

抗酸化フラボノイドとアルドステロン拮抗薬の動脈硬化抑制作用

吉栖 正典

要 旨: 本総説では、抗酸化フラボノイドの一つ、ケルセチンと新しい選択的鉱質コルチコイド受容体拮抗薬、エプレレノンの動脈硬化抑制作用について概説する。ケルセチンは、アンジオテンシンII刺激による培養血管平滑筋細胞の肥大を抑制した。またアルドステロンによる培養血管平滑筋細胞増殖作用がエプレレノンによって抑制された。これらの薬物による細胞内分子機構の研究によって、新規薬物の開発、新規適応症への拡大が期待される。

(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 649-654)

Key words: atherosclerosis, bioflavonoid, quercetin, aldosterone antagonist, eplerenone

はじめに

近年の細胞内情報伝達研究や分子生物学研究の発展によって、酸化ストレスがさまざまな疾病の病態生理に深く関わっていることが明らかになってきた。酸化ストレスは炎症、癌、変性などを基盤とする病態のみならず、発生、分化、増殖、老化などの生理現象にも深く関わっていることが明らかにされつつある。近年、動脈硬化の発症や進展に酸化ストレスが関与しているという説¹⁻³が有力になってきており、抗酸化作用をもつ薬物あるいは食品の動脈硬化予防効果が検討されている。本総説では、抗酸化フラボノイドの一つ、ケルセチンと新しい選択的鉱質コルチコイド受容体拮抗薬、エプレレノンの動脈硬化抑制作用について概説する。

酸化ストレスと動脈硬化

生体内で酸化ストレスの主体となって働く分子は酸素を含んだフリーラジカルである活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) である。ROSとは、一般にスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) と、 H_2O_2 (非ラジカル) も含んだ一群の酸素種を指す。このほか、広義には内皮由来の血管拡張因子、一酸化窒素ラジカル (NO^{\cdot}) や過酸化脂質なども含まれる。最近の

研究によると、心血管系では血管平滑筋細胞、内皮細胞や心筋細胞などでROSが産生されることが報告されている¹⁻³。動脈硬化の発症や進展に關与する血管平滑筋細胞でのROS産生系の主役として、NAD(P)Hオキシダーゼが近年注目を集めている^{2,4}。NAD(P)Hオキシダーゼはmulti-subunitの酸化酵素で、PDGF (platelet-derived growth factor) などの増殖因子やアンジオテンシンII、エンドセリンなどの脈管作動物質などで活性化されることが報告されている。血管平滑筋細胞でNAD(P)Hオキシダーゼの構成subunitの一つp22phoxの発現をアンチセンス法で抑制すると、アンジオテンシンII刺激によるスーパーオキシド産生が有意に抑制されることから、p22phoxは血管平滑筋細胞でのROS産生に重要な役割を果たしていることが示唆されている⁵。さらに最近、食細胞系NAD(P)Hオキシダーゼの細胞膜subunitの一つのgp91phoxのホモログであるnox-1がクローニングされた⁶。このnox-1は血管平滑筋細胞に発現していることが確認されており、さらにnox-1においてgp91phoxの機能部位であるフラビン結合部位とヘム結合部位が完全に保存されている⁷。nox-1のアンチセンスを血管平滑筋細胞にトランスフェクションさせると、アンジオテンシンII刺激によるスーパーオキシド産生と血清刺激による細胞増殖作用が抑制される^{6,8}ことからnox-1も血管平滑筋細胞でのNAD(P)Hオキシ

ダーゼの構成subunitとして機能していることが示唆される。最近の報告では、アンジオテンシンIIを介した高血圧がnox-1のノックアウトマウスで抑制されていたという実験結果から、nox-1の高血圧への関与も示唆されている⁹⁾。われわれの検討でも、培養血管平滑筋細胞において、酸素電極を用いてアンジオテンシンII刺激によるROS産生を測定すると、酸素消費量の増加からROS産生の促進が示唆され、抗酸化剤の投与によってこれが阻害されることが確認された¹⁰⁾。

