

喫煙による酸化ストレスと動脈硬化

国友 勝*

はじめに

喫煙は、動脈硬化の重大な危険因子である。しかし、喫煙と動脈硬化とを関係づける数多くの基礎・臨床研究がなされてきたにもかかわらず、喫煙による動脈硬化の発症機序は、未だ十分に解明されていない。

最近、酸化ストレスが動脈硬化病変の形成に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。たばこ煙にはフリーラジカルなど多種のオキシダントが含まれていることから、喫煙と動脈硬化の接点に酸化ストレスが関わっているのではないかと考えられる。私たちはこれまで、「喫煙－酸化ストレス－動脈硬化形成」という一連の過程を総合的に解明することを目的として研究を行ってきた。現在、図-1 に示す仮説を提唱し、それを裏付ける研究を進めている。下記にその研究成果について最近の知見を交えてまとめてみた。

酸化ストレスと動脈硬化

生体内における活性酸素産生と抗酸化システムとのバランスが崩れ酸化に傾くことを酸化ストレスという。酸化ストレスは、生体成分の脂質、蛋白質、DNA を酸化変性させ、細胞及び組織を徐々に障害する。とくに血管壁（血管内皮細胞）の障害は、動脈硬化形成や循環器疾患の病態形成を促進する¹⁾。

低比重リポ蛋白（LDL）の酸化によって生成する酸化 LDL は、動脈硬化の発症・進展に重要な役割を演じていることを示す数多くの証拠がある²⁾。酸化 LDL は、血管内皮下のマクロファ

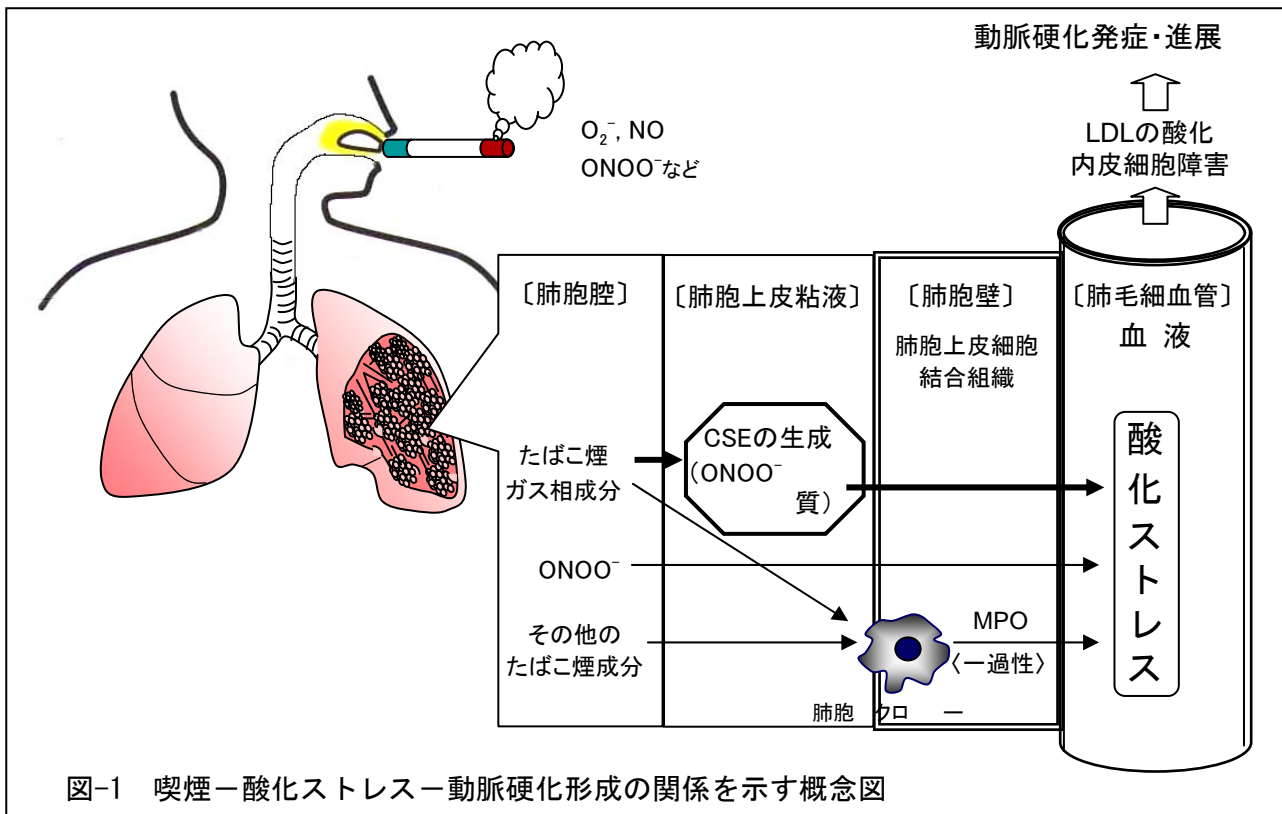
ージに取り込まれ、コレステロールを大量に蓄積した泡沫細胞を形成させる。また酸化 LDL は、内皮細胞や平滑筋細胞の機能を障害し、障害を受けた内皮細胞や平滑筋細胞からは活性酸素が産生され、それによって LDL の酸化が亢進するという悪循環が起こる。さらに酸化 LDL は、内皮細胞における一酸化窒素の産生を抑制することによって血小板凝集を亢進し、また内皮細胞に接着分子や走化因子を発現させ、血中の単球（血管壁でマクロファージ化する）を呼び寄せ³⁾。これらの変化はすべて動脈硬化形成における初期病変の事象である。一方、酸化 LDL を取り込んだマクロファージは、活性酸素種及び炎症性メディエーターを産生・放出する。最近、動脈硬化の発症・進展や不安定プラーク形成に酸化ストレスによる炎症が主要な役割を持つことが明らかにされている⁴⁾。

