

TLR4 is a critical regulator of angiotensin II-induced vascular remodeling: the roles of extracellular SOD and NADPH oxidase

(TLR4 はアンジオテンシン II による血管リモデリングに extracellular SOD および NADPH オキシダーゼを介して重要な役割を果たす)

氏名 中島 忠亮

所属 山口大学大学院医学系研究科

応用医工学系専攻 器官病態内科学分野

平成 27 年 6 月

目次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	1
3. 方法	2
(1) 化学薬品および抗体	2
(2) 研究プロトコル	2
(3) 組織採取、組織学的解析および免疫組織化学的解析	3
(4) NADPH オキシダーゼの活性および ecSOD の活性の検出解析	3
(5) 血管壁の $\cdot O_2$ の検出	3
(6) 免疫プロット	4
(7) 統計学的解析	4
4. 結果	4
(1) TLR4 欠損は AngII による血管リモデリングを防ぐ	4
(2) TLR4 欠損は AngII による ROS 産生を無効化する	5
(3) TLR4 欠損は AngII による NADPH オキシダーゼ活性を抑制する	5
(4) TLR4 欠損は AngII による MCP-1 発現作用を無効化する	5
(5) TLR4 欠損は AngII による ecSOD のアップレギュレーションを促進する	5
(6) 壁腔比は NADPH オキシダーゼ活性、 $\cdot O_2$ 量、MCP-1 に相関関係を示すが ecSOD には相関しない	6
5. 考察	6
6. 結語	8
7. 謝辞	1 2
8. 参考文献	1 2

1. 要旨

Toll-like receptor 4 (TLR4) とアンジオテンシン II (AngII) は活性酸素種 (ROS) の産生を介して血管リモデリングを来すことが示されている。AngII はまた抗酸化酵素である extracellular superoxide dismutase (ecSOD) の産生を促す。しかし、AngII による ROS の産生、血管リモデリングと高血圧において、TLR4 の役割は不明である。TLR4 機能が欠損したマウスに血圧上昇を来さない用量で AngII を持続投与したところ、血管リモデリングが明らかに抑制された。また、TLR4 機能欠損マウスに AngII を持続投与したところ ROS 含量と NADPH オキシダーゼ活性の上昇は明らかに低値であった。同様の効果は野生型マウス (WT) に AngII タイプ 1 (AT1) 受容体拮抗薬であるイルベサルタンを投与しても得られたが、TLR4 機能欠損マウスにイルベサルタンを投与しても結果に変化は生じなかった。興味深いことに、AngII 投与による ecSOD の発現および活性の上昇は、炎症惹起性ケモカインである MCP-1 が抑制されているにもかかわらず、WT よりも TLR4 機能欠損マウスで顕著であった。重要な点は、AngII による血管リモデリングは NADPH オキシダーゼ活性、ROS 含量と MCP-1 の発現量に相互関係があることである。また、ROS の産生増加を生じずに血圧上昇のみを来すノルエピネフリンを投与したところ、WT では明らかな血管リモデリングは生じなかった。これらの結果から、本研究系では、ROS 含量の増加は血管リモデリングの促進に必要であるが、血圧上昇には必要ないことが示唆された。本研究の結果、TLR4 が ecSOD の産生および活性を抑制し、NADPH オキシダーゼを活性化することで AngII による ROS 含量を調整する中心的な役割を果たし、炎症を惹起することで血管リモデリングを促進にすることが示唆された。

2. 研究の背景

高血圧において、アンジオテンシン II (AngII) は AngII タイプ 1 (AT1) 受容体を介した NADPH オキシダーゼの活性化により活性酸素種 (ROS) を増加させる。これにより、血管平滑筋の収縮、全身性の血圧上昇、血管内皮機能の障害、炎症反応および血管リモデリングが生じる¹⁻³⁾。これに付随して、AngII はまた、血管細胞外の主たる抗酸化酵素である extracellular superoxide dismutase (ecSOD) の産生および活性を促す^{4,5)}。実際、NADPH オキシダーゼ欠損マウスでは、AngII に起因した高血圧が低下する。一方、ecSOD 欠損マウスでは AngII の効果が増強する^{8,9)}。しかし、AngII による ROS 産生は、高血圧、血管リモデリング、炎症を含めた種々の血管反応において、必ずしも一致した結果が得られていない^{1,2)}。

当初 Toll-like receptors (TLRs) は、自然免疫に関与するレセプターとして同定された^{10,11)}。しかし、近年、TLR は外因性微生物に対する作用に限定しないという報告がされるようになった。そして、内因性 TLR リガンドが組織障害や感染を伴わない炎症の惹起に関連があることが示唆されるようになった^{12,13)}。さらに、炎症や心血管疾患の進展における TLR のシグナル伝達系に関する報告が増えつつある^{11,14,15)}。いくつかの研究結果から、数種の TLR

が動脈壁には発現しており^{11,16,17}、とりわけ血管リモデリングおよびアテローム性動脈硬化を促進することが示された^{15,18}。また、TLR4はNADPHオキシダーゼとの相互作用を介して、リポ多糖類(LPS)によるROS増加に関与していることが報告されている^{19,20}。これらの知見から、TLR4はAngIIによるROSの調整および血管リモデリングに関与していることが示唆される。

しかし、TLR4がROSの調節に関与し、どのようにAngIIによる高血圧において血管リモデリングを引き起こすかについては未だに不明である。本研究では、AngIIによる高血圧においてTLR4、AT1受容体、NADPHオキシダーゼ由来のROS、抗酸化酵素ecSODおよび血管リモデリングにおける炎症について検討した。

3. 方法

本研究は、山口大学動物使用委員会が動物愛護および適切な使用に関して定める「国立大学法人山口大学における動物使用に関する規則」を遵守して実施した。

(1) 化学薬品および抗体

AngII 酢酸水和物、L-(-)-ノルエピネフリン酒石酸水素塩単水和物、SOD 類似 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (Tempol) はSigma-Aldrich社 (St Louis, MO, USA) から購入した。AT1 受容体選択性拮抗薬であるイルベサルタン (IRB) は塩野義製薬 (Tokyo, Japan) から無償提供を受けた。以下の抗体は免疫科学もしくは免疫プロットに用いた。抗マウス MCP-1 ラビットポリクローナル抗体 (Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA)、抗ヒト Cu/ZnSOD ラビットポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、抗ヒト α -smooth muscle actin (SMA) ゴートポリクローナル抗体 (DAKO Japan, Kyoto, Japan)。高度の精製マウス ecSOD 抗体は過去の報告と同様にして取得した^{5,21}。