酸化ストレスによるMAP kinase活性化

Mitogen-activated protein(MAP)kinasesは、細胞の分化や増殖、アポトーシスなどに深く関わっているセリン/スレオニンリン酸化酵素である。現在のところ、ERK(extracellular signal-regulated kinase)1/2, JNK(c-Jun N-terminal kinase)SAPK(stress activated protein kinase), p38, big MAP kinase1(BMK1)ERK5の4つのファミリーに分けられている。最近ではこれら4つのMAP kinaseのすべてが酸化ストレスに感受性があることが明らかにされつつある^{1,3)}。われわれも、培養ラット大動脈平滑筋細胞において、過酸化水素(H₂O₂)刺激によってERK1/2, JNK, p38の3つのMAP kinaseが速やかにかつ強力に活性化されるのを見いだした¹¹⁾。また、培養PC12細胞を用いた検討で、第四のMAP kinase, BMK1が酸化ストレスによって活性化され、細胞死の誘導に対して防御的に働いていることを確認した¹²⁾。MAP kinaseの活性化は、その下流にある種々のタンパク質リン酸化酵素や転写因子の活性化を導き、細胞の分化や増殖、アポトーシスなどの形質の変換につながる事が知られている。事実われわれも、血管収縮性ペプチドのエンドセリンが培養ヒト冠動脈平滑筋細胞でERK1/2を活性化させ、転写因子activator protein-1の活性化を介して細胞増殖を引き起こすことを見いだしている¹³⁾。また、昇圧ペプチドのアンジオテンシンIIも、培養ラット大動脈平滑筋細胞の肥大や遊走の促進を引き起こすことも確認している^{14,15)}。

ケルセチンの動脈硬化予防作用

われわれはこの数年、抗酸化剤の動脈硬化予防作用について研究を行ってきた。その結果、培養血管平滑筋細胞においてフラビン含有酵素阻害剤のDPI(diphenylene iodonium), 細胞内の還元型グルタチオン

供与体のN-アセチルシステイン(NAC), 水溶性ビタミンEアナログのTrolox C, ビタミンC(ascorbic acid)などがアンジオテンシンIIによるJNK, p38活性化を抑制することを見いだした¹⁰⁾。バイオフィラボノイドは植物性食品に広く分布する一連の色素群であるが、その構造的特徴からフラボノール, フラバノール, フラバノン, フラボン, アントシアニン, およびイソフラボンに大別される。ケルセチン(quercetin)は野菜中に普遍的にみられる典型的なフラボノール型フラボノイドで抗酸化作用をもつ。われわれは最近、このケルセチンが、培養血管平滑筋細胞でのアンジオテンシンII刺激によるJNK活性化と細胞肥大を特異的に抑制することを見いだした(Fig. 1)⁴⁾。その細胞内機構として、アダプター蛋白Shcのチロシンリン酸化と, phosphatidylinositol 3-kinase(PI3-K)の活性化が関与していることが示唆された。しかしケルセチンは、腸管で吸収され血中に現れる時にはグルクロン酸抱合型になっていることが最近明らかになった¹⁶⁾。そこでわれわれは、ケルセチングルクロン酸抱合型を化学合成し、ケルセチンによる血管平滑筋細胞肥大抑制効果と比較した。その結果、ケルセチングルクロン酸抱合型はケルセチンと同程度のアンジオテンシンII刺激によるJNK活性化阻害効果と細胞肥大抑制作用を示した(Fig. 2)⁷⁾。臨床的には大規模臨床試験で、抗酸化薬の心血管病予防効果¹⁸⁾とそれに相反する結果¹⁹⁾が混在し、controversialな争点になっている。今後も抗酸化剤の動脈硬化予防作用の研究報告が集積していくであろうが、薬物であろうと食品成分であろうと、その吸収・分布・代謝・排泄を考えた *in vivo* formを用いた実験による検討が重要性を増してくるものと思われる。

