

令和 2 年 9 月 9 日現在

機関番号：31603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19201

研究課題名(和文)高機能性ペプチドを用いた血中酸化LDL濃度定量法の開発と体外診断への応用

研究課題名(英文)Quantitative method of oxidized LDL in blood using high-functional peptides and its application to in vitro diagnosis

研究代表者

佐藤 陽(Sato, Akira)

医療創生大学・薬学部・准教授

研究者番号：20458235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸化LDLは動脈硬化の主な原因物質として知られている。本研究では、最近私達が見出した酸化LDL特異結合性蛍光標識ペプチド、酸化LDL抗体ならびにポリエチレングリコール(PEG)-6000を用いた新たな血中酸化LDL濃度定量法を開発した(本手法は酸化LDLをナノグラムレベルまで検出可能である)。この定量法の有用性を実際に動脈硬化性疾患患者の血液を用いて調べた結果、患者の血中酸化LDL濃度は健常者に比べて高い傾向にあったが、患者の特性や症状、血液の状態によって結果にばらつきが出ることがわかった。以上より、本定量法にさらなる工夫を行うことにより、その体外診断としての早急な実用化を目指していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回私達は、酸化LDL特異結合性蛍光標識ペプチド、抗ヒト酸化LDL抗体ならびにポリエチレングリコール(PEG)を用いた血中酸化LDL濃度定量法を開発した。この手法は、非抗体のペプチドを用いた技術であり、従来のELISA技術に比べて少ない抗体数で、より低コストかつ短時間な血中酸化LDL濃度測定が可能となる。本技術の動脈硬化体外診断における有用性が確立されれば、その早期診断・発見、予防などにつながり、患者の死亡率の減少や医療費の削減につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：Oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) is known to play a major role in the pathogenesis of atherosclerosis. In this study, we found a novel in vitro method for measuring the levels of Ox-LDL in blood at the levels of nanogram, using a fluorescence-labeled peptide, which binds specifically to Ox-LDL, anti-human Ox-LDL antibody, and polyethylene glycol (PEG). This method appears to be useful for measuring Ox-LDL in blood of patients with atherosclerotic diseases, but the characterization of patients and various interference factors in blood may affect strongly this measurement. Further evaluation of the usefulness of this method will help in contributing toward the identification and diagnosis of atherosclerosis.

研究分野：衛生薬学

キーワード：動脈硬化 診断 酸化LDL ペプチド 定量

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の食の欧米化や人口の高齢化等に伴い、動脈硬化は年々増加傾向にある。また、動脈硬化に起因した死亡率は全体の約3割を占めることから、その有用な診断法の開発が強く求められている。

動脈硬化は、その初期症状はほとんど無く、突然心筋梗塞や脳梗塞などの疾患を発症して初めて気付くなどその早期発見を見逃す可能性が極めて高い。動脈硬化(特にアテローム動脈硬化)は、動脈の内側に不安定プラークが発生し、その破裂によって血栓が形成されて脳梗塞や心筋梗塞を引き起こすと考えられている。また、酸化LDLは不安定プラークに高濃度に蓄積され、その血中濃度も上昇することから、血中の酸化LDL濃度を診断指標とすることは動脈硬化の予防・診断において極めて有用なツールになると考えられる。従って、血中酸化LDL濃度定量技術が開発、実用化されれば、動脈硬化やそれが起因となる疾患(動脈硬化性疾患)の有用な診断につながり、患者の生活の質(QOL)の向上や死亡率の低下につながると考えられる。

現在、血中酸化LDL濃度測定技術として、LDLや酸化LDLを認識するApoB抗体や酸化LDL抗体、酸化LDL中の酸化ホスファチジルコリン(Ox-PC)を認識するFOH1a/DLH3モノクローナル抗体などの各種抗体を用いた手法(ELISA)が開発され、その定量化キットが市販化されている。