(2) 研究プロトコル

12-16 週齢オスの野生種 (WT) マウス (Balb/c, Charles River Japan, Yokohama, Japan, WT マウス; n=12) と Balb/c を背景に持つホモ接合体 TLR4 不活化マウス ($Tlr4^{lps-d}$, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA, $Tlr4^{lps-d}$ マウス; n=12)²²⁻²⁴ を山口大学生命科学実験施設で飼育した。

WT および $Tlr4^{lps-d}$ マウスを共に無作為に 4 群に分け、それぞれに生理食塩水 (対照群)、AngII (1.1mg/kg/日; AngII 群)、ノルエピネフリン (NE, 5.6 mg/kg/日; NE 群)、AngII に加え血圧に影響を来さない用量に調整した IRB (IRB 6mg/kg/日; IRB 群) を投与した。いくつかの研究では高用量 IRB (21.2mg/kg/日) を用いた。これらの投与量は事前に兆四両を検討し決定した。Osmotic minipump (Model 1002, Alzet Osmotic Pumps, Cupertino, CA,

USA) の植え込みに際して、麻酔はイソフルレン (Abbot Japan, Tokyo, Japan) を導入時 3%、維持 1% の濃度で投与した。生理食塩水、AngII および NE は皮下に Osmotic minipump を植え込みそれぞれ 2 週間投与した。IRB は、AngII を投与するとともに 2 週間経口投与を行った。投与開始から 2 週間後に体重を測定し、7 日および 14 日目に血圧と心拍数を非麻酔下で tail-cuff プレシスモグラフィにより測定した。

(3) 組織採取、組織学的解析および免疫組織化学的解析

それぞれの薬剤を投与 2 週間後、マウスに過量のイソフルレンを吸入させることにより安楽死させた。すべてのマウスにおいて、大動脈近位部は液体窒素で新鮮凍結した後、ジヒドロエチジウム (DHE) 染色用に厚さ 30 μm の薄切切片を作成した²⁵⁾。残余標本の一部は 10% に調整したホルムアルデヒドで固定した後、マッソン・トリクロム染色もしくはヘマトキシリン・エオジン染色用にパラフィン包埋し厚さ 4 μm の薄切切片を作成し、血管の形態を評価した。その他の大動脈組織は他の研究に用いるため -80°C で凍結保存した。

各切片は自動化顕微鏡 (Eclipse E1000, Nikon) に接続したデジタルカメラ (DXM1200F, Nikon, Tokyo, Japan) とカメラコントロールシステム (ACT-1, version 2.51, Nikon) を用いて定量的に評価を行った。これまでの報告に従い²⁶⁻²⁸⁾、大動脈の壁厚内腔比と中膜の総細胞数 ($\times 10^3 \text{ mm}^{-2}$) をそれぞれ評価した。各大動脈は盲目的に 3 断面を選択し、少なくともそのうちの 2 切片を NIH イメージソフトウェア version 1.62 (Bethesda, MD, USA) を用いて評価を行った。各大動脈切片の平均値を算出し統計学的解析を行った。大動脈の形態および蛋白の発現における選択的定量的解析は過去に詳述されている方法に従って行った^{26, 27)}。血管壁における MCP-1 および TLR4 の発現は、連続切片を用い、avidin-biotinylated enzyme complex 法 (Vector Laboratories, San Francisco, CA, USA)²⁶⁾ にて免疫組織化学的に評価した。

(4) NADPH オキシダーゼ活性および ecSOD 活性の検出

NADPH オキシダーゼ活性は 5 μM のルシゲニン (bis-*N*-methylacridinium nitrate) を電子受容体とし、100 μM の NADPH を基質として、従来の報告²⁵⁾ に従い蛍光法で解析した。ルシゲニンの計測はホモジネートの μg および単位分あたりの発現量で確認した。

ConA-Sepharose クロマトグラフィー (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) を、従来の報告に従って ecSOD の分離に用いた^{25, 29, 30)}。ecSOD 活性は SOD assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, US) を用いて測定した²⁵⁾。

(5) 血管壁における $\cdot\text{O}_2^-$ の検出

大動脈壁における ROS 含量増加を検討するため、厚さ 30 μm の固定していない凍結大動脈片を *in situ* 画像作成のために準備した。従来の報告に従って²⁶⁾、 $\cdot\text{O}_2^-$ 含量を DHE 蛍光染色 (Polysciences, Warrington, PA, USA) で測定した。 $\cdot\text{O}_2^-$ 検出のための DHE 特定につい

では、SOD 類似薬 Tempol (500U/ml) とブレインキューベーションすることで確認した。画像はレーザー走査共焦点顕微鏡 (LSM510, Zeiss, Munich, Germany) を用いて得た。内膜および中膜における $\cdot O_2^-$ 産生は、ヘマトキシリン・エオジン染色した連続切片を用いて盲検下で評価した。これらのデータは、コントロール WT マウスに対するパーセンテージとして表示した。

(6) 免疫ブロット

150mM NaCl, 5mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、10mM ピロリン酸ナトリウム、10mM β -グリセロリン酸、1mM Na_3VO_4 、1mM フェニルメタンスルホニルフルオリドおよび 10mg/ml アプロチニンを含む 25mM Tris (pH7.4) に Triton X-100 を加えて 1% の濃度に調整し、凍結サンプルをホモジネートして蛋白を抽出した。抽出した蛋白濃度は、BCA protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。各蛋白の発現を測定するため、ウェスタンブロット法で同量の各蛋白を硫酸ドデシルナトリウムポリアクリルアミドゲルの各レーンに充填し、フッ化ポリビニリデン膜 (Millipore, Bedford, MA, USA) に転写後、ヒト Cu/ZnSOD に対するウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、親和性精製されたマウス ecSOD 抗体とヒト α -SMA に対するヤギポリクローナル抗体 (DAKO Japan, Kyoto, Japan) を用いて証明した。標的蛋白は既報に従って²⁸⁾、NIH イメージソフトウェア version 1.62 と enhanced chemiluminescence system (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を用いて可視化し測定した。

