

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24年5月15日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590954

研究課題名（和文） 高血圧における酸化ストレス亢進に対する生体防御機構の新たな機序解明

研究課題名（英文） New Mechanisms of the Protection against the Increase in Oxidative Stress in Hypertension

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

研究成果の概要（和文）：アンジオテンシン II (AngII) は AngII 受容体タイプ 1 型受容体を介して TLR4 に働き、活性酸素種を増加させて血管再構築を来す一方で、TLR4 は AngII 受容体タイプ 1 型受容体を介さずに ecSOD の発現と活性を直接抑制することで血管壁における酸化ストレス産生を亢進させて血管再構築を惹起する可能性が示唆された。PPAR γ を介する経路は TLR4 を介する ecSOD 活性化に関与していなかった。

研究成果の概要（英文）：Angiotensin II (AngII) increased oxidative stress and induced vascular remodeling through AngII type 1 receptor via TLR4, whereas TLR4 directly inhibited ecSOD to promote the production of oxidative stress and vascular remodeling. PPAR γ was not involved in these processes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：Oxidative stress, Toll-like receptor, Angiotensin II, Superoxide dismutase

1. 研究開始当初の背景

高血圧はわが国において約4000万人も患者が存在し、心血管イベント及び死亡の独立した危険因子である。さらに、高血圧は糖・脂質代謝異常を合併しやすく、心血管疾患発症の高リスクであるメタボリックシンドローム

の構成要素でもある。

臨床において、心肥大をはじめ臓器障害がより進行している症例では、心血管イベントがより多発し、予後も不良であり、またメタボリックシンドロームに代表される過栄養状態では免疫異常も起きやすいことから、高血

圧, メタボリックシンドロームと免疫の間に何らかのクロストークが存在することが示唆される。

一方, 高血圧による動脈硬化の発症・進展機序における酸化ストレスと炎症, ならびに核内レセプターで糖・脂質代謝と細胞分化に密接に関連する転写因子の1つである peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)の役割が近年明らかとなってきた。われわれは, 高血圧では組織内アンジオテンシンIIがアンジオテンシンII タイプ1 (AT1)受容体を介する酸化ストレス産生酵素NADPH oxidase活性化による酸化ストレス産生亢進と, それに引き続く炎症性転写因子NF- κ Bとサイトカイン, ケモカインの誘導が血管リモデリングを促進すること, 高血圧ではPPAR γ の選択的活性化がNF- κ Bや一酸化窒素(NO)と独立してPPARのターゲット分子である生体防御機構の酸化ストレス消去酵素 superoxide dismutase (SOD)の活性化と, SODと同様にPPARのターゲット分子で, メタボリックシンドロームにおいて重要な役割を持つアディポネクチンの増加を介して, 組織内の酸化ストレスを低下させ, 血管リモデリングと線維化を抑制し, 血管機能も改善すること, さらに, 高コレステロール血症においてコレステロール低下薬スタチンがコレステロール低下作用と独立してNO非依存性にPPAR γ を選択的に活性化させることでextracellular SOD(ecSOD)を活性化させて血管壁の酸化ストレスを低下させ血管機能を改善することを報告した。

審良らにより明らかにされた先天免疫に関連するToll-like receptor 4(TLR4)は lipopolysaccharidesに対する受容体で心血管系組織にも発現し, 細菌感染に対する細胞内情報伝達系を活性化させ感染に関与するだけでなく, TLR4遺伝子多型解析からヒトの心

血管疾患発症にも関与することが明らかとなった。さらに, TLR4を介する細胞内情報伝達系には酸化ストレスの場合と同様に炎症に関連するNF- κ Bとサイトカイン・ケモカインが重要な経路であることから, 酸化ストレスとTLR4が相互に関連して動脈硬化の発症・進展に関与する可能性が示唆される。

われわれは, これまでの研究の結果, アンジオテンシン II は酸化ストレス産生酵素 NADPH oxidase を活性化させて酸化ストレス産生を亢進させ, TLR4 存在下でのみ血圧上昇作用と独立して NF- κ B を活性化する一方, ecSOD の活性を選択的に抑制することで大動脈壁の酸化ストレス産生をさらに亢進させて血管中膜平滑筋細胞の形質変換と血管リモデリングを促進することを明らかにした。また, アンジオテンシン II は心臓においても血圧上昇作用と独立して TLR4 存在下でのみ NADPH oxidase を活性化させて心筋内酸化ストレスを増加させ, 心肥大, 心筋内細動脈リモデリングと血管周囲線維化を促進し, 心機能を低下させることをあわせて見いだした。

最近 Fukai らは, アンジオテンシン II が ecSOD を介して血管壁の酸化ストレスを修飾し血圧調節に関わること, また, 細胞増殖にも関与する銅イオン依存性 Atox-1 を介して銅イオントランスポーターMenkes ATPase が ecSOD 活性を亢進させ, アンジオテンシン II による酸化ストレス増加, 血管内皮機能低下と血圧上昇に関与する重要な規定因子であることを報告した。一方 Fukai らの報告と異なり, われわれ独自のこれまでの研究結果からは, ecSOD は TLR4 にも制御され, 主に血管壁の構築に関与するが, 血圧を中心とする血管機能に影響を及ぼさない可能性があることから, 高血圧による酸化ストレス亢進状態では先天免疫に関与する TLR4 と PPAR γ の連関が酸化ストレス消去系酵素を調節し, 血管

