

冠動脈疾患病態形成における血管炎症とBDNFの重要性

井上 信孝^{*} 横山 光宏

要 旨: 動脈硬化は、内皮傷害からはじまる炎症性疾患である。炎症巣においては酸化ストレスが亢進しており、LDLの酸化的修飾、NOの不活化、VCAM、ICAMのようなレドックス感受性遺伝子の発現亢進を介して、動脈硬化の進展に深く関与している。ヒト冠動脈においては、NAD(P)H oxidaseが、その発現増強により局所的な酸化ストレスの増大を来す。さらに、血管床には、C-Reactive protein(CRP)が発現しており、この血管CRPが、その直接的な作用として、血管炎症に関与している。一方、精神的ストレス下では、さまざまな神経ペプチドの発現増強、神経体液性因子の分泌亢進が生じる。本稿では、精神的ストレスによってその発現が変動する因子のなかで、brain-derived neurotrophic factor(BDNF)に注目し、酸化ストレスと炎症性機転の観点から、冠動脈疾患病態形成における血管炎症とBDNFの重要性について、われわれの最近の知見を含めて概説する。(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 423-428)

Key words: oxidative stress, NAD(P)H oxidase, neurohumoral factor, mental stress, coronary heart disease

はじめに

動脈硬化は、内皮傷害からはじまる炎症性疾患であることは、高感度C-reactive protein(CRP)が心血管病の独立した重要な危険因子であることから裏付けられる。一方、動脈硬化を基盤とした急性冠症候群の発症には、高脂血症、高血圧、喫煙などの冠動脈危険因子が重要な役割を果たしていることは言うまでもないが、それに加えて、精神的ストレスがその発症に深く関わっている。われわれは1995年、阪神淡路大震災を経験し、震災後に虚血性心疾患の発症が増加したことを経験した。その一因として、災害による慢性的な精神的ストレスが大きな要因となっていることが推察された。最近、天災、人災が多く報道され、これらの災害後の慢性的なストレスに起因する心血管病発症の増大が危惧される。慢性的な精神的ストレスは、生体において視床下部 - 交感神経 - 副腎髄質系と視床下部 - 下垂体前葉 - 副腎皮質系を活性化させ、内分泌系、神経系、免疫系などに対してさまざまな反応を引き起

こす。また、精神的ストレスを負荷した動物においては血中の過酸化脂質の上昇が認められることや、ストレス負荷後に単離した白血球では活性酸素の産生が増強することが報告されており、酸化ストレスと精神的ストレスとがクロストークしていることが示唆されている。さらに、Huangらは、アポE欠損マウスに拘束による精神的ストレスを負荷することにより血中のinterleukin- α (IL-6)が上昇し、mast cellの活性化が生じることを示した。このように、精神的ストレスは、炎症性機転にも影響を及ぼすと考えられる¹⁾。

これまで、精神的ストレスと心血管病の成因は、主に視床下部 - 交感神経 - 副腎髄質系と視床下部 - 下垂体前葉 - 副腎皮質系から説明がなされている。しかしながら、精神的ストレス下では、さまざまな神経体液性因子の発現動態がダイナミックに変化する。われわれは今回、これらの因子のなかでbrain-derived neurotrophic factor(BDNF)に注目して、酸化ストレスと炎症性機転の観点から、冠動脈疾患成因における重要性を検討した。本稿では、われわれがこれまでに明らかにしてきた冠動脈疾患と酸化ストレスの知見とともに、これら