選択的鉱質コルチコイド受容体拮抗薬、エプレレノンの動脈硬化抑制作用

アンジオテンシンIIによる刺激は、副腎でのアルドステロンの産生、分泌を誘導する。アルドステロンは腎臓の遠位尿細管に存在する鉱質コルチコイド受容体に作用してナトリウムと水の代謝を調節するホルモンであるが、近年その強力な組織障害作用が報告されるようになってきた^{20,21)}。アルドステロンが細胞質に存在する鉱質コルチコイド受容体に結合すると、その複合体が標的遺伝子の5'上流の特異的塩基配列を認識して結合し、遺伝子発現誘導を介して蛋白合成を促進す

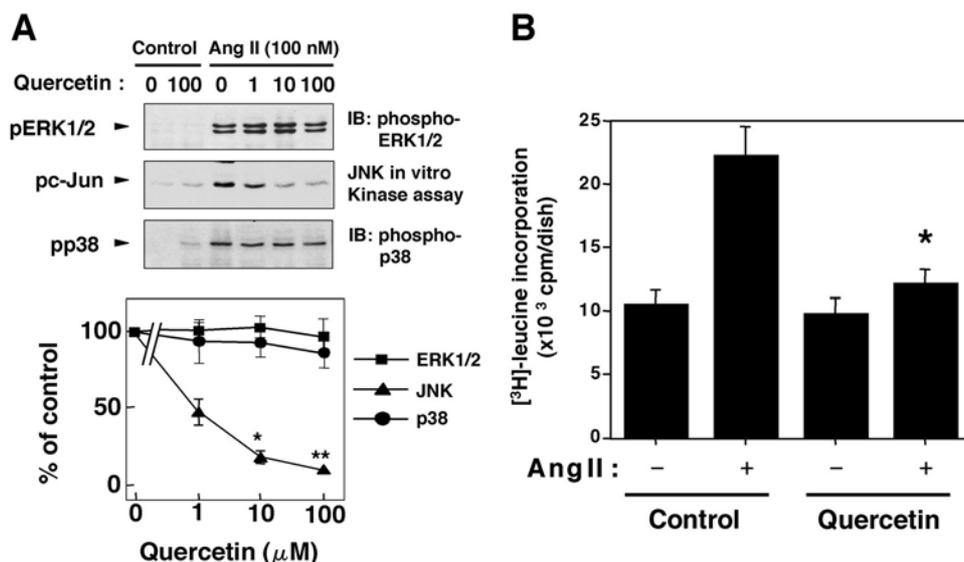


Figure 1 Quercetin inhibits angiotensin II-induced JNK activation (A) and hypertrophy (B) of cultured rat aortic smooth muscle cells. Based on reference 14.

