

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19790066
 研究課題名（和文）血管系疾患の新診断と治療法開発を指向した酸化高密度リポタンパクの病態生化学的研究
 研究課題名（英文） Elucidation of pathophysiological roles of oxidized high-density lipoprotein aimed at finding new diagnosis and treatment for vascular diseases
 研究代表者
 松永 俊之（MATSUNAGA TOSHIYUKI）
 岐阜薬科大学 薬学部・准教授
 研究者番号：80306274

研究成果の概要（和文）：動脈硬化巣に検出される濃度での炎症性マーカーでの処理は、血管内皮細胞や平滑筋細胞といった血管系細胞の生存率にほとんど影響を及ぼさなかった。炎症性マーカーとの結合において、リポタンパク非酸化体と酸化修飾体間で差異は認められなかったが、リポタンパク酸化修飾時に炎症性マーカーが共存すると、それはリポタンパクに結合してアポタンパク酸化体の生成を若干抑制した。また、その結合体は炎症性マーカーを含まない酸化リポタンパクよりも血管系細胞に対する感受性が小さかったことから、炎症性マーカーは動脈硬化の発症抑制に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Treatment with inflammatory markers at concentrations which are detected in atheromatous plaques less affected the viabilities of vascular cells such as endothelial cells and smooth muscle cells. In the binding affinity for the marker proteins, no significant difference was observed between un-oxidized and oxidized lipoproteins, whereas the oxidative modification of lipoprotein in the presence of the markers resulted in an increase in the marker-lipoprotein conjugates and a slight decrease in the oxidized apoprotein. In addition, the conjugates were less susceptible to endothelial cells than oxidized lipoproteins prepared without inflammatory marker, suggesting the involvement of the marker in the suppressive mechanism of atherogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：リポタンパク質、酸化、動脈硬化症、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

近年の日本人の死因の上位を占める動脈

硬化性疾患（心血管疾患や脳血管疾患など）の病態変化については徐々に解明されつつ

あるが、それら疾患の発症機序の詳細および画期的な治療薬の開発は依然進んでいないのが現状である。今までの幾多の研究により、低密度リポタンパク(LDL)が血中の活性酸素種等によって酸化修飾を被ると LDL は構造的および機能的に異常をきたし、血管系細胞(血管内皮細胞、平滑筋細胞や単球など)に対して毒性を発現することが知られており、それが動脈硬化性疾患の発症・進展機序の主因として広く認識されている。それに対し、抗動脈硬化作用を有する高密度リポタンパク(HDL)は、LDL よりも早く酸化されることが知られているにも拘らず、動脈硬化症における酸化 HDL の意義については全く解明されていなかった。我々は今までに動脈硬化発症における HDL 酸化体の関与を実証すべく種々検討し、その結果、健康人と比較して、動脈硬化患者血中には高濃度の酸化 HDL が存在することに加え、酸化 HDL は動脈硬化巣の血管内皮近傍に局在すること、*in vitro*で調製した酸化 HDL は、酸化 LDL ほど強力ではないが、細胞内活性酸素種の増加等を介して血管内皮細胞のアポトーシスを誘起することを見出した。このように、HDL の酸化修飾は、本来 HDL が有する抗動脈硬化作用を失うと同時に、血管内皮細胞アポトーシスを誘発して、動脈硬化の発症過程において酸化 LDL と同様あるいはそれ以上に重要な位置を占めることが明らかになった。

動脈硬化症は糖尿病、高脂血症および高血圧症の合併症であることに加え、炎症性疾患とも密接に関わることが最近明らかとなってきた。この知見はこれらの疾病と動脈硬化症の相互関係を明らかにすることが有効なマーカー及び画期的な治療薬の開発につながることを意味しているため、大変興味深い。また具体的には、炎症マーカーとして古くより知られる C 反応性タンパク質(C-reactive protein, CRP)は、各種培養細胞に対するアポトーシスや、酸化リン脂質を介した酸化 LDL への結合を引き起こすことから、これら炎症性マーカーの動脈硬化発症機序への関与が強く示唆されるが、CRP をはじめとする炎症性マーカーと酸化 HDL との相互作用についてはほとんど解明されていない。

