

学位の種類

博士

氏名

井澤和眞

学位論文題目

Impaired glutathione redox system paradoxically suppresses angiotensin II-induced vascular remodeling

アンジオテンシンII による血管リモデリングは、グルタチオンレドックス制御の破綻
環境下では逆説的に抑制される

共著者名；長谷部直幸、岡田基、住友和弘、会澤佳昭、川辺淳一、菊池健次郎

未公表

研究目的

心血管リモデリングは、高血圧にともなう臓器障害の主体を成すものであるが、生体の適応機序としての一面も有している。Angiotensin II(AII)は、血圧上昇、血管内皮障害、平滑筋細胞増殖などを介して、心血管リモデリングの過程に中心的役割を果たすと考えられている。NAD(P)H oxidaseの活性化などを介する酸化ストレスの亢進は、病態形成の主要な機序と考えられるが、生体内では内因性の抗酸化機序が常にこれに拮抗し、病態進展を抑制している。主要な内因性抗酸化機序であるグルタチオン(GSH)レドックス制御の破綻は、酸化ストレスを亢進させ様々な病態の背景因子として関与することが知られているが、AIIによる血管リモデリングの過程にGSHレドックス制御の破綻がいかなる影響を及ぼすかはこれまで明らかにされていない。本研究は、カフ傷害による動脈硬化病変モデルを用いて、AIIによる血管リモデリングの促進過程がGSHレドックス制御の破綻による酸化ストレス亢進条件でいかなる修飾を受けるかをはじめて明らかにし、生体の適応と破綻の表現形としての血管リモデリングにおける酸化ストレスの役割を明らかにすることを目的とした。

材料・方法

1. 実験モデルと検討指標

雄Sprague-Dawleyラット(9-10週令、平均体重297g)をペントバルビタール(40 mg/kg)腹腔内投与にて麻酔し、右大腿動脈周囲にポリエチレンチューブ(内径1.14mm、長さ6-8mm)を巻

いてカフ傷害血管を作製した。ラットはangiotensin II (AII; 200 ng/kg/min, 4w 浸透圧ミニポンプ)投薬群(n=14)、GSHの合成阻害薬:buthionine sulfoximine (BSO; 30 mmol/L, 5w po)投薬群(n=14)に分け、薬物を処置しないコントロール(n=7)とAII+BSO併用群(n=7)の4群で比較検討した。AIIはカフ血管傷害と同時に、BSOは血管傷害の1週間前より投与開始し、実験期間中、飲水量、体重、血圧、心拍数を測定した。5週間の実験期間終了時における血漿GSH、全血のGSH/GSSG、CDCFH蛍光プローブ法による好中球の活性酸素種量と産生能の変化を検討した。

2. 血管リモデリングの組織学的検討(組織変化、アポトーシス、酸化ストレス)

胸部下行大動脈、心筋内細動脈、カフ血管障害動脈の各標本を作製し、血管壁厚、新生内膜形成(内膜/中膜比)をヘマトキシリンエオジン染色で評価した。また免疫組織染色にて中膜、新生内膜におけるアポトーシスを抗single-stranded DNA (ssDNA) 抗体を用いて評価した。血管壁におけるsuperoxide産生はdihydroethidium (DHE) 蛍光強度を用いて評価した。

3. 培養細胞を用いた細胞増殖能の検討

5週令のSDラット大腿動脈よりexplant法にて血管平滑筋細胞を培養した。3~6継代の培養細胞の細胞増殖をBrdU Cell Proliferation Assay kitを用いて測定し、コントロール群を100%としてAII, BSO, AII+BSO, GSH monoethyl ester(BSOにより枯渇するGSHの拮抗的補充の目的)各処置の効果を検討した。BSO, GSH monoethyl esterは測定24時間前、AIIは測定12時間前に添加した。

4. 血管壁ストレスの比較

Laplaceの法則に基づく血管壁ストレス(σ_w)を算出し4条件における、平均血圧指標(σ_{cMAP})、収縮期血圧指標(σ_{cSAP})について血管の適応状態を比較検討した。

5. 統計解析

すべてのデータは平均±標準誤差で表示し、 $P < 0.05$ をもって統計学的に有意と判断した。

成 績

1. 血行動態、GSH/GSSG、酸化ストレスの変化

実験期間中、4群間で体重、心拍数に有意差は認められなかった。血圧はAII, AII+BSO群で拡張期、収縮期ともに上昇したが、BSO群では有意な修飾を認めなかった。血漿中GSHはcontrol群; 4.37 ± 0.48 , BSO群; 1.78 ± 0.26 , AII群; 2.46 ± 0.33 , AII+BSO群 $1.88 \pm 0.36 \mu\text{mol/L}$ とAII, BSO負荷ともに減少し、全血中GSHはcontrol群; 1.89 ± 0.13 , BSO群; 1.23 ± 0.05 , AII群; 2.52 ± 0.08 , AII+BSO群 $1.42 \pm 0.10 \text{ mmol/L}$ とBSOにより有意に減少した。好中球のROS産生能はAII単独では影響を受けなかったが、BSO負荷により有意に増加した。大