喫煙による酸化ストレスの増大

たばこ煙には、活性酸素、一酸化窒素、パーオキシナイトライト（ONOO⁻）、その他のフリーラジカルや酸化物など数多くのオキシダントが含まれていることから、それらオキシダントの複合効果による酸化ストレスの増大が、動脈硬化形成に促進的に働いていると考えられる。事実、喫煙によって、LDL 中の過酸化脂質の上昇、血管内皮細胞機能障害、血管平滑筋 Rho-kinase の活性化、各種酸化ストレスマーカーの上昇、血小板凝集能の亢進など、酸化ストレスと同様の変化が起こることが報告されている⁵⁾⁻⁷⁾。これらのことから、喫煙によって酸化ストレスが増大することは明白である。

われわれは、喫煙者と非喫煙者の血漿中酸化

* 武庫川女子大学薬学部



ストレスマーカーを測定し比較した。その結果、非喫煙者に比べ喫煙者では、LDLの酸化変性が亢進し、過酸化脂質(TBARS)、DNAの酸化損傷産物の8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)及び3-ニトロチロシン(ONOO⁻のバイオマーカー)が増加し(図-2)、逆に抗酸化物質であるビタミンEが顕著に減少していることを報告した。ONOO⁻は強力な酸化作用とニトロ化作用を有することが知られていることから、上記の結果は、喫煙による酸化ストレス上昇にONOO⁻あるいはONOO⁻類似反応物質が強く関わっていることを示唆している。しかも、注目すべきことは、喫煙者が10時間以上禁煙した後に紙巻たばこ1本喫煙した場合でも、30分後における8-OHdG、3-ニトロチロシン及び酸化LDLの血漿中濃度が喫煙前に比べさらに顕著に増加したことである(図-2)⁸⁾。このことは、喫煙による酸化ストレスの上昇が相当速やかであることを示唆している。

もし、たばこ煙中のオキシダントが全身の酸化ストレスを増加させるとするならば、そのオキシダントは、直接肺胞壁を通過して血液中に到達するか、またはマクロファージや好中球を

刺激して活性酸素を放出させる必要がある。しかし、活性酸素やフリーラジカルは、一般に反応性に富み、また特定の酵素により分解されやすく、非常に不安定である。それゆえ、たばこ煙が直接接触する口腔や肺組織に障害が起こったとしても、容易に血液に到達し、LDLや血管内皮細胞に影響を及ぼすまでには至らないものと推察される。そこで、たばこ煙中の何が酸化ストレスを増大させているかが次の課題となる。

