

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：30108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K11041

研究課題名(和文) LDLの硬さに影響する因子の探索と硬さ変化がマクロファージ泡沫化に与える影響

研究課題名(英文) Factors of changing Young's modulus of LDL and relation between Young's modulus of LDL and ingestion by macrophage

研究代表者

武田 晴治 (Takeda, Seiji)

北海道科学大学・薬学部・教授

研究者番号：80374726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：LDLを糖化した場合や抗酸化剤と加温した場合、LDLの硬さが低下した。これらLDLの酸化状態とLDLの硬さについての相関は観察されなかった。また、これらのLDLをTHP-1由来のマクロファージに添加することで、どの程度の細胞がLDLを取り込むかについて検討した。その結果、糖化により取り組む割合が増加し、抗酸化剤と加温したLDLの場合は、取り込みは抗酸化剤により異なった。抗酸化剤を添加したLDLの酸化状態と細胞への取り込み量の間には弱い相関が観察され、LDLの硬さと細胞への取り込み量の間にも相関が観察された。マクロファージに取り込まれるLDLは柔らかい傾向があることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血中に存在するLDLの量だけではなく、LDLの性質も動脈硬化などの疾患の進展に関与すると考えられている。疾患進展につながる性質をもつLDLとして小型化、糖化、酸化など多く要素が報告されているが、全ての要素を一つの方法で評価する方法はない。これまで、酸化LDLの硬さについて評価してきた。今回、LDLを糖化した場合、抗酸化剤を添加した場合にLDLの硬さが変化することを明らかとした。また、これら硬さが変化したLDLは疾患の進展に関与するマクロファージに取り込まれやすい傾向があることが判明した。LDLの硬さの評価により、まだ、知られていない危険な性質をもつLDLの解明につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Relation between Young's modulus of various LDLs and uptake of these LDLs by macrophage was investigated. Before addition to macrophage, LDL was incubated with glucose or various antioxidants for 2 days at 37 degrees. Young's modulus of the LDL decreased after incubation. However, relation between Young's modulus and oxidation degree of LDL measured by TBARS was not observed. Ingesting of these LDL by macrophages were measured. Weak relation between oxidation degree of LDL and ingesting amount of LDL by macrophages was observed. Soft LDL, induced by some antioxidants and glycation, tended to be ingested by macrophage compared to native LDL. It was revealed that the Young's modulus of the LDL after incubation with the antioxidants ingested by a macrophage tended to be low.

研究分野：健康科学

キーワード：低比重リポタンパク質 硬さ マクロファージ 抗酸化剤 糖化 原子間力顕微鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低比重リポタンパク質(LDL)の血液中への過剰な量の存在はアテローム性動脈硬化症など循環器系の疾患の進展となることは広く知られている。このため LDL は悪玉コレステロールと言われている。しかし、LDL はリン脂質、コレステロール、コレステイルエステル、アポ B-100 タンパク質などから形成される直径が 23~29 nm 程度の粒子群であり、LDL の粒子の中でも質が異なる超悪玉 LDL が存在することが知られている。これまで超悪玉 LDL として小型 LDL、酸化 LDL、修飾された LDL など知られている。これら LDL は、CD36 や LOX-1 受容体などを介してマクロファージに取り込まれ、疾患の進展に関与していると考えられている。これら超悪玉の割合を評価する方法の一つとして申請者は原子間力顕微鏡を利用して硬さと大きさから LDL の質を評価する研究を実施してきた。これまで、酸化処理、PLA₂ 処理などにより LDL のサイズは大きな影響を受けないが、LDL の硬さは柔らかくなることを報告している。LDL の硬さの変化する理由として、ApoB-100 の断片化が原因ではなく、脂質の構造の変化が原因の一つである可能性を報告している。しかし、LDL の硬さと LDL の質に関する情報は少ない。