動脈壁におけるsuperoxide産生はAII群、BSO群ともに増加し、AII+BSO群ではさらに亢進した。

2. BSO負荷による血管リモデリングの抑制

大動脈壁厚はcontrol群 0.60 ± 0.02 に対しAII群 0.83 ± 0.03 mmと増加したが、BSOの併用により 0.73 ± 0.03 mmと有意に抑制された($P < 0.05$)。冠動脈におけるwall/lumen ratioもAIIで増大したが(0.10 ± 0.02 to 0.26 ± 0.03 , $P < 0.01$)、BSO併用により抑制された(0.10 ± 0.01)。カフ傷害4週後における内膜・中膜比はcontrol群 0.15 ± 0.01 に対してAII群 0.28 ± 0.05 とAIIで有意に増大した。BSO単独では 0.11 ± 0.01 でありcontrol群との間に有意差を認めなかったが、AII+BSO群では 0.15 ± 0.02 とAIIによる新生内膜の形成がBSOにより抑制された。

3. アポトーシス

新生内膜のssDNA陽性細胞はcontrol群 0.05 ± 0.01 に対しBSO投与で 0.35 ± 0.05 と有意に増加した($P < 0.01$)。AII投与では 0.02 ± 0.01 と有意差を認めなかったがBSOの併用により 0.26 ± 0.06 と有意に増加した($P < 0.01$)。しかし中膜におけるssDNA陽性細胞数に差は認められず、PCNA陽性細胞数も新生内膜、中膜ともに群間で有意差を認めなかった。

4. 培養平滑筋細胞の増殖能に対するBSOの影響とGSH補充による改善

血管平滑筋細胞の細胞増殖は、AII刺激により 1.3 ± 0.1 倍増加した。BSO単独負荷($1-100 \mu\text{mol/L}$)では細胞増殖自体に影響を認めなかったが、AII刺激下ではBSOの濃度依存性にAIIによる細胞増殖を抑制した($P < 0.01$, $n=11$)。しかしこの抑制は、GSH monoethyl esterの追加投与により完全に復活することからGSH依存性であることが示された。

5. 血管壁ストレスの検討

血管壁ストレスは、平均血圧指標(σ_{cMAP})、収縮期血圧指標(σ_{cSAP})いずれにおいてもAII単独では有意な増加を認めなかったが、BSOの併用により有意な増大を認めた。

考 案

本研究の結果、AIIによって促進される高血圧性の血管リモデリングは、GSHレドックス制御の破綻による酸化ストレスの亢進状態では抑制されることが明らかになった。これは「酸化ストレスの増大は血管リモデリングを促進する」という従来の単純な仮説に反するものである。この興味深い現象は、新生内膜肥厚の抑制と中膜肥厚の抑制という二つの成分によって構成されるものであった。我々は、これらの主なメカニズムとして、少なくとも新生内膜ではアポトーシスの促進、中膜では平滑筋細胞増殖の抑制という別々の機序が発動されていることを明らかにした。

カフ傷害モデルにおける新生内膜肥厚は、動脈硬化の初期病変に類似するものとして各種検討に用いられている。GSHレドックス制御の破綻による酸化ストレス亢進状態でアポトーシスが促進されることは、他のいくつかの細胞系でも報告されており、我々の結果と合致するものである。バルーン傷害血管モデルを用いた以前の研究で、我々は、アポトーシス促進を利用したリモデリ

ングの抑制を血管形成術に応用できる可能性を報告しているが、今回の成績は、内因性の酸化ストレス亢進が同様のメリットをもたらす場合のあることを初めて指摘したものである。

一方、中膜肥厚の抑制は、単に血管リモデリング抑制の好ましい現象とは言えない側面を有している。並行して行った培養細胞での検討から、中膜肥厚の抑制は、平滑筋細胞の増殖抑制によるものであると考えられた。すなわち、BSOによる酸化ストレスの増大は、それ自体では有意な影響をもたらさないものの、AIIによる平滑筋細胞の増殖促進に対して用量依存的な抑制効果を示したのである。さらに、この抑制はGSH monoethyl esterの補充で完全に拮抗解除されることから、GSH依存性の現象と考えられた。現象としては、AIIによる血管リモデリング促進に対する抑制効果と見えるが、適応としての側面がどのようにこの現象に反映されているのかを血管ストレスの面から検討したところ、逆の要素が見出された。AIIでは著明な昇圧が生じるが、血管壁ストレスはcontrolと同程度に維持された。これは中膜肥厚による壁厚増大が昇圧ストレスに拮抗的に作用したものであり、適応現象のひとつの表現と考えられた。一方GSHレドックスの破綻による酸化ストレスの増大は、壁厚増加を抑制したが、血管壁ストレスは著しく増大しており、高血圧に対して一種の適応破綻状態にあるものと考えられた。興味深いことに動脈瘤形成の機序として、AIIと酸化ストレスの関与がともに指摘されており、我々が示した中膜肥厚の抑制はこの機序を裏付ける可能性が考えられた。