組織内の酸化ストレスレベルを決定し、血圧値に関係なく臓器障害を特異的に発症・進展させる新規の臓器障害惹起規定因子である可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アンジオテンシン II 負荷による高血圧において、酸化ストレス消去系酵素 ecSOD, PPAR γ と先天免疫に関与する TLR4 の関係に特に着目してその分子病態を探索し、臓器障害の新たな進展調節機序を解明することである。

3. 研究の方法

全身麻酔下に Osmotic mini-pump (Alzet) を用いて Wild-type マウスと TLR4 欠損マウスに Ang II を 2 週間皮下に持続注入する群、と Wild-type マウスに ノルエピネフリン を 2 週間併用持続注入する群をそれぞれ作成する。血圧は tail-cuff 法で測定する。Ang II 投与終了後マウスを安楽死させた後に組織を摘出し、以下の検討を行う。

(1) 腹部大動脈の組織学的検討：

TLR4 欠損と Ang II の平滑筋細胞肥大・増殖作用による血管リモデリング（再構築）と内膜肥厚ならびに PPAR γ と SOD の効果を検討する。すなわち、腹部大動脈の Masson Trichrome 染色した血管の断面薄切切片を用いて、盲検下にマルチカラー画像解析システムにて画像解析を行い、壁厚/内腔比を算出する。以下の画像解析は全て同様の方法で行う。

(2) 腹部大動脈壁酸化ストレスの評価：

腹部大動脈を用いて凍結切片を作成し、dihydroethidine 染色あるいは hydrogen peroxide (H_2O_2), 5-(and 6-)chloromethyl-2', 7' -dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetylesther 染色した薄切切片を用いて共焦点レーザー顕微鏡を用いたマルチカラー画像解析システムとコンピューター画像解

析システムにて血管壁局所における酸化ストレス量の指標である ROS 含量あるいは H_2O_2 含量をそれぞれ定量評価する。また、腹部大動脈壁の superoxide 産生を lucigenin-enhanced chemiluminescence 法にて測定し、あわせて Tempol にて ROS を SOD で消去できることを確認する。

(3) 腹部大動脈壁における PPAR α と PPAR γ の in vivo における評価：

動脈硬化に関連する主な PPAR は PPAR α と PPAR γ である。アンジオテンシン II (Ang II) で腹部血管壁における PPAR γ の発現が選択的に増加しているのかを確認する目的で、Western blot 法を用いて腹部大動脈壁における PPAR α と PPAR γ の発現を比較評価する。

(4) 腹部大動脈壁における酸化ストレス消去酵素 SOD の in vivo における検討：

酸化ストレスの消去には 3 種類の SOD があるが、なかでも Cu/ZnSOD と ecSOD が重要である。そこで、腹部大動脈壁における Cu/ZnSOD と ecSOD のタンパク発現量を Western blot 法で、また Cu/ZnSOD 活性を SOD-525TM reagent kit (OXIS), ecSOD 活性を Con A-Sepharose chromatography (Pharmacia) を用いてそれぞれ測定する。

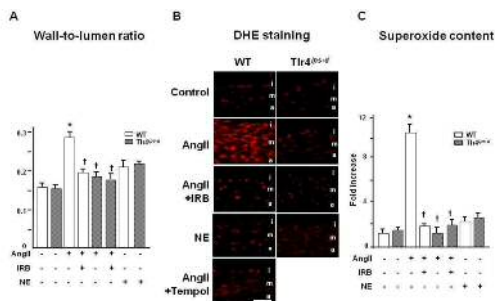
(5) TLR4 による ecSOD 抑制作用が AT1 受容体に依存しているのかを in vivo で検討する：

Ang II が AT1 受容体を介して TLR4 に働き、その結果 TLR4 が PPAR γ あるいは ecSOD の増加を抑制し、酸化ストレスを亢進させているのか、あるいは AT1 受容体を介さずに直接 TLR4 に作用して PPAR γ あるいは ecSOD を抑制することで酸化ストレス産生を亢進させているのかを AT1 受容体拮抗薬を Ang II と併用投与することで明らかにする。