LDL は生体内で糖などによる糖化など化学的修飾を受けるだけでなく、血中で脂溶性の分子など多くの薬剤を結合して輸送していることが報告されている。また、健康意識の高まりから市販の機能性食品などに含まれる抗酸化剤が服用されるケースもあるが、LDL と吸着する抗酸化剤も報告されている。しかし、糖化や抗酸化剤などの機能性分子により LDL の硬さが変化するのか、また、硬さの柔らかいものが超悪玉となる可能性があるのかについての知見はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は LDL を糖化した場合、または、複数の抗酸化剤を添加することで LDL の硬さが変化するのかどうかを検討し、硬さの変化した LDL が超悪玉の LDL となる可能性があるかどうかを評価することを目的とした。具体的には、抗酸化剤として、ケルセチン、ケンフェロール、クルクミン、カテキン、ダイゼイン、ナリンギン、アピゲニン、グルタチオン、トロロックス、クロロゲン酸を選んだ。これらの物質と LDL を混和して加温した LDL の硬さと大きさを、原子間力顕微鏡のフォースカーブ測定機能により測定した。

また、LDL が悪玉の中でも超悪玉を区別する方法として2つの方法を試すこととした。一つ目は抗酸化 LDL 抗体を使用する方法、二つ目はマクロファージが硬さの変化した LDL を細胞に取り込むのかどうかを検討する方法である。これらの二つの方法で超悪玉と考えられる LDL の硬さとの関連を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

LDL の分画

健常者(成人 20~50 代男女 20 名)から採血を実施して血清を得た。また、本研究は北海道大学および北海道科学大学の倫理審査の承認を得て実施した。得られた血清は比重差を利用して超遠心方法により LDL の分画(比重 1.019~1.063)を得た。得られた LDL 分画は SDS-PAGE でアポ B100 由来のバンドがあることを確認し、動的散乱法、原子間力顕微鏡で粒子直径が 23~30 nm であることを確認した。LDL の酸化状態はチオバルビタール酸反応性物質(TBARS)で評価した。

糖化 LDL の調整

LDL(0.25 mg/ml)に対して EDTA 2 mM 存在下、グルコースを 5 または 10 mM になるように LDL に添加し 37 °C 3 日間インキュベートした。TBARS 測定、硬さ測定、細胞への取り込み測定をする前に、限外ろ過法(アミコン:分子量カットオフ 10 万 KDa)により EDTA および糖などを取り除いた。

LDL の酸化状態評価

脂質過酸化により生成するアルデヒド類のうちのマロンジアルデヒド(MDA)を TBARS 測定キットにより測定し、TBARS を MDA 等量/mg apoB-100 として求めた。また、各 LDL の酸化度を以下のようにして求めた。

$$\text{酸化度 (\%)} = \frac{\text{各 LDL の TBARS}}{(\text{酸化 LDL の TBARS} - \text{未酸化 LDL の TBARS})} \times 100$$

抗酸化剤添加 LDL の調整

LDL(0.25 mg/ml)に対して各種抗酸化剤を 50 μM になるように LDL に添加した。このとき抗酸化剤は DMSO に溶解させ、DMSO が 0.5%になるようにして LDL に添加した。37 °C 1 時間加温後抗酸化剤を限外ろ過法で取り除き、LDL 濃度を 0.25 mg/ml とし、抗酸化剤添加 LDL とした。

AFM による硬さの測定

原子間力顕微鏡はアサイラムリサーチ社の MFP-3D を用いた。画像、および、フォースカーブの測定にはオリンパス社 AC40ACT のプローブを用いた。LDL を固定するための基板にはマイカ上に金薄膜をエピタキシャル成長させた基板(金マイカ)を作製して用いた。各種 LDL(0.05 mg/ml)を金マイカ基板上にのせ、室温で 30 分吸着させ、PBS で洗浄後、フォースカーブ測定によりヘルツモデルを用いて硬さを推定した。解析には装置付属の解析ソフトを利用した。

