 日目の虚血肢・腓腹筋において、TGF $\beta$ , VEGFR2, eNOS の発現が有意に増加しており、内皮細胞 Nox4 の生体における主たる役割は、低酸素応答・血管新生応答の助長にあると推定された。しかしながら、この応答は下肢における比較的緩徐な応答において観察されたことを念頭に置かな

なければならない。

##### (3) 脳虚血と内皮細胞 Nox4

中大脳動脈の閉塞時間を様々に変え、虚血領域内における細胞死の様子を免疫組織染色・電子顕微鏡で詳細に観察した。神経(45-90 分虚血)→アストロサイト(60-90 分虚血)→周皮細胞(数~24 時間虚血)の順で細胞死をきたしたのに対し、内皮細胞は永久閉塞状況下においても、少なくとも 24 時間以上(72-96 時間)生存することを明らかにした。内皮細胞死が生じる前に、微小血管内では好中球・赤血球・血小板凝集による血管閉塞が生じており、この応答は梗塞内部が出血へと移行(hemorrhagic transformation)しないための防御機構と考えられた。内皮細胞は他の細胞種に比し、虚血に対する強い抵抗性を有しており、機能破綻する前に血球凝集促進作用を発揮する可能性が示唆された。また、再灌流が生じた時点で、残存内皮細胞が多いほど周皮細胞の内皮細胞周囲への動員とそれに引き続く梗塞巣の組織修復が速やかに生じ、脳機能回復に寄与しうることを明らかにした。

培養細胞を用いた検討や下肢虚血の検討と合わせると、虚血内皮細胞における Nox4 発現誘導は内皮生存・増殖に寄与する可能性が高いと思われた。また NFkB 活性化は内皮細胞生存に寄与するとともに、好中球浸潤や血栓形成に寄与するサイトカインや血液凝固促進因子の分泌を増加させることから、Nox4 は脳においても内皮細胞の虚血応答を助長している可能性が示唆された。

その一方で、内皮細胞・周皮細胞に Nox4 を過剰発現させたマウスを用いて脳梗塞を作製すると、一過性虚血・再灌流、永久閉塞の両モデルにおいて、脳梗塞発症早期(発症 4 日目前後)では血液脳関門破綻が助長され梗塞サイズは拡大した。

これらのことより脳虚血における Nox4 発現意義の解釈は非常に難しいと考えられた。主たる作用は血管新生応答助長にあると思われるが、脳においては急激な血管新生誘導が却って血液脳関門の破綻を助長することがあり、Nox4 過剰発現でもそのような現象を観察している可能性が高いと現時点では判断している。長期の組織修復過程においては、下肢虚血同様、Nox4 が組織修復の促進に有利に作用する可能性があると考え、更なる検討を行っている。

##### (4) Shear stress による動脈硬化病変形成

アメロイド・コンストリクターを用いた段階的 shear stress(ずり応力)誘導新生内膜形成応答において、内皮 Nox4 過剰発現マウスではこの応答が増強し、Nox4 ノックアウトマウスでは抑制される可能性を見出した。培養細胞を用いた microarray の結果とも一致して、局所より産生される CXCL ケモカイン群の発現増加などを介して、炎症細胞浸潤が高

度に生じ、動脈硬化進展に寄与することが示唆された。また Nox4 過剰発現に伴い内皮細胞において発現増加する PDGF-B によって平滑筋の増殖が促進されている可能性がある。また内皮細胞 Nox4 の過剰発現は vaso vasorum の形成に寄与している可能性があり検討を継続している。

#### 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, Corresponding author には \*)

[雑誌論文] (計 8 件)

① Tachibana M, Ago T\*, Wakisaka Y, Kuroda J, Shijo M, Yoshikawa Y, Komori M, Nishimura A, Makihara N, Nakamura K, Kitazono T. Early reperfusion after brain ischemia has beneficial effects beyond rescuing neurons. *Stroke* 2017, in press

② Nishimura A, Ago T\*, Kuroda J, Arimura K, Tachibana M, Nakamura K, Wakisaka Y, Sadoshima J, Iihara K, Kitazono T. Detrimental role of pericyte Nox4 in the acute phase of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 36: 1143-54, 2016

③ Tong X, Khandelwal AR, Wu X, Xu Z, Yu W, Chen C, Zhao W, Yang J, Qin Z, Weisbrod RM, Seta F, Ago T, Lee KS, Hammock BD, Sadoshima J, Cohen RA, Zeng C. Pro-atherogenic role of smooth muscle Nox4-based NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol* 92: 30-40, 2016