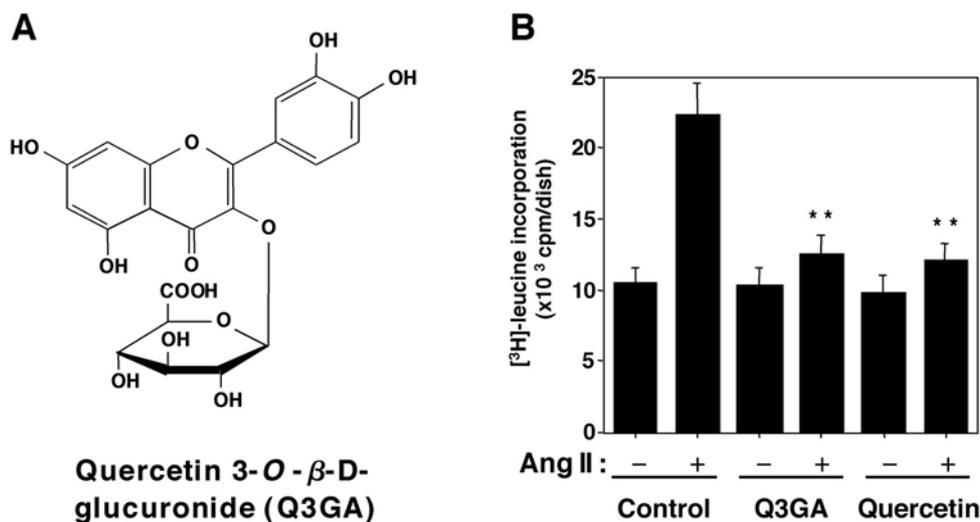


Figure 2 Chemical structure of quercetin glucuronide (Q3GA) (A) and its inhibition of angiotensin II-induced hypertrophy of cultured rat aortic smooth muscle cells (B). Based on reference 17.

る。このようなアルドステロンによる古典的ゲノム作用の効果発現には数時間を要するが、最近、数分以内に発現するアルドステロンの非ゲノム作用が注目されている。血管平滑筋細胞では、アルドステロン刺激によって細胞内カルシウムやcAMPの上昇、プロテイン

キナーゼCやNa⁺/H⁺交換機構の活性化が数分以内に起こることが報告されている^{22,23})。これらのアルドステロンによる非ゲノム作用は、鉍質コルチコイド受容体を介さないものであるとの意見もあるが、いまだ一定の見解を得ていない。先に述べたように酸化ストレスに

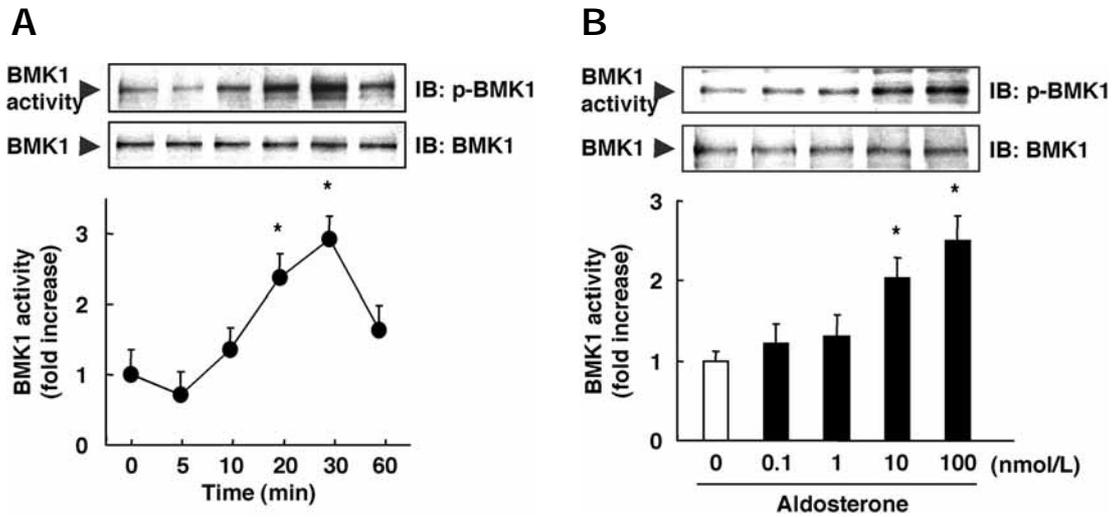


Figure 3 Time course (A) and concentration response (B) of aldosterone-induced BMK1 activation in cultured rat aortic smooth muscle cells. Based on reference 24.