たばこ煙水抽出液中のオキシダント

横出ら⁹⁾は、たばこ煙水抽出液と反応させて作製したたばこ変性LDLが、マクロファージに容易に取り込まれ泡沫細胞化を促進することを報告している。われわれは、たばこ煙からニコチン及びタールを除去したガス相の水抽出液(CSE)が、LDLの酸化変性作用ばかりでなくLDLアポ蛋白チロシン残基のニトロ化作用を持つことを見出し、CSE中にはONOO⁻類似反応物質が存在すると推測した¹⁰⁾¹¹⁾。なぜならばONOO⁻は不安定で、pH7.4において数分以内で分解されるのに対し、CSE中のONOO⁻類似反応物質

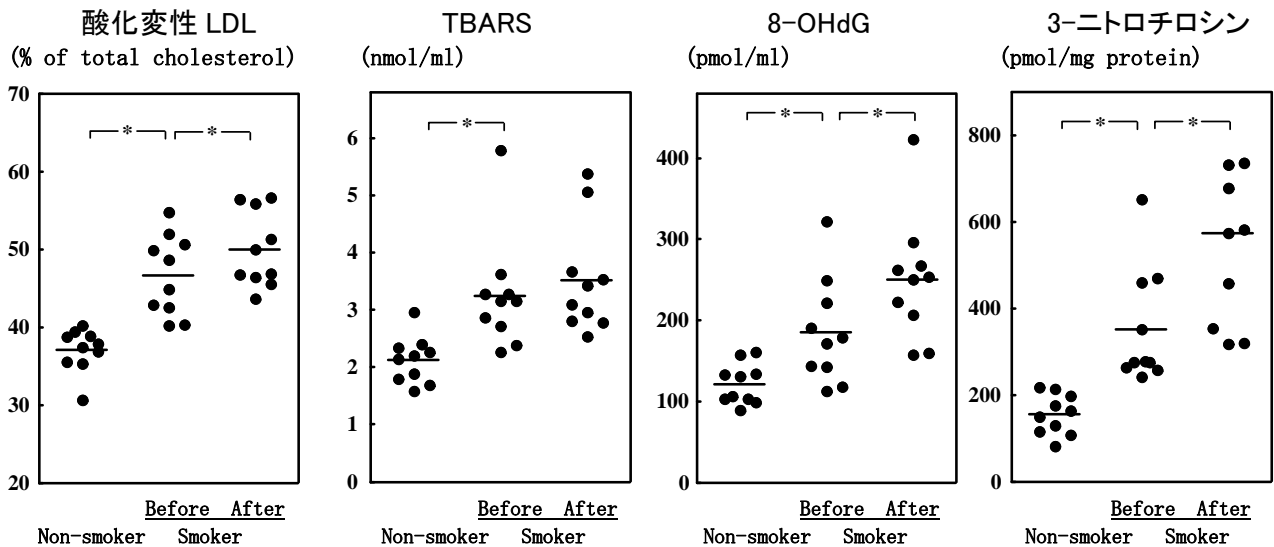


図-2 喫煙者の血漿中酸化ストレスマーカー

喫煙者の喫煙前（約 10 時間禁煙、Before）と紙巻たばこ 1 本再喫煙 30 分後（After）の比較

は室温で長時間安定であったからである。また、*in vitro* 実験において、チロシンと ONOO⁻ の反応による 3-ニトロチロシン生成速度はきわめて速いのに対し、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質との反応は徐々に進行する（反応終了まで 5 時間以上）ことから、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質は ONOO⁻ とは異なる構造を有すると考えられる。次に、CSE を自然発症高脂血症（WHHL）ウサギに 1 日 1 回、長期間静脈内投与したところ、*in vitro* の実験と同様に LDL の酸化変性とニトロ化が亢進し、粥状動脈硬化巣の形成が促進された¹²⁾。また、これらの変化は、抗酸化作用を有するビタミン E やフルバスタチンの投与により抑制されることが判明した¹³⁾。これらのことは、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質が酸化ストレスを増大し、動脈硬化を進展させる可能性が高いことを示唆している。

CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質の化学構造は今のところ不明である。目下、高速液体クロマトグラフィーを用いて分離し、HPLC/MS により構造解析を行っている。

たばこ煙水抽出液中オキシダントの膜透過性

喫煙による酸化ストレスの増大に CSE が関与し

ているとすれば、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質が肺胞壁を通過する必要がある。すでに ONOO⁻ は、赤血球膜や血小板膜を容易に透過して細胞内に拡散し、水に匹敵する透過性を示すことが報告されている¹⁴⁾。そこで、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質も膜透過性を示すのではないかと考え、2 種の透過実験を ONOO⁻ と比較して行った。透過性は、膜または肺胞壁を透過した後チロシン溶液と反応して生じる 3-ニトロチロシン濃度を測定することにより判定した。まず、ケモタキセルを用いた厚さ約 50 μm の基底膜（マトリゲル）の透過実験において、ONOO⁻ は瞬時に基底膜を透過したのに対し、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質はゆっくりと時間をかけて（6 時間以上）透過することが明らかとなった。次いで、ラット摘出肺標本の肺内空気を除いた後、両試液を肺内に注入し、肺外液への透過実験を行ったところ、基底膜を用いた時とほぼ同様の結果が得られた¹⁵⁾。一方、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質は、*in vitro* の実験において、肺胞マクロファージを活性化しなかった。これらのことは、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質はゆっくりと透過し、透過後もチロシン溶液と徐々に反応するのに対し、ONOO⁻ の透過性及び反応性はともに急速で一過性であることを示している。

