

## 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：11301

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20117009

研究課題名（和文） 内皮由来弛緩因子としての活性酸素の役割と作用機構の解明

研究課題名（英文） The role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as an endothelium-derived relaxing factors (EDRFs)

研究代表者

下川 宏明 (SHIMOKAWA HIROAKI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00235681

研究成果の概要（和文）：

血管内皮細胞は、たった一層の細胞群ではあるが、血管平滑筋細胞および血球系細胞との密接な相互作用を有し、血管機能制御の根幹を形成している(Shimokawa H, et al. *Science* 1983)。血管内皮はプロスタサイクリン (PGI<sub>2</sub>)・一酸化窒素(NO)・内皮由来過分極因子(EDHF)の3種類の血管弛緩因子を産生・放出し、これらは血管機能恒常性の維持に重要な役割を果たしている。我々は、生理的条件下ではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>がマウス及びヒト腸間膜動脈、ブタ冠微小血管におけるEDHFの本体として役立っており、血管弛緩反応を惹起していることを報告した(Shimokawa et al. *J Clin Invest* 2000, 2003, *J Exp Med* 2008)。

研究成果の概要（英文）：

Oxidative stress, generated by excessive reactive oxygen species (ROS) promotes cardiovascular disease. However, the precise mechanism how ROS (i.e., H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, and ·OH) deteriorate vascular function and promote vascular remodeling has not been clearly elucidated. Moreover, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> also plays a crucial role as a signaling molecule under physiological conditions. Our recent study revealed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is one of the endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) that contributes as a signaling molecule in the vasculature.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	18,000,000	5,400,000	23,400,000
2009年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2010年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2011年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
2012年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
総計	80,800,000	24,240,000	105,040,000

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：血管内皮・内皮由来弛緩因子・一酸化窒素・過酸化水素・一酸化窒素合成酵素

1. 研究開始当初の背景

血管内皮は、内皮由来弛緩因子

(endothelium-derived relaxing factors, EDRFs)と総称される弛緩因子を産生・遊離して、短期

的には血管トーンを弛緩優位に保ち、長期的には動脈硬化の発生・進展を抑制して、心血管系の恒常性の維持に極めて重要な働きをしている。このEDRFsには3種類あり、第1のプロスタサイクリン(PGI<sub>2</sub>)、第2の一酸化窒素(NO)は既に同定され、一部で臨床応用されている。第3の因子である内皮由来過分極因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF)の本体は不明であったが、我々は、NOとEDHFには血管径による明らかな役割分担があり、種差や血管床の如何に関わらず、NOはより太い血管で、EDHFは微小血管で重要な働きをしていることを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

血管内皮は、内皮由来弛緩因子と総称される主として3種類の弛緩因子を産生・遊離して、心血管系の恒常性の維持に極めて重要な役割を果たしている。第1のPGI<sub>2</sub>、第2のNOの同定に関しては、その重要性からノーベル賞が授与されている。我々は、第3の因子である内皮由来過分極因子(EDHF)の本体の一つが生理的濃度で内皮から産生・遊離されるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>であることを世界に先駆けて同定した。また、最近我々は、EDHF反応が血管内皮のNO合成酵素系に完全に依存していることを証明した。我々のEDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>学説は、とすれば酸化ストレスとしての負の面ばかりが強調されがちであったH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が、生体内で非常に重要なシグナル分子として心血管系の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした点で学術的意義が大きい。本研究では、我々の学説をさらに検証・発展させる目的で、

(1) 血管内皮におけるEDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の産生機構の解明、

(2) EDHFとしてのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の血管平滑筋へのシグナル伝達機構の解明、

(3) EDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の血管平滑筋の弛緩機構の解明、

(4) 内皮由来弛緩因子(NO, EDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)の生体内での意義の解明を目的とした。

本研究により、生理的条件下ではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>がマウス及びヒト腸間膜動脈におけるEDHFの本体として役立っており、血管弛緩反応を惹起していることを報告した(Shimokawa et al. *J*

*Exp Med* 2008)。一方、喫煙、高血圧、糖尿病、脂質異常症、加齢などの病的条件下では、酸化ストレス増幅蛋白サイクロフィリンAが各種の心血管病を促進することを突き止めた。

