

冠動脈疾患と酸化ストレス，炎症 特に急性冠症候群の病態と予防を中心に

横山 光宏

要 旨：血管内皮機能障害は動脈硬化の発症，進展，粥腫の不安定化とその破綻に関係する。また，冠動脈事故を予測するのに役立つ。血管内皮機能障害は酸化ストレスと深く関係する。疾患モデル動物やヒト冠動脈標本を用いての検討で，動脈硬化血管では酸化ストレスが増大しているが，その主因は血管系NAD(P)H oxidaseとuncoupled内皮型NO合成酵素によるスーパーオキシド(O_2^-)アニオンの産生であることを示した。炎症性マーカー，高感度CRP測定が将来の冠動脈事故の予知因子として有用である。CRPは肝臓以外では血管細胞で産生され，NAD(P)H oxidaseの発現増強を介する O_2^- の産生増加など種々の生物作用を有する。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 133-138)

Key words: acute coronary syndrome, oxidative stress, endothelial dysfunction, inflammation, unstable plaque

はじめに

動脈硬化は血管内皮細胞の傷害とそれに対する生体反応(応答)(response to injury)に始まる慢性の炎症性疾患である¹⁾。動脈硬化の発症原因は多因子であり，遺伝素因と環境要因が相互に作用して発症，進展するが，内皮細胞傷害部位での単球の内皮細胞への接着，内皮下層への移動，マクロファージへの分化と泡沫細胞形成において変性低比重リポ蛋白，特に活性酸素種による酸化修飾によって生成される酸化LDL(low density lipoprotein)が主役を演じる。また，酸化ストレスはmatrix metalloproteinase(MMP)の活性化による細胞外基質の断裂を生じ，粥腫の不安定化にも関与する(Fig. 1²⁾)。本稿では冠動脈硬化症と酸化ストレス，炎症に焦点を当て私達の教室の成績を中心に紹介する。

血管内皮機能障害と冠動脈疾患： eNOS由来NOと酸化ストレスの重要性

高脂血症，高血圧，糖尿病，喫煙などの動脈硬化の危険因子は血管内皮機能障害を来す。血管内皮機能障害は動脈硬化の発症，進展のみならず粥腫の不安定化

とその破綻にも関係する。また，血管内皮機能障害は冠動脈事故/心血管事故を予知するのに役立つことも報告されている。血管内皮機能障害の研究は家兎，ラット，マウスなどの動物に高コレステロール血症，糖尿病，高血圧などの疾患モデルを作製して行われる一方，ヒトの種々の血管床で血管内皮依存性弛緩反応や種々の血管傷害バイオマーカーの血中濃度測定にて精力的に行われている。種々の危険因子の存在によって血管内皮依存性弛緩反応の低下が認められるが，その抑制の分子機序は病因・病態によって異なることが示されている。すなわち，NO(nitric oxide)を産生するNO合成酵素(eNOS)活性化に至るシグナルの伝達機構，G蛋白特にGi蛋白を介するシグナル伝達障害以外に，産生されたNOを不活化するスーパーオキシド(O_2^-)アニオンの産生増加，eNOSの発現量の減少，eNOS活性化の障害機序として内因性eNOS阻害物質(asymmetric dimethylarginine)の増加，caveolinとの結合の増強やco-factor BH_4 の低下等が提唱されている。いずれにしても少量の制御されたNOの産生は，血管平滑筋細胞の弛緩作用，血管平滑筋細胞の遊走・増殖抑制， O_2^- アニオンなど酸素ラジカルの不活性化，

