

## 総 説

# 抗酸化薬の動脈硬化予防効果—*in vitro* での ebselen の作用と *in vivo* での経口亜硝酸の作用

奈良県立医科大学薬理学教室

吉 栖 正 典

## ATHEROPROTECTIVE EFFECTS OF ANTIOXIDANTS-*IN VITRO* EFFECT OF EBSELEN AND *IN VIVO* EFFECT OF ORALLY ADMINISTERED NITRITE

MASANORI YOSHIKAZUMI

Department of Pharmacology, Nara Medical University

Received June 8, 2005

**Abstract** : 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、酸化ストレスが様々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。たとえば高血圧、糖尿病、癌、動脈硬化などの発症や進展に酸化ストレスが関与しているという報告がある。一方で、抗酸化作用を持つ薬物が動脈硬化の進展抑制に効果があるという報告もあるが、その成績の多くは臨床的に満足のものではない。本総説では、酸化ストレスによる動脈硬化発症・進展の細胞内情報伝達機構について概説し、抗酸化薬としての ebselen (エブセレン) の *in vitro* での効果と経口亜硝酸投与の *in vivo* での効果を解説する。さらに、動脈硬化予防薬としての抗酸化薬の現状での問題点と今後の可能性について述べる。

**Key words** : oxidative stress, antioxidants, MAP kinase, ebselen, nitrite

### はじめに

酸素は細胞の生存と機能維持に必須のものであるが、酸化・還元状態(レドックス)が適切に調節されていなければ、正常の生命活動は維持できない。生命は、その進化の過程で酸素を利用するシステムを作り上げてきたと同時に、酸化ストレスを巧妙に回避する機構を備えてきた。細胞内シグナル伝達研究や分子生物学研究などの生命科学研究の発展により、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てきた。その意味で、酸化ストレスは生命にとって「両刃の剣」となりうるものである。生体の恒常性の維持に重要な意味を持つ酸化・還元状態の適切な制御は、疾病の予防や治療のための一つの重要な手段となり

うる。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<sup>1-3)</sup>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。

### 酸化ストレスと活性酸素種 (ROS)

酸化ストレスという用語は非常にポピュラーであるが、実際に分子レベルでどのようなものを指すのかを理解することが重要である。酸化ストレスの分子機構を理解する上で重要なのが不対電子を持つフリーラジカルである。原子は最外層の軌道に不対電子を持つと不安定な状態になり、安定を求めて電子の授受が行われる。不対電子を持つ原子または分子に、電子をあたえて安定化させるものの代表が水素であり、水素または電子を奪う酸化反応と、水素または電子を与える還元反応は同時に起こって

いる(一方の原子または分子が酸化されると他方は還元される)。酸化・還元反応によって生体は様々な影響を受けるが、臨床的意義が大きいの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、過酸化水素( $H_2O_2$ , 非ラジカル)も含んだ一群の酸素種を指す。この他、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。今まで ROS 産生は、炎症時の細菌食や虚血・再灌流時に、好中球やマクロファージなどの血球細胞からの burst によって起こるものと考えられていたが、最近ではそれ以外の細胞でも産生されることが明らかとなってきた。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産生されることが報告されている<sup>1-3)</sup>。これらの細胞において、酸素が1電子還元されることによってスーパーオキシドが生じる(図1)。スーパーオキシド産生系としては、ミトコンドリアの電子伝達系(チトクローム P-450)がよく知られているが、その他にもキサンチンオキシダーゼ、リポキシゲナーゼ、シクロオキシゲナーゼ、NO合成酵素(NO synthase, NOS), NAD(P)Hオキシダーゼなどがある。血管壁ではスーパーオキシドはNOと反応してperoxynitrite( $ONOO^{\cdot-}$ )に変換される(図1)。 $ONOO^{\cdot-}$ は脂質の過酸化や蛋白のニトロソ化を引き起こし動脈硬化の進展に関与しているといわれている<sup>4)</sup>。スーパーオキシ

ドは, superoxide dismutase (SOD) によって過酸化水素( $H_2O_2$ )に変換される。 $H_2O_2$ は他のラジカル種に比べ比較的安定で、細胞内 ROS の主役の一つと考えられている。 $H_2O_2$ は、カタラーゼによって水と酸素に分解されるが、同時に Fenton 反応または Haber-Weiss 反応によって非常に反応性の高いヒドロキシラジカル( $\cdot OH$ )が生じる。これらの ROS が、血管内皮細胞障害や、血管平滑筋細胞の増殖、心臓リモデリングを引き起こし、高血圧、動脈硬化や心不全の発症・進展に関与していることが明らかとなってきた。

**酸化ストレスと MAP キナーゼ**

MAP キナーゼは、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、ERK1/2, JNK/SAPK, p38, Big MAP kinase1(BMK1)/ERK5 の四つのファミリーに分けられている(図2)。以前は、ERK family は増殖因子で活性化され細胞の分化や増殖に、JNK や p38 は炎症性サイトカインやストレスによって活性化されアポトーシスやストレス応答遺伝子の発現に関わると考えられていたが、最近ではこれら四つの MAP キナーゼ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なりつつある。我々も、培養ラット大動脈平滑筋細胞において、 $H_2O_2$ によって ERK1/2, JNK, p38 の三つの MAP キナーゼが速やかにかつ強力に活性化されるのを見出した

