

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07944

研究課題名(和文)酸化LDLの生体内での生成・代謝過程の解明：安定同位体標識リポドミクスの応用

研究課題名(英文)Studies on process of generation and metabolism of oxidized LDL in vivo.

研究代表者

板部 洋之 (ITABE, Hiroyuki)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：30203079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：重水素標識リン脂質を用いて、生体内oxLDLの脂質がどのような代謝を受けるか調べた。標識した酸化PC(d13-PGPC)はLDL中で速やかに酵素的に加水分解された。標識リソPCを含むヒトLDLをHDLと37℃で混合すると、経時的に標識リソPCが減少し、4時間で50%以下になった。同時に標識リソPCに由来する様々なジアシル型PC分子種が生成し、経時的に増加した。標識リソPCはリポタンパク質間を移動し、生成したジアシル型PCもLDL、HDLの双方に分布した。再アシル化はHDL依存的で、LCAT阻害剤で抑制された。LDL中のoxPCはHDLの存在で種々酵素の代謝を受けることが示された。

研究成果の概要(英文)：Metabolic fate of oxidized phosphatidylcholine (oxPC) produced in oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) was investigated using deuterium-labeled lysoPC and oxPC. A labeled oxPC (d13-PGPC) was converted rapidly in LDL, but lysoPC was not generated in the presence of an Lp-PLA2 inhibitor. When LDL containing d13-lysoPC was incubated with HDL at 37°C, d13-lysoPC decreased in a time-dependent manner to less than 50% in 4 h. In the same time, a variety of diacyl-PC derived from the d13-lysoPC were produced. d13-lysoPC was able to transfer between LDL and HDL particles, and the generated diacyl-PCs distributed to both LDL and HDL. Reacylation of lysoPC did not occur in the absence of HDL and was blocked by addition of DTNB, an LCAT inhibitor. From these results, it was demonstrated that oxPC in LDL can be metabolized by multiple enzymes and reacylated to form diacyl-PC under the conditions that HDL can interact with LDL.

研究分野：生化学

キーワード：酸化LDL 動脈硬化 質量分析 安定同位体標識 リポドミクス

## 1. 研究開始当初の背景

日本の人口構成が高齢化し、またライフスタイルが変化したことにより、高脂血症、耐糖能異常、高血圧、肥満などの代謝異常を併せ持つ人が増え、また加齢黄斑変性、歯周病など高齢化に伴う疾患が急速に患者数を増やして来ている。こうした疾患には、全身性の代謝バランスだけでなく、感染、炎症、酸化ストレスなどの要因が大きく影響していると考えられている。

酸化変性を受けた低比重リポタンパク質 (oxLDL) は虚血性心疾患の重要な発症・進展要因である。oxLDL はスキャベンジャー受容体によってマクロファージ等の細胞に取り込まれ、脂質を蓄積した泡沫細胞を生じさせる原因となる。研究代表者は、酸化ホスファチジルコリン (oxPC) に特異的なモノクローナル抗体を用いた血漿 oxLDL の測定系を構築し、ヒト血漿中に微量の oxLDL の存在を明らかにした (Itabe H, *et al.*, *J Lipid Res.* 1996, 37:45)。血漿 oxLDL は、心筋梗塞急性期の患者血漿中で高値となること、ヒト冠動脈の動脈硬化巣中の泡沫細胞内に oxLDL が蓄積していることが免疫組織化学で示されたことから、生体内で生じる oxLDL が動脈硬化進展の一因であることが広く認められた。

また oxLDL は虚血性心疾患の予後診断因子としての可能性が期待されている。急性心筋梗塞患者で入院した患者の退院時の血漿 oxLDL レベルが高い群では、その後 6 か月までに再狭窄を起こす率が高かった (Naruko T, *et al.*, *ATVB* 2006, 26:877)。その他にも、世界の研究グループから血漿 oxLDL とその後の冠動脈疾患の関連を示す前向きコホート研究の報告があり、測定法の違いなどの問題点はあるが、ほぼコンセンサスが得られている。