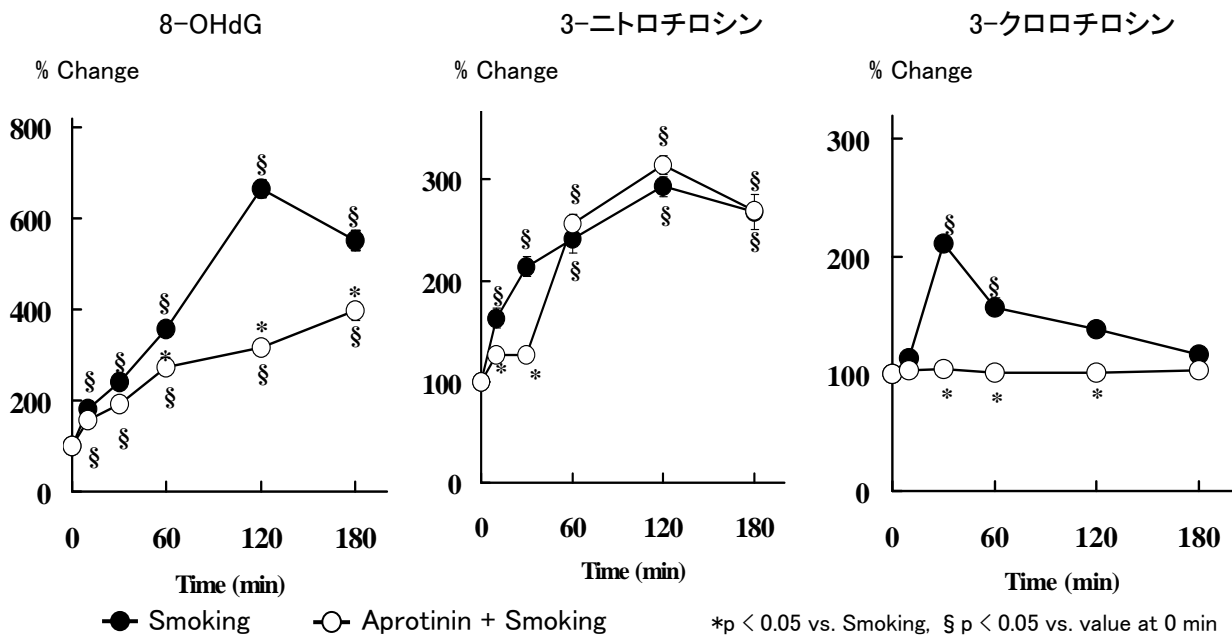


図-3 たばこ煙ガス相を吸入させたラットの血漿酸化ストレスマーカーの経時的変化と MPO 阻害薬アプロチニン前処置による影響

8本のたばこ煙（ニコチンとタールを除去）を30分間隔で2回（計16本）曝露

喫煙による酸化ストレス増大機序

喫煙者でも一定時間禁煙した後に再喫煙すると酸化ストレスが著明に増大することを先に述べたが、その増大機序を解明するため、ラットを用いて詳細に検討した。紙巻たばこ（フロンティアライト）8本の煙をアスピレーターにて吸引し、その途中にケンブリッジフィルターによりニコチンとタールを除去する装置とそのガス相をラットに曝露させる装置を設けた。曝露装置は15cm立方の亚克力板製のボックスで、その一部にガスの通路口とラットの頭部のみが挿入できる半円形の孔が空いている。麻酔したラットの頭部のみを密着して入れ、ラット大腿静脈にカニューレを挿入して経時的に採血し、各種血中の酸化ストレスマーカーを測定した。その結果、8本の紙巻たばこ煙ガス相の曝露（30分後に再曝露、計16本）によって、血清中の8-OHdG、3-ニトロクロロシン及び3-クロロクロロシン濃度が曝露後5分後から有意に増加しはじめ、8-OHdGと3-ニトロクロロシンは2時間後にピークとなり3時間以降まで持続した。一方、3-クロロクロロシンは30分後にピークと

なり以後減衰したが、再曝露による増加は全くみられなかった（図-3）¹⁶⁾。

生体内で生じる3-クロロクロロシンは、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）の唯一のバイオマーカーである。MPOは好中球やマクロファージに存在しH₂O₂とCl⁻から次亜塩素酸（HOCl）の生成を触媒する酵素で、殺菌作用や炎症反応に密接に関与している。HOClは蛋白チロシン残基をクロル化するが、さらにNO₂⁻と反応してNO₂Clを生成することで蛋白チロシン残基のニトロ化とクロル化を引き起こすことができる¹⁷⁾。それゆえ、MPOの活性化は、8-OHdG、3-ニトロクロロシン、3-クロロクロロシンの全ての生成を増加させる可能性がある。本実験において、たばこ煙ガス相の曝露によってMPOが活性化されることが示唆されたので、血清中のMPO活性（一部血中にも漏出する）を測定した。その結果、10分後にピークとなる一過性のMPO活性上昇が認められた。この活性上昇はMPO阻害薬アプロチニン（500 U/kg, i. p.）の前処置（たばこ煙吸入20分前）によって完全に抑制された。また、アプロチニン前処置によって、血清中の3-ニトロクロロシンの上昇は初期変化のみ抑制され、3-ク

ロクロシンの上昇は完全に抑制された。8-OHdG の上昇は初期には抑制されず 60 分以降に抑制された (図-3)¹⁶⁾。これらの結果、たばこ煙ガス相曝露の初期 (30 分まで) においては、一時的にマクロファージまたは好中球が活性化され、MPO 活性が上昇することによって HOCl 及び NO₂Cl が生成し、血清蛋白質チロシン残基がニトロ化及びクロル化されたと考えられる。また MPO の活性化が一過性である理由としては、酵素蛋白の酸化、ニトロ化またはクロル化により自ら失活したのであろうと推察している。さらに、ごく初期の変化の一部にはガス相中の ONOO⁻ が直接肺胞壁を透過した可能性も否定できない。たばこ煙ガス相曝露 30 分以降における持続的な 3-ニトロチロシンの上昇には、おそらく持続的ニトロ化能を有する CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質が関与していると考えられる。8-OHdG の上昇に関しては、ONOO⁻ 及び ONOO⁻ 類似反応物質に加え MPO 以外のアプロチニンで抑制されるペルオキシダーゼが関わっていると思われるが、詳細についてさらに追究する必要がある。

In vitro の実験において、われわれは CSE (おそらく ONOO⁻ 類似反応物質) が ONOO⁻ と同様に、培養内皮細胞のアポトーシスを誘導すること、内皮細胞とマクロファージとの接着を促進することを明らかにしている。したがって、CSE 中の ONOO⁻ 類似反応物質は、肺胞壁を透過した後、動脈硬化発症に促進的に作用していると考えられる。