抗酸化 LDL 抗体は硫酸銅酸化に対する抗酸化 LDL 抗体を利用した。抗体 0.1 mg/ml を金マイ

カ基板に固定化後、LDL または酸化 LDL を添加して固定されている LDL の密度、硬さを評価した。

THP-1 由来マクロファージによる各種 LDL の取り込みの測定

THP-1 は(株)ケーエーシより購入し、PMA(100 nM)によりマクロファージに分化させた。分化後、各種 LDL を添加して 37 °C で 24 時間インキュベートした。細胞が 99%以上生存していることを確認後に洗浄して、オイルレッドにより観察細胞面積当たり 50%以上がオイルレッドで赤く染まった細胞数をカウントし、観察した全細胞数で割ることで取り込まれた割合を求めた。

4. 研究成果

LDL の硬さを変化させる要素の候補として糖化と 10 種類の抗酸化剤を用いた。糖化 LDL と抗酸化剤添加した LDL に分けて結果を以下に示した。

・ LDL を糖化した場合の LDL の硬さへの影響

高血糖の状態の一つである 10 mM グルコース存在下で、37 °C で 2 日間インキュベーションした LDL は、未処理の LDL の硬さが 4.5~5 MPa であったのに対して、3.8 から 4 MPa 程度まで低下して、有意差を持って LDL の硬さが柔らかくなることが判明した。一方、グルコースを添加せずに同条件で加温した LDL では硬さは低下する傾向はあるが、未処理 LDL と硬さに有意な変化は観察されなかった。また、糖化の反応中に LDL が酸化されている可能性を考え、過酸化脂質量を DPPH による蛍光で測定したが、糖化前後で有意差は観察されなかったが、わずかに増加する傾向が観察された。一方、TBARS では有意差は観察されなかった。TBARS は参加初期での応答は少ないことより、糖化だけでなく、わずかな脂質の酸化が硬さに影響を及ぼしている可能性がある。

・ 糖化した LDL の THP-1 由来マクロファージへの取り込み

THP1 細胞からマクロファージに分化させた細胞に、同条件で糖化した LDL(9 nM MDA 等量/mg apoB-100)を限外ろ過により糖、EDTA などを除去後に添加して、細胞に取り込まれるかどうかをオイルレッドにより検討した。糖化した LDL を取り込んだ細胞の割合は 21%となった。一方、グルコースを添加せずに同様に処理した LDL(9nM TBARS/mg apoB-100)では 9.6%、37 °C で 10 日間加温した酸化 LDL(30 nM MDA 等量/mg apoB-100)を添加した場合では 43%となった。このことより糖化 LDL は酸化 LDL ほどではないが、未処理 LDL と比較すると細胞に取り込まれやすいことがわかった。糖化およびそれによる酸化初期による LDL の構造変化により CD36 を介して細胞に取り込まれたと推察される。

グルコース共存下または非存在下、同条件で加温した LDL の熱吸収を示唆熱型カロリメトリで 10 ~ 90 °C の範囲で測定した。その結果、LDL 内部の構造変化を反映している 30 °C 付近のブロードなピークの領域が低温側にシフトする傾向が観察された。脂質の流動性が変化することが硬さの変化と関連している可能性がある。このシフトが糖化による影響なのか、わずかな酸化による影響なのかについては今後の課題である。

・ 抗酸化剤を添加した時の LDL の硬さの変化

次にクロロゲン酸、クルクミン、ルテオリン、ケンフェロールなど 10 種類の抗酸化剤を LDL に添加したときの LDL の硬さへの影響を検討した。LDL の硬さを酸化 LDL のように大きく変動させた抗酸化剤はなかったが、以下のような結果となった。