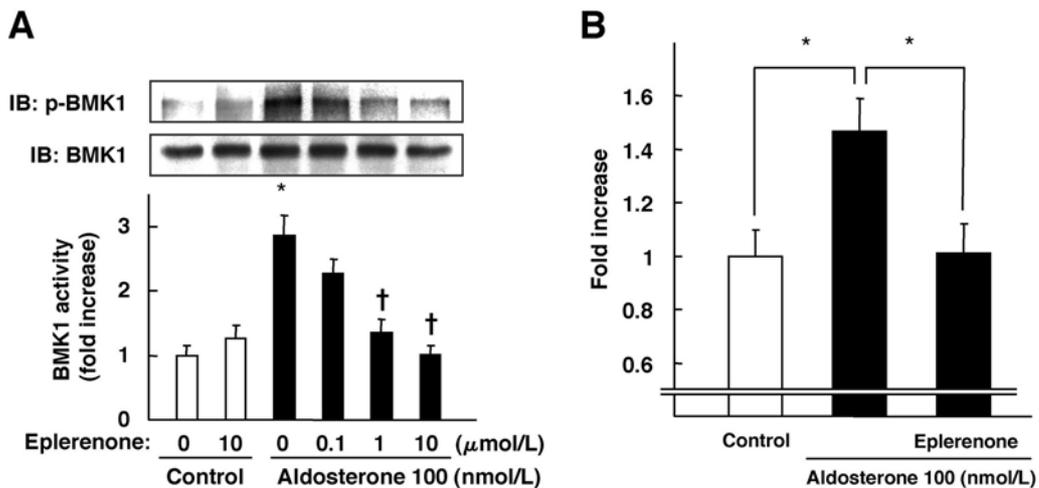


Figure 4 Effect of eplerenone on aldosterone-induced BMK1 activation (A) and proliferation (B) of cultured rat aortic smooth muscle cells. Based on reference 24.

よるMAPキナーゼの活性化は動脈硬化促進に働くことが予想されるので、われわれは培養血管平滑筋細胞を用いて、アルドステロンによるBMK1活性化を検討した²⁴⁾。その結果、アルドステロン刺激は、培養ラット大動脈平滑筋細胞でのBMK1を10分以内に活性化させた。BMK1の活性化のピークは30分で認められ、アルドステロンの濃度に依存的であった(Fig. 3)。また、選

択的鉱質コルチコイド受容体拮抗薬、エプレレノンはアルドステロンによるBMK1の活性化と細胞増殖を有意に抑制した(Fig. 4)。また、抗酸化剤Tironにも同様の効果が認められたため、このアルドステロンによる非ゲノム作用の一部には、酸化ストレスが関与していることが示唆された²⁴⁾。アルドステロンによる血管障害の細胞内分子機構が明らかにされていくなかで、それ

を標的とした新しい動脈硬化予防法の進展，動脈硬化治療薬の開発が期待される。

おわりに

以上，抗酸化フラボノイドの一つ，ケルセチンと新しい選択的鉍質コルチコイド受容体拮抗薬，エプレレノンの動脈硬化抑制作用について簡単に概説した。薬理学的には，抗酸化作用をもつ薬物あるいは食品の新しい作用が見つければ疾患治療への期待が高まるが，臨床応用までには代謝面を含めた地道な基礎研究が必須であると考ええる。一方，生体内生理活性物質の新しい作用が明らかになれば疾患の病態生理の理解が深まり，新しい治療薬開発に道を開くものであると期待される。

