

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2006～2008
課題番号：18591005
研究課題名 (和文) 酸化ストレスに対する生体応答としての動脈硬化初期病変形成能と治療法の開発
研究課題名 (英文) Biological response to oxidative stress as initial formation of atherosclerotic lesion and development of its treatment
研究代表者 及川 眞一 (OIKAWA SHINICHI) 日本医科大学・医学部・教授 研究者番号：30142946

研究成果の概要：酸化ストレスに対する反応として生成する過酸化脂質が動脈硬化初期病変形成に及ぼす影響として、本研究では過酸化リン脂質であるフォスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) が単球の接着能に及ぼす影響を中心に検討した。培養細胞を用いた解析の結果、PCOOH が単球細胞の ICAM-1 への接着を誘導する生理活性分子として作用する可能性を見出し、その作用機序を検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	630,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：PCOOH, ヒドロペルオキシド、接着分子、細胞接着、単球、LFA-1

1. 研究開始当初の背景

粥状動脈硬化の初期病変である粥腫形成において、主役となる細胞は泡沫化したマクロファージ (M ϕ) である。この病変を形成する過程では末梢血中の単球が血管内皮細胞に接着して内膜下に遊走し、レジデント細胞、すなわち M ϕ に分化するといった現象が初期病変として認識されている。この単球接着は酸化ストレスに対する生体応答の一つである。

単球接着の誘発因子として酸化ストレスが挙げられる。生体内で生じた酸化ストレス

は過酸化脂質を増加させるが、われわれは血中の過酸化脂質としてリン脂質のヒドロペルオキシドであるフォスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) について、リポ蛋白代謝、加齢、糖尿病、高脂血症との関係を明らかにしてきた (Clin Chem 46:822-828, 2000、Diab Res Clin Pract 56:19-25, 2002、Biochim Biophys Acta 1687:173-180, 2005、科研費課題番号 13671202 および 15590959)。すなわち酸化ストレスが存在する病態では血中 PCOOH が増加し、これによって細胞機能が変化するものと

考えられる。したがって、PCOOH を単球接着の刺激因子として利用することによって「酸化ストレス-過酸化脂質 (PCOOH) -単球接着能変化-病態変化」といった一連の関係を明らかにすることが可能となり、その機序についても解明することができるものと考えられた。

2. 研究の目的

(1) 高純度 PCOOH の作成

PCOOH の単球接着能に及ぼす影響を正確に評価するため、高純度 PCOOH の生成法を開発し、研究に用いる十分量の PCOOH を得る。

(2) 単球細胞接着モデル実験系の構築

単球細胞の接着能を簡便に評価するため、培養細胞系における接着モデル実験系を構築する。

(3) PCOOH による単球細胞の接着誘導

PCOOH の単球細胞接着誘導能を上記 (2) で構築したモデル実験系で検証し、その作用メカニズムを探索する。

(4) ヒト末梢血、モデル動物への応用

培養細胞での接着能評価モデルをヒト末梢血や動脈硬化モデル動物の単球に応用し、単球接着能と病体との関係の解明をめざす。

3. 研究の方法

(1) 高純度 PCOOH の作成

フォスファチジルコリン (PC) にリポキシゲナーゼを作用させ PCOOH を生成した後、ヒドロペルオキシド選択的な保護基を導入する。これを HPLC に供して副生成物と完全に分離、回収した後、保護基をはずして再び HPLC に供し、高純度 PCOOH を得る。

(2) 単球細胞接着モデル実験系の構築

まず、血管内皮細胞表面に発現する各種の接着分子 (ICAM-1、VCAM-1 および E-selectin) を 96-well 培養プレートにコーティング (固定化) する。この接着分子固定化プレートを用いて、ヒト単球由来 THP-1 細胞を各種の接着調節因子 (PCOOH など) 存在下で培養する。その後、プレートに接着した細胞数を計測することにより THP-1 細胞の各接着分子への接着能の変化を評価する。

(3) PCOOH による単球細胞の接着誘導

PCOOH が単球細胞の各接着分子への接着に及ぼす影響を、上記 (2) で構築した単球細胞接着モデル実験系で評価する。さらに、各接着分子を固定化したプレートに対する接着のうち、PCOOH による接着誘導が認められた