## 3. 研究の方法

### (1) 血管内皮におけるEDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生経路の解明

我々は、EDHF反応がNO合成酵素完全欠損マウスを用いて、EDHF反応が完全に内皮のNO合成酵素系に依存していることは証明できたが、その産生機構については不明な点が多い。本研究では、NO合成酵素の活性化機構・補酵素系とEDHF反応との関連について検討を行う。

### (2) EDHFとしてのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の血管平滑筋へのシグナル伝達機構の解明

内皮由来のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>がシグナル分子として血管平滑筋に働く場合、拡散機序に加えて、内皮と血管平滑筋との間に存在するgap junctionを通過して作用している可能性がある。この点を、gap junction阻害薬や分子プローブを用いた動態測定により検討する。

### (3) EDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の血管平滑筋の弛緩機構の解明

血管平滑筋のKCa channelの開口、Protein kinase G(PKG)1の活性化が関与している可能性があり、この点について検討する。また、領域代表者の赤池教授らが開発したニトロ化・S-グアニル化の蛍光プローブを用いて、これらの機序の関与についても検討する。

### (4) 内皮由来弛緩因子(NO, EDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)の生体内での意義の解明

NO合成酵素完全欠損マウスを用いて、内皮由来弛緩因子の特に冠循環における意義について検討する。

## 4. 研究成果

本研究では、EDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に関する、以下のような点を明らかにした。

### (1) 内皮由来過分極因子(EDHF)としてのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

血管内皮細胞は、たった一層の細胞群ではあるが、血管平滑筋細胞および血球系細胞

との密接な相互作用を有し、血管機能制御の根幹を形成している(Shimokawa H, et al. *Science* 1983)。血管内皮はプロスタサイクリン (PGI<sub>2</sub>)・一酸化窒素(NO)・内皮由来過分極因子(EDHF)の3種類の血管弛緩因子を産生・放出し、これらは血管機能恒常性の維持に重要な役割を果たしている。このH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は血管弛緩反応に関する役割をNOと分担しており、大動脈などの導管血管における弛緩反応は主としてNOにより制御されているが、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>は微小血管、特に抵抗血管において重要な役割を果たしていると考えられる。我々は、生理的条件下ではH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>がマウス及びヒト腸間膜動脈、ブタ冠微小血管におけるEDHFの本体として役立っており、血管弛緩反応を惹起していることを報告した(Shimokawa et al. *J Clin Invest* 2000, 2003, *J Exp Med* 2008)。

## (2) 酸化ストレスとしてのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

喫煙、高血圧、糖尿病、脂質異常症、加齢などは過剰なROS産生の原因になり、心血管疾患の促進因子である。血管平滑筋細胞は血管構築細胞の中でも圧倒的な数及び容積を有し、NADPH oxidases、xanthine oxidaseなどの多くのROS産生源を有する。Angiotensin IIなどのアゴニスト刺激や低酸素などの環境因子は大量のROS産生を促進し、血管内皮障害、血管平滑筋増殖、炎症細胞浸潤を引き起こす。従って、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>等のROSは生理的低濃度においては細胞の恒常性維持に重要な役割を果たす善玉因子である一方、過剰にあると心血管疾患を引き起こす悪玉因子として作用する、いわゆる「両刃の剣」と考えられている。血管平滑筋細胞も血管作動物質を産生・放出することが分かっており、酸化ストレス特異的に何らかの作動物質が分泌されることが1990年代より想定され、多くの研究が盛んに行われてきた。我々は、この酸化ストレス作動物質に関する継続的な研究の結果、多彩な作用を有するchaperon蛋白サイクロフィリンA (CyPA)がその一つであり、強力な心血管病促進作用を有することを突き止めた。