その様な状況下、最近私達は、酸化LDLとの特異的結合能を有する、非抗体のビオチニル化ペプチド(BP4~BP29)を創出した(蝦名・熊谷、特許第4017326号;佐藤・蝦名、特開2012-193166)。これらペプチドは、以下の特性を有することが明らかとなっている(Sato et al., *Chem. Biol. Drug Des.*, 2012; Sato et al., *Chem. Biol. Drug Des.*, 2015)。

1. 本ビオチニル化ペプチドはいずれも、YKDG配列を介して、酸化LDLの主要構成脂質であるリゾホスファチジルコリンおよびOx-PCに対して特異的結合性を示すが、normal LDLに豊富に存在するホスファチジルコリンに対しては結合性を示さない。
2. ペプチドのYKDG配列の、Kが酸化LDLとの結合に、Dが酸化LDLの特異的結合に重要である。
3. この特異的結合にはYKDG配列の他、N末端側に結合したビオチンが重要な役割を果たしている。
4. 本ペプチドは、マウス血漿中の酸化LDL画分に結合し、また37℃においてマウス血漿中、1時間後でも約7割が未変化体として分解されずに残存する。

その後、私達が見出した蛍光標識ペプチドは、従来のビオチニル化ペプチドよりも酸化LDLに対する結合性に優れていることがわかった。以上のことから、酸化LDLに対して特異的結合能を有する蛍光標識ペプチドは、動脈硬化の診断薬のシーズとして、血漿中酸化LDL濃度の定量に利用できると考えた。また、非抗体のビオチニル化ペプチドを用いた技術により、従来のELISA技術に比べて少ない抗体数で、より低コストかつ短時間な血中酸化LDL濃度測定が可能となる。本技術の動脈硬化体外診断における有用性が確立されれば、その早期診断・発見、予防などにつながり、患者の死亡率の減少や医療費の削減につながることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、蛍光標識ペプチドを用いた血中酸化LDL濃度定量法の開発と体外診断への応用を目的として、本研究期間中において以下の点を明らかにすることとした。

(1) 蛍光標識ペプチドを用いた血中酸化LDL濃度定量法の確立

当初は、私達が見出したビオチニル化ペプチドを用いて血中酸化LDL濃度定量法を開発する予定であったが、この方法では、酸化LDLとの結合性はあるものの検出感度が低いことがわかった。最近私達は、酸化LDLに対して特異的結合性を示す蛍光標識ペプチドを用いて、ヒトLDLを硫酸銅処理した酸化LDLを標準物質として、その用量と測定値(吸光度等)との相関性、感度や検出限界などの検討を行うこととした。

(2) 本ペプチドを用いた血中酸化LDL濃度定量法の体外診断における有用性の検証

動脈硬化や、虚血性心疾患等の動脈硬化性疾患の患者の血中酸化LDL濃度が上昇することが知られている。そこで、実際に本定量法を用いてこの患者、そして健常者における血中酸化LDL濃度を測定し、本技術の体外診断における有用性を検証した。また、本測定における抗凝固剤などの夾雑物の影響や血液の状態(例えば、血清、血漿いずれでも測定可能か)の影響も調べることにした。