2 . 研究の目的

動脈硬化性疾患の発症時に生成量が増加

することが明らかとなった酸化 HDL の各構成成分の構造的変化を健常人の HDL 成分と比較検討すると同時に、酸化リポタンパク処理による血管系細胞の機能変化を明確にすることにより、動脈硬化性疾患をはじめとした各種血管系疾患への酸化 HDL の関与を明らかにする。また、CRP や血清アミロイド A (serum amyloid A, SAA)などの炎症性疾患マーカーと酸化リポタンパクとの相互作用並びにその結合体の血管系細胞(血管内皮細胞、平滑筋細胞や単球)への直接作用を測定することにより、動脈硬化症における炎症性マーカーの意義を解明する。

3 . 研究の方法

(1) リポタンパクの単離とその酸化修飾体の調製

本研究で用いたリポタンパクは、十分なインフォームド・コンセントを得た後に健康人や各種疾患患者血漿から単離した。LDL や HDL (およびその亜画分)の単離には、臭化ナトリウムを用いた超遠心分離法を採用した。

リポタンパクの酸化修飾には硫酸銅を使用し、特記した場合を除いてその濃度は 30 μ M とした。硫酸銅存在下に 18 時間インキュベートした後、30 mM ジブチルヒドロキシトルエンおよび 0.3 mM エチレンジアミン四酢酸 2 ナトリウム塩を加えて酸化反応を停止し、リン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 中で十分透析することにより測定用酸化リポタンパクとした。また、硫酸銅以外の酸化修飾にはグルコースやパーオキシナイトライトを使用した。

(2) 炎症性マーカーとリポタンパクの結合性の評価

炎症性マーカーとリポタンパクを 37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした後、二次元電気泳動に供した。二次元電気泳動の一次元目にはバルビタール緩衝液中でアガロース電気泳動を行い、二次元目にはトリス-グリシン緩衝液中で 2-25% グラジエントゲルを用いたポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。電気泳動後のタンパク質をニトロセルロース膜に転写後、炎症性マーカーの特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により炎症性マーカーのスポットを検出した。標品のみを電気泳動して検出したスポットとその移動度を比較することにより、リポタンパクとの

結合の有無を評価した。

(3) リポタンパクの脂質画分とタンパク質画分の分画

リポタンパク中の脂質画分およびタンパク質画分はそれぞれ Folch 法および Edelstein らの方法の変法により単離した。また分画した脂質画分およびタンパク質画分を乾固した後、それぞれジメチルスルホキシドおよび PBS に溶解することにより細胞処理用試料とした。また、どちらの画分にも含まれない画分にはタンパク質と低濃度の脂質が検出されたため、タンパク質-脂質結合画分とし、50% ジメチルスルホキシドに溶解することにより試料とした。

(4) チオバルビツール酸関連化合物量の測定

リポタンパク中のチオバルビツール酸関連化合物量は、市販の蛍光測定用キットを用いて測定した。標準液として 1,1,3,3-テトラエトキシプロパンを用い、チオバルビツール酸関連化合物量は生成するマロンジアルデヒド当量として算出した。

(5) リポタンパク中の 4-ヒドロキシノネナール(4HNE)の検出

リポタンパク中に 10 M ジニトロフェニルヒドラジンを含む 2 N 塩酸を添加し、無酸素条件下にて室温で 48 時間静置した。クロロホルムで抽出後、クロロホルムを展開溶媒として薄層クロマトグラフィーを行った。4HNE のジニトロフェニル誘導体のバンドを抽出して濃縮後、高速液体クロマトグラフィーに供した。高速液体クロマトグラフィーのカラムには C₁₈ カラム (3.9 mm x 250 mm) を使用し、25 にて 80% メタノールにより溶出した。4HNE 誘導体は UV 検出器 (測定波長 378 nm) にて検出した。

(6) 細胞培養

ヒト血管内皮細胞、ヒト血管平滑筋細胞およびヒト単球様 U937 細胞は市販の培地中で増殖・維持した。

過酸化脂質代謝酵素の cDNA を組み込んだ pGW1 ベクターを Lipofectamine 2000 を用いてウシ血管内皮細胞に導入することにより過酸化脂質代謝酵素過剰発現細胞を調製した。