脳梗塞患者、人工透析患者でも血漿 oxLDL は上昇した。また、歯と歯肉の間隙の歯肉溝浸出液中に oxLDL が高濃度に存在することを見出した (Sakiyama Y, *et al.*, *J Periodont. Res.* 2010, 45:216)。抗 oxPC を認識するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学により、加齢黄斑変性の患部組織に oxPC の蓄積 (Suzuki M, *et al.*, *Mol. Vis.* 2007, 13:772) が見出されている。これらの結果は、oxLDL が健常者を含めてヒトの生体内で生じ、さまざまな組織に存在しうることを示している。そして、いくつかの病態に深く関わっていることが強く示唆されてきた。

一方で、循環血中での oxLDL の消失は極めて速く、静脈内投与した oxLDL は肝細胞内皮系で取り込まれ急速に処理されるとも報告されている。また、血漿 oxLDL レベルは LDL の 1/5000 ~ 1/10000 と、非常に低く、生体内での代謝が速やかに起こる可能性も考えられるが、生体内での oxLDL 生成機序も不明であり、生成した oxLDL の動きや代

謝も良く分かっていないのが現状である。

近年、質量分析装置の著しい技術的進歩があり、生体成分の網羅的解析が可能になってきた。特に脂質は異なる脂肪酸の組み合わせによる多様な分子種があり、従来の分析法では完全に分離することが困難であったが、液体クロマトグラフ・タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて異なる分子量の成分を網羅的に分析、高感度に検出することが可能になった。さらに、非酵素的に生じ構造未知の産物を含む脂質過酸化生成物に対する解析の試みもいくつも報告され、応用が進みつつある。研究代表者は LC-MS/MS を用いて、oxLDL の酸化に伴う oxPC プロファイル変化 (Sasabe N, *et al.*, *Lipids Health Dis.* 2014, 13:48) を明らかにした。硫酸銅処理で LDL を酸化変性すると、約 60 分のラグタイムの後、長鎖型 oxPC、短鎖型 oxPC の生成が見られるが、3 時間後以降明確に lysoPC の増加が観察された。酸化 LDL 中に生じた lysoPC がその後生体内でさらに代謝を受けるのかどうかは良く分かっていない。

本研究では、重水素で標識した PC あるいは oxPC 誘導体をトレーサーとして使い、特定の LPC や oxPC から生じる種々の代謝産物の分子種と分布を同時的網羅的に調べる。これにより LC-MS/MS の網羅的解析の特性を活かし、oxLDL 中での LPC や oxPC の挙動をより正確に理解し、疾患マーカーとしての可能性を評価するとともに、さまざまな試料での高感度定量への応用にも道を拓くものと考えた。

## 2. 研究の目的

酸化ストレスはさまざまな疾患に関わる生体への病的刺激であり、全身性あるいは組織局所での酸化ストレス状態を評価できるマーカーが求められている。研究代表者はこれまで抗酸化ホスファチジルコリン (oxPC) モノクローナル抗体を用いて血漿酸化 LDL を検出し、冠循環疾患と酸化 LDL との関連性を明らかにし、特に oxPC は心筋梗塞をはじめ加齢黄斑変性、歯周病、脳梗塞、腎不全などの疾患へも関連することを示してきた。本研究では、安定同位体で標識した PC やその誘導体を用いて LC-MS/MS によるリン脂質の一斉解析を行い、oxLDL 中の oxPC の代謝運命を明らかにする。それにより、血漿 oxLDL が生体内でどのように生成し、またどのように細胞に移行し、病巣形成に関わるのか、多面的な実態の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

重水素ラベル PC、oxPC の作成

重水素化ジパルミトイル PC (d<sub>13</sub>-DPPC) は Avanti 社から購入した。d<sub>13</sub>-DPPC リポソームに、ハチ毒ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (Sigma 社) を加えて 2 時間インキュベートし、重水

素化リゾ PC ( $d_{13}$ -lysoPC) を調製した。HPLC で精製した  $d_{13}$ -lysoPC は、LC-MS/MS を用いて分子量と純度を確認した。

#### LDL と HDL による oxPC の代謝

健常ヒト血漿から、KBr を用いた不連続密度勾遠心法で LDL および HDL を分離した。分離した LDL に  $d_{13}$ -lysoPC を添加し、 $d_{13}$ -lysoPC 標識 LDL とした。 $d_{13}$ -lysoPC 標識 LDL を LCAT 阻害剤 (ジチオビスニトロ安息香酸:DTNB) 添加、非添加条件下、HDL と 37 でインキュベートした。0~4 時間反応後、KBr で比重 1.063 に調整した緩衝液を加えて超遠心し、LDL と HDL を分離し、両画分中の脂質プロファイルを LC-MS/MS で分析した (図 1)。m/z=197 のフラグメントイオンを生じる脂質を調べることで  $d_{13}$ -lysoPC に由来する PC 各分子種を網羅的に追跡した。通常の PC 各分子種から生じるフラグメントイオンは m/z=184 なので、もともと含まれているリン脂質とは区別して選択的に標識脂質分子の代謝の様子を調べることができる (図 2)。