(7) 統計学的解析

すべての数値は平均 \pm 標準誤差で示した。各群は StatView version 5.01 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて Scheffe の多重比較検定法による分散分析を用いて検定した。 $\cdot O_2^-$ 含量および MCP-1 の増加率、NADPH オキシダーゼおよび ecSOD の活性値の 4 項目と壁厚内腔比との関連は単回帰分析を用いて統計学的解析を行った。P < 0.05 を統計学的に有意とした。

4. 結果

(1) TLR4 の欠損は AngII による血管リモデリングを防ぐ

表 1 に介入 14 日目の体重、心拍数、血圧および中膜の総細胞数を示した。コントロールの WT および Tlr4^{lps-d} マウスは同様の体重と心拍数を示し、薬剤投与によりこれらの指標に影響はなかった。AngII および NE は、コントロールの WT および Tlr4^{lps-d} マウス群に比べ、すべての薬剤投与群で同様に収縮期血圧が上昇した。薬剤投与群間で血圧に明らかな差異はなかった。コントロールの WT および Tlr4^{lps-d} マウス群は、中膜の細胞数も同等であった。さらに、WT および Tlr4^{lps-d} マウスにいずれの薬剤を投与しても、中膜の細胞数に変化はなかった。

図 1a に示すように、コントロールの WT および Tlr4^{lps-d} マウス群は、壁厚内腔比は同等であった。WT マウスにおいて、AngII 投与群はコントロール群に比べて、著明に壁厚内腔比が大きくなった。しかし、Tlr4^{lps-d} マウスでは、AngII 投与群はコントロール群に比べて壁厚内腔比は変わらなかった。WT マウスでは、AT1 受容体拮抗薬 IRB を投与した群では AngII による壁厚内腔比の増大が抑制された。NE 投与群では WT および Tlr4^{lps-d} マウスともに壁厚内腔比は大きくならなかった。

(2) TLR4 の欠損は AngII による ROS 産生を阻害する

図 1b は、腹部大動脈における・O₂⁻の *in situ* における発現を示している。WT および Tlr4^{lps-d} マウスの内膜および外膜はほぼ DHE の蛍光はなく、中膜にわずかに認められるのみであった。図 1c で示すように、定量評価では、コントロール群の WT マウスに比べて AngII 投与群のみ血管壁全体で 10 倍の DHE 蛍光増加を示した。一方、WT マウスの IRB 群では、WT マウスの AngII 群に比べて著明に DHE 蛍光が減じた。一方、Tlr4^{lps-d} マウスの AngII 群および IRB 群は、WT マウスの AngII 投与群に比べて、DHE 蛍光の上昇は有意ではなかった。Tempol とともにインキュベーションすることで、WT マウス AngII 投与群の DHE 蛍光は著明に減少した。このことは、DHE シグナルが主に・O₂⁻の増加を反映しているためと考えられる（図 1b）。NE 投与群では、WT および Tlr4^{lps-d} マウスともにごくわずかな・O₂⁻の増加を示すのみであった。

(3) TLR4 の欠損は AngII による NADPH オキシダーゼ活性を抑制する

AngII は、WT マウスに対してのみ血管壁における NADPH オキシダーゼ活性を約 3 倍上昇させた（図 2）。IRB 投与により、この反応は阻害された。NE 投与群では、WT および Tlr4^{lps-d} マウスともに NADPH オキシダーゼ活性の増加はほぼ認められず、ともにコントロール群と同等の値であった。

(4) TLR4 の欠損は AngII による MCP-1 発現作用を阻害する

免疫化学的に、MCP-1 は内膜および中膜の細胞質において茶褐色に染色された（図 3a）。血管壁における定量解析では、WT および Tlr4^{lps-d} マウスのコントロール群は同等の MCP-1 の発現を示す（図 3b）。WT マウスでは、コントロール群に対して AngII 投与群は 3.5 倍の MCP-1 の発現を示す。そして、この発現は IRB の投与でコントロール群と同等の値に低下する。一方、Tlr4^{lps-d} マウスにおいては、AngII 群、IRB 群ともに MCP-1 の発現はコントロール群と同等である。NE 投与群では WT および Tlr4^{lps-d} マウスともにコントロール群に比べて有意な上昇はなかった。

(5) TLR4 の欠損は AngII による ecSOD のアップレギュレーションを促進する

WT マウスでは、AngII 群において ecSOD の発現がコントロール群と比べ 3 倍程度上昇し

た。また、Tlr4^{lps-d}マウスではAngII群においてecSODの発現がコントロール群と比べ7倍程度上昇した。これらの結果は、IRB投与により影響を受けなかった。一方、WTマウスの高用量IRB群ではecSODの発現は抑制された(図4a)。AngIIは、WTマウスにおいて、ecSOD活性もコントロール群に比べて10倍上昇させた。Tlr4^{lps-d}マウスでは、AngIIによるecSOD活性上昇はより顕著であった(図4b)。ecSOD活性は、IRB群ではAngII群と著変ないものの、高用量IRB群では明らかに抑制された。他方、NE群はWTおよびTlr4^{lps-d}マウスともにecSOD活性に影響しなかった(図4a、4b)。さらに、何れの群でもCu/ZnSODの発現は変化しなかった(図4c)。

(6) 壁厚内腔比はNADPHオキシダーゼ活性、・O₂含量、MCP-1に正相関するがecSODには相関しない

壁厚内腔比とNADPHオキシダーゼ活性、・O₂含量、MCP-1およびecSODとの相関関係について評価した。定量的評価で、壁厚比はNADPHオキシダーゼ活性、・O₂量、MCP-1との間に明らかな正相関を示したが(図5a-c)、ecSODとは相関がなかった(図5d)。