## (3) 酸化ストレス増幅蛋白サイクロフィリンA

我々は、酸化ストレスが血管平滑筋細胞の

増殖や遊走を促進する現象に着目し、それを説明する分子的基盤の探索を長年行ってきた。そして最近、酸化ストレス環境下において血管平滑筋細胞より分泌される各種の蛋白の中からサイクロフィリンA (CyPA)を同定し、Rho-kinase依存性に分泌され、分泌された細胞外 CyPAはautocrine/paracrine的に作用して酸化ストレス増幅系を形成し、Rho-kinase特異的阻害薬 Fasudilはこの増幅系を完全に遮断することを報告した(Satoh K, et al. *Antioxid Redox Signal*. 2010)。分泌された細胞外 CyPAは平滑筋細胞に対して増殖・遊走を、血管内皮に対しては接着因子の発現と آپトーシスを、炎症細胞に対しては血管壁への遊走を促進することを、動脈再狭窄モデル・腹部大動脈瘤モデル・心筋肥大モデル・動脈硬化モデルを用いて確認し、論文発表を行った(Satoh K, et al. *Circulation* 2008, *Nat Med*.2009)。

さらに、ヒト腹部大動脈瘤病変でもCyPAの発現が亢進していることやヒト動脈硬化プラーク破綻機構にもCyPAが深く関わっていることを、当科の心筋梗塞患者の冠動脈プラーク破綻部位より得られた組織および血清を用いた検討により確認し、常に臨床応用を目指した基礎研究・臨床研究を行っている(Satoh K, Shimokawa H, et al. *Circ J* 2010, *Nitric Oxide* 2010, *Circ J* 2013)。

我々の研究は、革新的な心血管治療薬や新しいバイオマーカーの開発に繋がる可能性があり、特許申請も行っている。

本研究を通じて、これまで明らかにされていなかったEDHF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に関する詳細なメカニズムが初めて明らかになった。

## 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 (全て査読あり)] (計 107 件)

1. Tanaka S, Fukumoto Y, Nochioka K, Minami T, Kudo S, Shiba N, Takai Y, Williams CL, Liao JK, Shimokawa H. Statins exert pleiotropic effects through SmgGDS up-regulation with a resultant Rac1 degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013(in press) doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300922
2. Takagi Y, Yasuda S, Takahashi J, Tsunoda

- R, Ogata Y, Seki A, Sumiyoshi T, Matsui M, Goto T, Tanabe Y, Sueda S, Sato T, Ogawa S, Kubo N, Momomura S, Ogawa H, Shimokawa H. Clinical implications of provocation tests for coronary artery spasm: safety, arrhythmic complications and prognostic impact -Multicenter registry study of the Japanese Coronary Spasm Association- *Eur Heart J.* 34:258-267,2013. doi: 10.1093/eurheartj/ehs199.
3. Satoh K, Fukumoto Y, Sugimura K, Miura Y, Aoki T, Nochioka K, Tatebe S, Miyamichi-Yamamoto S, Shimizu T, Osaki S, Takagi Y, Tsuburaya R, Ito Y, Matsumoto Y, Nakayama M, Takeda M, Takahashi J, Ito K, Yasuda S, Shimokawa H. Plasma cyclophilin A is a novel biomarker for coronary artery disease. *Circ J.* 77:447-455,2013. doi:10.1253/circj.CJ-12-0805
  4. Nakajima S, Ohashi J, Sawada A, Noda K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Essential role of the bone marrow for microvascular endothelial and metabolic functions in mice. *Circ Res.* 111:87-96, 2012. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.270215.
  5. Ohashi J, Sawada A, Nakajima S, Noda K, Takaki A, Shimokawa H. The mechanisms for enhanced endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in microvessels in mice. *Circ J.* 76:1768-1779, 2012. doi:10.1253/circj.CJ-12-0197
  6. Tsuburaya R, Yasuda S, Shiroto T, Ito Y, Gao JY, Aizawa K, Kikuchi Y, Ito K, Takahashi J, Ishibashi-Ueda H, Shimokawa H. Long-term treatment with nifedipine suppresses coronary hyperconstricting responses and inflammatory changes induced by paclitaxel-eluting stent in pigs *in vivo*: Possible involvement of Rho-kinase pathway- *Eur Heart J.* 33:791-799, 2012. doi: 10.1093/eurheartj/ehs145.
  7. Satoh K, Shimokawa H. Vascular-derived reactive oxygen species for homeostasis and diseases. *Nitric Oxide.* 25:211-215, 2011. doi: 10.1016/j.niox.2011.04.005.
  8. Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: Important new therapeutic target in cardiovascular diseases. *Am J Physiol.* 301:H287-296,2011. doi: 10.1152/ajpheart.00327.2011.
- [学会発表] (計 67 件)  
 <国際学会> (\* 招待講演)
1. **European Society of Cardiology Congress 2012 (August 25-29, Munich, Germany)**  
 <Hotline Session>  
 \*Shimokawa H. The Great East Japan Earthquake Disaster and cardiovascular diseases.
  2. **6<sup>th</sup> European Congress of Pharmacology (July 19, 2012, Granada, Spain)**  
 <Main Session: Rho/Rho-kinase Signaling in Health and Diseases>  
 \*Shimokawa H. Role of Rho/Rho-kinase pathway in the cardiovascular system.
  3. **Rome Cardiology Forum 2012 (March 30, 2012, Rome, Italy)**  
 <Symposium: Update on coronary vasomotion>  
 \*Shimokawa H. Update on coronary spasm.
  4. **Invited lecture at the San Raffaele University (March 30, 2012, Milano, Italy)**  
 \*Shimokawa H. Rho-kinase as an important new therapeutic target in cardiovascular medicine.
  5. **Invited lecture at Royal Adelaide Hospital (April 30, 2012, Adelaide, Australia)**  
 \*Shimokawa H. Recent progress in endothelial research.
  6. **Invited lecture at the Cardiac Society of Australia & New Zealand Meeting (May 1, 2012, Adelaide, Australia)**  
 \*Shimokawa H. Coronary spasm in 2012: Mechanisms and treatment.
  7. **Invited lecture at Medical Grand Round of the Queen Elizabeth Hospital (May 1, 2012, Adelaide, Australia)**  
 \*Shimokawa H. Rho-kinase as an important CV therapeutic target.
  8. **Invited lecture at the Cardiology Academic Meeting of the Queen Elizabeth Hospital (May 1, 2012, Adelaide, Australia)**  
 \*Shimokawa H. Recent progress in endothelial research.