神戸大学大学院医学系研究科循環呼吸器病態学

^{*}現 国立循環器病センター研究所脈管生理部

2005年 6月30日受理

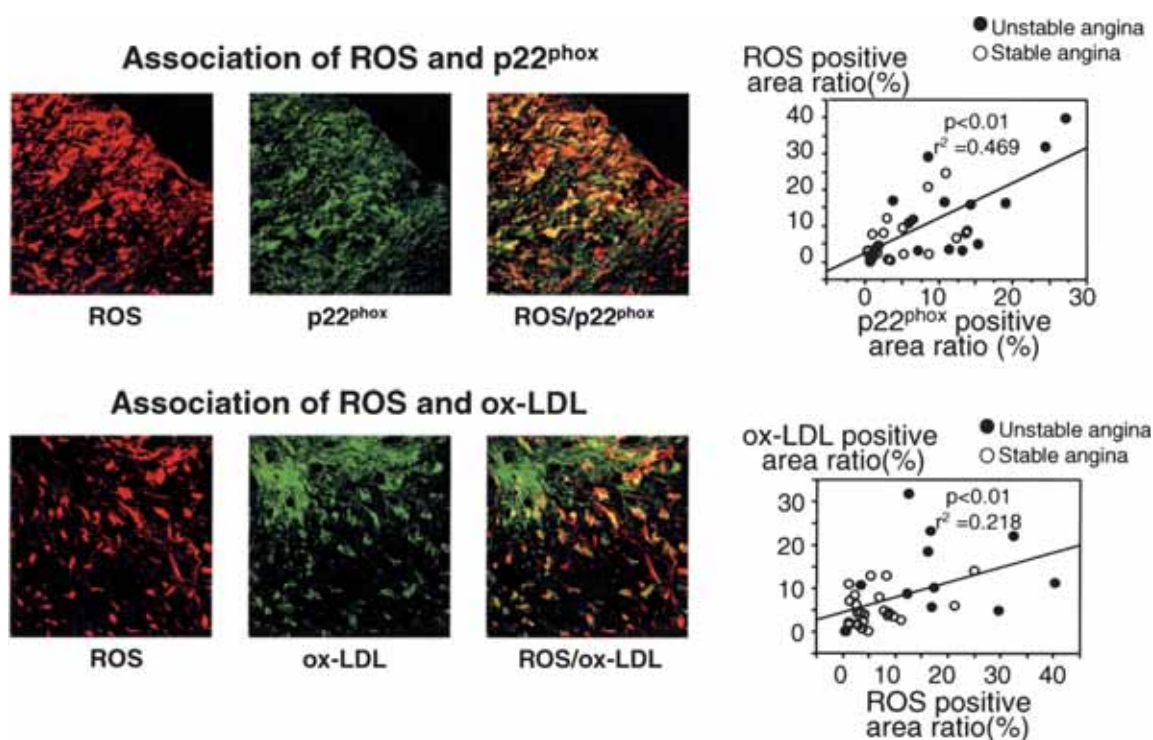


Figure 1 Double staining to show association between ROS and p22^{phox}, or oxidized LDL (ox-LDL). Upper panels show double labeling of ROS and p22^{phox}. Lower panels show double labeling of ROS and ox-LDL. Red fluorescence signals show *in situ* ROS generation detected by dihydroethidium fluorescence microtopography. Green signals show immunofluorescence of p22^{phox} and ox-LDL. Co-localization of ROS and immunofluorescence is shown by yellow labeling. There was a considerable overlapping of ROS and p22^{phox}. Similarly, the distribution of ox-LDL was partially associated with the generation of ROS. Figure on the right side shows semi-quantitative analysis to indicate the correlation of ROS-positive cells with the expression of p22^{phox}. Correlation of ROS-positive cells with the distribution of ox-LDL. Closed and open circles indicate UAP and SAP, respectively.

ROS: reactive oxygen species, LDL: low-density lipoprotein, UAP: unstable angina pectoris, SAP: stable angina pectoris

文献 2 より改変のうえ転載。

の最近の結果を紹介する。

酸化ストレスとNAD(P)H oxidase

血管での酸化ストレスは、LDL(low-density lipoprotein: 低比重リポ蛋白)の酸化的修飾, NOの不活化, レドックス感受性遺伝子の発現亢進を介して, 動脈硬化の進展に重要な役割を果たしている。活性酸素の産生源は, 単一ではなく, 組織, 細胞種, 病態によって異なるが, 病的血管では, NAD(P)H oxidaseが活性酸素種の産生源として重要な役割を果たしている^{2,3}。NAD(P)H oxidaseは, 膜分画に存在するgp91^{phox}, p22^{phox}, 細胞質分画に存在するp47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, およびsmall G proteinであるracから構成されているが, 最近, さまざまな組織でgp91^{phox}のホモログがクローニングされ, こ

れらは, Nox(NADPH oxidase)DUOXと呼ばれる。細胞質コンポーネントであるp47^{phox}, p67^{phox}のホモログとしてp41^{nox}, p51^{nox}が同定された。今後, これら新しい細胞質調節蛋白の活性化機構, 病態における意義の解明が待たれる。