④ Makihara N, Arimura K, Ago T\*, Tachibana M, Nishimura A, Nakamura K, Matsuo R, Wakisaka Y, Kuroda J, Sugimori H, Kamouchi M, Kitazono T. Involvement of platelet-derived growth factor receptor  $\beta$  in fibrosis through extracellular matrix protein production after ischemic stroke. *Exp Neurol* 264: 127-34, 2015

⑤ Nakamura K, Arimura K, Nishimura A, Tachibana M, Yoshikawa Y, Makihara N, Wakisaka Y, Kuroda J, Kamouchi M, Ooboshi H, Kitazono T, Ago T\*. Possible involvement of basic FGF in the upregulation of PDGFR  $\beta$  in pericytes after ischemic stroke. *Brain Res* 1630: 98-108, 2015

⑥ Tong X, Khandelwal AR, Qin Z, Wu X, Chen L, Ago T, Sadoshima J, Cohen RA. Role of smooth muscle Nox4-based NADPH oxidase in neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol* 89 (Pt B): 185-94, 2015

⑦ Kuroda J, Ago T, Nishimura A, Nakamura K, Matsuo R, Wakisaka Y, Kamouchi M,

Kitazono T. Nox4 is a major source of superoxide production in human brain pericytes. *J Vasc Res* 51: 429-38, 2014

⑧ Chen L, Hou X, Xiao J, Kuroda J, Ago T, Sadoshima J, Cohen RA, Tong X. Both hydrogen peroxide and transforming growth factor beta 1 contribute to endothelial Nox4 mediated angiogenesis in endothelial Nox4 transgenic mouse lines. *Biochim Biophys Acta* 1842 (12PtA): 2489-99, 2014

[学会発表] (計 6 件)

① 吾郷哲朗. 「基礎と臨床を渡す脳血管障害の新研究」脳梗塞後の組織修復における再灌流治療の有用性に関する基礎的研究. 第 42 回日本脳卒中学会学術集会. 2017.3.16 大阪 (シンポジウム)

② 吾郷哲朗. **Neurovascular Unit** からみた脳血管障害. 第 20 回眼創傷治癒研究会. 2016.8.20 福岡 (特別講演)

③ 吾郷哲朗. 「生活習慣病と脳梗塞・認知症」脳虚血と **NADPH oxidase family**. **Vas-Cog Japan 2016** 2016.8.6 金沢 (シンポジウム)

④ 吾郷哲朗. 「脳心血管病における炎症の役割」活性酸素種産生酵素 **Nox4** による内皮・周皮細胞の分子制御とその意義. 脳心血管加齢研究会 2014.12.6 大阪 (シンポジウム)

⑤ 吾郷哲朗. 心・脳血管病からみえる活性酸素種産生酵素 **Nox4** の功罪. 第 31 回臨床フリーラジカル研究会 2014. 12. 5 京都 (招待講演)

⑥ 吾郷哲朗. 脳保護療法と NVU. 第 26 回脳循環代謝学会 2014. 11. 21 岡山 (シンポジウム)

[図書] (計 1 件)

① 吾郷哲朗. 血液脳関門. 脳神経外科プラクティス 6 「脳神経外科医が知っておくべきニューロサイエンスの知識」橋本信夫監修. 三國信啓・深谷親編集. 文光社 pp. 114-5, 2015 (分担執筆)

[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://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・腎高血圧脳血管内科・講師

研究者番号：30514202

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

北園 孝成 (KITAZONO TAKANARI)

九州大学大学院・医学研究院・病態機能内科学・教授

研究者番号：70284487

黒田 淳哉 (KURODA JUNNYA)

九州大学・大学病院・腎高血圧脳血管内科・助教

研究者番号：70614858

脇坂 義信 (WAKISAKI YOSHINOBU)

九州大学・大学病院・腎高血圧脳血管内科・助教

研究者番号：50631694

立花 正輝 (TACHIBANA MASAKI)

九州大学大学院・医学研究院・病態機能内科学・大学院生

吉川 容司 (YOSHIKAWA YOJI)

九州大学大学院・医学研究院・病態機能内科学・大学院生

古森 元浩 (KOMORI MOTOHIRO)

九州大学大学院・医学研究院・病態機能内科学・大学院生

牧原 典子 (MAKIHARA NORIKO)

九州大学大学院・医学研究院・病態機能内科学・大学院生 (現・九州中央病院・脳血管内科医長)

西村 中 (NISHIMURA ATARU)

九州大学大学院・医学研究院・病態機能内科学・大学院生 (現・九州大学病院・脳神経外科・助教)

中村 晋之 (NAKAMURA KUNIYUKI)

九州大学大学院・医学研究院・病態機能内科学

佐渡島 純一 (SADOSHIMA JUNICHI)

Rutgers New Jersey Medical School,  
Department of Cell Biology and Molecular  
Medicine, Professor