ものについては、インテグリン (単球側の接着分子) の中和抗体や各種の阻害剤等を用いて、その接着誘導メカニズムを探索する。

(4) ヒト末梢血、モデル動物への応用

培養細胞での接着能評価モデル実験系を応用し、ヒト末梢血や動脈硬化モデル動物の単球を用いて、その接着能を評価する。

4. 研究成果

(1) 高純度 PCOOH の作成

1-Palmitoyl-2-linoleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PLPC) に大豆リポキシゲナーゼを作用させ PCOOH を生成した。得られた PCOOH を含む混合物に 2-methoxypropene (MxP) を作用させ PCOOH の MxP 付加体 (PCOOMxP) を得た。PCOOMxP は逆相 HPLC において、他のリポキシゲナーゼ反応副生成物と容易に分離・精製することが可能であった。精製した PCOOMxP から MxP を脱離し、最終的に収率約 70% で高純度 (>99%) PCOOH を得た。また、PCOOH の還元体であるフォスファチジルコリンヒドロキシド (PCOH) は、PCOOH を NaBH₄ で還元して作成した。

(2) 単球細胞接着モデル実験系の構築

単球細胞の各接着分子に対する接着能を 96-well プレートで簡便に評価する培養細胞モデル実験系を以下のように構築した。

96-well プレートに抗 IgG (Fc) 抗体をコーティング

↓
ブロック (BSA)

↓
各接着分子 (ICAM-1、VCAM-1 および E-selectin) の IgG (Fc) キメラタンパク質を固定化

↓
ヒト単球由来 THP-1 細胞を各種の接着調節因子 (PCOOH など) 存在下で培養

↓
未接着細胞の除去

↓
接着細胞の染色 (crystal violet)

↓
接着細胞数を吸光度で測定

このモデル実験系により、単球細胞の接着能を 96-well プレートで簡便に再現性よく評価することが可能となった。

(3) PCOOH による単球細胞の接着誘導

PCOOH が単球細胞の接着能に及ぼす影響を上記 (2) で構築した接着モデル実験系で解析した。その結果、PCOOH は THP-1 細胞の ICAM-1

に対する接着を濃度依存的に誘導した。また、PCOOHはTHP-1細胞のVCAM-1への接着も亢進したがE-selectinへの接着には影響を与えなかった(図1)。

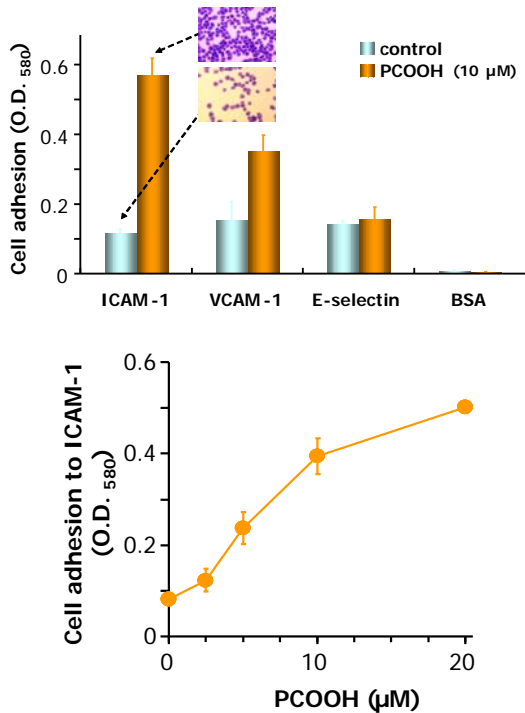


図1. PCOOHによるTHP-1細胞の接着誘導

このTHP-1細胞のICAM-1への接着誘導はPCOOHとその還元体であるPCOHに特異的であり、未酸化のPC、lysoPC、PCOOHの酸化二次生成物、脂肪酸ヒドロペルオキシド、過酸化水素などには認められなかった(図2)。

また、細胞内における活性酸素種(ROS)の上昇も認められなかったことから、PCOOHによる接着誘導には、ROSの発生は関与していないものと考えられた。

つぎに、ICAM-1と結合すると考えられるTHP-1細胞膜上のβ2インテグリンについて、PCOOHによる接着誘導への関与を検討した。その結果、抗CD11aおよび抗CD18抗体によってICAM-1への接着がほぼ完全に阻害された。したがって、PCOOHによって誘導されるTHP-1細胞のICAM-1への接着は、CD11a/CD18ヘテロダイマーであるLymphocyte function-associated antigen-1(LFA-1)を介していることが明らかとなった(図3)。

しかし、フローサイトメトリーによる解析では、LFA-1の細胞表面発現量にPCOOHによる影響は認められなかった。したがって、PCOOHによるTHP-1細胞のICAM-1への接着亢進にはLFA-1の量的変化に依存しない他の機序を考慮することが必要であると考えられた。そこで、LFA-1の膜表面における局在性に着目して検討を行った。その結果、PCOOHはTHP-1細胞にアクチンの重合を伴う擬足様

