

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08607

研究課題名(和文)酸化によるLDL粒子の硬さの分布の変化と加齢の関係

研究課題名(英文)Relation between the distribution of the stiffness of the LDL and age

研究代表者

武田 晴治 (TAKEDA, SEIJI)

北海道大学・保健科学研究院・准教授

研究者番号：80374726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：低比重リポタンパク質(LDL)は、酸化を受けることにより動脈硬化や血栓形成を促進する。これまでにLDLの硬さは酸化により柔らかくなることを報告しているがメカニズムについてはわかっていない。そこで本研究では、LDLをプロテアーゼで処理することによりApoB-100を切断した場合およびフォスホリパーゼA2 (PLA2)で脂質を切断したときにLDLの硬さの影響を調べることで、そのメカニズムの解明を試みた。その結果、プロテアーゼでは硬さの変化はなく、PLA2で硬さが柔らかくなることがわかった。硬さの変化は脂質の構造の変化によることが分かった。また、加齢により硬さのが硬くなる傾向があることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Oxidation of low-density lipoproteins (LDLs) is one of the risk factor for developing cardiovascular disease. Recently, we reported that the elastic modulus of oxidized LDLs decreased with increasing oxidation level of the LDL. However, the mechanisms of the decrease of the elastic modulus have not been well investigated. We thought that the structure change of the LDL might contributed to the decrease. This study measured the elastic modulus of LDLs before and after proteases, phospholipase A2. Although the enzyme treatment did not change the elastic modulus, treatment with PLA2 decreased the elastic modulus. Results suggest that structure change of the lipid structure of the LDL might contribute to the decreasing of the elastic modulus. We also investigated the relation between the age and the distribution of the LDL. Although detail more work will be required, we found that the elastic modulus tend to increase with increasing the age.

研究分野：生物物理化学

キーワード：低比重リポ蛋白質 硬さ 酵素 加齢

1. 研究開始当初の背景

低比重リポ蛋白質(LDL)は、脂質、コレステロールおよび一つのアポ蛋白質(ApoB-100)から形成されており ApoB-100は LDL 表面を帯状になって覆っていると考えられている。LDL は末梢組織へのコレステロールの輸送を行っているが、様々な酸化ストレスにより生成したラジカルにより未酸化 LDL(n-LDL)中の不飽和脂質が酸化され過酸化脂質が生成し、ApoB-100 が修飾されることにより酸化 LDL (ox-LDL)になることが知られている。例えば、高血糖や高血圧など物理的や化学的なストレスにより血管内皮細胞が障害を受け、血管内皮細胞と骨格筋細胞の間の領域に低比重リポ LDL が浸入することにより ox-LDL が局所的に生成してマクロファージを泡沫化して冠動脈疾患などの引き金となると考えられている。

脂質の酸化は冠動脈疾患だけではなく、高血圧、糖尿病、非アルコール性肝炎など全身の健康状態と大きく関連していることが報告されている。脂質の酸化状態を測定する従来法としてチオバルビツール(TBA)法、抗原抗体反応を利用する法、質量分析装置による過酸化脂質の定量的に測定など多く存在する。申請者も、CNTを固定化した電極(CNTベース電極)を利用して ox-LDL の検出と測定方法について検討を行ってきた。しかし、これらの酸化状態の評価方法では一部の LDL 粒子の酸化がかなり進行しているような場合と、粒子が全体的に弱く酸化されているような状態を区別することができなかった。そこで、申請者は AFM により一粒子レベルで LDL の硬さを測定したところ、LDL の硬さの分布と酸化状態に相関があることが判明し、酸化が進行すると 500kPa 以下の柔らかい粒子の観測頻度が高くなることが判明した。硬さの変化のメカニズムについては未解明であったが TBA 法などでは誤差範囲に入る弱い酸化条件でも硬さの分布には有意差がでることが判明していた。

加齢によって体内の抗酸化機構のバランスが崩れ、LDL は酸化されやすくなり、弱い酸化が起こり、個々の LDL の硬さの分布が変わってくると考えられる。本方法の有用性を検討する上で、AFM を用いて、酸化

による硬さの変化のメカニズムを調べることが求められていた。また、加齢などが LDL の硬さの分布に与えるかどうかを検討することも本方法の有用性を調べる上で必要と考えられた。

2. 研究の目的

低比重リポタンパク質(LDL)は、酸化を受けることによりマクロファージの泡沫化作用や血小板活性化作用を獲得し、動脈硬化や血栓形成を促進する。原子間力顕微鏡(AFM)はナノメートルスケールで大きさや物性を評価する手段として用いられており、酸化と LDL の物性変化について検討を行っている。AFM のフォースカーブ測定を用いて、LDL の硬さは酸化により柔らかくなることを報告している。しかし、硬さの変化のメカニズムについてはわかっていない。そこで、本研究は LDL をプロテアーゼで処理することにより ApoB-100 を切断した場合およびフォスホリパーゼ A₂ (PLA₂)で脂質を切断したときに LDL の硬さの影響を調べることで、そのメカニズムの解明を試みることとした。また、加齢により硬さの分布に影響があるかどうかについて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

【方法】

本研究はボランティアの方から採血を実施するため、北海道大学による研究倫理審査を申請して承認を得た(承認番号 15-89-6)。

(1) LDL の酵素処理

健常者から採血をして血清を得たのち、比重差を利用して超遠心法により LDL を分離した。LDL の濃度はローリー法を用いて apoB-100 の濃度に換算して 0.3 から 0.35 mg/ml となるように調整した。ApoB-100 の加水分解による断片化が硬さに影響を与えるかどうかについて検討するために、キモトリプシン(0.05 mg/ml)および V8 プロテアーゼ(0.05 mg/ml)を LDL に添加して 37 で 1 時間から 3 時間加温した。ApoB-100 が酵素で切断されていることを SDS-PAGE で確認した。

次に PLA₂(蛇由来)で処理した LDL を作製した。0.05mg/ml の PLA₂ を 0.35mg/ml の LDL 100 μL に添加して、室温で 1 時間から 3

時間反応させた。LDL の酸化状態は酸化分解物であるマロンジアルデヒド(MDA)をチオバルビタール酸反応性物質量(TBARS)として評価した。PLA₂の活性は酵素法を利用した市販の遊離脂肪酸キットにより評価した。また、LDLに含まれているLp-PLA₂の活性は市販のPAF-AH測定キットを用いて評価した。

(2) AFM による硬さの測定

酵素処理したLDLおよび未処理のLDLを、mica上にエピタキシャル成長させた金膜上またはマイカ上に滴下して室温で3分間放置した後にPBSで洗浄して未吸着のLDLを取り除いた。原子間力顕微鏡(AFM)はAsyrum Researc社のMFP3DまたはJPK社のNanowizad3を使用した。LDLイメージ像はタッピングモードまたはACモードで、緩衝溶液中で形状の測定を行った。探針はオリンパス製のAC40TSを用い、ばね定数はサーマル法により測定した。AFM探針をLDLに押し付けたときの探針の反り情報から、探針の移動量に対して押し付け量を計算して硬さについての評価を試みた。硬さの算出にはヘルツモデルを用いて、装置に付属しているソフトを用いて解析した。

(3) 加齢によるLDLの硬さの変化の検討

健常者22歳から73歳までの17名の血清から比重差を利用して超遠心法によりLDLを分離した。22歳から37歳までの6名(A群)、38歳から54歳までの6名(B群)、および55歳から73歳までの5名(C群)の3つの群に分けた。酵素処理したLDL同様にmica上にLDLを吸着させてACモードで、緩衝溶液中でLDLの形状の測定、およびフォースカーブ測定を行い、硬さを測定した。

AFM探針のばね定数はサーマル法により推定し、0.04~0.11N/mの探針を使用した。

4. 研究成果

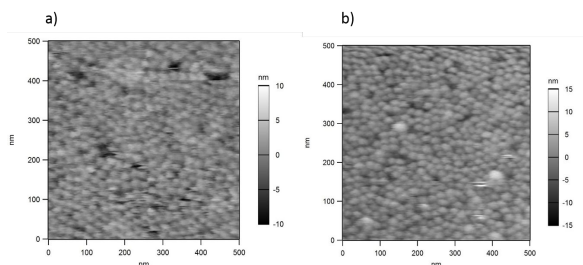


図1. マイカ基板上に吸着したLDLの典型的なAFMイメージ像
a), b)はそれぞれ酵素未処理のLDL, PLA₂で処理したLDLのイメージ像

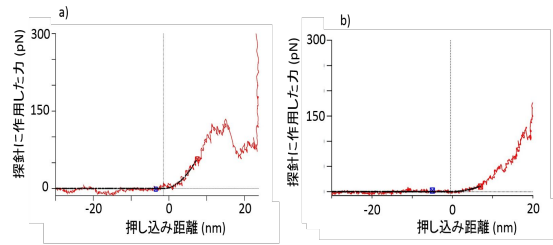


図2. マイカ基板上に吸着したLDLに対するフォースカーブから求めた力と押し込み距離の関係
a), b)はそれぞれ酵素未処理のLDL, PLA₂で処理したLDLの解析結果を示した

LDL または酵素処理した LDL を修飾した mica 基板に吸着させて溶液中でイメージ像を測定した。図1にはLDLおよびPLA₂で酵素処理したときのLDLをマイカ基板上に吸着させたときのイメージ像の一例を示した。基板上にLDLの粒子が基板全体に密に吸着していることが分かる。これらの粒子の大きさは縦横20~30nmの粒子であることが判明した。しかし、プロテアーゼによる酵素処理によりLDLのイメージ像から粒子径についての差は観察されなかった。LDLの高さについてはLDLが基板に密に固定されており基板の表面が観察でなかったためイメージ像からでは判明しなかった。そこで、探針がLDLに触れてから、LDLを押しつぶして基板に接触するまで距離を求めた。図2にはフォースカーブよりLDLをAFMの探針で押しこんだ距離とその時に作用した力の関係(フォース-インデントーション曲線)を求めた。押し込み量が0付近の黒のはAFM探針がLDLと接触したと推定される点を示し、押し込み量が+の領域は押し込んだ距離を表している。灰色の示した点がマイカ基板に接触したと推定される場所であり、黒のと灰色の距離がLDLの高さと推定される。酵素処理したLDLおよび未処理のLDLの高さは20~30nm

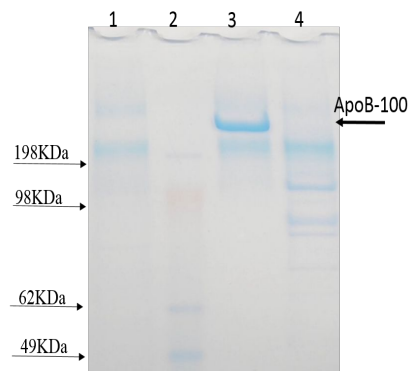


図3. プロテアーゼで処理したLDLのSDS-PAGE
レーン1,2,3,4はそれぞれ、 α キモトリプシン処理したLDL、マーカー未処理LDL, V8プロテアーゼ処理したLDLを示す

の高さであり差は観察されなかった。プロテアーゼにより apoB-100 が切断されているかどうかについては SDS-PAGE により解析した。結果を図 3 に示した。図 3 より キモトリプシンおよび V8 プロテアーゼにより apoB-100 のバンドが消失していることがわかり、apoB-100 が断片化されていることを確認した。

次に吸着した LDL 粒子に対して AFM 探針を押し付けることによりフォースカーブを測定した。一つの試料で AFM の探針の位置を変えながら約 80 回のフォースカーブの測定を繰り返し行った。フォースカーブよりフォース-インデンテーション曲線を求め、硬さを推定した。図 2 はその一例で、a), b) には得られたフォース-インデンテーション曲線をヘルツモデルでフィッティングした結果を黒線で示している。その結果それぞれの硬さは 1.39 MPa(a) と 0.36 MPa(b) と推定された。5 人の血液から分画した LDL について同様に測定して得られたフォース-インデンテーション曲線の解析した。得られた硬さの分布から各分布の中央値を求め、その平均値を表 1 にまとめた。

キモトリプシンおよび V8 プロテアーゼで処理した場合、わずかに硬さが変化する場合もあったが、硬さの分布に変化は観察されなかった。一方、PLA₂ で処理した場合は硬さが減少することが判明した。また、PLA₂ の活性に必要なカルシウムを EDTA でキレートした状態で LDL を処理した場合は硬さの減少がなくなった。PLA₂ の活性により LDL の硬さが変化していることが示唆された。PLA₂ はリン脂質の 2 位のアシル鎖を加水分解して遊離脂肪酸を生成することが知られており、PLA₂ の活性を遊離脂肪酸の量を測定することにより確認した。PLA₂ により遊離脂肪酸が増加し、EDTA の添加により遊離脂肪酸は未処理の LDL と同じ値であることを確認した。また、PLA₂ 処理した LDL

表1. 酵素処理したLDLの硬さの分布の中央値

	硬さの分布の中央値の平均 (MPa)
酵素未LDL	1.2 ± 0.3
αキモトリプシン処理LDL	1.3 ± 0.2
V8酵素処理LDL	1.2 ± 0.2
PLA ₂ 酵素処理LDL	0.7 ± 0.3
EDTA存在下PLA ₂ 酵素処理LDL	1.3 ± 0.2

を限外濾過フィルター(分子量 10 万カットオフ)でろ過した濾過液について遊離脂肪酸量を同様に測定したところ濾過前の遊離脂肪酸量の約 27%が確認できた。このことは PLA₂ により切断された LDL の一部は LDL 粒子から遊離していることを示唆した。

これらのことより LDL の硬さは ApoB-100 のプロテアーゼによる切断では変化すもことはなく、PLA₂ による脂質の構造の変化により硬さが柔らかくなっていることが示唆された。

LDL の分画には Lp-PLA₂ が含まれていることが知られており、酸化した脂質を切断することが知られている。そこで酸化により LDL の硬さが柔らかくなる理由として Lp-PLA₂ が関与しているのではないかと考えた。そこで Lp-PLA₂ の阻害剤である Darapladib と pefabloc を用いて Lp-PLA₂ の関与について検討した。阻害剤は終濃度 100 μM から 1mM になるように LDL に添加して用いた。Lp-PLA₂ の活性は PAF-AH の測定キットで評価したところ、阻害剤によりその活性はバックグラウンドのレベルまで低下していることを確認した。阻害剤で Lp-PLA₂ を不活化した状態で LDL を硫酸銅で酸化した。LDL の酸化状態は TBARS を測定しており、酸化により TBARS は 0.2 μM (酸化前) から 15 μM になることを確認し、阻害剤添加に存在下でも酸化により生成する TBARS 量は変化を受けないことを確認した。また、また、酸化 LDL を限外濾過フィルター(分子量 10 万カットオフ)でろ過した濾過液について遊離 TBARS を同様に測定したところ濾過前の遊離脂肪酸量の約 17%が確認できた。このことは酸化により生成した TARS の一部は LDL 粒子から遊離していることを示唆した。

阻害剤で Lp-PLA₂ を不活化した状態で LDL を硫酸銅で酸化した場合の硬さの分布を測定した。硬さの分布の中央値の平均値は nLDL, 酸化 LDL, Darapladib 存在下で酸化した LDL, pefabloc 存在下で酸化した LDL, それぞれ、1.6 MPa, 0.6 MPa, 0.6 MPa, 0.7 MPa となり、阻害剤の有無に関係なく、酸化した場合は LDL の硬さは柔らかくなることが判明した。Lp-PLA₂ によるリン脂質の加水分解が硬さの変化の原因ではないことが判明した。

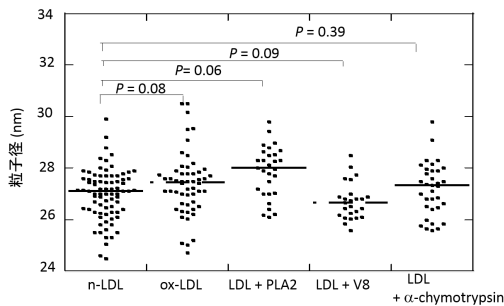


図4. DLSによりLDL、酸化LDL、酵素処理したLDLの粒子径を解析した結果各ドットは各サンプルの粒子径分布解析により求めた粒子径である。線は各分布の中央値を示している。