9. **Invited lecture at the Flinders Medical Center (May 2, 2012, Adelaide, Australia)**

\*Shimokawa H. Present status & future perspectives of heart failure in Japan.

〔図書〕(計 53 件)

1. 下川宏明：日本人の虚血性心疾患に関する基礎的・臨床的研究. 日本医師会雑誌 141:2237-2242,2013. (日本医師会医学賞受賞記念総説)
2. 下川宏明、神戸茂雄：内皮由来過分極因子の医学的意義. 血栓と循環 (メディカルレビュー社). 20:165-169,2012.
3. 下川宏明：大震災と循環器・呼吸器疾患 (序文). 呼吸と循環 (医学書院). 60:895-895,2012.
4. 下川宏明：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が制御する血管弛緩反応. 日本薬理学雑誌. (日本薬理学会) 139:229-235,2012.
5. 下川宏明：肺高血圧診療の進歩をみる. 特集にあたって. Vascular Medicine. (先端医学社) 8:1-2,2012.
6. 下川宏明：医学論文の書き方 -Circulation Journal 編集長からのアドバイス- 心臓 (日本心臓財団・日本循環器学会) 43:1414-1416,2011.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称：サイクロフィリンAによる心血管疾患の検査方法  
発明者：下川宏明、佐藤公雄  
権利者：下川宏明、佐藤公雄 (国立大学法人東北大学)  
種類：特許  
番号：特願 2012-239615  
出願年月日：2012 年 10 月 30 日  
国内外の別：国内
2. 名称：「スタチンの用法、用量を決定する方法」  
発明者：下川宏明、田中眞一  
権利者：下川宏明、田中眞一  
種類：特許  
番号：特願 2011-197906  
出願年月日：2011 年 9 月 12 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cardio.med.tohoku.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

下川 宏明 (SHIMOKAWA HIROAKI)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00235681

(2)研究分担者

佐藤 公雄 (SATO KIMIO)  
東北大学・高等教育開発推進センター  
・准教授  
研究者番号：80436120