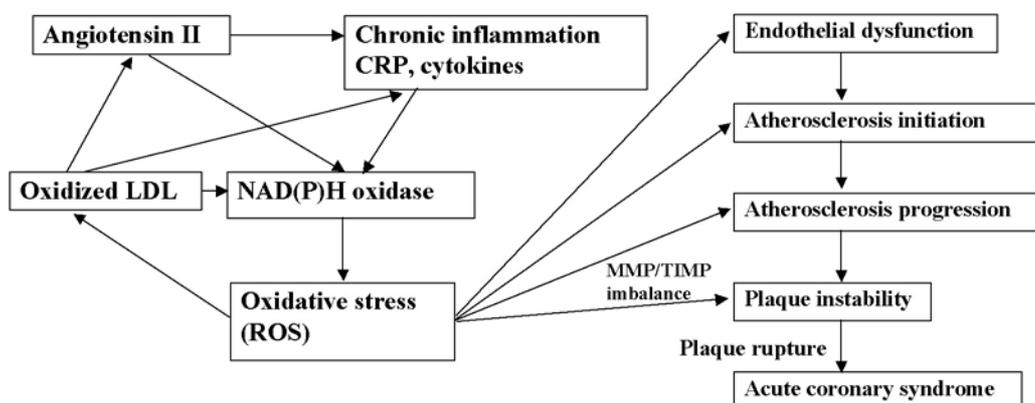


Figure 1 Proposed schema for pathogenesis of acute coronary syndrome.

LDLなどの脂質の酸化修飾の抑制, 血管内皮細胞表面の接着因子の発現抑制による白血球の接着抑制, 血小板接着, 凝集抑制など, 動脈硬化抑制的に作用する。また, 最近の報告ではNOは免疫系の活性化の制御やミトコンドリア生合成にも関与するとされる。

私達は血管内皮細胞にeNOSを過剰発現するマウスの作製に成功し, このマウスを用いてL-arginine/eNOS/NO/cGMP系の血管に対する作用を検討した。eNOSは頸動脈結紮や低酸素性肺高血圧症などの血管リモデリングに対し保護的に作用し, その機序には血管の炎症細胞の浸潤抑制作用が関与していた³⁻⁵。また, リポポリサッカライドによる敗血症性ショック炎症モデルにおいてeNOS過剰発現は好中球による肺組織傷害を抑制し, 生存率を改善し, 下肢虚血再灌流モデルにおける再灌流時の活性酸素の産生を抑制し, 組織傷害を軽減させた^{6,7}。一方, eNOS過剰発現の高脂血症による動脈硬化に対する効果をapoE欠損マウスと交差交配を行うことによって検討した⁸。予想に反して, eNOS過剰発現マウスでは大動脈の動脈硬化病変の面積がapoE欠損マウスに比べて有意に大であった。その原因にはco-factor BH₄低下によるuncoupled eNOSによるO₂⁻アニオンの産生が関与していることが判明した。apoE欠損マウスの大動脈組織ではeNOSのco-factorのBH₄濃度の低下と酸化型7,8-BH₂濃度の増加が認められ, BH₄を食餌に混ぜて投与すると動脈硬化病変面積が縮小した。生体内でのBH₄合成の律速酵素GTP cyclohydrolase 1の過剰発現マウス, eNOS過剰発現マウスおよびapoE欠損マウスの三者掛け合わせた群ではeNOS過剰発現マウス ×

apoE欠損マウス群に比べて動脈硬化面積の縮小が見られた。これらの実験成績からBH₄の補給はeNOS recouplingを来し, 再びNOを主として産生することが示された。