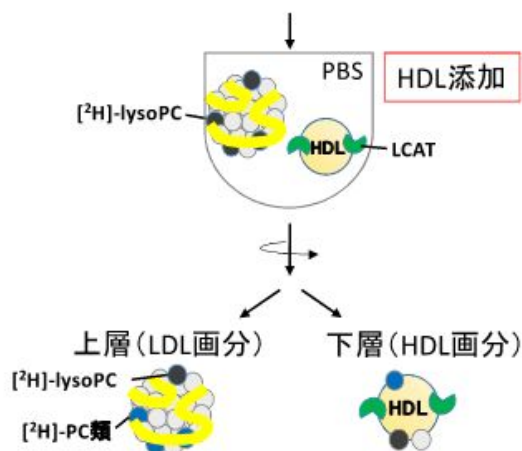


図 1  $d_{13}$ -lysoPC の移行と代謝実験の概略

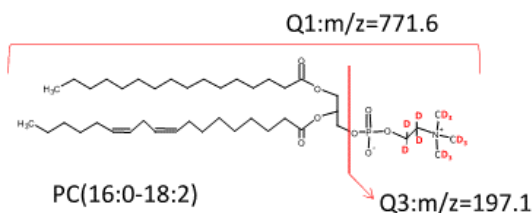


図 2  $d_{13}$ -PC とフラグメントイオン

血漿中での LDL から LPC の移行と代謝  
ヒト血漿に  $d_{13}$ -lysoPC 標識 LDL を添加し 37 でインキュベート後、KBr で比重を調製した不連続密度勾配超遠心し、分画した各リポタンパク質画分中の脂質プロファイルを LC-MS/MS で分析した。

#### $d_{13}$ 標識 oxPC の合成

oxPC はさまざまな酸化生成物を含む混合物である。これまでの種々の研究から、代表

的な oxPC 産物は PC ヒドロペルオキシドなどの長鎖型 oxPC 類と、酸化された脂肪酸鎖が開裂した短鎖型 oxPC 類に大別される。短鎖型 oxPC として、アラキドン酸含有 PC に由来する PGPC (1-palmitoyl-2-glutaroyl-PC) や POVPC (1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-PC)、リノール酸含有 PC に由来する PAPC (1-palmitoyl-2-azelaroyl-PC) や PONPC (1-palmitoyl-2-(9-oxononanoyl)-PC) などが知られている。今回、 $d_{13}$ -lysoPC からこれらの短鎖型 PC の一つを有機合成し、oxPC 代謝を調べるツールとした。

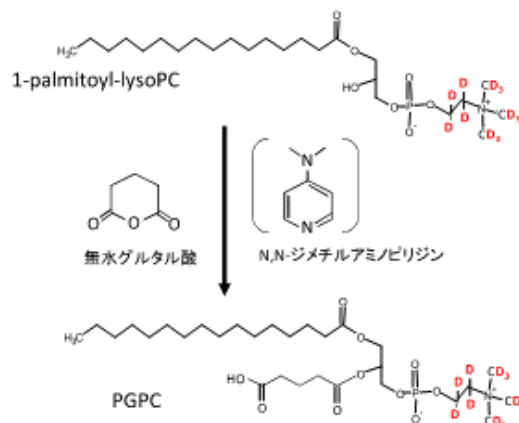


図 3  $d_{13}$ -PGPC の合成反応

$d_{13}$ -lysoPC (1mg) に、無水条件下、無水グルタル酸を加え、N,N-ジメチルアミノピリジンに触媒として縮合反応させ、 $d_{13}$ -1-palmitoyl-2-glutaroyl-PC ( $d_{13}$ -PGPC) を合成した。HPLC で精製後、LC-MS/MS を用いて分子量と純度を確認した (図 3)。