(7) 培養細胞の毒性評価

細胞を type-I コラーゲンでコートした 96 ウェルプレート中に 4×10^4 cells/ウェルずつ播種し、37 °C、5% CO₂ インキュベーター中で 24 時間培養した。リポタンパク除去ヒト血清および抗生物質のみを含む培地に交換して 18 時間培養後、培地中に測定用試料を添加した。対照群として培地のみのブランクと試料の代わりに PBS を添加した 100% コントロールを調製した。生細胞数の割合は MTT 法により測定した。

(8) 細胞内活性酸素種の測定

細胞内で生成したスーパーオキシドアニオンおよび過酸化水素は、それぞれの蛍光プローブであるジヒドロキシエチジウムおよび DCFH を用いて測定した。処理した細胞を蛍光プローブとインキュベートした後、細胞を 4% パラホルムアルデヒドにて固定し、フローサイトメトリーに供した。

(9) ウェスタンブロット分析

細胞を 0.1% トリトン X-100 とプロテアーゼ阻害剤を含む PBS に懸濁して 26 ゲージの針を 30 回通して細胞膜を破壊し、その細胞破砕液を遠心分離することによりウェスタンブロット分析用試料を得た。試料 40 μg を 12.5% アクリルアミドゲルを用いたドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、それらタンパク質をポリビニリデンジフルオリド膜に転写した。特異的抗体とその二次抗体を用いて順次膜をインキュベートし、膜状の抗体反応性タンパク質を化学発光法にて検出した。

4. 研究成果

(1) 炎症性マーカー (CRP および SAA) による培養血管内皮細胞への毒性の検討

ヒト大動脈血管内皮細胞を CRP で 48 時間刺激したところ、100 μg/ml 以上の高濃度の CRP 処理により細胞毒性が発現し、その毒性には活性酸素の産生亢進とそれに伴うアポトーシス誘導機序 (ミトコンドリアの膜機能低下とカスパーゼ酵素群の活性化) が関与することが明らかとなった。しかしながら、細胞毒性が発現した CRP 濃度は健常人の基準値よりも 20 倍以上高く、炎症を除く動脈硬化性疾患患者の検査値ではこの CRP 値はほとんど見

られないため、生理的条件下での CRP 単独処理は血管内皮細胞に対して毒性を示さないと判定した。また、100 µg/ml 以上の濃度の SAA 刺激においても血管内皮細胞の生存率低下は認められなかった。さらに、これら炎症性マーカーの生理的条件下での処理は、血管平滑筋細胞や U937 細胞の生存率に影響を及ぼさなかったことから、CRP や SAA はこれら血管系細胞に対して直接毒性を発現しないことが示された。

(2) 炎症性マーカーと酸化 HDL の結合性の検討

CRP や SAA の炎症性マーカーの HDL (非酸化 HDL および酸化 HDL) との結合性を二次元電気泳動により検討したところ、SAA は非酸化 HDL と酸化 HDL の両方に結合したが、CRP はどちらとも結合しなかった。それに対し、CRP と HDL の混合液を硫酸銅によって酸化した結果、CRP-酸化 HDL 結合体が検出され、同様の結果が SAA 添加時にも認められた。動脈硬化発症時には血中活性酸素量および炎症性マーカー濃度が共に高まることから、両炎症性マーカーと酸化 HDL 結合体は新規動脈硬化マーカーとなりうることが推察された。

(3) 炎症性マーカー 酸化 HDL 結合体による細胞毒性の検証

上記(2)の条件下において CRP-酸化 HDL および SAA-酸化 HDL の両結合体を調製し、それらによるヒト血管内皮細胞の生存率の変化を測定したところ、SAA-酸化 HDL 処理群による細胞生存率の低下は、(炎症性マーカー非存在下に調製した)酸化 HDL とほとんど同じであったが、CRP-酸化 HDL による細胞毒性は酸化 HDL よりも小さかった。また、このような傾向は CRP-酸化 HDL 結合体のタンパク質画分において認められた。それに加えて、CRP のアポリタンパクへの結合が検出されたこと、並びに CRP 共存下に HDL を酸化するとアポタンパク酸化体の生成量が減少したことから、HDL 酸化時に CRP が共存すると、CRP はアポタンパクに結合することにより酸化アポタンパクによる毒性を軽減すると推察された。CRP によるアポタンパクの酸化抑制機序の詳細については今後の課題と考えている。