内皮細胞機能障害は酸化ストレスの増大, 内皮細胞接着分子の発現亢進, アンジオテンシンII, エンドセリン-1とプラスミノゲンアクチベーター・インヒビター-1の産生増加およびNOとプロスタサイクリンの産生減少など種々の生理活性物質の産生変化を介して炎症反応を惹起し, 組織因子の発現増加や線溶系抑制などによって血栓形成傾向に働くことが明らかにされている。実際, 動脈硬化血管では活性酸素種の産生系と消去系の不均衡によって酸化ストレスが増大している⁹⁻¹¹。活性酸素種の産生系としてxanthine oxidase, NAD(P)H oxidase, uncoupled NOS, ミトコンドリア電子伝達系, myeloperoxidaseなどがある。活性酸素種の消去系としてはsuperoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, thioredoxin reductaseなどである。酸化ストレス増大の原因として心臓血管系ではNAD(P)H oxidaseによるO₂⁻アニオンの産生が重要視されている¹²。血管系NAD(P)H oxidaseは細胞膜分画にp22 phoxとgp91 phoxあるいはそのホモログ, 細胞質分画にp47 phoxとp67 phoxおよびsmall GTP結合蛋白質のracから構成される。この酸化酵素はアンジオテンシンII, トロンピン, 酸化LDL, 炎症性サイトカインや機械的伸展刺激などによって活性化される。血管細胞にはnox1, nox2 (gp91 phox), nox4のnox isoformが存在する。マクロファージ, 線維芽細胞にはnox2が存在し, 平滑筋細胞

Table 1 Inflammatory markers as predictors of cardiovascular risk

(1) Acute phase reactants
C-reactive protein (CRP)
Serum amyloid A (SAA)
Fibrinogen
(2) Soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1, P-selectin)
(3) Cytokines (interleukin-1 β , -6, -8, -10, -18, TNF- α)
(4) Others (lipoprotein-associated phospholipase A ₂ , myeloperoxidase, pregnancy-associated plasma protein, soluble CD40 ligand, macrophage inhibitory cytokine-1, LOX-1 etc)

にはnox1とnox4が存在し、内皮細胞にはnox2とnox4が発現している。血管細胞でのnox1の発現は*in vivo*では僅少である。これらのnoxは細胞内の特定の部位に局在し、特異的な血管機能を司っている可能性があるが、その詳細な解析は今後の重要な研究課題である¹³⁾。正常血管ではNAD(P)H oxidase subunitsが外膜線維芽細胞にごく僅かに発現しているが、動脈硬化病変では血管内皮細胞、平滑筋細胞の一部、マクロファージ、線維芽細胞に強く発現している。産生されたO₂⁻アニオンは動脈硬化抑制の重要な役割を果たすNOを不活化し、動脈硬化促進の中心的役割を果たす酸化LDLを産生し、接着分子や炎症サイトカインを産生し炎症反応を生じる。

狭心症患者のdirectional coronary atherectomy(DCA)標本と剖検ヒト冠動脈標本を用いての蛍光免疫組織化学的検討では、動脈硬化冠動脈は正常冠動脈に比べてNAD(P)H oxidaseの発現増加を認め、動脈硬化の進展とともに発現が増強した¹⁴⁾。不安定狭心症群では安定狭心症群に比べてその発現が強く、活性酸素種と酸化LDLの発現についても同様であった¹⁵⁾。活性酸素種の産生量とp22 phox発現量、酸化LDLの産生量の間には正の相関を認めた。私達は培養血管内皮細胞を用いて酸性LDLとその重要な構成要素のリゾフォスファチジルコリンがNAD(P)H oxidaseの発現量を増大させ、産生された活性酸素が細胞外matrix metalloproteinase-2(MMP-2)の産生を増加させることを報告した¹⁶⁾。また、急性冠症候群患者では血中酸化LDL濃度の上昇が認められることが報告されている¹⁷⁾。これらの所見は酸化ストレスの増大の原因となるO₂⁻アニオン自体とLDLの酸化修飾によって産生された酸化LDLが急性冠症候群の病因・病態に深く関与していることを示唆している。