各 LDL の粒子径を動的光散乱法(DLS)で測定した(図 4)。

その結果、酵素処理や酸化により有意差は確認されなかったが、酸化 LDL と PLA2 処理した LDL については粒子径がわずかに増大する傾向が観察されている。

酸化の場合は TBARS の LDL 粒子からの遊離、PLA₂ 処理の場合は遊離脂肪酸の LDL からの遊離が判明しており、LDL の成分が粒子の外にでていながらも関わらず、粒子径がわずかに増加していることが柔らかさの原因の可能性が考えられる。

LDL は酸化によりアポタンパク質の断片化と脂質の構造の変化が起こる。本研究によりプロテアーゼにより硬さは変化を受けず、PLA2 で硬さが変化することより、酸化により硬さが変化する要因として、アポタンパク質の断片化ではなく、脂質の構造の変化が原因であることが判明した。脂質の加水分解でも、酸化でも脂質の構造に影響を与える因子は硬さの変化をもたらす可能性があることが示唆された。これらの結果については現在、国際誌に投稿中である。

次に加齢により LDL の硬さの分布に変化があるかどうかについて検討した。

LDL を mica 基板に吸着させて溶液中でイメージ像を測定した。3 つの群における大きさの差は観察されなかった。LDL は基板上に密に吸着しており、その大きさは縦または横が約 20~30nm であった。LDL の高さについてフォース-インデンテーション曲線から 20~32nm の高さであることが判明した。

一方、A 群(22 歳から 37 歳)の LDL の硬さの分布を測定して、その中央値の平均を求めたところ 1 ± 0.03 MPa であった。同様

に B 群(38 歳から 54 歳)および C 群(55 歳から 73 歳)の LDL の硬さの平均値はそれぞれ 1.4 ± 0.4 MPa と 1.7 ± 0.2 MPa となった。加齢により酸化を受けた LDL が増加すると加齢とともに LDL の硬さは柔らかくなると想定したが加齢とともに硬さは増加する傾向が観察された。

現段階では臨床的には十分な n 数がえられていないが、LDL の硬さに与える影響は酸化以外にもあると考えられる。酸化以外が LDL の硬さに与える影響など詳細の研究については今後の課題となる。

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 1 件)

Seiji Takeda, Toshihiro Sakurai, Shu-Ping Hui, Hirotooshi Fuda, Hitoshi Chiba, Effects of enzymes on elastic modulus of low-density lipoproteins were investigated using atomic force microscopy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 501(3), 607-611, 2018, 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

2018.8 第 58 回日本臨床化学会, LDL の硬さと加齢について, 武田晴治、櫻井俊宏、惠淑萍、千葉仁志

② 2017.10 第 57 回日本臨床化学会, 酸化還元電位および硬さ分布から LDL の酸化状態を評価, 武田晴治、Agus Subagyo, 布田博敏、惠淑萍、末岡和久、千葉仁志

③ 2017.10 第 57 回日本臨床化学会, LDL の酸化および酵素処理が硬さに与える影響について, 武田晴治、Agus Subagyo, 布田博敏、惠淑萍、末岡和久、千葉仁志

2017.09 第 55 回日本生物物理学会, Effect of enzymes treatment on physical properties of low-density lipoprotein, Seiji Takeda, Agus Subagyo, Shu-Ping Hui, Hirotooshi Fuda, Kazuhisa Sueoka, Hitoshi Chiba

⑤ 2016.09 第 54 回日本生物物理学会 Physical properties of low-density lipoprotein after oxidation or enzyme treatment, Seiji Takeda, Agus Subagyo, Shu-Ping Hui, Hirotooshi Fuda, Rojeet Shrestha, Kazuhisa Sueoka, Hitoshi Chiba

2015.09 第 49 回日本臨床検査医学会
北海道支部総会, 酸化による LDL の硬さ
の変化について, 武田晴治、Agus Subagyo,
布田博敏、惠淑萍、末岡和久、千葉仁志

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田晴治 (TAKEDA SEIJI)

北海道大学・大学院保健科学研究院・准教授

研究者番号：80374726

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()