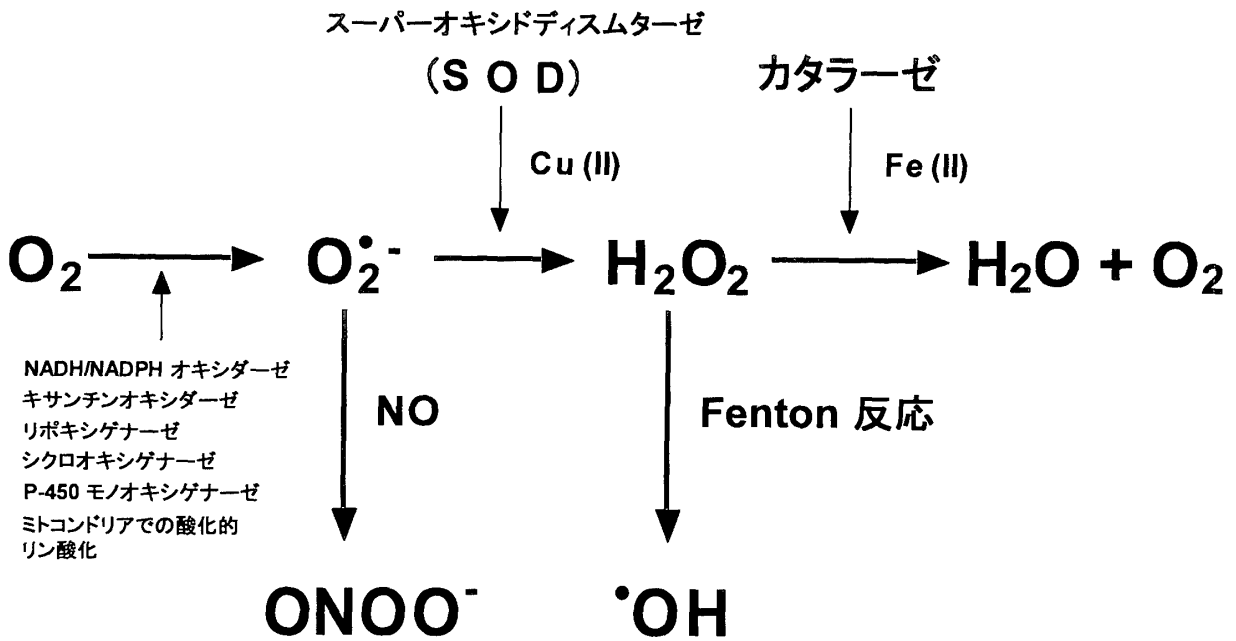


図1. 心血管系細胞内における活性酸素種(ROS)産生反応 (文献3より引用・改変)

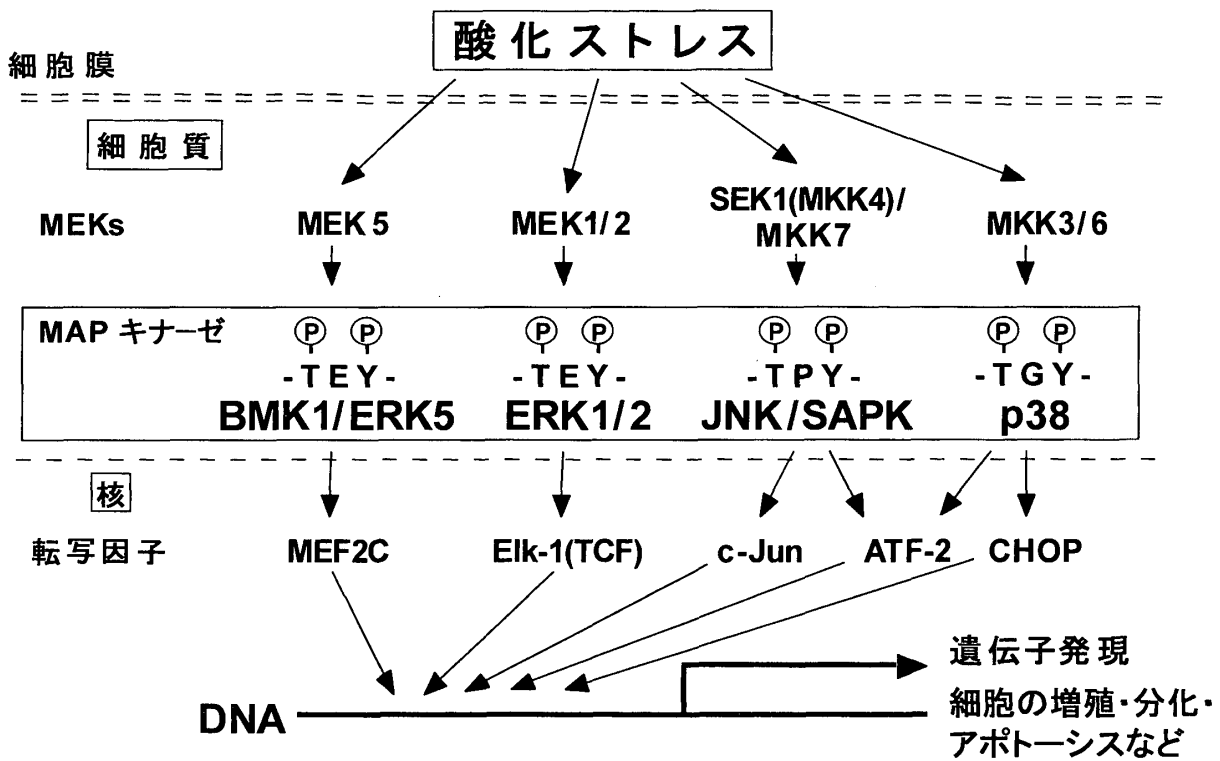


図2. 酸化ストレスによる MAP キナーゼ活性化の細胞内情報伝達経路 (文献3より引用・改変)