硬さが 3.9 MPa 以上となった抗酸化剤

ナリンギン、ダイゼイン、GSH、クロロゲン酸、カテキン

硬さが 3.9 MPa 未満となった抗酸化剤

ケルセチン、アピゲニン、クルクミン、トロロックス、ケンフェロール

ちなみに同条件で LDL および酸化 LDL の硬さを測定した場合、未処理の LDL の硬さは 5.2 MPa、抗酸化剤を添加せず DMSO のみ添加した場合は 4.6 MPa、酸化 LDL の場合は 2.5 MPa となった。

・ 抗酸化剤を添加した LDL の THP-1 由来マクロファージへの取り込み

次にこれら抗酸化剤と加温した LDL のマクロファージへの取り込みを観察した。未酸化処理 LDL(DMSO 入り)および酸化 LDL をマクロファージが取り込んだ割合はそれぞれ 11%および 35%となった。硬さの変化が少なかった(3.9MPa 以上)抗酸化剤と加温した LDL をマクロファージが取り込んだ割合は $9 \pm 3\%$ となった。一方、3.9 MPa 未満まで硬さを変化させた抗酸化剤とインキュベートさせた LDL をマクロファージが取り込んだ割合は $18 \pm 9\%$ となった。

これらの結果は硬さが 3.8 MPa 未満まで変化してしまった LDL はマクロファージに取り込まれる可能性が高いことを示唆している。しかし、抗酸化剤と加温している間に LDL が酸化している可能性が考えられたため、各抗酸化剤と LDL を細胞なしの条件下、37 °C で加温して TBARS を測定した。

・ 抗酸化剤を添加した LDL の TBARS

まず、DMSO を LDL に添加した場合、酸化度は 80%となり DMSO の添加により TBARS の生成は減少した。DMSO に抗酸化剤を溶解させた場合、LDL の酸化度は抗酸化剤により異なるが、80~15%まで低下した。酸化度の増加とマクロファージへの取り込みに関しては酸化度が大きいほど取り込み量が多くなると予想したが、弱い相関($R=0.36$)が見られた。弱い相関となった理由として

抗酸化剤による LDL への酸化抑制効果だけでなく、抗酸化剤のマクロファージへの影響などが考えられるが詳細は今後の課題となる。

硬さの変化が少なかった(3.9 MPa 以上)抗酸化剤と加温した場合の LDL の酸化度は、平均値は 48 ± 33 % となった。標準偏差が大きい理由としてダイゼイン、ナリンギンの酸化度が 80 付近であったためである。ダイゼイン、ナリンギンは今回の条件では LDL の酸化を抑制していないことが判明した。しかし、ダイゼイン、ナリンギンを添加した LDL については細胞への取り込みの割合は 15% 以下であった。これら LDL の酸化が進行しているのに細胞への取り込みが少ないことになる。この原因として抗酸化剤による LDL 表面への吸着による取り込み阻害、細胞への影響などが考えられるが、今後の課題となった。

一方、硬さが 3.9 MPa 未満まで低下した LDL の酸化度の平均値は 19 ± 4 % となり未酸化 LDL と比較すると酸化は進行していることが判明した。抗酸化剤が LDL に吸着などして LDL の構造を変化させ、正常な LDL ではなく、異物と認識され細胞に取り込まれた可能性が考えられる。この構造変化で硬さが変化しただと考えられる。

酸化の進行が硬さを変化させている可能性も考えられるが、これら 5 つの LDL の酸化度に有意差はなく、酸化度と LDL の硬さ、および、酸化度と細胞が取り込んだ割合には相関係数(R)が 0.4 以下となった。一方、硬さと LDL を取り込んだ細胞の割合には相関係数 R が 0.61 の相関があったことより、抗酸化剤添加により構造が変化し、LDL がマクロファージに取り込まれた可能性があると考えられる。