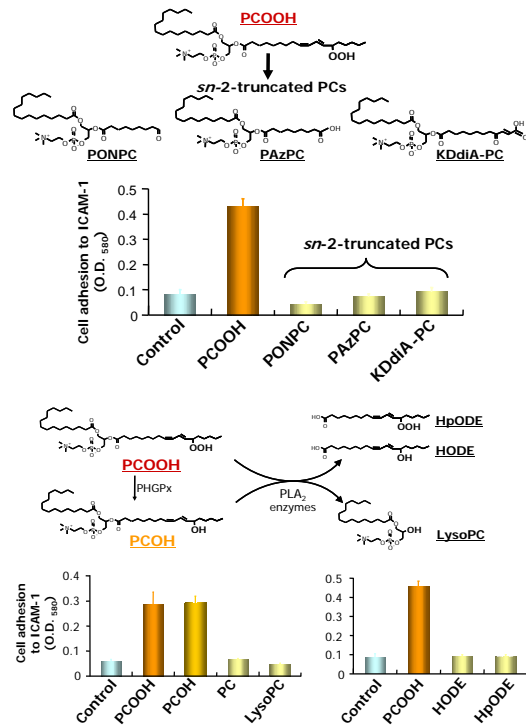


図2. PCOOHとPCOHに特異的なTHP-1細胞のICAM-1への接着誘導

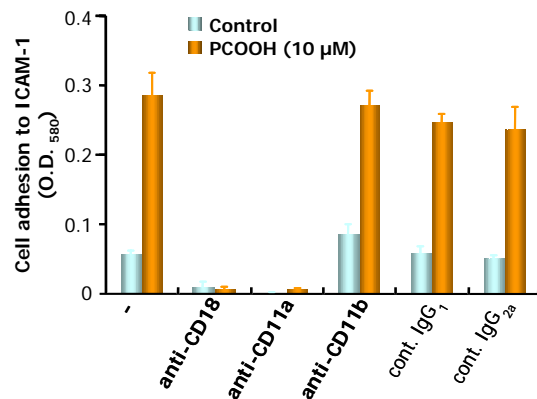


図3. LFA-1(CD11a/CD18)を介したICAM-1への接着

突起の出現を誘導し、LFA-1がこの擬足様突起部位に局在することを認めた(図4)。また、このPCOOHによる擬足様突起の形成は、アクチン重合阻害剤によって抑制され、このとき、ICAM-1への接着も同時に抑制された。

様々な阻害剤を用いた解析から、HMG-CoA還元酵素阻害剤であるスタチン剤がこの偽足様突起の形成とICAM-1への接着を強力に抑制することを見出した(図5)。このスタチン剤による接着抑制作用はメバロン酸やゲラニルゲラニルニリン酸の添加によって完全に消失したことから、偽足様突起形成とそれに伴うICAM-1への接着亢進にはプレニル化(ゲラニルゲラニル化)タンパク質(低分子量Gタンパク質など)の機能が関与しているものと推定された。これらのことから、