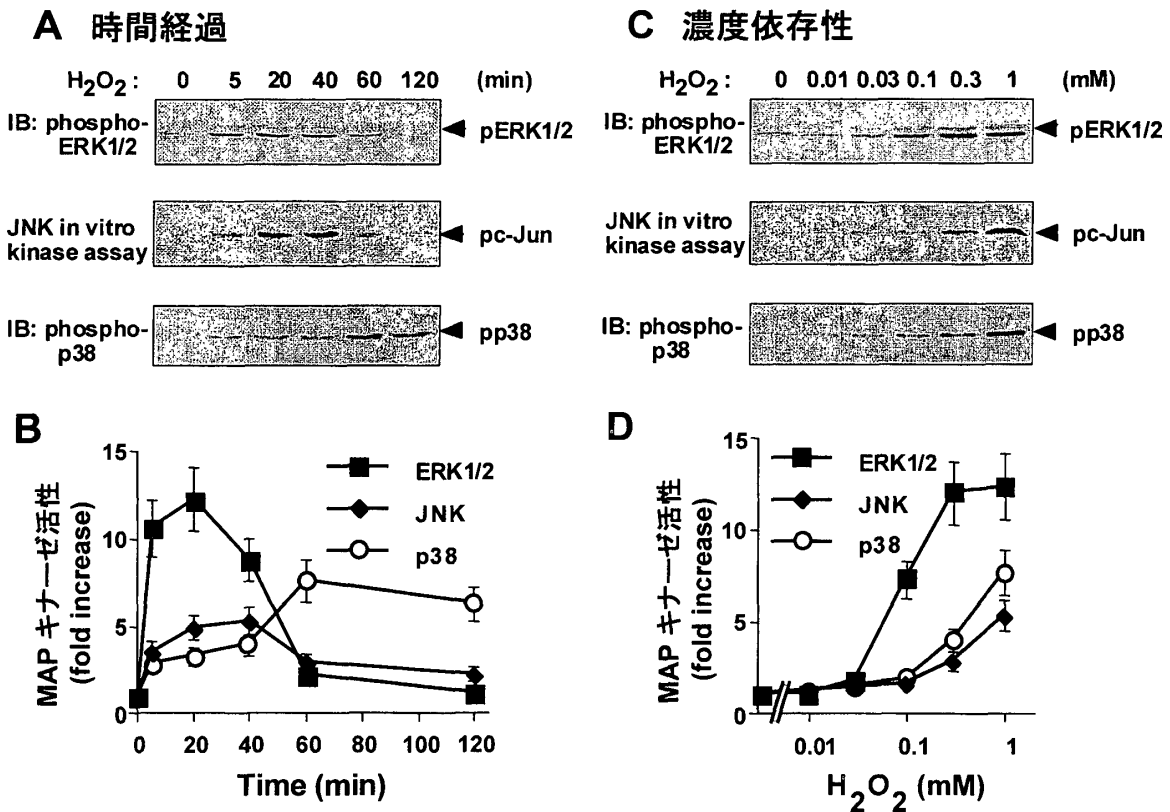


図3. 培養ラット大動脈平滑筋細胞における H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激による MAP キナーゼ (ERK1/2、JNK、p38) 活性化の時間経過と濃度依存性 (文献5より引用・改変)

(図3)<sup>9)</sup>。我々の検討では、このうち JNK の活性化が、Src チロシンキナーゼとアダプター蛋白 Cas のリン酸化を介していることが明らかとなった<sup>9)</sup>。MAP キナーゼの活性化は、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。事実我々も、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出している<sup>6)</sup>。

**血管壁での活性酸素種産生系**

先に述べたように、最近では、スーパーオキシドや H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> などの ROS が血管平滑筋細胞、内皮細胞や心筋細胞などで産生されることが明らかになってきた<sup>1-3)</sup>。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(図4)<sup>27)</sup>。NAD(P)H オキシダーゼは multi-subunit の酸化酵素で、PDGF 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 のひとつ 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<sup>8)</sup>。さらに最近、食細胞系 NAD(P)H オキシダーゼの細胞膜 subunit のひとつの

gp91phox のホモログである nox-1 がクローニングされた<sup>9)</sup>。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<sup>10)</sup>。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<sup>9,11)</sup> 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(図4)。我々も、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を確認した<sup>12)</sup>。

**血管リモデリング予防薬あるいは治療薬としての抗酸化薬**

上述したように、ROS による酸化ストレスは血管平滑筋細胞や線維芽細胞の増殖や、血管内皮細胞のアポトーシスを引き起こし、血管リモデリングに深く関わっていることが明らかになってきた。そしてアンジオテンシン II やエンドセリンなどの脈管作動物質がアゴニストとして ROS 産生の刺激となること、リモデリングの細胞内機構に MAP キナーゼが重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。それでは血管リモデリングの予防薬あるいは治療薬としての抗酸化剤の可能性はどうか。In vitro では、フラビン含有酵素阻害剤の

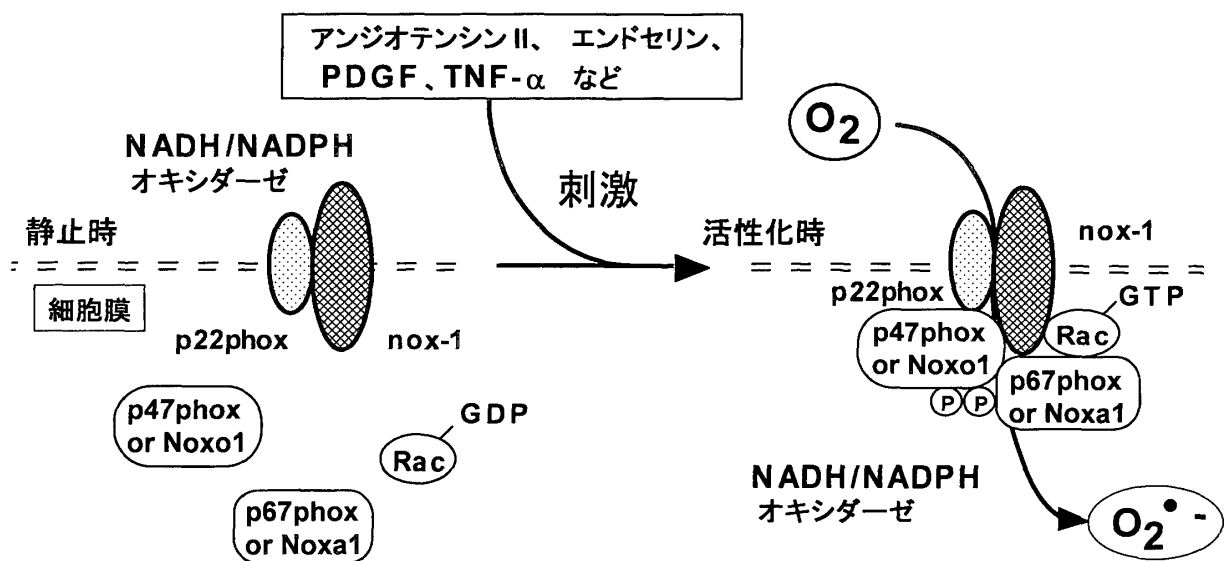


図4. 脈管作動物質による細胞膜 NAD(P)H オキシダーゼ活性化の模式図

DPI(diphenylene iodonium) や  $H_2O_2$  スカベンジャーのカタラーゼの過剰発現が、アンジオテンシン II 刺激による p38 を介した血管平滑筋細胞肥大を抑制するとの報告がある<sup>13)</sup>。また、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) と DPI が、エンドセリンによる血管平滑筋細胞での ROS 産生、JNK 活性化と細胞増殖を抑制したとの報告もある<sup>14)</sup>。そこで我々も、培養血管内皮細胞を用いて、抗酸化薬 ebselen(エブセレン)の動脈硬化予防作用を検討した。

### エブセレンの動脈硬化予防作用

#### 1) 開発の経緯

エブセレン (ebselen, 2-phenyl-1, 2-benzisoseleazol-3(2H)-one) は、1970 年代後半にドイツのナッターマン社(現アベンティス社)において合成された脂溶性の有機化合物である(図 5)<sup>15)</sup>。エブセレンはグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) と同様に分子内にセレン (Se) を含有する化合物であり、GSH-Px 様作用、抗炎症作用、抗酸化作用など多彩な薬理作用を有する。本邦では、脳血管障害急性期の治療薬としての開発が進み、くも膜下出血後の脳血管攣縮や脳硬塞急性期に効果のあることが実