ここで柔らかい LDL を認識しているのか、それとも、マクロファージが認識する LDL が結果として柔らかい LDL となったのかについて課題が残っている。

今回は十分な検討ができていないが、クルクミンを LDL に添加して加温すると粒子径(動的光散乱法)が 2 倍程度となることがあり、LDL の会合体ができていた可能性が考えられる。カテキンではこのようなことが観察されていないことより、クルクミンにより脂質の構造が壊され表面に脂溶性などの部位が露出して会合したことも考えられる。今回は硬さの測定時に LDL のイメージは一部領域しか観察していない。硬さとイメージの同時測定が可能な AFM 装置が市販されていることより、今後、これらの硬さを変化させた抗酸化剤や薬剤を添加した LDL の構造、および物性を評価する必要がある。

抗体およびLDL関連受容体を用いたLDLの選択的固定化について

市販の抗ヒトLDL抗体、抗酸化LDL抗体をマイカ、または、金マイカ基板に固定化した。基板上に吸着した抗体は観察できた。しかし、LDL、酸化LDLどちらを添加しても、固定化量、形状、硬さ、について有意差を観察することはできなかった。基板に抗体を物理吸着することで抗体のLDLに対する特異性が低下したと考えられた。そこで、Hisタグを導入した組み換えLDL受容体および組み換えLOX-1受容体の利用を模索した。これら受容体の活性についてはバイオレイヤー干渉法により確認した。組み換えLOX-1についてはマイルドに酸化したLDL(15 nM MDA等量/mg apoB-100)に対して結合定数、吸着量が増加し、酸化がさらに進行したLDLについては、結合定数が低下した。LOX-1については酸化処理をしていないLDLに対しても吸着が観察されたが、結合量が少なかったため、試料中の酸化したLDLが吸着していると考えた。一方、組み換えLDL受容体については酸化未処理のLDLだけでなく、マイルドに酸化したLDLについても吸着が観察されたが、更に酸化が進行したLDLについては吸着量が減少した。これら組み換え受容体の各LDLの結合は、既に報告されている各受容体のLDLへの結合の性質と似ていることがわかった。今後、これらの受容体を基板に固定化することで、これらの受容体に認識されるLDLの硬さを評価することで超悪玉LDLの判別に応用できる可能性がある。

総括

LDL を糖化すると LDL の硬さが低下することが分かった。その理由として、糖化およびわずかの酸化が関与している可能性がある。また、抗酸化剤を添加して加温した場合、LDL の硬さと酸化状態には相関が観察されず、酸化状態と細胞への取り込みの割合にも弱い相関しか観察されなかった。一方、LDL の硬さと細胞への取り込みについては良い相関が観察された。マクロファージに取り込まれる LDL の硬さは低い傾向があることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武田 晴治、吉川 大亮、三上 宏騎、濱向 青緒、後潟 夏菜子、高須賀 太一
2. 発表標題 修飾した低比重リポタンパク質(LDL)に対するリコンビナントLDL関連受容体の親和性の評価
3. 学会等名 電気化学会第89回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武田晴治、後潟夏菜子、濱向青緒、スパキョアグス、高須賀太一
2. 発表標題 Physical properties of low-density lipoproteins recognized by recombinant LOX-1 receptor
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Seiji Takeda, Toshihiro Sakurai, Shu-Ping Hui, Hitoshi Chiba
2. 発表標題 Effect of glycation on the physical properties of low density-lipoprotein
3. 学会等名 第58回生物物理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後潟夏菜子、Agus Subagyo、武田晴治、末岡和久
2. 発表標題 固定化方法の違いが原子間力顕微鏡による低比重リポタンパク質の物性評価に与える影響
3. 学会等名 膜シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武田晴治、Agus Subagyo、後潟夏菜子、末岡和久
2. 発表標題 原子間力顕微鏡による基板上に吸着した低比重リボタンパク質粒子膜の酸化プロセスの解析
3. 学会等名 膜シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seiji Takeda, Shu-Ping Hui, Hirotooshi Fuda, Hitoshi Chiba
2. 発表標題 Putative mechanism of the elastic modulus change of low density-lipoprotein
3. 学会等名 第56回生物物理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------