LDL を Lp-PLA<sub>2</sub> 阻害剤 (pefabloc) 存在下で  $d_{13}$ -PGPC を取り込ませ、HDL と co-incubate したときの代謝産物について同様に検討した。

#### 4. 研究成果

$d_{13}$ -lysoPC 標識 LDL を HDL に加えて 37 で 0、1、2、4 時間インキュベートした。HDL 存在下で LDL 中の  $d_{13}$ -lysoPC は反応時間依存的に減少したが、HDL 中の  $d_{13}$ -lysoPC 量はほとんど増加しなかった。一方、LDL 中には  $d_{13}$ -diacyl 型 PC 分子種が増加した。生成した  $d_{13}$ -diacyl 型 PC 分子種の大部分は 1-palmitoyl-2-linoleoyl-PC であった。反応系に加える HDL 量を変えてみると、 $d_{13}$ -diacyl 型 PC の増加は HDL 量と相関した。

LDL 中  $d_{13}$ -lysoPC の減少および  $d_{13}$ -diacyl 型 PC の生成は HDL 無しでインキュベートしても起こらず、HDL との相互作用を介した反応であると考えられた。

DTNB 存在下でインキュベートした場合、 $d_{13}$ -diacyl 型 PC の生成は control レベルま

で抑制され、LDL 中の lysoPC が LCAT (レシチン・アシル CoA アシル転移酵素) によって再アシル化されていることが示された。LCAT は遊離コレステロールの OH 基に脂肪酸を転移する酵素であるが、lysoPC の OH 基に他のリン脂質の脂肪酸部分を転移する作用も知られており、リポタンパク質中の lysoPC の再アシル化に強く寄与していることが確かめられた。

LDL 中の d<sub>13</sub>-PGPC は LpPLA<sub>2</sub> (PAF-AH とも呼ばれる) 阻害剤である pefabloc 処理により検出量が増加した。逆に pefabloc 非存在下ではほとんど検出されず、LpPLA<sub>2</sub> が LDL に生じた酸化 PC を速やかに lysoPC に加水分解しているものと考えられた。生じた lysoPC は HDL の LCAT により大部分が LDL 上でリモデリングされること、また lysoPC の HDL への移行も存在することが示された。

血漿中に存在する酸化 LDL は、動脈硬化症の危険因子として注目されている。当研究室では最近、健康者血漿中から陰性荷電位に富み、抗酸化リン脂質抗体結合性を示す酸化 LDL を分離することに成功した (投稿準備中)。ヒト血漿中の oxLDL は、従来考えられてきた酸化 LDL の組成と異なり、lysoPC の蓄積が見られない。本研究では、LDL 中に存在する lysoPC が HDL との間で粒子間移行し、LCAT による代謝を受けて再アシル化されることを証明した。また、PGPC のような短鎖 oxPC が速やかに加水分解されて lysoPC になりうる可能性も強く示唆された。

これらの結果を踏まえると、血液中のように HDL が共存する環境下では、生じた酸化 LDL 中の oxPC がそのまま粒子中に留まり蓄積するのではなく、粒子間を移行し代謝されていくことが推察される (図 4)。脂質分子がこのような速やかな加水分解、粒子間移行、代謝と再生を受け一方、apoB タンパク質上に起こった修飾は、より長期間固定されて LDL 粒子の物性や生理的性状に影響を与えているのではないかと考えている。

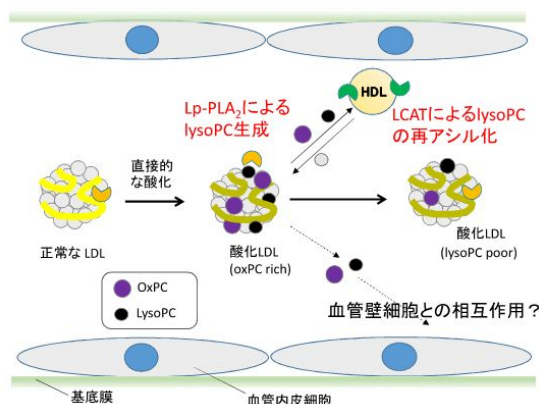


図 4 血中での oxLDL の代謝

今後は、さらに oxLDL と血管壁の細胞との相互作用による oxLDL 中脂質の代謝について、また相互作用する HDL 側の変化についても検討を深めていく必要があると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 9 件)