5. 考察

今回の研究で、TLR4の欠損は、血圧に影響を与えることなくAngIIによる血管リモデリングを減弱し、NADPHオキシダーゼ活性を減弱させ、ROS産生も抑制することを明らかにした。同様の効果はIRBを投与したWTマウスにおいても見られた。同時に、AngIIによる血管リモデリングはNADPHオキシダーゼおよびROS含量に正相関を示すことを見出した。また、ROS産生を増やすことなく血圧を上昇させるNEの持続投与は、WTマウスでは血管リモデリングを生じなかった。このことから、本研究系では血管リモデリングはROSの上昇により加速されるが、高血圧による変化には依存しないことが示唆された。これまでTLR4の欠損が、AngIIによるNADPHオキシダーゼを介したROS産生を抑制する、という今回の知見を支持する報告がいくつかある。Parkらによって、LPSによるROS産生経路にTLR4とNADPHオキシダーゼとの直接の相互作用が関与すると報告されている¹⁹⁾。De Batistaらも、高血圧自然発症ラットの培養血管平滑筋を用いて、AngIIがTLR4受容体のmRNAを増加し、AT1受容体拮抗薬を用いることでmRNAの増加量が減少することを示した。一方、TLR4抑制薬はラットの血管平滑筋細胞において、AngIIによるNADPHオキシダーゼ活性と・O₂産生、移動と増加を減弱させることが示されている³¹⁾。さらに我々は、TLR4/MyD88経路は酸化ストレスを惹起することでAngIIが誘導する細胞のアポトーシスに関与していると確信している³²⁾。以上、今回の研究結果から、TLR4はAngIIによるNADPHオキシダーゼ活性化とそれによる血管内ROSの産生に中心的な役割を果たし、血管リモデリングの進展を助長することが明らかとなった。

TLR4はNF-κB活性経路にも関与することが示されている³³⁻³⁵⁾。粥状動脈硬化における血管平滑筋細胞において、炎症惹起性サイトカインと酸化ストレスはTLR4とMCP-1の発現に

関与していることが示唆されている^{36,37)}。これらは、AT1 受容体に依存し、AngII による炎症の惹起は、AT1/TLR4/NF- κ B のシグナル伝達経路を介している³⁸⁾。我々の研究成果とこれまでの報告³⁶⁻³⁹⁾をまとめると、AT1/TLR4/NF- κ B のシグナル伝達経路は AngII による NADPH オキシダーゼを介した ROS 産生、炎症の惹起、血管リモデリングに重要かつ不可欠であることを示唆している。

我々の研究成果から、TLR4 は血圧のコントロール経路には直接組み込まれておらず、AngII による高血圧は ROS の含量に依存しないことが示された。高血圧をはじめとして種々の血管に変化を生じると考えられる、AngII に誘導された ROS の役割には、いまだ矛盾が存在する^{1,2)}。例えば、ROS の減少に関与する構成要素 (Nox1 または Nox2) の遺伝子削除による NADPH オキシダーゼ活性の抑制は、AngII の持続注人を行ってもマウスにおける高血圧と心肥大の進展を抑制した。しかし、ヒトレニンを発現させたトランスジェニックマウスと交雑したマウスではそのようなことは生じなかった¹⁾。これらの矛盾の原因は、今のところ不明である。しかし、これらは遺伝的背景 (C57Bl/6 *vs.* Balb/c) の相違や、ROS もしくは AngII のどちらに暴露するかの相違、終生にわたる遺伝モデル *vs.* 数週間の投薬モデルの相違などに起因するものかもしれない。

哺乳類では、SOD には 3 種の同位体が存在する。細胞質に存在する Cu/ZnSOD、ミトコンドリアに存在する MnSOD、そして ecSOD である⁴⁾。ecSOD は血管に強く発現する銅を含有した主要な抗酸化酵素で、細胞外へと分泌される。これは、細胞外の $\cdot O_2^-$ 含量を調整することにより AngII による高血圧を調節する^{8,40,41)}。興味深いことに、Cu/ZnSOD の発現に影響を与えることなく、Tlr4^{lps-d} マウスは AngII により ecSOD の発現と活性を上昇させる。高用量の IRB のみが ecSOD 活性を抑制し、一方、低用量の IRB は AngII による ROS および NADPH オキシダーゼ活性の上昇を抑制する。これらの発見は、AngII の NADPH オキシダーゼおよび ecSOD への影響が、異なる AT1 受容体のサブタイプを介していることを示唆する⁴²⁾。これらの結果で矛盾しない点は、これまで報告されたように ecSOD の発現増加が AT1 受容体に依存しているという点である⁵⁾。今回の研究結果では、ROS 産生と炎症を惹起する TLR4 の賦活化が、血管リモデリングと AT1 受容体を介する血管系における ecSOD のアップレギュレーションを抑制した。

本研究において、AngII によるアップレギュレーションあるいは TLR4 による ecSOD の制御についての詳細な機序は不明である。AngII は NADPH オキシダーゼによる $\cdot O_2^-$ 産生とは無関係に平滑筋細胞において ecSOD をアップレギュレートする^{5,43,44)}。そして内因性の TLR リガンドは組織損傷により放出され、感染を伴わない炎症を惹起すると考えられる^{12,13)}。このように、血管リモデリングにおいて、TLR4 は内因性リガンドとしての潜在的な役割があることが示唆される。さらに、最近、銅輸送体である Menkes ATPase が AngII による高血圧や ecSOD 活性を介した血管内皮機能、 $\cdot O_2^-$ 産生に重要な働きをしていることが報告された³⁰⁾。注目すべきは、TLR4 欠損が特異的に ecSOD 活性を上昇させる点である。ecSOD 蛋白の増加に比べて、ecSOD 活性の上昇は著しい。このことは ecSOD 活性が TLR4 により制御されて

いることを示唆する。我々の研究で示されたように、内在性リガンドと他の酵素（例えば Menkes ATPase）が TLR シグナル伝達カスケード内で、AngII による ecSOD のアップレギュレーション、ROS 生産と血管リモデリングに関係していることを示しているのかもしれない。