総括 ・ 結論

カフ傷害血管モデルにおいて、GSHレドックス制御の破綻による酸化ストレスの亢進は、AIIによる酸化ストレスを相加的に増強したが、新生内膜形成と中膜肥厚の促進という血管リモデリングに特徴的なふたつの現象は、いずれも抑制された。この機序として、前者においてはアポトーシスの促進が、後者においては平滑筋細胞増殖の抑制が主要な機序として関与するものと考えられた。

新生内膜形成の抑制は、動脈硬化初期病変の抑制というメリットをもたらす可能性を示唆したが、中膜肥厚の抑制は、高血圧ストレスに抗し切れない脆弱な血管をもたらす危険性を示唆した。

本研究は、ひとつの病変モデルにおいて、血管リモデリングにおける酸化ストレスの二面性を明らかにしたはじめての報告である。

引用文献

1. Meister A: Selective modification of glutathione metabolism.
Science 1983, 220; 472-477.
2. Aizawa Y, Kawabe J, Hasebe N, Takehara N, Kikuchi K.
Pioglitazone enhances cytokine-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells and reduces intimal hyperplasia.
Circulation. 2001 104; 455-460.
3. Nageswara R, Aleksander Vendov, Marschall S. Runge.
Oxidative Stress and Vascular Disease.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2005 25; 1-11

参考論文

1. Okada M, Hasebe N, Aizawa Y, Izawa K, Kawabe J, Kikuchi K.:
Thermal treatment attenuates neointimal thickening with enhanced expression of heat-shock protein 72 and suppression of oxidative stress.
Circulation. 2004 109; 1763-1768.
2. Ohta T, Hasebe N, Tsuji S, Izawa K, Jin YT, Kido S, Natori S, Sato M, Kikuchi K.
Unequal effects of renin-angiotensin system inhibitors in acute cardiac dysfunction induced by isoproterenol.
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 287: H2914-2921.

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏名	井澤和眞
審査委員長 牛首文隆 ㊞			
審査委員 笹嶋唯博 ㊞			
審査委員 菊池健次郎 ㊞			
学位論文題目			
Impaired glutathione redox system paradoxically suppresses angiotensin II-induced vascular remodeling			
(アンジオテンシンⅡによる血管リモデリングは、グルタチオンレドックス制御の 破綻環境下では逆説的に抑制される)			
<p>心血管リモデリングは、高血圧にともなう臓器障害の主体を成すが、生体の適応機序としての側面を有している。Angiotensin II (AII) は、血圧上昇、血管内皮障害、平滑筋細胞増殖などを介して心血管リモデリングを促進するが、その機序として NADPH oxidase の活性化による酸化ストレスの増大が知られている。一方、AII による血管リモデリングの過程における内因性抗酸化機序であるグルタチオン・レドックス制御の役割は不明である。本研究は、カフェインによるラット頸動脈新生内膜形成モデルと培養血管平滑筋細胞を用い、AII の血管リモデリング促進作用や細胞増殖作用に対するグルタチオン・レドックス制御の影響を解析することにより、血管リモデリングにおける酸化ストレスの役割解明を目指したものである。</p>			

本研究の結果、AIIにより促進される血管リモデリングは、グルタチオンの減少に基づく酸化ストレスの亢進により抑制されることが明らかとなった。この現象には、新生内膜肥厚の抑制と中膜肥厚の抑制という二つの要素が認められ、その機構として新生内膜ではアポトーシスの促進、中膜では平滑筋細胞増殖の抑制が明らかとなった。また、BSOはAIIによる培養血管平滑筋細胞の増殖促進に対してグルタチオン依存的な抑制作用を示した。さらに、AIIは著明に血圧を上昇させたが、中膜肥厚による壁厚増大が大動脈での血管壁ストレスの増加を抑制していた。しかし、グルタチオンの減少による酸化ストレスの増大下では、壁厚増加が抑制されて血管壁ストレスの著しい増大を招いた。これらの結果、グルタチオン・レドックス制御の阻害はAIIによる新生内膜形成の抑制というメリットをもたらすと同時に、高血圧ストレスへの血管の適応を阻害するデメリットを示すことが明らかとなった。

今回の成績は、内因性抗酸化機序の阻害がAIIの血管リモデリング促進作用を抑制することを初めて明らかにしたものである。また、この機構が血管形成術に応用できる可能性を示唆するものであり、その意義は大きいと考えられる。

なお、論文提出者に対し各審査委員より、本論文とその関連領域に関して試問が行われ、適切な回答が得られた。

以上より、本論文は博士の学位論文として適切であると判定した。