まとめ

喫煙した場合、たばこ煙が気道や肺胞の水分に溶解して CSE を生成する。CSE 中に存在する安定な ONOO⁻ 類似反応物質が肺胞壁を徐々に透過し血液中に到達して、LDL を徐々に酸化及びニトロ化して変性し、また、血管内皮細胞の機能を障害し、DNA を酸化損傷することで動脈硬化の発症・進展を促進すると考えられる (図-1)。今後は、たばこ煙中の ONOO⁻ 類似反応物質の化学構造を決定し、このオキシダントの抗酸化消

去物質を発見することにより、毒性の少ないたばこ製品の開発が期待される。

文 献

- 1) Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 29-38.
- 2) Witztum JL, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11: 93-102.
- 3) Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381-478.
- 4) Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-43.
- 5) Harats D, Ben-Naim M, Dabach Y, Hollander G, Stein O, Stein Y. Cigarette smoking renders LDL susceptible to peroxidative modification and enhanced metabolism by macrophages. *Atherosclerosis* 1989; 79: 245-52.
- 6) Anazawa T, Dimayuga PC, Li H, Tani S, Bradfield J, Chyu KY, Kaul S, Shah PK, Cercek B. Effect of exposure to cigarette smoke on carotid artery intimal thickening: the role of inducible NO synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1652-8.
- 7) Noma K, Goto C, Nishioka K, Hara K, Kimura M, Umemura T, Jitsuiki D, Nakagawa K, Oshima T, Chayama K, Yoshizumi M, Higashi Y. Smoking, endothelial function, and Rho-kinase in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 2630-5.
- 8) Yamaguchi Y, Haginaka J, Morimoto S, Fujioka Y, Kunitomo M. Facilitated nitration and oxidation of LDL in cigarette smokers. *Eur J Clin Invest* 2005; 35: 186-93.
- 9) Yokode M, Kita T, Arai H, Kawai C, Narumiya S, Fujiwara M. Cholesteryl ester accumulation in macrophages incubated with low density lipoprotein pretreated with cigarette smoke extract. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 2344-8.
- 10) Yamaguchi Y, Kagota S, Haginaka J, Kunitomo M. Peroxynitrite-generating species: good candidate oxidants in aqueous extracts of cigarette smoke. *Jpn J Pharmacol* 2000; 82: 78-81.
- 11) Yamaguchi Y, Kagota S, Haginaka J, Kunitomo M. Participation of peroxynitrite in oxidative modification of LDL by aqueous extracts of cigarette smoke. *FEBS Lett* 2002; 512: 218-22.
- 12) Yamaguchi Y, Matsuno S, Kagota S, Haginaka J,

Kunitomo M. Oxidants in cigarette smoke extract modify low-density lipoprotein in the plasma and facilitate atherogenesis in the aorta of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis* 2001; 156: 109-17.

- 13) Yamaguchi Y, Matsuno S, Kagota S, Haginaka J, Kunitomo M. Peroxynitrite-mediated oxidative modification of low-density lipoprotein by aqueous extract of cigarette smoke and the preventive effect of fluvastatin. *Atherosclerosis* 2004; 172: 259-65.
- 14) Lufano M, Balazy M. Interactions of peroxynitrite and other nitrating substances with human platelets: the role of glutathione and peroxynitrite permeability. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 515-23.
- 15) Yamaguchi Y, Nasu F, Harada A, Kunitomo M. Oxidants in gas-phase of cigarette smoke raise systemic oxidative stress through the lung alveolar wall. *J Pharmacol Sci*, in press.
- 16) 国友勝、山口優 他. リポ蛋白及び血管壁を酸化変性させるたばこ煙成分の同定ならびにその機構の解明. 平成 17 年度喫煙科学研究財団研究年報 2006; 958-63.
- 17) Gaut JP, Byun J, Tran HD, Lauber WM, Carroll JA, Hotchkiss RS, Belaaouaj A, Heinecke JW. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants *in vivo*. *J Clin Invest* 2002; 109: 1311-9.