6. 結語

結論として、我々は高血圧による血管リモデリングにおいて一つの新しい重要なメカニズムを発見した。AngII は高血圧、血管内皮機能障害、粥状動脈硬化に続く ROS 産生に関与する¹⁾。一方、TLR4 存在下では、血管系における ROS の除去システムの調整は、高血圧の血管リモデリングの進展において、重要な役割を果たす。今回の研究において、我々は TLR4 が血管壁内で AngII による ROS の調整に関して重要な役割を演ずることを明らかにした。すなわち、TLR4 はより効率的に ROS を産生し、NADPH オキシダーゼおよび MCP-1 の活性化と ecSOD の抑制を介して血管リモデリングを引き起こす炎症を増強するのかもしれない。我々の研究結果から、ROS の除去系を支持し、AngII により引き起こされる高血圧で生じる血管リモデリングの進展から血管壁を守るため、TLR4 を抑制することで ROS 産生システムを障害する更なる治療の可能性が明らかとなった。AngII 刺激が TLR4 と ecSOD 活性に同じように依存しているかどうか確定するには、さらに *in vitro* の研究が必要である。

	WT				Tlr4 ^{ps-d}			
	Control	AngII	IRB	NE	Control	AngII	IRB	NE
Body weight, g	28.9±0.5	27.3±1.1	27.0±1.3	27.6±1.5	29.0±1.0	30.0±2.9	26.8±1.4	26.9±1.9
Heart rate, beats per minutes	476±64	479±42	510±25	492±33	513±17	415±54	473±40	482±20
Systolic blood pressure, mm Hg	105±3	169±3 ^a	157±2 ^a	158±9 ^a	115±4	173±3 ^b	158±8 ^b	160±7 ^b
Total cell number, ×10 ³ mm ⁻²	4813±309	5103±94	4828±131	4953±407	4680±120	4752±209	4895±480	4937±388

表1 14日目の体重、心拍数、収縮期血圧、細胞数 AngII; アンジオテンシン II、NE; ノルオエピネフリン、IRB; イルベサルタン、Tlr4^{ps-d}; TLR4 不活化マウス、WT; 野生種マウス、腹部大動脈の中膜細胞の定量分析はヘマトキシリン・エオジン染色で試行した。すべての数値は平均±標準誤差で示した。n=3。

^a P<0.05 vs. コントロール WT マウス群。

^b P<0.05 vs. コントロール Tlr4^{ps-d} マウス群。

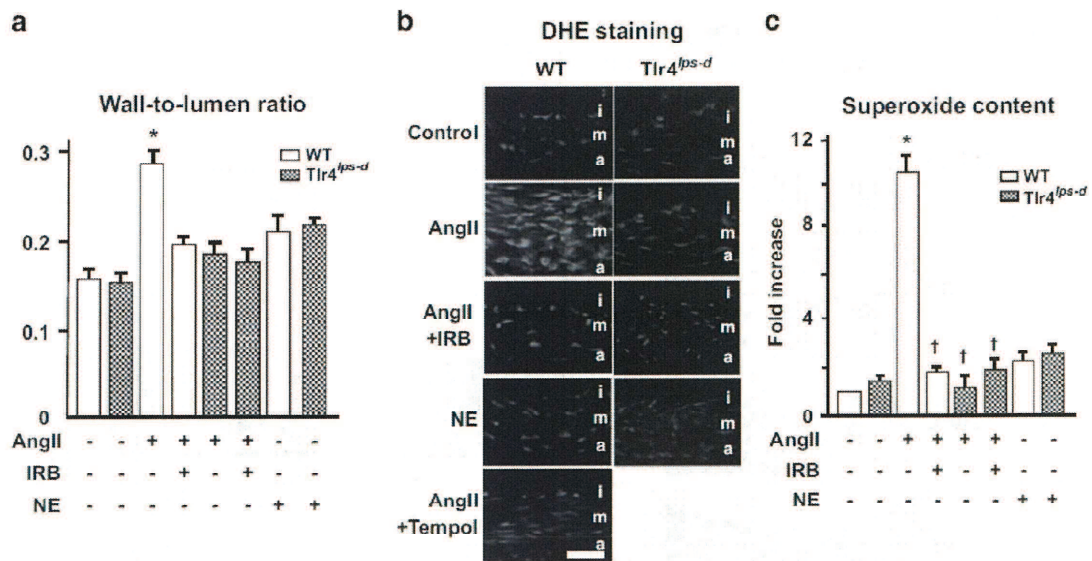


図1 血管リモデリングと腹大動脈の・O₂の *in situ*評価 (a) 壁腔比の定量分析の結果。バーは、標準偏差を示す。n = 3。*P<0.05 vs. 他のグループ。(b) 酸化 DHE で標識された大動脈の・O₂の蛍光顕微鏡写真。バーは 50 μm。AngII を投与した WT マウス群のみ内膜 (i)、中膜 (m)、外膜 (a) にわたって蛍光度が上昇している。(c) DHE 蛍光度の定量分析の結果。バーは、標準偏差を示す。n = 3。*P<0.05 vs. 他のグループ。AngII; アンジオテンシン II、NE; ノルオエピネフリン、IRB; イルベサルタン、Tlr4^{lps-d}; TLR4 不活化マウス、WT; 野生種マウス。

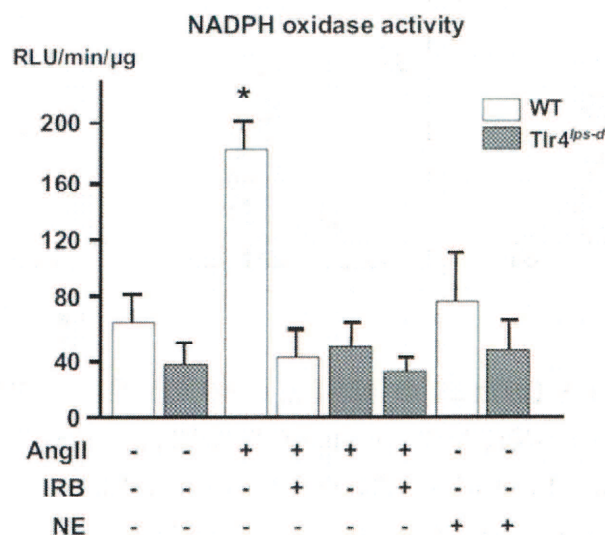


図2 大動脈の中の NADPH オキシダーゼ活性の定量分析の結果。バーは、標準偏差を示す。n = 3。*P<0.05 vs. 他のグループ。AngII; アンジオテンシン II、NE; ノルオエピネフリン、IRB; イルベサルタン、Tlr4^{lps-d}; TLR4 不活化マウス、WT; 野生種マウス。