1. Kuwata H, Yuzurihara C, Kinoshita N, Taki Y, Ikegami Y, Washio S, Hirakawa Y, Yoda E, Aiuchi T, Itabe H, Nakatani Y, Hara S.: The group VIA calcium-independent phospholipase A2 and NFATc4 pathway mediates IL-1 $\beta$ -induced expression of chemokines CCL2 and CXCL10 in rat fibroblasts. FEBS J. 2018 in press, Doi: 10.1111/febs.14462. (査読あり)
2. Itabe H, Kato R, Sasabe S, Obama T, Yamamoto M.: Significance of oxidized low-density lipoprotein in body fluids as a marker related to diseased conditions. Curr. Med. Chem. 2018, In press. Doi: 10.2174/0929867325666180307114855. (査読あり)
3. Moriya Y, Obama T, Aiuchi T, Sugiyama T, Endo Y, Koide Y, Noguchi E, Ishizuka M, Inoue M, Itabe H, Yamamoto M.: Quantitative proteomic analysis of gingival crevicular fluids from deciduous and permanent teeth. J. Clin. Periodontol. 2017, 44(4):353-362 doi: 10.1111/jcpe.12696. (査読あり)
4. Yamada S, Koike T, Nakagawa T, Kuniyoshi N, Ying Y, Itabe H, Yamashita A, Asada Y, Shiomi M.: Morphological features of coronary plaques in WHHLMI rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), an animal model for familial hypercholesterolemia. Experimental Animals, 2017, 66(2):145-157. doi: 10.1538/expanim.16-0078 (査読あり)
5. Ishizuka M, Kato R, Moriya Y, Noguchi E, Koide Y, Inoue S, Itabe H, Yamamoto M.: Changes in apolipoprotein B and oxidized low-density lipoprotein levels in gingival crevicular fluids caused by periodontal tissue conditions. J. Periodont. Res. 2017, 52(3):594-602. doi: 10.1111/jre.12427. (査読あり)
6. Itabe H, Yamaguchi T, Nimura S, Sasabe N.: Perilipins: A diversity of intracellular lipid droplet proteins. Lipids Health Dis. (2017)

16(1):83. doi: 10.1186/s12944-017-0473-y.  
( 査読あり )

7. Miyazaki T, Tonami K, Hata S, Aiuchi T, Ohnishi K, Lei X-F, Kim-Kaneyama J, Takeya M, Itabe H, Sorimachi H, Kurihara H, Miyazaki A.: Disturbance of pre-mRNA splicing by calpain-6 aggravates pinocytotic cholesterol deposition in macrophages. *J. Clin. Invest.* 2016, 126:3417-3432. doi: 10.1172/JCI85880. ( 査読あり )
8. Nimura S, Yamaguchi T, Ueda K, Kadokura K, Aiuchi T, Kato R, Obama T, Itabe H.: Olanzapine promotes the accumulation of lipid droplets and the expression of multiple perilipins in human adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015, 467:906-912. doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.045 ( 査読あり )
9. Yamaguchi T, Fujikawa N, Nimura S, Tokuoka Y, Tsuda S, Aiuchi T, Kato R, Obama T, Itabe H.: Characterization of lipid droplets in steroidogenic MLTC-1 Leydig cells: Protein profiles and the morphological change induced by hormone stimulation. *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2015, 1851:1285-1295. doi:10.1016/j.bbalip.2015.06.007. ( 査読あり )

[学会発表](計 19 件)

1. 小浜孝士、板部洋之、他 8 名「血管内皮細胞の炎症誘導における好中球細胞外トラップと酸化 LDL の関与」 日本薬学会第 138 年会 2018 年
2. 加藤里奈、板部洋之、他 9 名 「動脈硬化初期病変進展過程における抗酸化タンパク質 Peroxiredoxin 2 及び Thioredoxin 低下による平滑筋細胞の酸化ストレス亢進」 日本薬学会第 138 年会 2018 年
3. 澤田直子、板部洋之、他 5 名 「動脈硬化症患者血漿中の酸化 LDL の分離とその性状解析」 日本薬学会第 138 年会 2017 年
4. 加藤里奈、板部洋之、他 8 名 「動脈硬化進展初期過程における平滑筋細胞の Peroxiredoxin 2 低下による酸化ストレス亢進と形質変化」 ConBio2017 (日本生化学会・日本分子生物学会合同年会) 2017 年
5. 笹部直子、板部洋之、他 9 名 「HDL による LDL 中の酸化 PC 代謝の安定同位体リピドミクスを用いた解析」 ConBio2017 (日本生化学会・日本分子生物学会合同年会) 2017 年