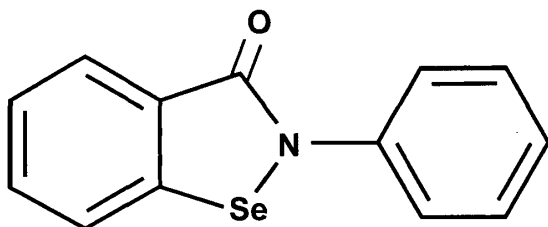


図 5. ebselen(エブセレン)の化学構造式

験的および臨床的に示されている<sup>16)</sup>。

#### 2) エブセレンの薬理作用

先に述べたように、ROS による酸化ストレスは動脈硬化の進展などの血管リモデリングに関与している可能性が高いが、ROS を消去する系の活性化は動脈硬化抑制に働くことが予想される。ROS は生体内に合目的的に存在する種々のメカニズムによって還元、消去されるが、その主要消去系の一つに  $H_2O_2$  や過酸化脂質の還元作用を担う細胞内酸化還元調節酵素として GSH-Px がある。エブセレンは生体内の GSH-Px と同様に GSH 存在下に NADPH を消費して  $H_2O_2$  などの過酸化物を還元する。またフリーラジカル種を同定・定量できる電子スピン共鳴 (electron paramagnetic resonance, EPR) 法を用いた検討で、エブセレンは *in vitro* でのスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) 消去作用を示すことが報告されている。我々も EPR 法を用いた実験で、培養 PC12 細胞において、エブセレンが  $H_2O_2$  刺激によるヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) 産生を抑制することを確認している(図 6)<sup>17)</sup>。酸化ストレスによる血管内皮細胞の障害は、アポトーシスや接着分子の発現を招いて動脈硬化を進展させ、血栓形成にも促進的に働くことが考えられる。そこで我々は、培養血管内皮細胞 (HUVEC) を用いてエブセレンの動脈硬化進展抑制作用を検討した。HUVEC において、炎症性サイトカインの一つ Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 刺激による MAP キナーゼ活性化に対するエブセレンの効果を検討すると ERK1/2, JNK/SAPK, p38 の 3 種の MAP キナーゼのうち、JNK の活性化をエブセレンが特異的に抑制することを見出した(図 7)<sup>18)</sup>。またエブセレンは、JNK 活性化に引き続く ROS 感受性転写因子, AP-1 と NF- $\kappa B$  の活性化を阻害し、血管内皮細胞に存在する接着分子の

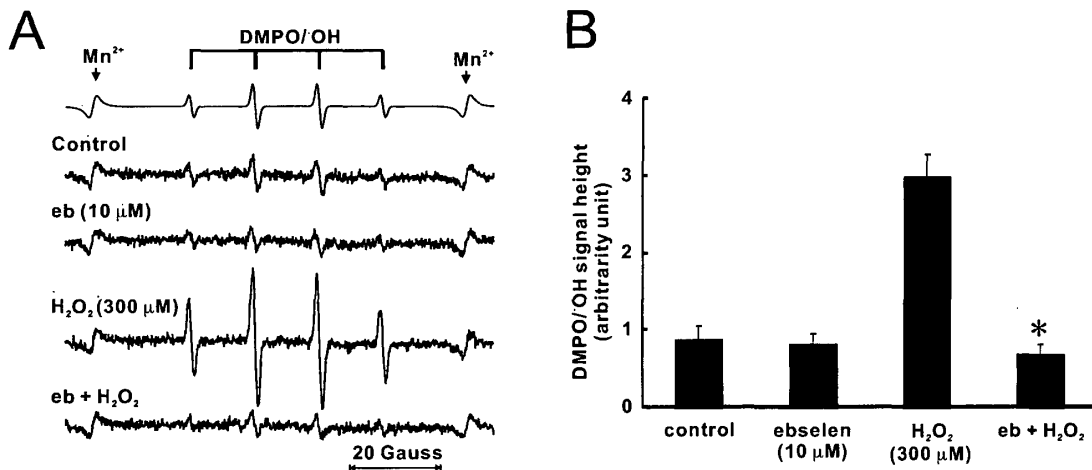


図 6. 培養 PC12 細胞における  $H_2O_2$  刺激によるヒドロキシラジカル ( $\cdot OH$ ) 産生に対するエブセレンの抑制効果(A は EPR シグナルを, B はその信号強度の定量を示している)。\*:  $p < 0.05$  (文献 17 より引用・改変)

となるかもしれない。

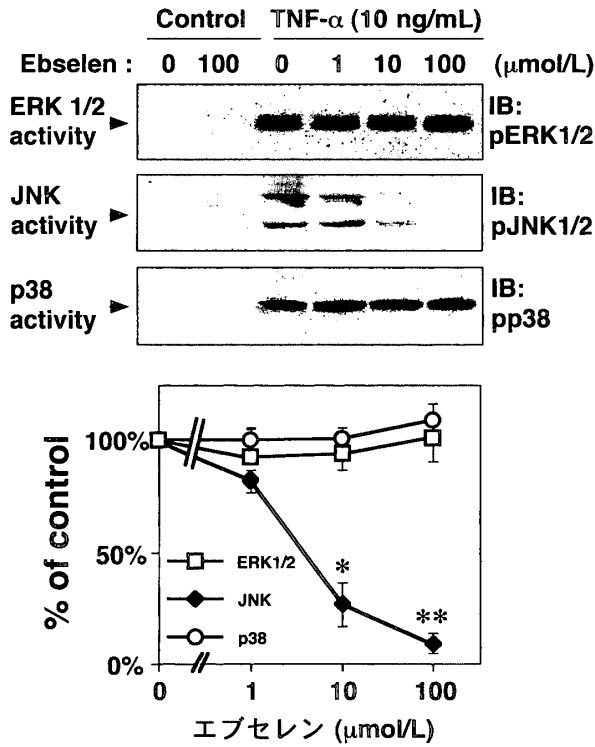


図7. 培養血管内皮細胞(HUVEC)における, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 刺激によるMAPキナーゼ活性化に対するエブセレンの効果(Aは活性化ERK1/2, JNK/SAPK, p38のバンドを, Bはそのdensitometryによる定量を示している).  
\*: p<0.05, \*\*: p<0.01  
(文献18より引用・改変)

発現を抑制した<sup>18)</sup>. このことは動脈硬化の進展の原因となる血管リモデリングにエブセレンが抑制効果を持つ可能性を示している. 事実, 動脈硬化の原因となる血管平滑筋細胞の遊走<sup>19)</sup>や, 糖尿病性微小血管障害の原因となる血管内皮機能障害<sup>20)</sup>をエブセレンが抑制したという報告がある. その他にも我々は, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激による血管内皮細胞のアポトーシスをエブセレンが抑制することを確認した<sup>21)</sup>. その細胞内情報伝達機構を検討したところ, エブセレンによる p38 MAP キナーゼの阻害が関与していることが明らかになった<sup>21)</sup>.