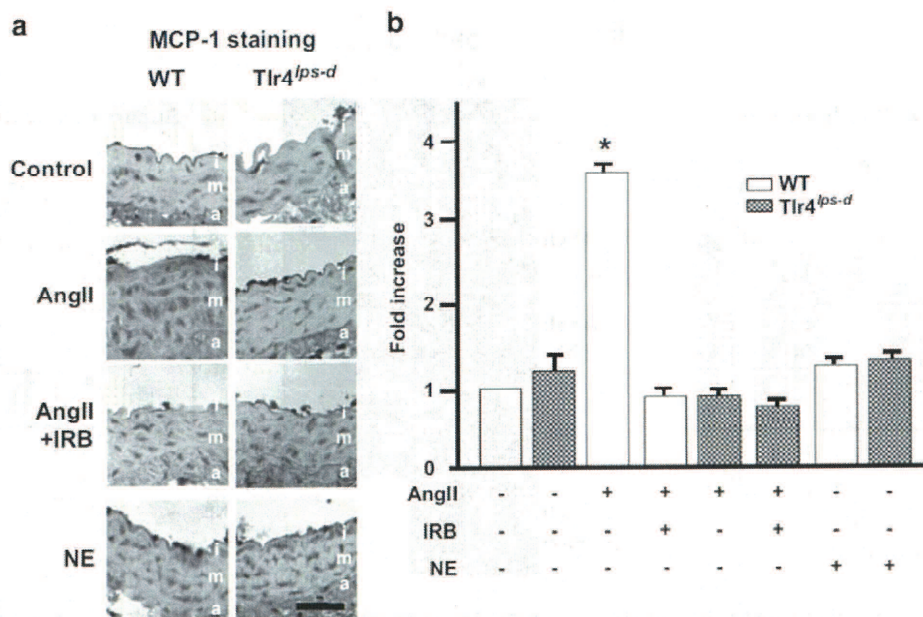


図3 大動脈のMCP-1の発現 (a) 大動脈のMCP-1の免疫組織化学的染色。バーは50 μ m。I:内膜、m:中膜、a:外膜。(b) 大動脈中膜のMCP-1発現率の定量分析。バーは、標準偏差を示す。n = 3。*P<0.05 vs. 他のグループ。AngII; アンジオテンシンII、NE; ノルオエピネフリン、IRB; イルベサルタン、Tlr4^{lps-d}; TLR4不活化マウス、WT; 野生種マウス。

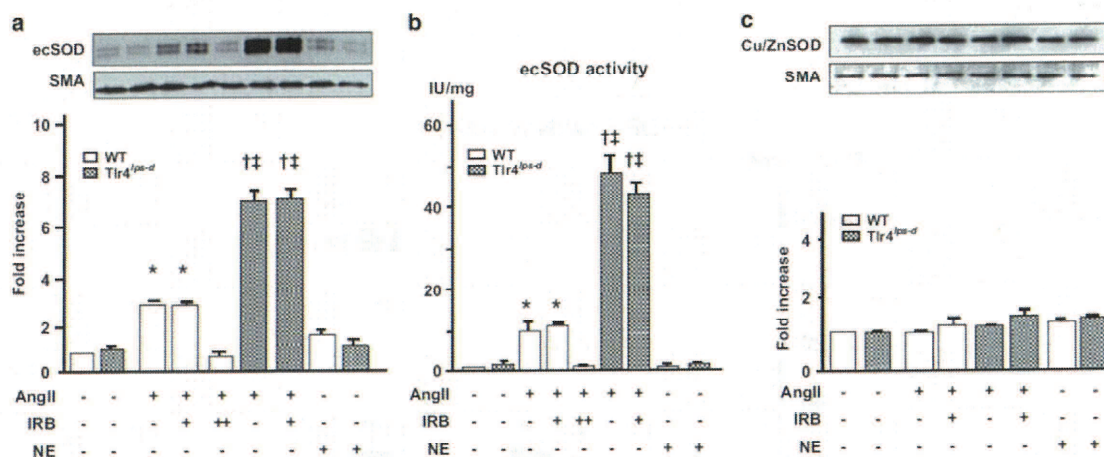


図4 大動脈でのecSODとCu/ZnSODの発現量とecSODの活性 (a) 大動脈でのecSODの発現量のウェスタンブロット解析。マウスecSODが31/35kDaの二重線を呈する。*P<0.05 vs. コントロールWTマウス、†P<0.05 vs. Tlr4^{lps-d}マウス、‡P<0.05 vs. AngII投与WTマウス。バーは、標準偏差を示す。IRBの投与量; +: 1.1mg/kg/日, ++: 21.2mg/kg/日。(b) 大動脈のecSOD活性。*P<0.05 vs. コントロールWTマウス、†P<0.05 vs. Tlr4^{lps-d}マウス、‡P<0.05 vs. AngII投与WTマウス。バーは、標準偏差を示す。IRBの投与量; +: 1.1mg/kg/日, ++: 21.2mg/kg/日。(c) 大動脈でのCu/ZnSODの発現量のウェスタンブロット解析。バ

一は、標準偏差を示す。n = 3。AngII; アンジオテンシン II、NE; ノルオエピネフリン、IRB; イルベサルタン、SMA; α -平滑筋アクチン、Tlr4^{lps-d}; TLR4 不活化マウス、WT; 野生種マウス。