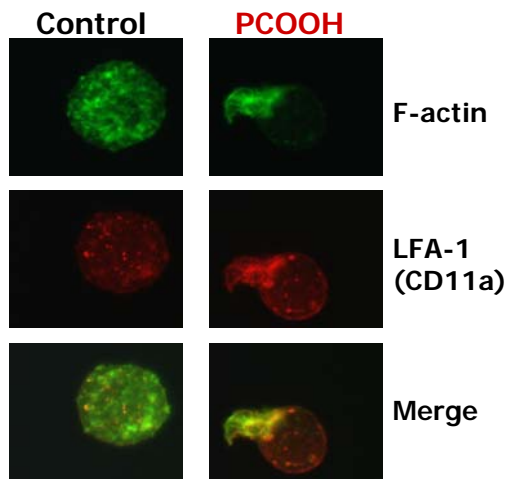


図4. PCOOHによる偽足様突起の形成とLFA-1の局在

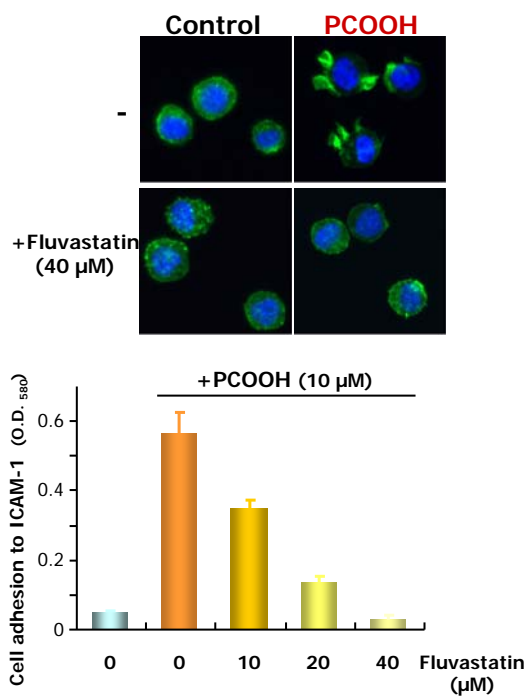


図5. スタチンによる偽足様突起成と接着の抑制

スタチン剤は血清コレステロール降下作用に加えて、単球の血管内皮への接着能を低下させることによって動脈硬化抑制的に作用する可能性があると考えられた。

(4) ヒト末梢血、モデル動物への応用

THP-1細胞を用いて構築した単球接着モデルを応用し、ヒト末梢血単球やマウス単核球などの生体試料を用いた接着能評価系の構築を試みた。しかしながら、生体試料由来の単球ではTHP-1などの細胞株と比較して非特異的な接着が非常に多く、得られる細胞数にも制限があるため、簡便な評価系の確立には到らなかった。生体試料を用いた接着能評価系を今後確立するためには、特異性や検出感

度の向上など、幾つかの問題点を克服する必要があると考えられた。

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2件)

- ① Ibusuki, D., K. Nakagawa, A. Asai, S. Oikawa, Y. Masuda, T. Suzuki, and T. Miyazawa. 2008. Preparation of pure lipid hydroperoxides. *J. Lipid Res.* **49**: 2668-2677. 査読有
- ② Asai, A., F. Okajima, K. Nakagawa, D. Ibusuki, K. Tanimura, Y. Nakajima, M. Nagao, M. Sudo, T. Harada, T. Miyazawa, and S. Oikawa. 2009. Phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to intracellular adhesion molecule-1. *J. Lipid Res.* **50**: 957-965. 査読有

[学会発表] (計6件)

- ① 浅井明、岡島史宜、谷村恭子、中島泰、仲川清隆、宮澤陽夫、及川眞一、過酸化リン脂質PCOOHは単球の接着分子ICAM-1への結合を亢進する、第14回生体パーオキシド研究会、2006年8月12日、仙台
- ② 浅井明、岡島史宜、仲川清隆、指宿大悟、谷村恭子、中島泰、長尾元嗣、宮澤陽夫、及川眞一、過酸化リン脂質PCOOHによる単球細胞株THP-1の血管内皮接着分子ICAM-1への接着誘導とそのメカニズム、第15回生体パーオキシド研究会、2007年8月25日、仙台
- ③ 浅井明、岡島史宜、谷村恭子、中島泰、長尾元嗣、仲川清隆、指宿大悟、宮澤陽夫、及川眞一、過酸化脂質 phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH)による単球細胞の接着誘導、第9回糖尿病合併症とVascular Biology研究会、2008年3月1日、東京
- ④ Asai, A., F. Okajima, K. Tanimura, Y. Nakajima, M. Nagao, K. Nakagawa, D. Ibusuki, T. Miyazawa, S. Oikawa. Phosphatidylcholine hydroperoxide, a primary oxidation product of phosphatidylcholine, induces THP-1 cell adhesion to ICAM-1. 77th European Atherosclerosis Society Congress. 26-29, Apr. 2008. Istanbul, Turkey.
- ⑤ 浅井明、岡島史宜、谷村恭子、中島泰、長尾元嗣、仲川清隆、指宿大悟、宮澤陽夫、及川眞一、リン脂質酸化一次生成物

phosphatidylcholine hydroperoxide
(PCOOH) によるTHP-1 細胞のICAM-1 への
接着誘導、第 41 回日本動脈硬化学会総
会・学術集会、2008 年 7 月 10-11 日、つ
くば

- ⑥ 浅井明、岡島史宜、仲川清隆、指宿大悟、
谷村恭子、中島泰、長尾元嗣、宮澤陽夫、
及川眞一、過酸化リン脂質PCOOHによつて
誘導されるTHP-1 細胞のICAM-1 への接着
と、スタチン、トコトリエノールによるそ
の抑制作用、第 16 回生体パーオキシド
研究会、2008 年 8 月 30 日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

及川 眞一 (OIKAWA SHINICHI)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：30142946

(2) 研究分担者

宮澤 陽夫 (MIYAZAWA TERUO)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20157639