酸化 HDL でヒト単球様 U937 細胞を処理したところ、酸化 LDL よりも軽度であったが、

200 µg/mL 以上の濃度において毒性が発現し、それは 10 µM 以上の硫酸銅酸化時において顕著であった。また、酸化 HDL をタンパク質画分、タンパク質-脂質結合体および脂質画分にそれぞれ分画して同様に毒性を検討した結果、酸化 LDL とは異なり、タンパク質画分処理群において顕著な U937 細胞生存率の低下が認められた。

また、ヒト血管平滑筋細胞を酸化 HDL (0~200 µg/ml) で 48 時間処理したところ、細胞生存率に顕著な変化は認められなかったが、そのタンパク質画分およびタンパク質-脂質結合体において若干の生存率の低下が認められた。

これらの成果から、酸化リポタンパク誘発血管細胞毒性機序へのアポタンパク酸化体または脂質結合体の関与が推測された。

(4) 酸化 HDL 中の 4HNE の定量とその血管内皮細胞毒性機序の解明

酸化 HDL 中に生成する 4HNE 量を測定したところ、LDL 酸化時の 4HNE 生成量よりも大変少量ではあるが、4HNE 生成量の増加が認められた。また、4HNE 等の過酸化脂質の還元代謝に関わる酵素(アルドケト還元酵素)の血管内皮細胞内への導入は、4HNE による血管内皮細胞毒性を顕著に低減したことから、過酸化脂質の動脈硬化発症機序への関与が示唆された。

また、銅酸化以外の酸化方法(グルコースでの長期間インキュベートやパーオキシナイトライトによる修飾)で調製した酸化 HDL による血管内皮細胞毒性は、硫酸銅酸化体と比較して大変小さく、その変動はそれぞれの HDL 酸化修飾体中の過酸化脂質量と相関が見られたことから、それぞれの修飾時に生成する過酸化脂質やその修飾体が血管内皮細胞毒性の一因であることが推察された。

動脈硬化症(狭心症)患者から採取した HDL 中での過酸化脂質生成量(4HNE や過酸化リン脂質)を測定したが、健常人の HDL と比較して有意な差異は認められなかった。

(5) 酸化リポタンパクにより誘導される酸化ストレスに及ぼす一酸化窒素(NO)の効果

低濃度の酸化リポタンパクまたは酸化度の低いリポタンパクでの血管内皮細胞の処理は、細胞内 NO 量を増加させたが、高濃度

(200 µg/ml 以上)の酸化リポタンパクや酸化度(硫酸銅 10 µM 以上)の高いリポタンパクは NO 量を減少させた。このような NO 量の変動は、他の酸化ストレス誘導剤(過酸化水素やフェナンスレンキノン)でも認められ、抗酸化剤の前添加によりほとんど検出されなかったことから、酸化ストレスの誘導と NO 産生との相関が示唆された。

研究者番号：80306274

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

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)

(1) Toshiyuki Matsunaga, Marina Arakaki, Tetsuro Kamiya, Mariko Haga, Satoshi Endo, Ossama El-Kabbani, Akira Hara, Nitric oxide mitigates apoptosis in human endothelial cells induced by 9,10-phenanthrenequinone: Role of proteasomal function. *Toxicology*, (査読有), 268 巻, 191-197, 2010 年

[学会発表](計3件)

(1) 井上 由佳梨、松永 俊之、新垣 麻理奈、原 明、酸化高密度リポタンパクによる血管内皮細胞毒性に対する炎症性マーカーの抑制効果、第81回日本生化学会大会 第31回日本分子生物学会年会合同大会、2008年12月12日、神戸

(2) 松永 俊之、動脈硬化発症機序における酸化 HDL の意義の解明、第 54 回日本薬学会東海支部総会・大会、2008 年 7 月 5 日、愛知

(3) 松永俊之、井上由佳梨、三井田孝、菰田二一、原 明、C-reactive protein および Serum amyloid A と酸化リポタンパク質の結合、第 53 回 日本薬学会東海支部総会・大会、2007 年 7 月 7 日、愛知

[その他]

ホームページ

<http://www.gifu-pu.ac.jp/lab/seika/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松永 俊之 (MATSUNAGA TOSHIYUKI)

岐阜薬科大学 薬学部・准教授