不安定粥腫の画像診断

冠動脈粥腫の画像イメージング法の最近の進歩は目覚ましいものがあるが、現在臨床で主として使用されているのは血管内超音波法(IVUS)である。本法は冠動脈壁内の解剖学的情報を血管断層像として実時間に提供する侵襲的画像診断法である。粥腫から反射された高周波信号データのデジタル化再構築画像(virtual histology)を用いて組織性状診断(fibrous, fibrofatty, dense calcium, necrotic core)に分類を行うことが可能である。脆弱な易破綻性粥腫、すなわちfibroatheromaはnecrotic coreを10%以上含む粥腫と定義されているが、その臨床的意義については今後の検討を要する。IVUSの解像力は100 μ mであり、65 μ m以下とされる不安定粥腫の線維性被膜の厚さを定量的に評価することはできない。IVUSの欠点を補うために私達は光干渉断層撮影(optical coherence tomography: OCT)を併用して、不安定粥腫の組織診断を行っている¹⁸⁾。OCTの最大の欠点は組織深部到達度が2~3mmであることで今後改善を要する。

冠動脈硬化と炎症性マーカー

動脈硬化が炎症性疾患であることから、炎症性マーカーを含めて種々のバイオマーカーの血中濃度を測定することによって将来の冠動脈疾患の発症とその予後を予知することが可能であるかどうかについて現在強い関心が集まっている(Table 1)。すなわち、現在日々の診療で用いられている古典的な冠危険因子に加えて将来心血管事故を生じる確率をできるだけ正確に予知するための新規のマーカーの探索が行われている。それらの中で、血漿高感度C反応性蛋白(C-reactive

Table 2 Pathophysiological effects of CRP

<ul style="list-style-type: none"> • Upregulation of adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, E-selectin • Upregulation of monocyte chemoattractant protein (MCP-1) expression • Downregulation of eNOS expression • Decrease in prostacyclin synthesis • Upregulation of PAI-1 expression • Upregulation of AT₁ receptor expression • Promotion of uptake of oxidized LDL • Stimulation of ROS production • Endothelium-independent vasorelaxation

protein: CRP) 値の測定の有用性が注目されている。CRPは肺炎球菌菌体のC-多糖類と沈降反応を生ずる血液由来の蛋白質として同定され、主として肝臓でインターロイキン-6(IL-6)などの炎症性サイトカインによって産生され、全身性炎症マーカーとして頻用されてきた。最近、高感度CRPの測定が冠動脈疾患を有さない健常人(一次予防)および、心血管病患者(二次予防)で心臓死、急性心筋梗塞、急性冠症候群、脳卒中などの心血管事故を発症する予知因子として有用であることが報告されている¹⁹⁾。また、最近の研究でCRPは肝臓以外の組織、すなわち血管組織でも産生され、動脈硬化血管、特に不安定狭心症患者の粥腫には安定狭心症患者の粥腫に比べてCRPが強く発現している²⁰⁾。実際、CRPは血管平滑筋細胞や内皮細胞で炎症性サイトカインや酸化LDLなどによって発現誘導される。CRPは血管壁構成細胞である内皮細胞、平滑筋細胞、単球・マクロファージに対して*in vitro*で多彩な炎症および動脈硬化を促進させる生物作用を有することが報告されている(Table 2)。私達は培養血管平滑筋細胞でCRPがNAD(P)H oxidaseの発現を亢進させ、活性酸素の産生を増加させることを報告している²¹⁾。また、ヒトCRPを肝臓に強発現させたトランスジェニックマウスを用いてCRPの動脈硬化形成促進作用や血栓形成作用が*in vivo*で報告されている^{22, 23)}。したがって、CRPは単なる炎症マーカーではなく、炎症を惹起する分子として働いている可能性が高い。実際、PepysらはCRP阻害薬1,6-bis(phosphocholine)-hexaneの投与によってラットの冠動脈閉塞モデルを用いてCRPによる心筋傷害増強作用を阻止することを報告した²⁴⁾。したがって、今後

CRPを治療ターゲットとした新しい治療戦略が期待される。CRPの高値は感染症や関節リウマチなどの慢性炎症患者以外に高血圧、肥満、喫煙、糖尿病、メタボリックシンドローム、エストロゲンなどで認められ、その低値は運動、適度のアルコール摂取、スタチン、ナイアシンなどの薬物投与で認められる。2003年の炎症と心血管病に関するAHA/CDC statementでCRPは心血管リスクの独立した予測因子として有用であるとの報告がなされた²⁵⁾。