### 3) 現在のトピックス

エブセレンは, 抗酸化作用以外にもリポキシゲナーゼ阻害作用や, ミエロペルオキシダーゼ阻害による白血球の粘着, 浸潤抑制作用も持ち, 抗炎症薬としても期待される. 今後, ROSが発症や進展に関与すると考えられる動脈硬化をはじめとする炎症性疾患のほか, アレルギーや自己免疫疾患などがエブセレンによる治療ターゲット

### 経口亜硝酸の動脈硬化予防作用

#### 1) 生体内での亜硝酸からのNO産生

一酸化窒素(nitric oxide, NO)は一般に生体内ではL-アルギニンを基質としてNO合成酵素(NO synthase, NOS)によって生成され, 循環調節等の生理機能に関わっていることは広く知られている. 従来, 生体内で生理作用を発揮したNOは, 亜硝酸から硝酸へと代謝を受け, 速やかに体外へ排泄されると考えられてきた. すなわち亜硝酸は生体内で[NO→亜硝酸→硝酸→排泄]という一方通行の代謝経路における中間体にすぎず, 特異的な生理作用はほとんどないと考えられてきた. ところが近年, 亜硝酸が生理的条件下で再度NO源になる実験結果が*in vitro*の系で示されたことから, 生体内の亜硝酸についての意義が再検討され始めている. 化学の領域では, NOS以外のNO生成経路が存在することが知られている. すなわち, 還元剤を含んだ亜硝酸は強酸性条件下では, 化学反応により容易にNOが生成する. ヒトに硝酸を含む溶液を摂取させると上部小腸で吸収され, 吸収された硝酸の25%が唾液腺から口腔内へ分泌される<sup>22)</sup>. さらに口腔内細菌によって, 分泌された硝酸の20%が亜硝酸へと変換され<sup>23)</sup>, 胃に到達することが報告されている(腸-唾液腺循環)<sup>24,25)</sup>. このとき胃内では, 亜硝酸濃度の低下とNOガスの発生が確認され<sup>26)</sup>, 経口摂取された亜硝酸塩が, 胃内で酸分解を受けてNOへと変換されることが示された.

#### 2) 血中NO定量のためのEPRサブトラクション法

胃内で生成したNOが循環血液中出现するか否かを検討するため, 我々はEPRサブトラクション法によるヘモグロビン(Hb)NO測定法を開発した<sup>27)</sup>. NO分子そのものはガスのため消滅が非常に速く補足しがたいが, 一部がHbと結合することからHbNOとして定量できないかと考えた. HbNOは, ニトロシルヘモグロビン(HbNO)とS-ニトロソヘモグロビン(SNOHb)として存在することが, Stamlerらによって報告されている<sup>28)</sup>. このうち, HbNOは酸素分子(O<sub>2</sub>)と反応してメトヘモグロビン(metHb)と硝酸へと代謝されるため(HbNO + O<sub>2</sub> → metHb + NO<sub>3</sub>)<sup>29)</sup>, NO代謝における中間体と考えられてきた. しかしStamlerらはHbNOやSNOHbは血中においてNOの輸送およびリザーバーとしての役割を担っているというモデルを提唱した. このHbNOのうち, 約75%はHb(Fe<sup>3+</sup>)NOで, 残りの25%がHb(Fe<sup>2+</sup>)NOとして存在しているが<sup>30)</sup>, Hb(Fe<sup>2+</sup>)NOはEPR法によって特異的に検出が可能である. EPR装置を用いた血中NO測定

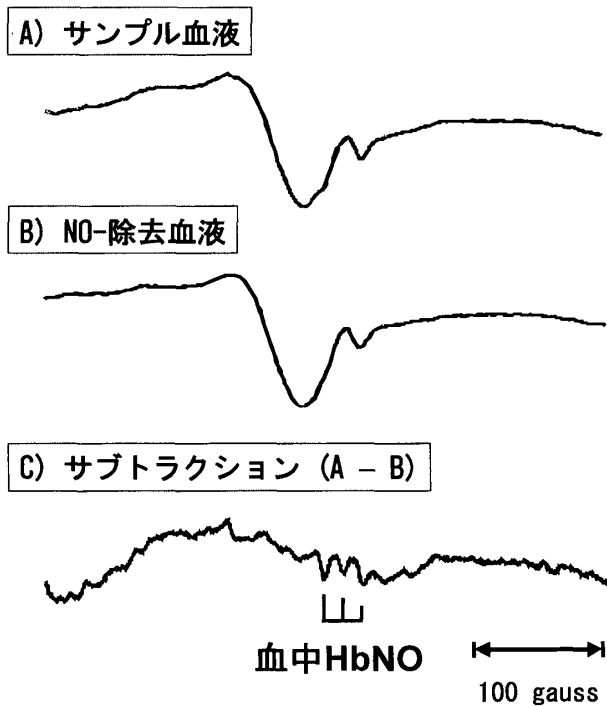


図8. EPRサブトラクション法による血中HbNOシグナルの検出。(A): 対象ラットにおけるHbNO signal, (B): L-NAME(2g/L)を一週間飲水投与し血中NOを枯渇状態にしたラットにおけるHbNO signal, (C): (A)から(B)をサブトラクションしたシグナル。(文献27より引用・改変)

法の問題点としてHbNOのシグナルに血中微量元素由来のシグナルが重複してしまうこと、HbNOに由来するEPRシグナルは非常に弱く従来のEPR測定法では検出は困難であることがあげられる。我々はこの問題点を克服するために、対象のラット血液サンプルのEPRシグナルから血中NO枯渇ラット(L-nitroarginine methyl ester, L-NAME(2g/L)を一週間飲水投与したラット)の血液サンプルのEPRシグナルを差し引く(サブトラクション)方法で3本の特徴的シグナルからなる血中HbNOが高感度に検出できた(図8)<sup>27)</sup>。次に、外因性亜硝酸由来のNOと内因性NOとを区別するため、我々は窒素の安定同位体である<sup>15</sup>NO<sub>2</sub>を用いたEPRサブトラクション法で検討した<sup>31,32)</sup>。SDラットに亜硝酸の安定同位体である<sup>15</sup>NO<sub>2</sub>を投与し、血中HbNO生成を検討した。通常では、Hb<sup>15</sup>NOに由来する小さな3本線のEPRシグナルが観察されるが、外因性に<sup>15</sup>NO<sub>2</sub>を投与すると、血液中に内因性には存在しない<sup>15</sup>NOに特徴的な2本線のHbNO由来のEPRシグナルが検出された。このことは経口摂取された亜硝酸が血中でのNO源となりうることを示している。