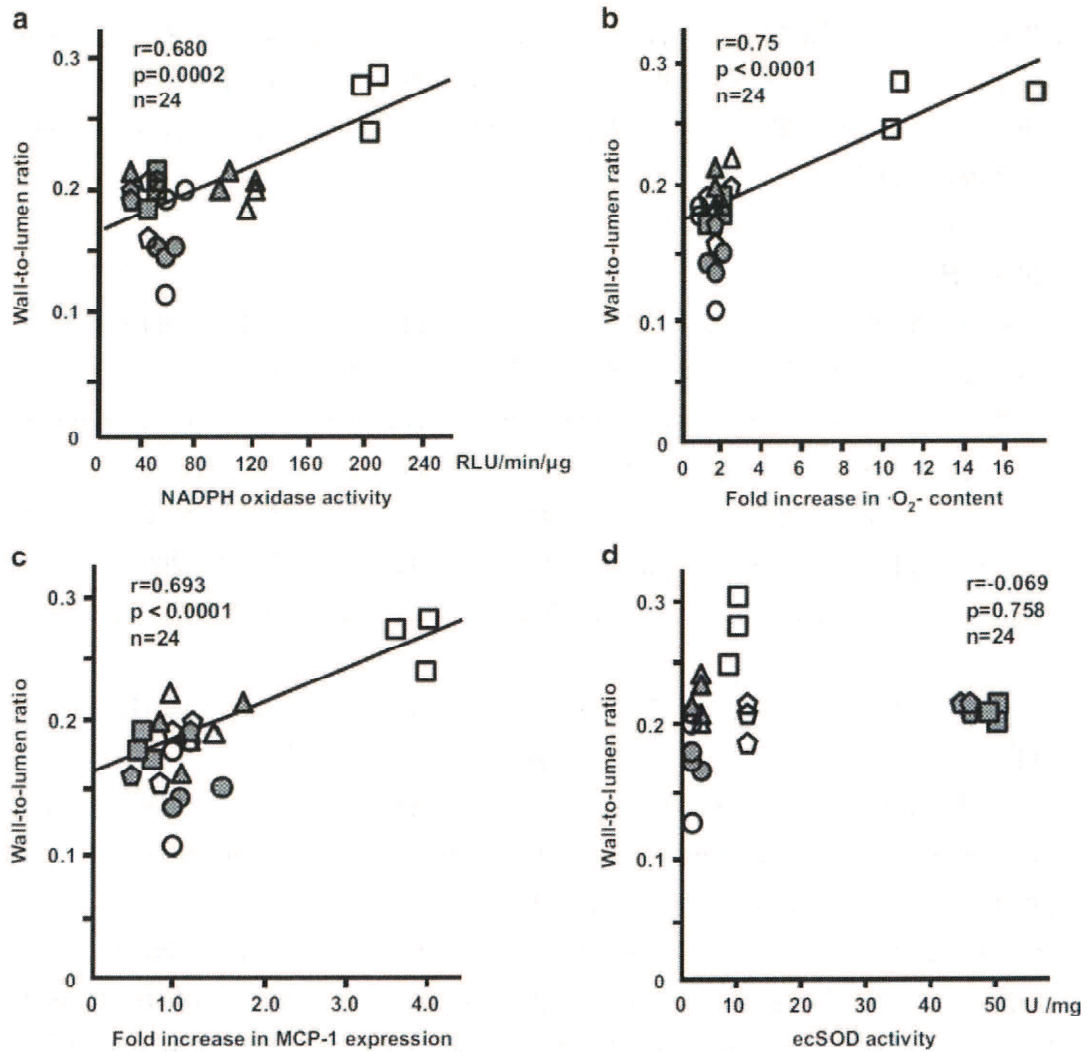


図5 壁腔比とNADPH オキシダーゼ活性 (a)、 $\cdot O_2^-$ 量 (b)、MCP-1 (c)、ecSOD の相関関係 各点ごとにマウスは異なる。AngII; アンジオテンシン II、NE; ノルオエピネフリン、IRB; イルベサルタン、Tlr4^{lps-d}; TLR4 不活化マウス、WT; 野生種マウス。コントロール WT マウス (○)、AngII 投与 WT マウス (□)、AngII+IRB 投与 WT マウス (◇)、NE 投与 WT マウス (○)、コントロール Tlr4^{lps-d} マウス (○)、AngII 投与 Tlr4^{lps-d} マウス (□)、AngII+IRB 投与 Tlr4^{lps-d} マウス (◇)、NE 投与 Tlr4^{lps-d} マウス (△)。

7. 謝辞

今回、本研究を行う機会を与えて頂いた山口大学大学院器官病態内科学前教授・松崎益徳先生、山口大学大学院器官病態内科学教授・矢野雅文先生、また、直接ご指導いただきました山口大学医学部附属病院臨床研究センター診療教授兼副センター長・梅本誠治先生をはじめとして、米国イリノイ大学シカゴ校医学部薬理学循環器学講座・深井透先生、山口大学大学院器官病態外科学助教授・吉村耕一先生、山口大学総合科学実験センター生命科学実験施設長兼准教授・村田智昭先生ならびに山口大学大学院器官病態内科学の皆様にも厚く御礼申し上げます。研究の進展に多大なご助力を頂いた、吉野敬子氏、石原里江氏、岡本陽子氏にも御礼申し上げます。

8. 参考文献

- 1 Lassegue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 653-661.
- 2 Welch WJ. Angiotensin II-dependent superoxide: effects on hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension* 2008; 52: 51-56.
- 3 Kishi T. Regulation of the sympathetic nervous system by nitric oxide and oxidative stress in the rostral ventrolateral medulla: 2012 Academic Conference Award from the Japanese Society of Hypertension. *Hypertens Res* 2013; 36: 845-851.
- 4 Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2002; 55: 239-249.
- 5 Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res* 1999; 85: 23-28.
- 6 Matsuno K, Yamada H, Iwata K, Jin D, Katsuyama M, Matsuki M, Takai S, Yamanishi K, Miyazaki M, Matsubara H, Yabe-Nishimura C. Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. *Circulation* 2005; 112: 2677-2685.
- 7 Landmesser U, Cai H, Dikalov S, McCann L, Hwang J, Jo H, Holland SM, Harrison DG. Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II. *Hypertension* 2002; 40: 511-515.
- 8 Gongora MC, Qin Z, Laude K, Kim HW, McCann L, Folz JR, Dikalov S, Fukai T, Harrison DG. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension* 2006; 48: 473-481.
- 9 Jung O, Marklund SL, Geiger H, Pedrazzini T, Busse R, Brandes RP. Extracellular superoxide dismutase is a major determinant of nitric oxide bioavailability: in