抗炎症薬と冠動脈疾患

アスピリン, peroxisome proliferators-activated receptors (PPAR α), スタチン, cyclooxygenase-2(Cox2) 阻害薬など種々の抗炎症作用を有する薬剤が臨床で使用されているが、心血管事故と血管炎症との関連について最も研究されている薬剤はHMG CoA reductase阻害薬すなわちスタチンである。大規模臨床試験CARE(Cholesterol And Recurrent Events), PRINCE(Pravastatin Inflammation CRP Evaluation), Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention(AFCAPS-Tex CAPS)などのサブ解析でCRPの高値群で低値群に比べて心血管事故が多く、スタチン投与によって心血管事故、LDL-コレステロールおよびCRPはいずれも減少した。しかし、CRPの減少度とLDL-コレステロールの低下度の間には相関が認められず、CRP高値群で冠動脈イベントが強く抑制された。また、急性冠症候群でスタチンによる強力なLDL-コレステロールの低下によって心血管事故の再発を予防することができるとの報告がなされている。その機序として高コレステロール血症が急性冠症候群の発症に関与し、スタチンがコレステロール低下作用によって炎症を抑制した可能性が考えられる。またCRPがスタチン投与早期から低下することからスタチンが血管細胞に直接作用してLDL-コレステロール低下作用に依存せずに血管内皮機能の改善、プラークの安定化、酸化ストレスの減弱、炎症反応の抑制などの多彩な作用(pleiotropic effects)によって心血管事故を減らした可能性も考えられる²⁶⁾。

JUPITER(Justification for the Use of statins in Primary prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin)試験はCRP 2mg/L以上でLDL-コレステロール値130mg/ml以下の健常者での心血管事故抑制試験で、その結果が待たれる。

Physician's Health Studyでアスピリン投与が将来の心筋梗塞の発症リスクを44%抑制し、その抑制効果はCRP高値群のほうが低値群に比べて大であることも報告されている。

最近Cox2 inhibitorと心血管事故の関連が注目されているが、本剤投与群で心筋梗塞の発症が多く、その理由としてCox2によるプロスタサイクリンの産生が抑制される一方、Cox1によるトロンボキサンA₂の合成が抑制されず血栓ができやすいことが考えられる²⁷⁾。その他の抗炎症薬によって動脈硬化性心血管事故が減るかどうかについては十分な検討がなされていない。今後の検討が待たれる。

文 献

- 1) Libby P: Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002, **420**: 868–874.
- 2) Heistad DD: Unstable coronary-artery plaques. *N Engl J Med*, 2003, **349**: 2285–2287.
- 3) Ohashi Y, Kawashima S, Hirata K et al: Hypotension and reduced nitric oxide-elicited vasorelaxation in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest*, 1998, **102**: 2061–2071.
- 4) Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M et al: Endothelial NO synthase overexpression inhibits lesion formation in mouse model of vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 201–207.
- 5) Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T et al: Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertension*, 2001, **37**: 322–327.
- 6) Yamashita T, Kawashima S, Ohashi Y et al: Resistance to endotoxin shock in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 2000, **101**: 931–937.
- 7) Ozaki M, Kawashima S, Hirase T et al: Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells is protective against ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Am J Pathol*, 2002, **160**: 1335–1344.
- 8) Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T et al: Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*, 2002, **110**: 331–340.
- 9) Yokoyama M: Oxidant stress and atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, **4**: 110–115.
- 10) Kawashima S, Yokoyama M: Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 998–1005.
- 11) Okuda M, Inoue N, Azumi H et al: Expression of glutaredoxin in human coronary arteries: its potential role in antioxidant protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21**: 1483–1487.
- 12) Yokoyama M, Inoue N: How vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression are regulated. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 1540–1541.
- 13) Wolin MS: Subcellular localization of Nox-containing oxidases provides unique insight into their role in vascular oxidant signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 625–627.
- 14) Azumi H, Inoue N, Takeshita S et al: Expression of NADH/NADPH oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation*, 1999, **100**: 1494–1498.
- 15) 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.
- 16) Inoue N, Kobayashi S, Yokoyama M: Oxidative stress and inflammation in plaque instability: role of vascular C-reactive protein. *Atherosclerosis XIII International Congress Series*, 2004, **1262**: 71–74.
- 17) Ehara S, Ueda M, Naruko T et al: Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*, 2001, **103**: 1955–1960.
- 18) Matsumoto D, Shite J, Shinke T et al: Neointimal coverage of sirolimus-eluting stents at 6-month follow-up: evaluated by optical coherence tomography. *Eur Heart J*, 2007, **28**: 961–967.
- 19) Ridker PM, Rifai N, Rose L et al: Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*, 2002, **347**: 1557–1565.
- 20) Kobayashi S, Inoue N, Ohnishi 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.
- 21) Inoue N, Takeshita S, Gao D et al: Lysophosphatidylcholine increases the secretion of matrix metalloproteinase 2 through the activation of NADH/NADPH oxidase in cultured aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2001, **155**: 45–52.
- 22) Danenberg HD, Szalai AJ, Swaminathan RV et al: Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation*, 2003, **108**: 512–515.