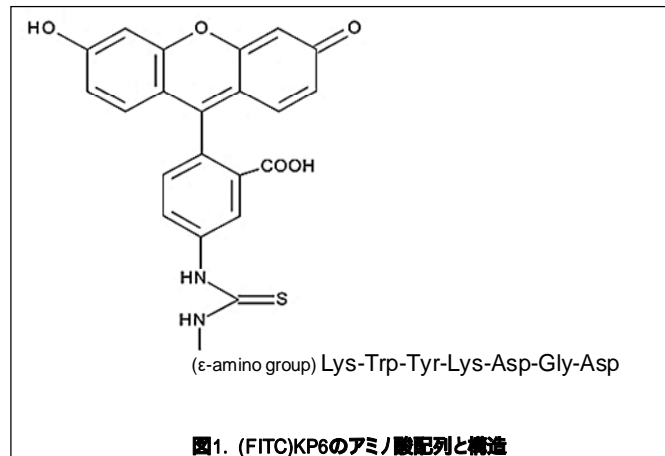
3. 研究の方法

(1) 蛍光標識ペプチドを用いた血中酸化 LDL 濃度定量法の確立

本研究では、まず酸化 LDL に対してより高い特異的結合性を示す蛍光標識ペプチドの創出を試みた。私達は既に、この1つとしてフルオロセインイソチオシアネート(FITC)を標識化したペプチド(FITC)KP6(図1)を見出してきたが、この他にローヤルゼリー由来タンパク質であるロイヤリシン(Royalisin)の、11アミノ酸残基よりなる部分ペプチド(FITC-AC)royalisin P11(酸化 LDL との特異的結合に重要な、YKD 配列に類似した FKD 配列を有する)を作製して、これらペプチドの酸化 LDL に対する特異的結合性の比較を行った結果、(FITC)KP6 の酸化 LDL に対する特異的結合性は、(FITC-AC)royalisin P11 のそれよりも高いことが解った (Sato et al., *J. Pept. Sci.* 2018;24:e3072)。そこで本研究では、蛍光標識ペプチドとして(FITC)KP6(図1)を用い、ヒト血液より単離・精製した LDL を硫酸銅処理した酸化 LDL を標準物質として用いて、以下の研究を実施した。

LDL の単離・精製と酸化 LDL の調製

20~30 歳代の健常者より採血を行い、その血漿から段階的浮上分画法により超遠心を行い LDL を単離した。酸化 LDL はその酸化度に合わせて、MM-LDL (硫酸鉄による酸化、mildly oxidized LDL)、Ox-LDL (硫酸銅による酸化、heavily oxidized LDL) の計 2 種類を作製した。なお、ヒトの血液を用いるため、申請者の在籍機関にある研究倫理委員会に計画書等の書類を提出し、承認を受けて行った。採血は本学の医師が行い、また健常者の人権および尊厳を重んじ、個人情報保護に留意するとともに健常者を保護し研究の公正と信頼性を確保した。



酸化 LDL とその抗体との免疫複合体の形成

酸化 LDL (MM-LDL、Ox-LDL) とその抗体との複合体は、これら LDL にウサギ抗ヒト Cu^{2+} 酸化 LDL ポリクローナル抗体と混合し、4℃で一晩インキュベーションすることにより作製した。

ポリエチレングリコール (PEG) により分離した酸化 LDL-IC に対する (FITC)KP6 の結合解析

酸化 LDL (遊離型、免疫複合体型) 含有 PBS (pH 7.4) またはヒト血清に、同容量の 7% PEG-6000 含有ホウ酸緩衝生理食塩水 (BBS, pH 8.4) を混合して 4℃で一晩静置した後、この混合液を 3,000 rpm で 30 分間遠心し、上清 (Supernatant) と沈殿物 (Pellet) を分離した。Pellet は混合液 (上清) と同容量の PBS で懸濁した。Supernatant と Pellet の各溶液 15 μl と (FITC)KP6 10 μg の混合液について、3% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (還元・変性無し) を行った後、そのゲルを蛍光画像解析装置で撮影し、(FITC)KP6 と各種 LDL の複合体形成を確認した。

(2) 本定量法の体外診断における有用性の検証

(1) において蛍光標識ペプチドを用いた血中酸化 LDL 濃度定量法について検証、評価を行った後、実際に動脈硬化や、虚血性心疾患など動脈硬化性疾患の患者の血中酸化 LDL 濃度を測定し、本技術の体外診断としての有用性を評価した。実際に患者の血液を用いるため、前述の通り、申請者の在籍機関および血液供給を受けたにある研究倫理委員会に計画書等の書類を提出し、承認を受けて行った。被験者の人権および尊厳を重んじ、個人情報保護に留意するとともに健常者を保護し研究の公正と信頼性を確保した。