われわれは, 虚血性心疾患の病態におけるNAD(P)H oxidaseを介した酸化ストレスの役割を検討する目的で, directional coronary atherectomy(DCA)を施行した狭心症患者の冠動脈片を用いて, 活性酸素産生の主要な産生源であるNAD(P)H oxidase p22^{phox}の発現様式, および酸化LDLの局在を検討した²。活性酸素は, dihydroethidium蛍光法にて検討した。Fig. 1で示すように, DCA冠動脈片における活性酸素は, p22^{phox}発現および, 酸化LDLの局在と相関していた(Fig. 1)。この結

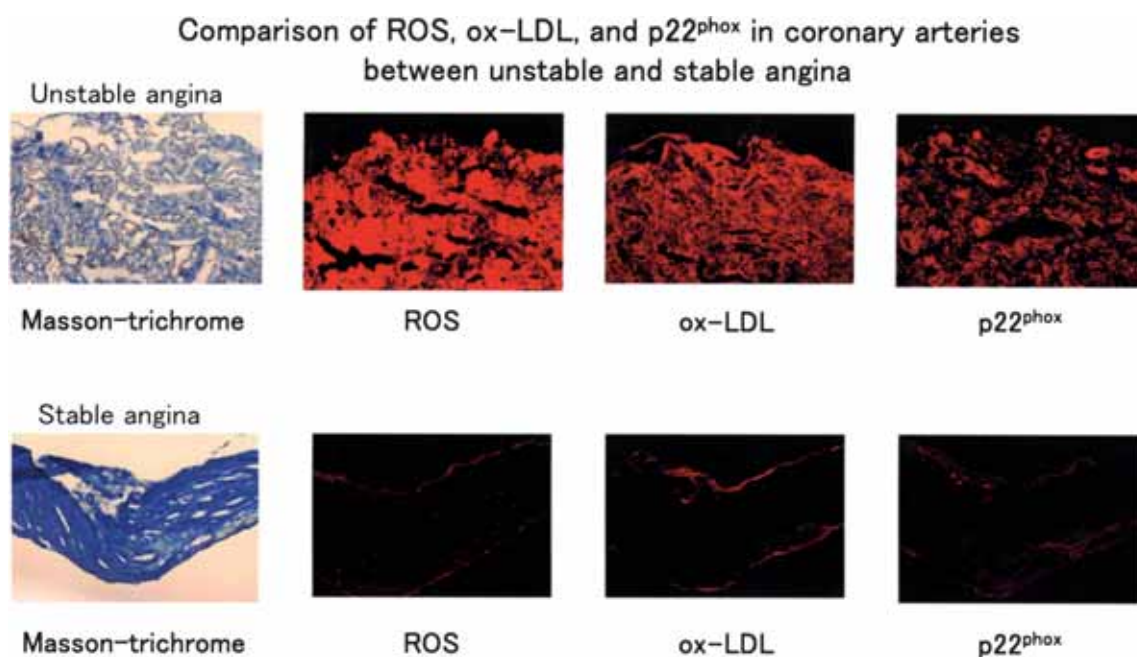


Figure 2 Immunohistochemical examinations of DCA specimens. Upper panels are examinations of DCA specimen containing hypercellular lesion from a patient with UAP. Lower are those with much fibrous tissues of a patient with SAP.

文献2より改変のうえ転載。

果は、冠動脈床において、NAD(P)H oxidaseによって産生された活性酸素がLDLの酸化的修飾に深く関わっていることを示唆する。さらに、不安定狭心症患者からのDCA標本における活性酸素、酸化LDLおよびp22^{phox}の発現は、安定狭心症に比べていずれも増強していた (Fig. 2)。これらの所見から、NAD(P)H oxidase p22^{phox}系を介した活性酸素が、局所的な酸化ストレスの増大を来し、粥腫の不安定化に寄与していると推察された。

血管炎症と血管CRP

Pentraxin familyに属するCRPは、肺炎球菌のC-polysaccharideのphosphochine残基に結合する蛋白として同定された。CRPは、急性炎症に伴って、その転写活性が劇的に増加することから、急性反応性蛋白、炎症指標として、一般的に用いられている。CRPは、菌体成分、あるいはアポトーシスに陥った細胞の膜成分に結合することにより、これらの排除を促し生体防御に関わっている。高感度CRP測定の普及により、血中CRP濃度が心血管病の重要な危険因子であることが示され、CRPの重要性が再確認されている。CRPに関する

Table 1 Biological activity of C-reactive protein

Adhesion molecule expression VCAM-1, ICAM, E-selectin
Chemoattractant expression MCP-1
eNOS
Plasminogen activator inhibitor-1 expression
Angiotensin type1 receptor
Production of ROS
Endothelium-independent relaxation

研究も精力的に行われており、最近CRPに関する重要な事が明らかとなった。すなわち(1)肝外組織におけるCRPの産生、(2)CRPの持つ生理活性である。これまで、CRPは肝臓で産生されるとされていたが、最近、血管、腎臓、神経組織などの肝外組織でも産生されていることが明らかとなった⁴⁻⁶⁾。また、これまでCRPは、単なる炎症マーカーとしてしか認識されていなかったが、CRP自体がTable 1に挙げるようなさまざまな

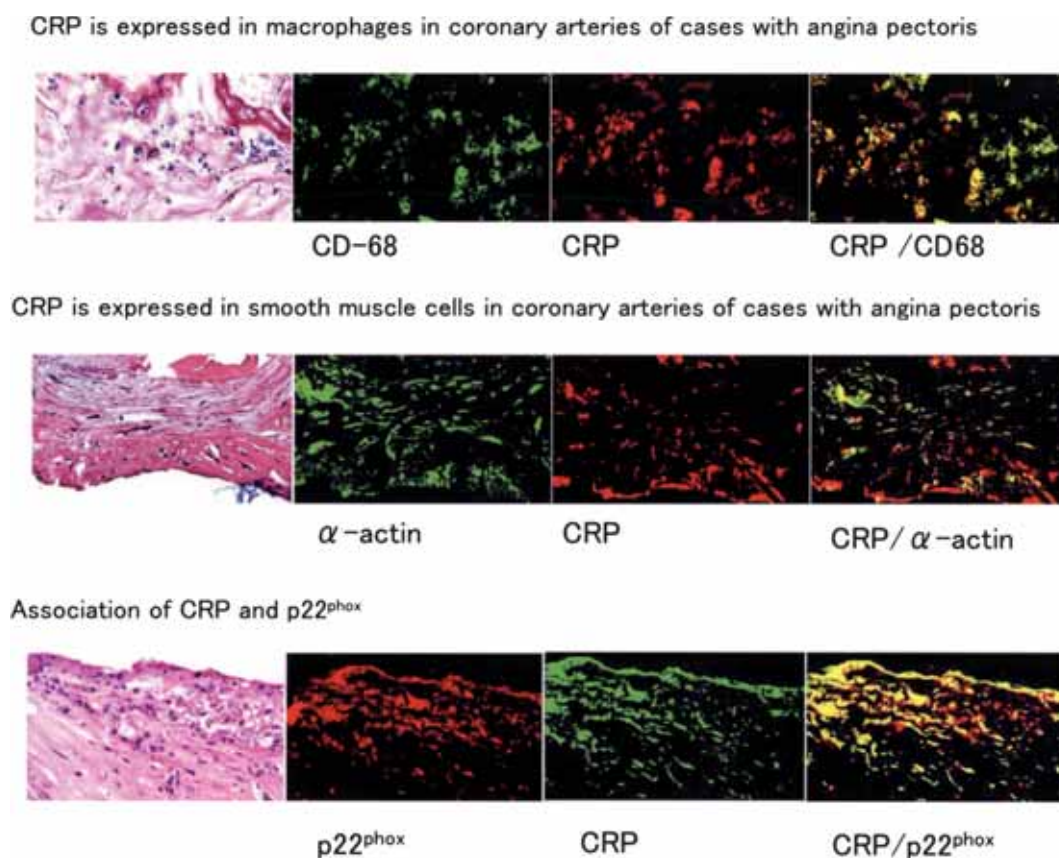


Figure 3 Upper and middle panels: Double labeling immunofluorescence of CRP and cell markers. Green fluorescence signals show cell markers, anti-CD68 antibody for macrophages (upper panels) and anti α -actin antibody for SMCs (lower panels). Red fluorescence signals show the immunoreactivity of CRP. Colocalization of cell markers and CRP signals are shown by yellow fluorescence. Lower panels: Double labeling immunofluorescence to show the association of CRP and NADH/NADPH oxidase p22^{phox}. Red fluorescence signals show the immunoreactivity of p22^{phox}. Green fluorescence signals show the expression of CRP. Co-localization of p22^{phox} and CRP signal is shown by yellow fluorescence.