### 3) 食源性亜硝酸の降圧作用

以上の結果は、経口摂取された亜硝酸由来のNOが血中でHbNOとして存在し、循環動態に影響を与える可能性を示唆している。ところで、食生活の改善が高血圧を含め生活習慣病の予防につながることは以前からよく言及されている。最近になり、野菜、果物、低脂肪食品などからなるDASH食(Dietary Approaches to Stop Hypertension)による降圧効果が報告されている<sup>33,34)</sup>。しか

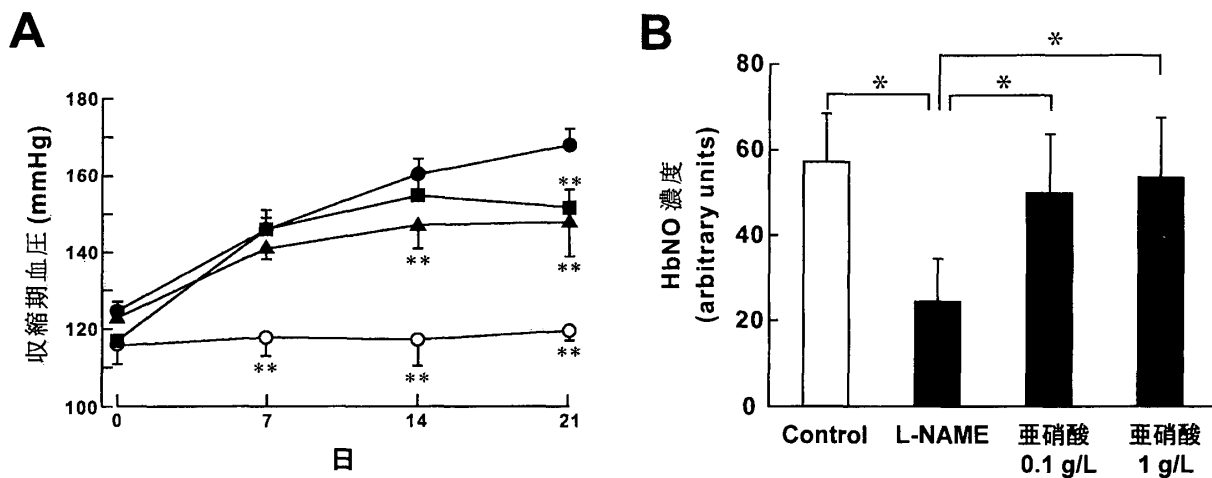


図9. L-NAME誘発高血圧ラットモデルでの経口亜硝酸投与による降圧効果(A)と血中HbNO濃度の変化(B)。(A): Control群(○), L-NAME単独投与群(●), L-NAME+亜硝酸塩100mg/L投与群(■), L-NAME+亜硝酸塩1000mg/L投与群(▲)。 \*\*: p<0.01 vs L-NAME単独投与群(B): L-NAME誘発高血圧ラットモデルに亜硝酸塩を3週間同時投与させた時の血中HbNO濃度。 \*: p<0.01 (文献31より引用・改変)

しなぜ野菜中心の食生活が高血圧の予防につながるか、そのメカニズムに関してはいまだ解明されていない。野菜や果物中には高濃度の硝酸および亜硝酸が含まれていることから<sup>35)</sup>、Thöniらは経口摂取した亜硝酸が血圧低下作用を発揮しているのではないかと推定した<sup>36)</sup>。亜硝酸を実験動物に投与すると血圧が低下するという報告もある<sup>37)</sup>。そこで我々は亜硝酸による血圧低下は亜硝酸から生成したNOの効果によるのではないかと仮定し、亜硝酸塩をL-NAME高血圧ラットに経口摂取させた時の血中HbNOシグナル強度と血圧を測定することにより検討した。実験は12週齢の雄性SDラットにL-NAME(1g/L)を飲水により3週間慢性投与することにより高血圧を発症させたモデルを使用した。L-NAME投与と同時に亜硝酸塩(100, 1000 mg/L)を飲水投与させることにより、それぞれの血圧およびHbNO濃度につき観察した。その結果、L-NAME単独投与群で、血中のHbNO濃度の低下とともに、著明な高血圧が観察され、亜硝酸塩投与群で、HbNO濃度の低下が回復し、高血圧も改善された(図9)。このことは、経口的に摂取した亜硝酸によって血中のHbNO動態が影響を受けるだけでなく、降圧作用にも寄与している事を示すものでありHbNOが血中においてNOの輸送およびリザーバーとしての役割を担っているというモデル<sup>28)</sup>を支持する結果と考えられる。おそらく、経口亜硝酸投与による血中のNO増加が、血管内皮機能保護に働き降圧作用をもたらしたことが推察される。

#### その他の抗酸化薬の動脈硬化予防作用、臨床試験の結果と問題点

その他の抗酸化薬、抗酸化食品成分の動脈硬化予防作用についても我々は検討を加えてきた。In vitroの実験では、培養血管平滑筋細胞で水溶性ビタミンEアナログのTrolox CとビタミンC(Ascorbic acid)がアンジオテンシンII刺激によるJNK, p38活性化を抑制することを見出ししている<sup>12)</sup>。また食品成分として、自然食品に含まれるバイオフィラボノイド類のひとつQuercetin(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出した<sup>38)</sup>。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際に、ほとんどがグルクロン酸抱合を受けていることが最近明らかになっている<sup>39)</sup>。そこで我々は、ケルセチングルクロン酸抱合型を化学合成して実験を行

ない、ケルセチンと同等の抗酸化活性と、JNK阻害作用を確認した<sup>40)</sup>。In vitroでの薬物の抗酸化作用のほとんどが未変化体で検討されているが、抗酸化薬の作用を検討する際には、薬物の吸収・代謝を考慮に入れたin vivo formでの実験が今後重要になるであろう。