4. 研究成果、総括及び今後の展望

(1) (FITC)KP6、ウサギ抗ヒト Cu^{2+} 酸化 LDL ポリクローナル抗体、ならびに PEG-6000 を用いた検討の結果、各種酸化 LDL (遊離型、免疫複合体型) 含有 PBS (pH 7.4) に同容量の 7% PEG-6000 含有 BBS (pH 8.4) を添加すると、その遊離型は Supernatant に、免疫複合体型は Pellet にそれぞれ存在することが解った。なお、(FITC)KP6 は、遊離型の酸化 LDL (MM-LDL、Ox-LDL) およびその免疫複合体型の両者に対して結合し、非酸化 LDL の遊離型および結合型に対してほとんど結合しなかった。さらに、(FITC)KP6 の Ox-LDL、MM-LDL 免疫複合体型に対する結合はともに用量依存的であり、その検出感度は 10 ng 以上と、遊離型に対する結合性に比べて 20 倍以上高かった。

(2) 各種 LDL 含有ヒト健常者血清に同容量の 7% PEG-6000 含有 BBS を添加したとき、上記(1)と同様、(FITC)KP6 は、遊離型の酸化 LDL (MM-LDL, Ox-LDL) およびその免疫複合体型の両者に対して結合し、非酸化 LDL の遊離型および結合型に対してほとんど結合しなかった(図2)。

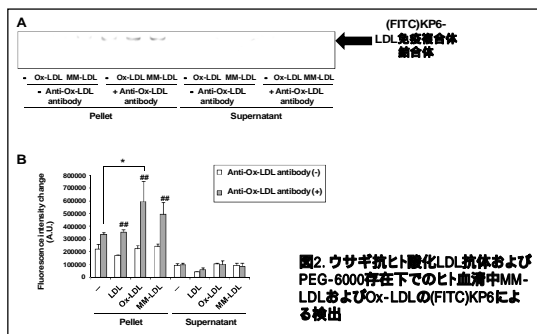


図2. ウサギ抗ヒト酸化LDL抗体およびPEG-6000存在下でのヒト血清中MM-LDLおよびOx-LDLの(FITC)KP6による検出

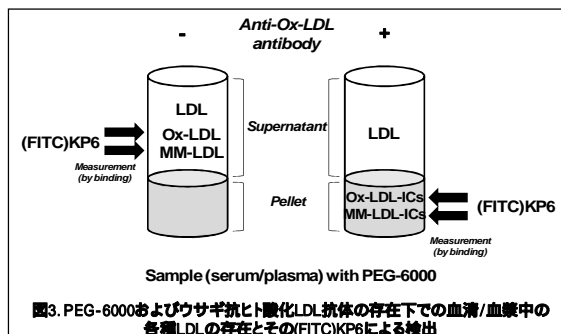


図3. PEG-6000およびウサギ抗ヒト酸化LDL抗体の存在下での血清/血漿中の各種LDLの存在とその(FITC)KP6による検出

(3) 実際に様々な動脈硬化性疾患患者の血液(血清)を用いて、先の実験で確立した血中酸化 LDL 定量法(図3)の有用性を調べた結果、この定量法により、動脈硬化性疾患の患者の血中酸化 LDL 濃度は健常者のそれに比べて高い傾向にあったが、患者の特性やその症状によって結果にばらつきがあること、血液中の乳びなどの影響(採血前の食事等の影響など)を受けやすいこともわかった(乳びについては電気泳動の際に影響するようだ)。したがって、本定量法の体外診断としての有用性を確立するためには、様々な因子の影響を受けにくい、さらなる工夫をする必要があると考えられた。