4. 研究成果

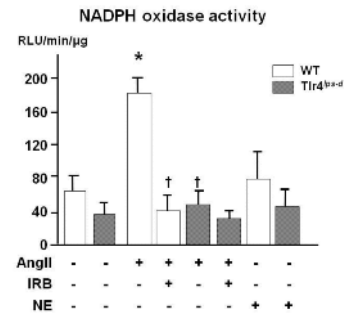
TLR4 欠損マウスおよび野生型 (WT) マウスにアンジオテンシン II およびノルエピネフリンを投与して高血圧負荷モデル群を作成した。また、アンジオテンシン II 受容体タイプ 1 型拮抗薬を、血圧変化を来さない低用量でアンジオテンシン II 投与群に同時投与した群を作成した。コントロールの TLR4 欠損マウスおよび WT マウスでは、血圧、脈拍、体重および血管壁内腔比に有意差はなかった。WT マウスにおいて、アンジオテンシン II はコントロールマウスに対して著しく血管壁内腔比を増加させた。しかし、TLR4 欠損マウスではアンジオテンシン II による血管壁内腔比の増加は惹起されなかった。低用量アンジオテンシン II 受容体タイプ 1 型拮抗薬を投与した WT マウスでは、アンジオテンシン II のみを投与したマウスよりも血管壁内腔比の増加は抑制された。(図 1)

図1



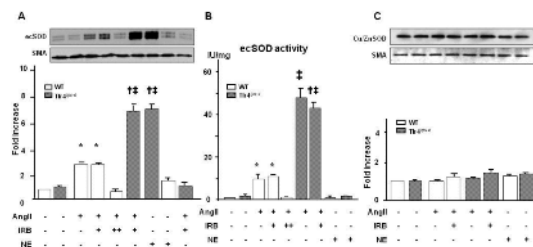
さらに、アンジオテンシン II 投与による活性酸素種の上昇は、TLR4 欠損マウスで著しく抑制された。同様に WT マウスでも、低用量アンジオテンシン II 受容体タイプ 1 型拮抗薬でアンジオテンシン II による活性酸素種の上昇が抑制された。低用量アンジオテンシン II 受容体タイプ 1 型拮抗薬は TLR4 欠損マウスの活性酸素種含量に影響を与えなかった。(図 2)

図2



WT マウスに比べ TLR4 欠損マウスでは、アンジオテンシン II により ecSOD の活性および発現が著しく増強された。(図 3)

図3



一方、アンジオテンシン II あるいはノルエピネフリンにより PPAR γ は全く変化しなかった。以上から、アンジオテンシン II がアンジオテンシン II 受容体タイプ 1 型受容体を介して TLR4 に働き、活性酸素種を増加させて血管再構築を来すが、一方で TLR4 はアンジオテンシン II 受容体タイプ 1 型受容体を介さずに ecSOD の発現と活性を直接抑制することで血管壁における酸化ストレス産生を亢進させて血管再構築を惹起する可能性が示唆された。本実験系において、PPAR γ を介する経路は TLR4 を介する ecSOD 活性化には関与していなかった。

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〕 (計 1 件)

- ① Hashimoto R, Umemoto S, Guo F, Umeji K, Itoh S, Kishi H, Kobayashi S, Matsuzaki M. Nifedipine activates PPARgamma and exerts antioxidative action through Cu/ZnSOD independent of blood-pressure lowering in SHRSP. J Atheroscler Thromb. 2010 Aug 31; 17(8):785-95. 査読有.

〔学会発表〕 (計 25 件)

- ① Nakashima T, Umemoto S, Matsuda S, Okamoto T, Murata T, Yoshimura K, Fukai T, Matsuzaki M. Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 regulates NAD(P)H oxidase-generated oxidative stress and vascular remodeling in angiotensin II-induced hypertension. ESC Congress 2011, 27-31 August 2011, Paris, France.
- ② Matsuda S, Umemoto S, Yoshino H, Nakashima T, Ito S, Aoki H, Yoshimura K, Murata T, Matsuzaki M. Toll-like receptor 4 selectively activates MCP-1 to induce cardiac hypertrophy and dysfunction in angiotensin II-induced hypertension. ESC Congress 2010, 29 Aug - 02 Sep 2010, Stockholm, Sweden.
- ③ Yoshino H, Umemoto S, Matsuda S, Nakashima T, Itoh S, Aoki H, Yoshimura K, Murata T, Fukai T, Matsuzaki M. Toll-like receptor 4 increases oxidative stress by inhibiting the upregulation of extracellular superoxide dismutase in angiotensin II-induced hypertension. ESC Congress

2009, 29 Aug - 02 Sep 2009, Barcelona, Spain.

- ④ Matsuda S, Umemoto S, Yoshino H, Aoki H, Itoh S, Yoshimura K, Murata T, Matsuzaki M. Angiotensin II induces cardiac systolic and diastolic dysfunction via Toll-like receptor 4 mediated upregulation of oxidative stress in murine heart. The American Society of Hypertension, Inc 24rd Annual Scientific Meeting and Exposition, May 6-9, 2009, San Francisco, USA.
- ⑤ Yoshino H, Umemoto S, Matsuda S, Itoh S, Aoki H, Yoshimura K, Murata T, Fukai T, Matsuzaki M. Toll-like receptor 4 augments angiotensin II-induced oxidative stress by inhibiting the upregulation of extracellular superoxide dismutase. The American Society of Hypertension, Inc 24rd Annual Scientific Meeting and Exposition, May 6-9, 2009, San Francisco, USA.

〔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：90263772

(2) 研究分担者

吉村 耕一 (YOSHIMURA KOHICHI)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授(特命)

研究者番号：00322248