文献 7 より改変のうえ転載 .

まな生理活性を持つことが明らかとなり、CRPは単なるマーカーではなく、それ自体が直接的に炎症性機転に働いていると考えられる。

われわれは、虚血性心疾患の病態におけるCRPの役割を検討するために、DCAによって得られた虚血性心疾患患者の冠動脈片を用いた検討を行った。Fig. 3で示すように、ヒト冠動脈においてもCRPの発現が認められ、それは、平滑筋細胞およびマクロファージの細胞マーカーとその局在がオーバーラップしていた⁷⁾。興味深いことに、この血管CRPの発現は、NAD(P)H oxidaseの発現と近接していた(Fig. 3)。また、培養冠動脈平滑筋細胞にCRPを負荷すると、濃度依存性に活性化

素の産生が増強した(Fig. 4)。これらの所見から、CRPは単なる炎症マーカーとしてではなく、血管細胞自身がCRPを産生し、NAD(P)H oxidase系にて、局所的な酸化ストレスの増大を来し、冠動脈疾患の病態形成に重要な役割を果たしていると推察される。

BDNFと虚血性心疾患 精神的ストレスとのクロストーク

BDNFは、神経細胞の分化、発生、維持に本質的な役割を果たしている神経ペプチドである。これまでの報告で、精神的ストレス下では、その発現がダイナミックに変化することが示されている。また、BDNF、

Effect of CRP on ROS production in cultured human coronary smooth muscle cells

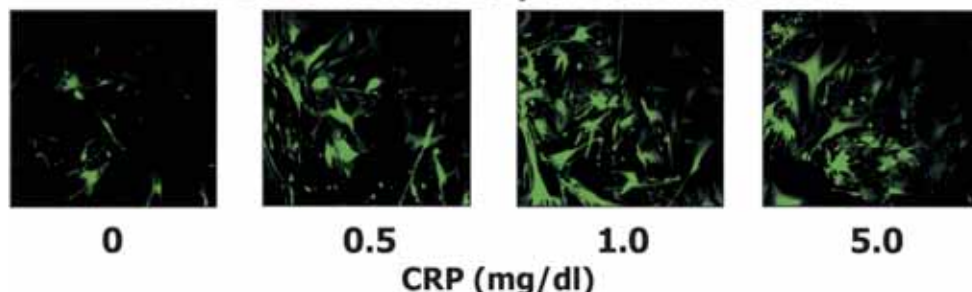


Figure 4 Effects of CRP on intracellular H_2O_2 concentration. CRP increased the generation of H_2O_2 in a dose-dependent manner assessed by the H_2DCFDA method.

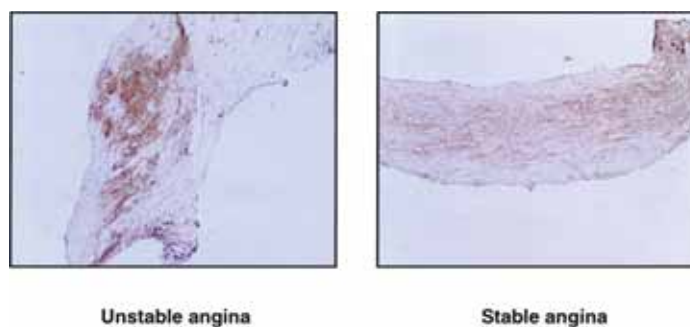


Figure 5 Expression of BDNF in human coronary arteries.

およびその受容体 trk family, $p75^{NTR}$ の発現は心血管系にも認められ、内膜肥厚との関連が指摘されている⁸⁾。ごく最近、血管新生において、BDNFが重要な役割を果たしていることが示されたが⁹⁾、心血管病の病態形成の役割に関しては十分明らかにされていない。そこでわれわれは、虚血性心疾患の病態におけるBDNFの重要性を検証するために、患者の冠静脈洞および、大動脈起始部のBDNFの濃度格差を測定することにより、冠循環特異的なBDNFの産生を検討した。不安定狭心症例では、安定狭心症、非冠動脈疾患に比べて、有意にBDNFの冠循環での産生が亢進していた。DCAにて得られた冠動脈片を用いた免疫組織学的な検討でも、不安定狭心症例では、安定狭心症例に比べてBDNFの冠動脈での発現が増強していた(Fig. 5)。また、培養冠動脈平滑筋細胞を用いた検討では、BDNFは、NAD(P)H oxidase を活性化し、活性酸素の産生を