- 23) Paul A, Ko KW, Li L et al: C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2004, **109**: 647–655.
- 24) Pepys MB, Hirschfield GM, Tennent GA et al: Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. *Nature*, 2006, **440**: 1217–1221.
- 25) Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW et al: Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 2003, **107**: 499–511.
- 26) Ridker PM, Cannon CP, Morrow D et al: C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med*, 2005, **352**: 20–28.
- 27) Drazen JM: COX-2 inhibitors - a lesson in unexpected problems. *N Engl J Med*, 2005, **352**: 1131–1132.

Roles of Oxidative Stress and Inflammation in Coronary Artery Disease —Focus on Pathophysiology and Prevention of Acute Coronary Syndrome

Mitsuhiro Yokoyama

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

Key words: acute coronary syndrome, oxidative stress, endothelial dysfunction, inflammation, unstable plaque

Overproduction of reactive oxygen species (ROS) or increased oxidative stress is considered a major mechanism involved in the pathogenesis of endothelial dysfunction, the initiation and progression of atherosclerosis and its adverse events. Evidence supports the importance of nitric oxide (NO) derived from endothelial nitric oxide synthase (eNOS) as a vasoprotective substance, and of vascular NAD(P)H oxidase-derived ROS as important signaling molecules in vascular cells.

Our study shows that dysfunction of eNOS in hypercholesterolemia and atherosclerosis caused superoxide anion (O_2^-) rather than NO, to be generated, which accelerated the initiation and progression of atherosclerosis by crossbreeding the apolipoprotein E (apoE) knockout and eNOS transgenic mice. Furthermore, insufficiency of NOS cofactor BH_4 (tetrahydrobiopterin) is responsible for the switch from NO to O_2^- . We also examined the relationship between NAD(P)H oxidase expression/activity and atherosclerosis in coronary atherectomy specimens. They were obtained from patients with unstable and stable angina as well as atherosclerotic and non-atherosclerotic coronary arteries from autopsy patients. Upregulation of vascular NAD(P)H oxidase caused plaque instability, as matrix metalloproteinases may be activated by enhanced NAD(P)H oxidase-generated ROS in coronary arteries.

Our study also indicates that C-reactive protein (CRP) is abundantly present in coronary arteries from patients with unstable angina. Therapeutic inhibition of CRP may be a new approach to cardiovascular protection. It is the ultimate goal to develop novel therapeutic strategies to prevent cardiovascular events by controlling molecular targets of oxidative stress and inflammation. (*J Jpn Coll Angiol*, 2007, **47**: 133–138)