(4) 私達はこれまでに(FITC)KP6をはじめ複数種の酸化 LDL 特異結合性蛍光標識ペプチドを見出し、このペプチド、抗酸化 LDL 抗体ならびに PEG-6000 を用いた血中酸化 LDL 濃度定量法を開発した。この定量法は、ペプチドが酸化 LDL のみならず、酸化 LDL とその抗体との免疫複合体にも結合することを利用したものであり、従来方法よりも検出感度が 20 倍以上高いものであることがわかった。さらにこの定量法の体外診断としての有用性を調べるため、実際に動脈硬化性疾患の患者と健常者の血液を用いて検討を行ったが、患者の血中酸化 LDL 濃度は健常者よりも高い傾向にあるものの、食事や服薬状況など様々な影響を強く受ける可能性が考えられた。特に患者によっては、血清が白濁しておりこれを遠心等により除去する必要があるか、採血日の前夜からは食事制限をするなどの対応、今後更に詳細な点について調べていく必要があると考えている。本研究によって本定量法の体外診断としての有用性はある程度わかったが、様々な因子の影響を受けにくいさらなる工夫を行うことによりこの手法を確立させ、早急に実用化できるものにしたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akira Sato, Hiroto Unuma, Yoji Yamazaki, Keiichi Ebina	4. 巻 24
2. 論文標題 A fluorescently labeled undecapeptide derived from a protein in royal jelly of the honeybee-royalisin-for specific detection of oxidized low-density lipoprotein	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Peptide Science	6. 最初と最後の頁 e3072
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/psc.3072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 佐藤 陽	4. 巻 4月号
2. 論文標題 動脈硬化の新たな診断指標としての血中IgE濃度	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ぶんせき	6. 最初と最後の頁 157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Akira Sato, Yoji Yamazaki, Keiichi Ebina	4. 巻 27
2. 論文標題 A method for in vitro measurement of oxidized low-density lipoprotein in blood, using its antibody, fluorescence-labeled heptapeptide and polyethylene glycol	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Fluorescence	6. 最初と最後の頁 1985-1993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10895-017-2137-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 佐藤 陽	4. 巻 416
2. 論文標題 脂質を標的としたペプチド創薬研究	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 福島の進路	6. 最初と最後の頁 50-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 佐藤 陽	4. 巻 136
2. 論文標題 蛍光標識ペプチドを用いた新規動脈硬化診断薬の開発研究	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1367-1372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.16-00080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sato A, Ueda C, Kimura R, Kobayashi C, Yamazaki Y, Ebina K	4. 巻 26
2. 論文標題 A fluorescence-labeled heptapeptide, (FITC)KP6, as an efficient probe for the specific detection of oxidized and minimally modified low-density lipoprotein	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Fluorescence	6. 最初と最後の頁 1141-1150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10895-016-1808-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akira Sato, Miyuki Yamazaki, Hinako Watanabe, Eiko Sakurai, Keiichi Ebina	4. 巻 26
2. 論文標題 Human estrogen sulfotransferase and its related fluorescently labeled decapeptides specifically interact with oxidized low-density lipoprotein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Peptide Science	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/psc.3274	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐藤 陽, 山崎洋次, 蝦名敬一
2. 発表標題 酸化LDLとその免疫複合体を指標とする新たな動脈硬化診断法の開発
3. 学会等名 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 陽, 山崎洋次, 蝦名敬一
2. 発表標題 動脈硬化診断のための新たな血中酸化LDL濃度定量法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴沼大翔, 佐藤 陽, 山崎洋次, 蝦名敬一
2. 発表標題 ロイヤルゼリー由来ペプチドを用いた新規動脈硬化診断用プローブの開発
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 陽, 上田千恵美, 木村 龍, 小林千智, 山崎洋次, 蝦名敬一
2. 発表標題 蛍光標識ペプチドを用いた新規動脈硬化診断用プローブの開発
3. 学会等名 日本薬学会第137年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 陽
2. 発表標題 動脈硬化の診断に有用な酸化LDL検出蛍光プローブの開発
3. 学会等名 イノベーション・ジャパン2016～大学見本市&ビジネスマッチング～
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 佐藤 陽
2. 発表標題 動脈硬化の診断に有用な酸化LDL検出蛍光プローブの開発
3. 学会等名 JSTショートプレゼン
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 佐藤 陽, 蝦名敬一
2. 発表標題 蛍光標識ペプチドおよびPEG分画法を用いた血中酸化LDL濃度測定法の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

http://www.isu.ac.jp/ http://www.isu.ac.jp/department/pharm/pharm/staff.html
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	蝦名 敬一 (Ebina Keiichi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	山崎 洋次 (Yoji Yamazaki)		