亢進させた。

血管床の酸化ストレスの増大には、NAD(P)H oxidase が重要な役割を果たしている。また、精神的ストレスによって、その発現が大きく変動するBDNFが、NAD(P)H oxidase を介して酸化ストレスを増強させ、急性冠症候群の発症に関与している可能性がある。このように、精神的ストレスと、酸化ストレスは、神経体液性因子を介してクロストークしていると推察される。

冠動脈疾患における炎症の重要性

Russell Rossが提唱した「response to injury説」の本質は今なお生き続けている。これまで炎症性マーカーであるとしか考えられてなかったCRPが、それ自身が持つpro-inflammatoryな作用を介して、積極的に病態形成に関与している。また、神経ペプチドが血管細胞に働きかけて、血管機能を制御する可能性がある。さら

にまた，さまざまな分野で炎症性機転，組織修復機構が細胞生物学的，分子生物学的に明らかにされつつあり，こうした研究のなかで，動脈硬化を基盤とした心血管病を炎症性疾患ととらえた新たな治療法，診断法の開発を期待したい。

文 献

- 1) Huang M, Pang X, Karalis K et al: Stress-induced interleukin-6 release in mice is mast cell-dependent and more pronounced in Apolipoprotein E knockout mice. *Cardiovasc Res*, 2003, **59**: 241–249.
- 2) Azumi H, Inoue N, Ohashi Y et al: Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22**: 1838–1844.
- 3) Ejiri J, Inoue N, Tsukube T et al: Oxidative stress in the pathogenesis of thoracic aortic aneurysm: protective role of statin and angiotensin II type 1 receptor blocker. *Cardiovasc Res*, 2003, **59**: 988–996.
- 4) Yasojima K, Schwab C, McGeer EG et al: Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*, 2001, **158**: 1039–1051.
- 5) Jabs WJ, Logering BA, Gerke P et al: The kidney as a second site of human C-reactive protein formation *in vivo*. *Eur J Immunol*, 2003, **33**: 152–161.
- 6) Yasojima K, Schwab C, McGeer EG et al: Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 2000, **887**: 80–89.
- 7) Kobayashi S, Inoue N, Ohashi Y et al: Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23**: 1398–1404.
- 8) Kraemer R: Reduced apoptosis and increased lesion development in the flow-restricted carotid artery of p75^{NTR}-null mutant mice. *Circ Res*, 2002, **91**: 494–500.
- 9) Kermani P, Rafii D, Jin DK et al: Neurotrophins promote revascularization by local recruitment of TrkB⁺ endothelial cells and systemic mobilization of hematopoietic progenitors. *J Clin Invest*, 2005, **115**: 653–663.

Vascular Inflammation in Pathogenesis of Coronary Artery Disease —Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor—

Nobutaka Inoue and Mitsuhiro Yokoyama

Division of Cardiovascular and Respiratory Medicine, Department of Internal Medicine,
Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan

Key words: oxidative stress, NAD(P)H oxidase, neurohumoral factor, mental stress, coronary heart disease

Oxidative stress plays an essential role in pathogenesis of atherosclerotic vascular diseases via various mechanisms including endothelial injury, the oxidative modification of LDL, up-regulation of redox-sensitive genes, and imbalance of MMP and TIMP. Among various potential origins of reactive oxygen species (ROS), it has now become evident that NAD(P)H oxidase is the most important enzymatic system in vessel walls. Recently, we demonstrated that C-reactive protein (CRP) is expressed in atherosclerotic coronary arteries, and that it up-regulated the expression of NAD(P)H oxidase p22^{phox}. Thus, the interaction of CRP and NAD(P)H oxidase contributes to pathogenesis of coronary artery disease.

On the other hand, psychological stress alters the expression of various neuro-humoral factors including brain-derived neurotrophic factor (BDNF). It is reported that BDNF is expressed in cardiovascular system; however, their significance in cardiovascular disease remains unclear. We found that coronary circulation-specific production of BDNF increased in unstable angina. In this review, we discuss the interaction of vascular inflammation and oxidative stress in pathogenesis of coronary artery disease focusing on BDNF. (J Jpn Coll Angiol, 2005, **45**: 423–428)