6. 板部洋之 「生体内酸化 LDL の実態について：生成・代謝・輸送と疾患」日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 特別講演 2017 年
7. 加藤里奈、板部洋之、他 7 名 「動脈硬化初期病変進展過程における平滑筋細胞の酸化ストレス上昇と形質変化の関係性」 第 49 回日本動脈硬化学会・学術集会 2017 年
8. 石塚元規、板部洋之、他 5 名 「歯肉溝滲出液中の酸化 LDL と歯周病に伴う炎症について」 第 59 回日本脂質生化学会 2017 年
9. 加藤里奈、板部洋之、他 8 名 抗酸化タンパク質 Peroxiredoxin2 による大動脈平滑筋細胞の酸化ストレス制御と初期動脈硬化進展への影響の解析 日本薬学会第 137 年会 2017 年
10. 笹部直子、板部洋之、他 5 名 安定同位体リピドミクスを用いた HDL による LDL 酸化制御機構の解析 日本薬学会第 137 年会 2016 年
11. 加藤里奈、板部洋之、他 8 名 動脈硬化初期病変の発症過程における平滑筋細胞の酸化ストレス上昇と脱分化型への形質変化 第 17 回 PH シンポジウム 2016 年
12. 笹部直子、板部洋之、他 11 名 ヒト血漿から分離した酸化 LDL に含まれる酸化リン脂質と変性タンパク質の解析 衛生薬学・環境トキシコロジーフォーラム 2016 年
13. 小浜孝士、板部洋之、他 7 名 ヒト血漿から分離した酸化 LDL のリン脂質プロファイリングとトリポタンパク質の酸化変性 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会第 24 回大会 2016 年
14. 加藤里奈、板部洋之、他 11 名 大動脈平滑筋細胞の脱分化を伴う Peroxiredoxin 2 低下と動脈硬化初期病変の進展 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2016 年
15. 加藤里奈、板部洋之、他 10 名 大動脈平滑筋細胞の Prx2 発現低下と脱分化の進行は動脈硬化初期病変の進展を促進する 日本薬学会第 136 年会 2016 年 3 月
16. 増田しおり、板部洋之、他 5 名 安定同

位体リポドミクスによる酸化 LDL-HDL 間の脂質リモデリングの解析 日本薬学会第 136 年会 2016 年

17. Itabe H, Kato R, Hayashi M, Obama T, Aiuchi T, Yamaguchi T. Reduced expression of peroxiredoxin 2 in aortic smooth muscle cells at the onset of atherosclerosis in apoE-knockout mice. 11th International Congress on Coronary Artery Disease, 2015
18. 小浜孝士、板部洋之、他 7 名 急性心筋梗塞患者の血中酸化 LDL の脂質プロファイルと酸化 LDL 生成時における Lp-PLA<sub>2</sub> の役割 第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2015 年
19. 石塚元規、板部洋之、他 4 名 歯肉溝浸出液中の apoB、酸化 LDL は歯周病の炎症状態を反映する 第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会 2015 年

〔図書〕(計 2 件)

1. 笹部直子、板部洋之： Lp-PLA<sub>2</sub> と変性リポタンパク質の代謝 臨床化学、2018、47、128-135、日本臨床化学会
2. 小浜孝士、板部洋之： 生体内酸化 LDL 中のバイオマーカー網羅的探索 昭和学術雑誌 (2015) 75:138-146、昭和大学学術会

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ URL

<http://www10.showa-u.ac.jp/~biolchem/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

板部 洋之 (ITABE, Hiroyuki)  
昭和大学・薬学部・教授  
研究者番号：30203079

### (2) 研究分担者

小浜 孝士 (OBAMA, Takashi)  
昭和大学・薬学部・准教授  
研究者番号：60395647

加藤 里奈 (KATO, Rina)  
昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：30392400

笹部 直子 (SASABE, Naoko)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：50643566

(平成 28 年度より研究分担者)

山口 智広 (YAMAGUCHI, Tomohiro)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：50347530

(平成 27 年度まで研究分担者)

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし