

令和元年5月15日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08245

研究課題名(和文) 酸化変性リポタンパク質の炎症惹起性と好中球細胞外トラップ形成との相互関連

研究課題名(英文) Proinflammatory activity elicited by oxidized low-density lipoproteins and neutrophil extracellular trap formation

研究代表者

小濱 孝士 (Obama, Takashi)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：60395647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではHL-60由来好中球を用いてNETs形成に対する酸化LDLの影響を調べた。PMA刺激により誘導されるHL-60由来好中球のNETs形成は酸化LDLにより促進され、細胞外へのDNAおよびMPOの放出が顕著に増加した。これら変化は未変性LDLでは見られなかった。またNETs形成後の培養上清は血管内皮細胞を伸長させ炎症応答を増加させた。以上の結果から酸化LDLは好中球のNETs形成を促進することで血管傷害を増悪させる働きをもつことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中コレステロールの中でも超悪玉として知られる酸化LDLは、血管内での脂質蓄積や血管炎症を引き起こす危険因子であることが知られている。血液中の白血球の多くを占める好中球は生体防御において重要な働きをするが、過度に活性化すると組織傷害を引き起こす。本研究は好中球の活性化に対する酸化LDLの影響について調べた。酸化LDLは好中球の活性化を促進して血管内皮細胞の炎症応答を増悪させることが示唆され、動脈硬化および血管炎症が進行する際の新しいメカニズムが存在する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) on neutrophil extracellular trap (NET) formation using HL-60-derived neutrophils. OxLDL, but not native LDL, enhanced PMA-induced NET formation with enhanced release of myeloperoxidase into the culture media, leading to elongation of human aortic endothelial cells and increased inflammatory responses. These data suggest that oxLDL may play important roles in exacerbating endothelial functions through accelerating NET formation.

研究分野：生化学

キーワード：好中球 酸化LDL リポタンパク質 動脈硬化 血管炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

循環血中における低比重リポタンパク質 (low-density lipoprotein: LDL) の量的な増加は、動脈硬化性疾患のリスクを上昇させる独立した危険因子である。したがって血中 LDL を低下させるための薬物治療は心血管疾患の発症リスクを減少させる方法として確立している。しかし血中 LDL を低下させるだけでは動脈硬化発症のリスクを部分的にしか抑えられないことが課題となっている。この“残余リスク”を改善することが、循環器系疾患に対する新たな取り組みとして重要視されている。

生体成分の分析技術が大幅に向上したことにより、循環血中には酸化や小型化といった変化を生じた LDL が存在することが明らかとなり、循環器系疾患を制御するための重要なターゲットとしても認識されつつある。当研究室では酸化 LDL が動脈硬化病変だけでなく、循環血中にも存在することを示してきた。その存在量は血漿中 LDL 画分のうち 0.1% 未満とごく僅かではあるものの、冠動脈疾患患者の血漿では数倍上昇すること、また動脈硬化モデルマウスでは動脈硬化病変形成の進行前の発症初期に血中酸化 LDL が上昇することを示し、酸化 LDL が動脈硬化症の発症に寄与する危険因子として注目してきた。

動脈硬化病変の形成過程における酸化 LDL の生理的役割については、これまで主にマクロファージや血管内皮に対する働きについて国内外でさかんに検討されてきた。酸化 LDL はマクロファージに際限なく取り込まれるため、血管内での脂質蓄積を引き起こす。また酸化 LDL は血管内皮細胞などに作用すると炎症を誘発し、血管傷害を生じる。これらと比較して、好中球に対する酸化 LDL の働きについてはあまり解析が進んでいない。好中球は血中の白血球の多くを占めており、感染初期の免疫応答など自然免疫において重要な役割を担うが、リポタンパク質による影響についての報告は極めて少なく、特に酸化 LDL が好中球に作用するとどのような反応を示すのかについてはよくわかっていない。

免疫反応の応答初期を担う好中球は、好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) を起こすことが 2004 年に報告された。NETs は好中球による新しい細胞死としてネトーシス (NETosis) とも呼ばれる。NETs は細胞外に自身の DNA を網状に放出して細菌などを絡めとり殺菌する働きで、免疫応答の一つとして報告された。しかし非感染時でも生体内で NETs が生じていることが次第に明らかとなり、過剰な NETs 形成が組織傷害を起こす側面が次第に注目され、自己免疫疾患やがん、アルツハイマーなど多様な疾患に関わることが明らかとなった。NETs は動脈硬化や血栓といった循環器系疾患でも見いだされており、血管の炎症・傷害の発症に深く関わるということが強く示唆されている。しかしその具体的なメカニズムはいまだ解明されておらず不明な点が多い。

2. 研究の目的

好中球 NETs と酸化 LDL は、それぞれ血管炎症惹起性を有することが知られているが、両者の相互関係についてはいまだ検討されていない。酸化 LDL は LDL が生体内酸化ストレスにより酸化変性を受けて生成すると考えられている。また酸化 LDL は内因性異物としてスカベンジャー受容体などに認識されることから、酸化 LDL が好中球に内因性異物として認識される可能性があることが推測され、好中球 NETs 形成と酸化 LDL 生成が協同的に作用して動脈硬化などの疾患に関与することが示唆された。

本研究は、酸化変性リポタンパク質が有する炎症惹起性と好中球 NETs 形成による組織炎症との相互関係に着目し、好中球 NETs 形成に対する酸化変性リポタンパク質の役割を明らかにする。そして動脈硬化病変の形成過程で生じている血管内皮細胞での炎症反応や障害性に影響する可能性について明らかにすることを目的とする (図 1)。

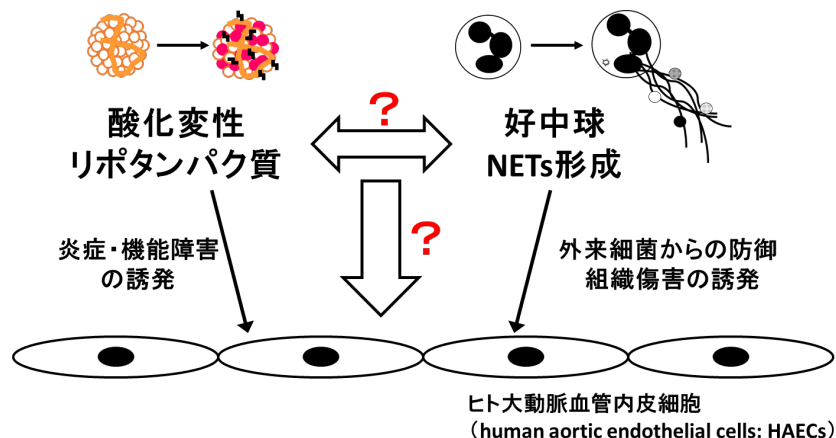


図 1. 好中球 NETs 形成における酸化 LDL の役割と血管炎症への寄与

3. 研究の方法

本研究は昭和大学薬学部倫理委員会の承認を受けて以下の手順で実施した。

(1) ヒト LDL の分画と酸化 LDL の調製

健常ヒト血漿から LDL を超遠心法により分画した。LDL 濃度を 0.2 mg/mL とし、5 μ M 硫酸銅と混合し、37 $^{\circ}$ C で 3 h インキュベーションして酸化 LDL を調製した。

(2) HL-60 細胞を用いた NETs 形成と酸化 LDL の影響 (図 2)

HL-60 由来好中球の作成と刺激: HL-60 細胞を 2 μ M all-trans retinoic acid (AtRA) で 4 日間処理し、好中球様細胞に分化誘導して HL-60 由来好中球とした。50 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で 30 min 刺激して NETs を誘導した後、さらに 20 μ g/mL の LDL または酸化 LDL で 2 h 刺激した。

NETs 形成の定量解析と蛍光顕微鏡による観察: HL-60 由来好中球を刺激した後、培地中に放出された NETs 由来 DNA を Micrococcal Nuclease で部分切断した後、SYTOX Green で染色して蛍光プレートリーダーで定量解析した。またチャンバースライド内で HL-60 由来好中球を刺激して NETs を形成させ、細胞外に放出された DNA を SYTOX Green で染色して蛍光顕微鏡を用いて観察した。

ヒストンシトルリン化の解析: HL-60 由来好中球を刺激した後、細胞抽出液を用いて Western blot により解析した。また免疫染色を行い蛍光顕微鏡により NETs 構造とともに観察した。

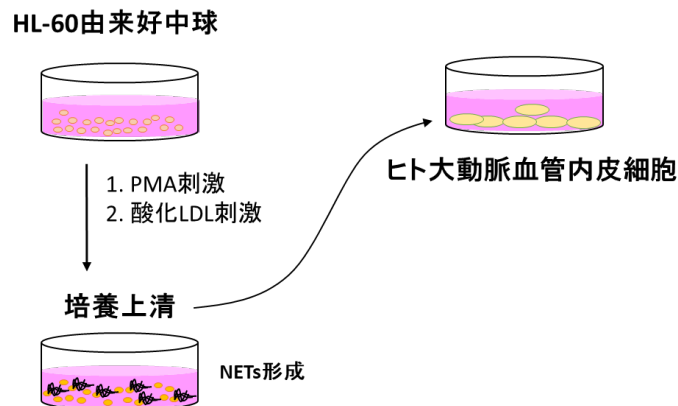


図 2 . HL-60 由来好中球の NETs 誘導とヒト大動脈血管内皮細胞の刺激

(3) NETs 放出物によるヒト大動脈血管内皮細胞 (human aortic endothelial cells: HAECs) の応答 (図 2): HL-60 由来好中球から放出された NETs 構成成分による影響を調べるために、HL-60 由来好中球を刺激した後の培地を回収し、HAECs の培地に加えて 24 h インキュベーションした (図 2)。HAECs に発現する細胞間接着分子である VE-cadherin を染色し蛍光顕微鏡で観察した。また HAECs の細胞抽出物を用いて Western blot を行い、タンパク質の発現変動を解析した。

4. 研究成果

(1) HL-60 由来好中球の NETs 形成に対する酸化 LDL の影響

HL-60 由来好中球を PMA 刺激することにより NETs 形成が引き起こされ、培地中への DNA 放出と細胞外網状 DNA の形成が確認された。蛍光顕微鏡による NETs 構造の観察から、SYTOX Green 染色された網状 DNA とシトルリン化ヒストンが共局在したことから、NETs が進行したことによる結果であることを確認した。一方、未変性 LDL または酸化 LDL 単独で HL-60 由来好中球を刺激したときには NETs 形成は確認されず、ヒストンシトルリン化も検出されなかった。このことから未変性 LDL および酸化 LDL には、ヒストンシトルリン化を介した NETs 形成を引き起こさないことがわかった。PMA 刺激後の HL-60 由来好中球をさらに酸化 LDL で刺激したとき、細胞外への DNA 放出と NETs 構造の形成が顕著に促進された。また培地中への MPO 放出も明確に観察された。培地成分について Native-PAGE を行うと、LDL 中の主要なタンパク質成分である apolipoprotein B-100 と同じ分子量で MPO が検出された。このことから、PMA 刺激で誘導され酸化 LDL により促進された NETs 形成において、細胞外に放出された MPO は酸化 LDL と相互作用することが示された。これら酸化 LDL による効果は未変性 LDL では確認されなかったことから、LDL の酸化変性が持つ性質により引き起こされることが分かった。

(2) NETs 放出物による HAECs の応答

HL-60 由来好中球の NETs 形成後の培地中には NETs により細胞外へ放出された成分が含まれる。HL-60 由来好中球が NETs を形成したときの培養上清を HAECs に作用させると、VE-cadherin 染色が低下し、HAECs の形態が伸長して真円度が有意に低下した。これら HAECs での変化は、HL-60 由来好中球を PMA で刺激後さらに未変性 LDL または酸化 LDL で刺激したときの培養上清でさらに顕著となった。

HAECs での MMP-1 発現を Western blot で解析した結果、の結果と対応して、MMP-1 の発現誘導が引き起こされた。

HL-60 由来好中球を PMA で刺激せず NETs を形成しないとき、未変性 LDL または酸化 LDL 単独で刺激した後の培養上清を HAECs に作用させても、HAECs の形態変化と MMP-1 発現誘導は引き起こされなかった。以上の結果から、HL-60 由来好中球の NETs 形成による HAECs の伸長と炎症応答は、リポタンパク質存在下で促進されることが明らかとなった。

- (3) 本研究から、酸化 LDL は好中球 NETs 形成を促進する働きをもつこと、また好中球 NETs 形成が引き起こす HAECs の炎症応答が LDL および酸化 LDL により増悪することが示された。以上の結果から酸化 LDL は好中球 NETs 形成を介して血管炎症を促進する作用を有する可能性が強く示唆された。動脈硬化や血管炎症の新たな発症機構の解明に繋がることを期待される。今後、NETs 由来成分によるリポタンパク質変性の可能性の解明とその分子レベルでの解析、好中球 NETs 形成のどの過程で酸化 LDL が作用し細胞外への DNA 放出を促進するか、また HAECs に対する炎症誘導作用に関わる分子を詳細に解析する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

Obama T, Miyazaki T, Aiuchi T, Miyazaki A, Itabe H, Evaluation of Protein-Protein Interactions using an On-Membrane Digestion Technique., J. Vis. Exp. (2019) e59733, In-press. (査読あり)

Kato R, Hayashi M, Aiuchi T, Sawada N, Obama T, Itabe H., Temporal and spatial changes of peroxiredoxin 2 levels in aortic media at very early stages of atherosclerotic lesion formation in apoE-knockout mice., Free Radic Biol Med. (2019) 130:348-360. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.458. (査読あり)

Itabe H, Kato R, Sasabe N, 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)

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)

[学会発表](計8件)

現在からさかのぼる、通し番号

小濱孝士、他9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)

小濱孝士、他10名

好中球細胞外トラップ形成への酸化 LDL の関与と血管内皮細胞の炎症応答
第91回日本生化学会大会(2018年)

清水優花、大日方瞳、栗原徹、小濱孝士、他4名

HL-60 由来好中球の好中球細胞外トラップ形成と酸化 LDL : DNA 放出に対する影響
第62回日本薬学会関東支部大会(2018年)

中村美沙季、綾部かれん、小濱孝士、他4名

HL-60 由来好中球の好中球細胞外トラップ形成と酸化 LDL : ミエロペルオキシダーゼ放出に対する影響
第62回日本薬学会関東支部大会(2018年)

伊藤沙恵、大矢夏菜、須賀日咲子、小濱孝士、他4名

好中球細胞外トラップと酸化 LDL によるヒト血管内皮細胞での炎症誘導
第62回日本薬学会関東支部大会(2018年)

森谷拓海、高林衿花、小濱孝士、他4名

好中球細胞外トラップと酸化 LDL によるヒト血管内皮細胞の形態変化

第 62 回日本薬学会関東支部大会 (2018 年)

小濱孝士、他 8 名

ヒト血漿からの酸化 LDL 分離と脂質酸化による性状の変化、第 58 回日本脂質生化学会 (秋田) 6 月 9, 10 日 (2016 年)

小濱孝士、他 8 名

ヒト血漿から分離した酸化 LDL のリン脂質プロファイルと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 回年会 (2016 年)

〔図書〕(計 1 件)

小濱孝士、笹部直子、相内敏弘、加藤里奈、板部洋之

ヒト血漿中からの酸化 LDL 分離とリン脂質プロファイルの解析

ビタミン E 研究の進歩 XVII (ビタミン E 研究会) p43-47

〔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

<http://www10.showa-u.ac.jp/~biolchem/sub11.htm>

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：板部 洋之

ローマ字氏名：(ITABE Hiroyuki)

研究者番号：30203079

研究協力者氏名：巖本 三壽

ローマ字氏名：(IWAMOTO Sanju)

研究者番号：50176567

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。