文 献

- 1)Abe J, Berk BC: Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*, 1998, **8**: 59–64.
- 2)Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M: NAD (P) H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 2000, **86**: 494–501.
- 3)Yoshizumi M, Tsuchiya K, Tamaki T: Signal transduction of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases in cardiovascular disease. *J Med Invest*, 2001, **48**: 11–24.
- 4)Griendling KK, Sorescu D, Lassegue B et al: Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20**: 2175–2183.
- 5)Ushio-Fukai M, Zafari AM, Fukui T et al: p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 23317–23321.
- 6)Suh YA, Arnold RS, Lassegue B et al: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*, 1999, **401**: 79–82.
- 7)Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS et al: Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci*, 2000, **25**: 459–461.
- 8)Lassegue B, Sorescu D, Szocs K et al: Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*, 2001, **88**: 888–894.
- 9)Matsuno K, Yamada H, Iwata K et al: Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation*, 2005, **112**: 2677–2685.
- 10)Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K et al: Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *Hypertens Res*, 2001, **24**: 251–261.
- 11)Yoshizumi M, Abe J, Haendeler J et al: Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 11706–11712.
- 12)Suzaki Y, Yoshizumi M, Kagami S et al: Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 9614–9621.
- 13)Yoshizumi M, Kim S, Kagami S et al: Effect of endothelin-1 (1-31) on extracellular signal-regulated kinase and proliferation of human coronary artery smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 1998, **125**: 1019–1027.
- 14)Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K et al: Quercetin inhibits Shc- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated c-Jun N-terminal kinase activation by angiotensin II in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 2001, **60**: 656–665.
- 15)Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K et al: Src and Cas are essentially but differentially involved in angiotensin II-stimulated migration of vascular smooth muscle cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH₂-terminal kinase activation. *Mol Pharmacol*, 2004, **65**: 832–841.
- 16)Moon JH, Tsushida T, Nakahara K et al: Identification of quercetin 3-O-β-D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic Biol Med*, 2001, **30**: 1274–1285.
- 17)Yoshizumi M, Tsuchiya K, Suzaki Y et al: Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **293**: 1458–1465.
- 18)Stephens NG, Parsons A, Schofield PM et al: Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*, 1996, **347**: 781–786.
- 19)Yusuf S, Dagenais G, Pogue J et al: Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators.

- N Engl J Med, 2000, **342**: 154–160.
- 20) Pitt B, Remme W, Zannad F et al: Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. N Engl J Med, 2003, **348**: 1309–1321.
- 21) Zannad F, Alla F, Dousset B et al: Limitation of excessive extracellular matrix turnover may contribute to survival benefit of spironolactone therapy in patients with congestive heart failure: insights from the randomized aldosterone evaluation study (RALES). Rales Investigators. Circulation, 2000, **102**: 2700–2706.
- 22) Wehling M, Ulsenheimer A, Schneider M et al: Rapid effects of aldosterone on free intracellular calcium in vascular smooth muscle and endothelial cells: subcellular localization of calcium elevations by single cell imaging. Biochem Biophys Res Commun, 1994, **204**: 475–481.
- 23) Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M et al: Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects. Pharmacol Rev, 2000, **52**: 513–556.
- 24) Ishizawa K, Izawa Y, Ito H et al: Aldosterone stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via big mitogen-activated protein kinase 1 activation. Hypertension, 2005, **46**: 1046–1052.

Atheroprotective Effects of Quercetin, a Bioflavonoid and Eplerenone, a Selective Mineralocorticoid Receptor Antagonist

Masanori Yoshizumi

Department of Pharmacology, Nara Medical University School of Medicine, Nara, Japan

Key words: atherosclerosis, bioflavonoid, quercetin, aldosterone antagonist, eplerenone

Reactive oxygen species (ROS) have been known to play an important role in the pathogenesis of atherosclerosis and several other cardiovascular diseases. Several lines of evidence indicate that ROS and mitogen-activated protein (MAP) kinases are involved in vascular remodeling under various pathological conditions. MAP kinases have demonstrated their sensitiveness to oxidative stress, suggesting MAP kinases play a key part in cell differentiation, growth, apoptosis, and the regulation of a variety of transcription factors and gene expressions. A bioflavonoid, quercetin (3,3', 4', 5,7-pentahydroxyflavone) inhibited angiotensin II-induced c-Jun N-terminal kinase activation and resultant hypertrophy of vascular smooth muscle cells (VSMC). Therefore, inhibition of MAP kinases by antioxidant treatment may prove to be a therapeutic strategy for cardiovascular diseases. On the other hand, the non genomic effects of aldosterone have been implicated in the pathogenesis of various cardiovascular diseases. We found that eplerenone, a selective mineralocorticoid receptor antagonist, inhibited aldosterone-induced VSMC proliferation. Big MAP kinase 1 (BMK1) has been suggested being partly responsible for aldosterone-induced VSMC proliferation since pharmacological and genetic inhibition of BMK1 reduced the proliferation. Investigation of the molecular mechanisms of quercetin or eplerenone action may provide novel therapeutic targets for cardiovascular diseases. (J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 649–654)