抗酸化薬の臨床研究では、大規模臨床試験でビタミンEの冠動脈疾患二次予防効果を示したCHAOS<sup>41)</sup>などがある。しかし、GISSI-prevenzione<sup>42)</sup>やHOPE study<sup>43)</sup>などではビタミンEは冠動脈疾患の二次予防に効果がなかったという結果であり、抗酸化薬が心血管病治療に有効であるとのEvidenceが確立されたとはいえない状況である。それでは抗酸化薬が、in vitroで効果を示しても臨床的に効果がない場合があるのはどうしてであろうか。心血管疾患を合併した透析患者を対象にしたSPACE試験<sup>44)</sup>ではビタミンE補充療法の有用性が確認されており、酸化ストレスの大きい病態では抗酸化療法が有効なのではないかという議論もなされている。

#### おわりに

以上、動脈硬化の発症・進展における酸化ストレスの関与とMAPキナーゼの役割、さらにエプセレンと経口亜硝酸の動脈硬化予防効果について解説した。最近の研究の進展により、酸化ストレスは様々な疾病の病態生理に関わっていることが明らかにされてきたが、抗酸化療法の有用性が確立されたものは少ない。その理由は多数挙げられるであろうが、一つには酸化ストレスが多様な産生機構によって発生することがある。核内で産生される活性酸素種などもあり、抗酸化薬の細胞内分布などにも問題がある可能性がある。今後の研究の方向性として、一方では酸化ストレス感受性細胞内分子のさらなる探究であろう。ROS感受性の鍵となる分子が同定できれば、それをターゲットとした分子標的薬の開発も可能となろう。もう一方では、吸収・分布・代謝・排泄を考えたin vivoでの抗酸化薬の臨床薬理学的研究であろう。In vitroで効果があってもin vivoで効果のない抗酸化剤も多く、そのメカニズムを明らかにしていくことは臨床的に有用な抗酸化薬を開発していく上で重要であると思われる。より効果の高い抗酸化薬が発見・開発されれば、吸収や代謝を考慮した投与法を考えることによって、単に予防ではなく積極的な治療薬としての抗酸化薬の可能性が広がるものと思われる。

[謝辞]本稿で述べた、経口亜硝酸の動脈硬化予防作用の研究は、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・薬物治療解析学分野の土屋浩一郎助教授と、情報伝達薬



理学分野の玉置俊晃教授が中心となって行なわれたものである。ここに感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) **Abe, J.**, and **Berk, B. C.** : Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc. Med.* **8** : 59-64, 1998.
- 2) **Griendling, K. K.**, **Sorescu, D.** and **Ushio-Fukai, M.** : NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ. Res.* **86** : 494-501, 2000.
- 3) **Yoshizumi, M.**, **Tsuchiya, K.** and **Tamaki, T.** : Signal transduction of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinases in cardiovascular disease. *J. Med. Invest.* **48** : 11-24, 2001.
- 4) **Carr, A. C.**, **McCall, M. R.** and **Frei, B.** : Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20** : 1716-1723, 2000.
- 5) **Yoshizumi, M.**, **Abe, J.**, **Haendeler, J.**, **Huang, Q.** and **Berk, B. C.** : Src and Cas mediate JNK activation but not ERK1/2 and p38 kinases by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **275** : 11706-11712, 2000.
- 6) **Yoshizumi, M.**, **Kim S.**, **Kagami, S.**, **Hamaguchi, A.**, **Tsuchiya, K.**, **Houchi, H.**, **Iwao, H.**, **Kido, H.** and **Tamaki, T.** : Effect of endothelin-1 (1-31) on extracellular signal-regulated kinase and proliferation of human coronary artery smooth muscle cells. *Brit. J. Pharmacol.* **125** : 1019-1027, 1998.
- 7) **Griendling, K. K.**, **Sorescu, D.**, **Lassegue, B.** and **Ushio-Fukai, M.** : Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20** : 2175-2183, 2000.
- 8) **Ushio-Fukai, M.**, **Zafari, A. M.**, **Fukui, T.**, **Ishizaka, N.** and **Griendling, K. K.** : 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.* **271** : 23317-23321, 1996.
- 9) **Suh, Y. A.**, **Arnold, R. S.**, **Lassegue, B.**, **Shi, J.**, **Xu, X.**, **Sorescu, D.**, **Chung, A. B.**, **Griendling, K. K.** and **Lambeth, J. D.** : Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* **401** : 79-82, 1999.
- 10) **Lambeth JD.**, **Cheng G.**, **Arnold RS.**, and **Edens WA** : Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem. Sci.* **25** : 459-461, 2000.
- 11) **Lassegue, B.**, **Sorescu, D.**, **Szocs, K.**, **Yin, Q.**, **Akers, M.**, **Zhang, Y.**, **Grant, S. L.**, **Lambeth, JD.** and **Griendling, K. K.** : Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ. Res.* **88** : 888-894, 2001.
- 12) **Kyaw, M.**, **Yoshizumi, M.**, **Tsuchiya, K.**, **Kirima, K.** and **Tamaki, T.** : Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. *Hypertens. Res.* **24** : 251-61, 2001.
- 13) **Ushio-Fukai, M.**, **Alexander, R. W.**, **Akers, M.** and **Griendling K. K.** : p38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy. *J. Biol. Chem.* **273** : 15022-15029, 1998.
- 14) **Fei, J.**, **Viedt, C.**, **Soto U.**, **Elsing, C.**, **Jahn, L.** and **Kreuzer, J.** : Endothelin-1 and smooth muscle cells: induction of Jun amino-terminal kinase through an oxygen radical-sensitive mechanism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20** : 1244-1249, 2000.
- 15) **Muller, A.**, **Cadenas, E.**, **Graf, P.** and **Sies, H.** : A novel biologically active seleno-organic compound-I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). *Biochem. Pharmacol.* **33** : 3235-3239, 1984.
- 16) **Yamaguchi, T.**, **Sano, K.**, **Takakura, K.**, **Saito, I.**, **Shinohara, Y.**, **Asano, T.** and **Yasuhara, H.** : Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Ebselen*

