

ずり応力誘発性動脈硬化進展過程における内皮細胞・活性酸素種産生酵素 Nox4 の役割解明

吾郷哲朗

九州大学病院 腎・高血圧・脳血管内科

【研究の背景】

活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)は、生体における種々の病態を修飾する重要な因子である。健常状態において ROS は主としてミトコンドリア電子伝達系からの副産物として産生される。一方、病態下ではミトコンドリア以外の酵素からも ROS は産生されており、NADPH oxidase(Nox)はその代表的 ROS 産生酵素である。Nox には 5 つのホモログ・タンパク質(Nox1~5)が存在する¹⁾。このうち Nox4 が心血管系細胞に強く発現し²⁾、心血管病の病態を修飾することを我々はこれまでに報告してきた³⁻⁶⁾。これらの成果から得られた興味深い点の一つは、Nox4 が単に病態悪化に寄与するだけではなく、病態によっては有益な作用を発揮するという点である。ゆえに、病態ごとに Nox4 を介した ROS 産生が果たす役割を検討し、臨床応用を慎重に考慮する必要がある。

【目 的】

Ross の傷害反応仮説に従えば、内皮細胞機能障害は粥状硬化発症の起点となる。ROS は内皮機能障害を引き起こす重要な因子の一つであることから、内皮細胞に発現する ROS 産生酵素 Nox4 が病態の発症進展に寄与する可能性がある。今回、ずり応力によって誘発される粥状硬化の進展過程に内皮細胞 Nox4 がどのような影響を及ぼすか検討する。

【方 法】

- 1) マウス頸動脈狭窄モデルを用いた内皮細胞 Nox4 の意義についての検討
アメロイド・コンストリクターと呼ばれる緩徐体液吸収による血管狭窄器具をマウス総頸動脈に約 2 週間装着し、局所血流動態を変化(Shear stress を発生)させ、ずり応力の変化に伴う新生内膜形成・炎症細胞浸潤(=動脈硬化)を誘導した。このモデルに、i) Tie2 プロモーターによる内皮細胞特異的 Nox4 過剰発現マウス(Tg-EC-Nox4)、ii) Nox4 ノックアウトマウス(Nox4 KO)を用いて、内皮細胞 Nox4 が表現型に与える影響について免疫組織学的に評価した。
- 2) 内皮細胞 Nox4 の発現変化が新生内膜形成・炎症細胞浸潤に及ぼす効果についての分子細胞機序の検討
培養内皮細胞を用いて、低酸素(1% O₂)刺激および Nox4 過剰発現を行い、生じる細胞内シグナル伝達や遺伝子発現(サイトカイン、接着因子、内皮生存・増殖因子)変化を real-time PCR や immunoblot で検討した。

【結 果】

- 1) マウス総頸動脈にアメロイド・コンストリクター(径 0.5mm)を装着し血管狭窄を生じさせると、約 2 週間の経過で狭窄近位側(心臓側)に新生内膜形成と炎症細胞浸潤を認めた。これらの組織変化は Tg-EC-Nox4 で有意に亢進し、Nox4 KO で有意に抑制されていた。すなわち内皮細胞における Nox4 の発現変化は、ずり応力の変化に伴う新生内膜形成・動脈硬化の進展に影響を及ぼしうることが示唆された。
- 2) アデノウイルスを用いて Nox4 を培養内皮細胞に強制発現させると、CXCL8(内皮増殖因子)および CXCR4(内皮遊走因子に対する受容体)の発現は有意に増加したが、CXCL2/3(好中球遊走ケモカイン)および ICAM-1/VCAM/E-selectin(内皮細胞における炎症細胞接着因子)の発現は有意に抑制されていた。一方 Nox4 は低酸素によって発現誘導されるタンパク質であることから、1%低酸素に対するこれらの因子の発現変化を観察すると、Nox4 を含め検討した上記すべての

因子において有意な発現増加を認めた。

【考 察】

Nox4 は内皮細胞における主たる ROS 産生酵素であり²⁾、本動物実験の研究成果からも血管狭窄部におけるずり応力変化に伴う動脈硬化病変の進展に促進的に作用することが示唆された。そこで Nox4 を介した ROS 産生は炎症細胞浸潤を介した更なる局所 ROS の産生を促進する可能性を考慮したが、細胞・分子レベルの検討によると、内皮細胞における Nox4 の発現増加は主として内皮細胞自身の生存・増殖・遊走に寄与しているようであり、内皮細胞への炎症細胞接着や遊走に関してはむしろ抑制的に作用する可能性が示唆された。近年、粥状硬化病変の発症進展における血管壁内低酸素応答が注目されている。血管壁・低酸素応答により炎症細胞の接着・遊走が誘導されるが、同時に発現誘導される内皮細胞 Nox4 は過剰な炎症細胞浸潤を抑制しながら、主として内皮細胞自身の生存や血管新生応答に寄与している可能性があると考えられた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

動脈硬化の発生・進展に ROS が関与することはほぼ間違いない事実であり、ROS 抑制による動脈硬化進展予防治療の可能性が模索されている。しかしながら本研究成果からも示唆されるように ROS の病態への関与は多様かつ複雑であり、更なる病態解明が不可欠であることが改めて示唆された。

【参考・引用文献】

1. Ago T, et al. Pathophysiological roles of NADPH oxidase/nox family proteins in the vascular system. -Review and perspective. *Circ J* 75:1791-1800, 2011
2. Ago T, et al. Nox4 as the major catalytic component of an endothelial NAD(P)H oxidase. *Circulation* 109:227-233, 2004
3. Ago T, et al. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ Res* 106:1253-1264, 2010
4. Chen L, Ago T, et al. Both hydrogen peroxide and transforming growth factor beta 1 contribute to endothelial Nox4 mediated angiogenesis in endothelial Nox4 transgenic mouse lines. *Biochim Biophys Acta* 1842:2489-2499, 2014
5. Tong X, Ago T, et al. Role of smooth muscle Nox4-based NADPH oxidase in neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol* 89:185-194, 2015
6. Nishimura A, Ago T, et al. Detrimental role of pericyte Nox4 in the acute phase of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 36:1143-1154, 2016