- vivo and ex vivo evidence from ecSOD-deficient mice. *Circ Res* 2003; 93: 622-629.
- 10 Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009; 21: 317-337.
- 11 Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; 4: 444-454.
- 12 Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, Viglianti G, Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev* 2005; 204: 27-42.
- 13 Hollestelle SC, De Vries MR, Van Keulen JK, Schoneveld AH, Vink A, Strijder CF, Van Middelaar BJ, Pasterkamp G, Quax PH, De Kleijn DP. Toll-like receptor 4 is involved in outward arterial remodeling. *Circulation* 2004; 109: 393-398.
- 14 Michelsen KS, Wong MH, Shah PK, Zhang W, Yano J, Doherty TM, Akira S, Rajavashisth TB, Arditi M. Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10679-10684.
- 15 Shinohara M, Hirata K, Yamashita T, Takaya T, Sasaki N, Shiraki R, Ueyama T, Emoto N, Inoue N, Yokoyama M, Kawashima S. Local overexpression of toll-like receptors at the vessel wall induces atherosclerotic lesion formation: synergism of TLR2 and TLR4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2384-2391.
- 16 Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* 2002; 105: 1158-1161.
- 17 Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, Luthringer D, Xu XP, Rajavashisth TB, Yano J, Kaul S, Arditi M. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation* 2001; 104: 3103-3108.
- 18 Vink A, de Kleijn DP, Pasterkamp G. Functional role for toll-like receptors in atherosclerosis and arterial remodeling. *Curr Opin Lipidol* 2004; 15: 515-521.
- 19 Park HS, Jung HY, Park EY, Kim J, Lee WJ, Bae YS. Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J Immunol* 2004; 173: 3589-3593.
- 20 Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11: 115-122.
- 21 Fukui T, Galis ZS, Meng XP, Parthasarathy S, Harrison DG. Vascular expression

- of extracellular superoxide dismutase in atherosclerosis. *J Clin Invest* 1998; 101: 2101-2111.
- 22 Vogel SN, Wax JS, Perera PY, Padlan C, Potter M, Mock BA. Construction of a BALB/c congenic mouse, C.3H-Lpsd, that expresses the Lpsd allele: analysis of chromosome 4 markers surrounding the Lps gene. *Infect Immun* 1994; 62: 4454-4459.
- 23 Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Huffel CV, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-2088.
- 24 Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, Hoefler IE, Nederhoff MG, Goumans MJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, Joles JA, Quax PH, Piek JJ, Pasterkamp G, de Kleijn DP. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* 2008; 102: 257-264.
- 25 Umeji K, Umemoto S, Itoh S, Tanaka M, Kawahara S, Fukai T, Matsuzaki M. Comparative effects of pitavastatin and probucol on oxidative stress, Cu/Zn superoxide dismutase, PPAR-gamma, and aortic stiffness in hypercholesterolemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H2522-H2532.
- 26 Itoh S, Umemoto S, Hiromoto M, Toma Y, Tomochika Y, Aoyagi S, Tanaka M, Fujii T, Matsuzaki M. Importance of NAD(P)H oxidase-mediated oxidative stress and contractile type smooth muscle myosin heavy chain SM2 at the early stage of atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 2288-2295.
- 27 Kawahara S, Umemoto S, Tanaka M, Umeji K, Matsuda S, Kubo M, Matsuzaki M. Up-regulation of Akt and eNOS induces vascular smooth muscle cell differentiation in hypertension in vivo. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 45: 367-374.
- 28 Umemoto S, Kawahara S, Hashimoto R, Umeji K, Matsuda S, Tanaka M, Kubo M, Matsuzaki M. Different effects of amlodipine and enalapril on the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase pathway for induction of vascular smooth muscle cell differentiation in vivo. *Hypertens Res* 2006; 29: 179-186.
- 29 Stralin P, Karlsson K, Johansson BO, Marklund SL. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 2032-2036.

- 30 Qin Z, Gongora MC, Ozumi K, Itoh S, Akram K, Ushio-Fukai M, Harrison DG, Fukai T. Role of Menkes ATPase in angiotensin II-induced hypertension: a key modulator for extracellular superoxide dismutase function. *Hypertension* 2008; 52: 945-951.
- 31 De Batista PR, Palacios R, Martin A, Hernanz R, Medici CT, Silva MA, Rossi EM, Aguado A, Vassallo DV, Salaices M, Alonso MJ. Toll-like receptor 4 upregulation by angiotensin II contributes to hypertension and vascular dysfunction through reactive oxygen species production. *PLoS One* 2014; 9: e104020.
- 32 Lv J, Jia R, Yang D, Zhu J, Ding G. Candesartan attenuates Angiotensin II-induced mesangial cell apoptosis via TLR4/MyD88 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380: 81-86.
- 33 O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 353-364.
- 34 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4: 1144-1150.
- 35 Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003; 198: 1043-1055.
- 36 Otsui K, Inoue N, Kobayashi S, Shiraki R, Honjo T, Takahashi M, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M. Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries. *Heart Vessels* 2007; 22: 416-422.
- 37 Dasu MR, Riosvelasco AC, Jialal I. Candesartan inhibits Toll-like receptor expression and activity both in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 2009; 202: 76-83.
- 38 Ji Y, Liu J, Wang Z, Liu N. Angiotensin II induces inflammatory response partly via toll-like receptor 4-dependent signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem* 2009; 23: 265-276.
- 39 Su B. Linking stress to immunity? *Nat Immunol* 2005; 6: 541-542.
- 40 Chu Y, Iida S, Lund DD, Weiss RM, DiBona GF, Watanabe Y, Faraci FM, Heistad DD. Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces arterial pressure in spontaneously hypertensive rats: role of heparin-binding domain. *Circ Res* 2003; 92: 461-468.

- 41 Jun T, Ke-yan F, Catalano M. Increased superoxide anion production in humans: a possible mechanism for the pathogenesis of hypertension. *J Hum Hypertens* 1996; 10: 305-309.
- 42 Oliverio MI, Best CF, Kim HS, Arendshorst WJ, Smithies O, Coffman TM. Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation. *Am J Physiol* 1997; 272: F515-F520.
- 43 Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griendling KK. 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* 1998; 273: 15022-15029.
- 44 Duff JL, Marrero MB, Paxton WG, Schieffer B, Bernstein KE, Berk BC. Angiotensin II signal transduction and the mitogen-activated protein kinase pathway. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 511-517.