- Study Group. *Stroke* **29** : 12-17, 1998.
- 17) Yoshizumi, M., Kogame, T., Suzuki, Y., Fujita, Y., Kyaw, M., Kirima, K., Ishizawa, K., Tsuchiya, K., Kagami, S. and Tamaki, T. : Ebselen attenuates oxidative stress-induced apoptosis via the inhibition of the c-Jun N-terminal kinase and activator protein-1 signaling pathway in PC12 cells. *Brit. J. Pharmacol.* **136** : 1023-1032, 2002.
  - 18) Yoshizumi, M., Fujita, Y., Izawa, Y., Suzuki, Y., Kyaw, M., Ali, N., Tsuchiya, K., Kagami, S., Yano, S., Sone, S. and Tamaki, T. : Ebselen inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced c-Jun N-terminal kinase activation and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Exp. Cell. Res.* **292** : 1-10, 2004.
  - 19) Weber, D. S., Taniyama, Y., Rocic, P., Seshiah, P. N., Dechert, M. A., Gerthoffer, W. T. and Griendling, K. K. : Phosphoinositide-dependent kinase 1 and p21-activated protein kinase mediate reactive oxygen species-dependent regulation of platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell migration. *Circ. Res.* **94** : 1219-1226, 2004.
  - 20) Brodsky, SV., Gealekman, O., Chen, J., Zhang, F, Togashi, N., Crabtree, M., Gross, SS., Nasjletti, A. and Goligorsky, M. S. : Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen. *Circ. Res.* **94** : 377-384, 2004.
  - 21) Ali, N., Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., Kyaw, M., Fujita, Y., Izawa, Y., Abe, S., Kanematsu, Y., Kagami, S. and Tamaki, T. : Ebselen inhibits p38 mitogen-activated protein kinase-mediated endothelial cell death by hydrogen peroxide. *Eur. J. Pharmacol.* **485** : 127-135, 2005.
  - 22) Bartholomew, B. and Hill, M. J. : The pharmacology of dietary nitrate and the origin of urinary nitrate. *Food Chem. Toxicol.* **22** : 789-795, 1984.
  - 23) Spiegelhalder, B., Eisenbrand, G. and Preussmann, R. : Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Cosmet. Toxicol.* **14** : 545-548, 1976.
  - 24) Duncan, C., Dougall, H., Johnston, P., Green, S., Brogan, R., Leifert, C., Smith, L., Golden, M. and Benjamin, N. : Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat. Med.* **1** : 546-551, 1995.
  - 25) Mowat, C. and McColl, K. E. : Alterations in intragastric nitrite and vitamin C levels during acid inhibitory therapy. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **15** : 523-537, 2001.
  - 26) McKnight, G. M., Smith, L. M., Drummond, R. S., Duncan, C. W., Golden, M. and Benjamin, N. : Chemical synthesis of nitric oxide in the stomach from dietary nitrate in humans. *Gut* **40** : 211-214, 1997.
  - 27) Kirima, K., Tsuchiya, K., Sei, H., Hasegawa, T., Shikishima, M., Motobayashi, Y., Morita, K., Yoshizumi, M. and Tamaki, T. : Evaluation of systemic blood NO dynamics by EPR spectroscopy: HbNO as an endogenous index of NO. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285** : H589-596, 2003.
  - 28) Gow, A. J., Luchsinger, B. P., Pawloski, J. R., Singel, DJ. and Stamler, J. S. : The oxyhemoglobin reaction of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96** : 9027-9032, 1999.
  - 29) Kosaka, H. and Shiga, T. : Detection of nitric oxide by electron spin resonance using hemoglobin. In: Feelisch M., Stamler JS., eds. *Methods in Nitric Oxide Research*. Chichester: John Wiley & Sons, pp373-381, 1996.
  - 30) Nagababu, E., Ramasamy, S., Abernethy, D. R. and Rifkind, J. M. : Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. *J. Biol. Chem.* **278** : 46349-46356, 2003.
  - 31) Tsuchiya, K., Kanematsu, Y., Yoshizumi, M., Ohnishi, H., Kirima, K., Izawa, Y., Shikishima, M., Ishida, T., Kondo, S., Kagami, S., Takiguchi, Y. and Tamaki, T. : Nitrite is an alternative source of NO in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **288** : H2163-2170, 2005.
  - 32) Okamoto, M., Tsuchiya, K., Kanematsu, Y., Izawa, Y., Yoshizumi, M., Kagawa, S. and Tamaki, T. : Nitrite-derived nitric oxide

- formation following ischemia-reperfusion injury in kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **288** : F182-187, 2005.
- 33) Appel, L. J., Moore, T. J., Obarzanek, E., Vollmer W. M., Svetkey, L. P., Sacks, F. M., Bray, G. A., Vogt, T. M., Cutler, J. A., Windhauser, M. M., Lin, P. H. and Karanja, N. : A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N. Engl. J. Med.* **336** : 1117-1124, 1997.
- 34) Moore, T. J., Conlin, P. R., Ard, J. and Svetkey, L. P. : DASH (Dietary Approaches to Stop Hypertension) diet is effective treatment for stage 1 isolated systolic hypertension. *Hypertension* **38** : 155-158, 2001.
- 35) White, J. W, Jr. : Relative significance of dietary sources of nitrate and nitrite. *J. Agric. Food Chem.* **23** : 886-891, 1975.
- 36) Beier, S., Classen, H. G., Loeffler, K., Schumacher, E. and Thöni, H. : Antihypertensive effect of oral nitrite uptake in the spontaneously hypertensive rat. *Arzneimittel-forsch.* **45** : 258-261, 1995.
- 37) Vleeming, W., van de Kuil, A., te Biesebeek, J. D., Meulenbelt, J. and Boink, A. B. : Effect of nitrite on blood pressure in anaesthetized and free-moving rats. *Food Chem. Toxicol.* **35** : 615-619, 1997.
- 38) Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., Kirima, K., Kyaw, M., Suzaki, Y., and Tamaki, T. : 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.* **60** : 656-665, 2001.
- 39) Moon, J., Tsushida, T., Nakahara, K. and Terao, J. : Identification of quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucuronide as an antioxidative metabolite in rat plasma after oral administration of quercetin. *Free Radic. Biol. Med.* **30** : 1274-1285, 2001.
- 40) Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., Suzaki, Y., Kirima, K., Kyaw, M., Moon, J. H., Terao, J. and Tamaki, T. : Quercetin glucuronide prevents VSMC hypertrophy by angiotensin II via the inhibition of JNK and AP-1 signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293** : 1458-1465, 2002.
- 41) Stephens, N. G., Parsons, A., Schofield, P. M., Kelly, F., Cheeseman, K. and Mitchinson, M. J. : Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* **347** : 781-786, 1996.
- 42) GISSI-Prevenzione Investigators : Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *Lancet* **354** : 447-455, 1999.
- 43) The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators : Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. *N. Engl. J. Med.* **342** : 154-160, 2000.
- 44) Boaz, M., Smetana, S., Weinstein, T., Matas, Z., Gafer, U., Iaina, A., Knecht, A., Weissgarten, Y., Brunner, D., Fainaru, M. and Green, M. S. : Secondary prevention with antioxidants of cardiovascular disease in end-stage renal disease (SPACE): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* **356** : 1213-1218, 2000.