

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 31日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21300280

研究課題名（和文） 炎症部位におけるオゾン酸化コレステロールの生成機構の解明と生物活性、疾患への関与

研究課題名（英文） Elucidations of the mechanisms for the formation of cholesterol-ozonolysis products in inflamed tissues, their biological activities and involvement in disease development

研究代表者

大島 寛史 (OHSHIMA HIROSHI)

静岡県立大学・食品栄養科学部長 教授

大学院 薬食生命科学総合学府 食品栄養環境科学研究院

食品栄養科学専攻・薬食生命科学専攻

生化学研究室

研究者番号：80433209

研究成果の概要（和文）：

コレステロールのオゾン酸化物であるアセロナール類を高感度特異的に分析する方法を開発した。この方法を用いて、炎症部位においてヒト好中球はオゾン様活性酸素種を産生し、コレステロールを酸化してアセロナール類を生成することを明らかにした。アセロナール類は、生体の重要なシグナル分子である一酸化窒素の生合成を阻害し、神経細胞などに対して強い毒性を示すことから、アルツハイマー病などの原因物質である可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a highly sensitive and specific method to analyze atheronals, cholesterol ozonolysis products. Using this method, we have reported that human neutrophils in inflamed tissues can produce an ozone-like oxidant(s) which can oxidize cholesterol to generate atheronals. Because atheronals impair the formation of an important signal molecule, nitric oxide, by inhibiting nitric oxide synthases and also exert potent cytotoxic effects against a variety of cells including neuronal cells, these could be causative agents for Alzheimer's disease and others.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：コレステロール、生活習慣病、脂質、炎症、栄養学

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病とは、食習慣、運動習慣、休養、喫煙、飲酒などの生活習慣がその発症、進展

に關与する疾患群である。生活習慣病の原因として、メタボリック症候群があり、中でも肥満が第一に重要である。発症機構として、

肥満に認められる肥大化した脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカインの作用による血管や脂肪組織の慢性炎症が重要な役割を果たしていると考えられている。慢性炎症においては、様々な活性酸素・窒素種が高濃度に生成され、タンパク質などの生体成分と反応することにより、その機能低下などをもたらす、病的反応を惹起するものと考えられる。最近、Wentworth らは、ヒトの炎症組織において、非常に反応性の高いオゾン様活性酸素種の生成する可能性を報告し (Wentworth et al., Science, 298, 2195-2199, 2002; Babior et al., PNAS 100, 3031-3034, 2003)、さらに、ヒト動脈硬化巣においてコレステロールのオゾン特異的酸化コレステロール (atheronal-A と atheronal-B) の存在を明らかにした (Wentworth et al., Science, 302,1053-1056, 2003)。atheronal-A と B は、コレステロールとスーパーオキシドアニオン (O_2^-)、ヒドロキシラジカル ($HO\cdot$)、一重項酸素 (1O_2) などの活性酸素種の反応では生成されず、オゾンとの反応によってのみ特異的に生成すると報告されてきた (Gumulka & Smith, JACS 105, 1972-1979,1983)。生体内におけるオゾン様活性酸素の生成機構として、Wentworth らは、抗体 (イムノグロブリン類) が、酵素的触媒作用により、 1O_2 と水 (H_2O) から過酸化水素 (H_2O_2) を生成する際に、オゾン様活性酸素 (三酸化二水素、 H_2O_3) が生成するという機構を提唱している (Nieva & Wentworth, Trend Biochem Sci 29, 274-278, 2004)。この抗体の触媒作用により生成されるオゾン様活性酸素は、その反応性の高さゆえに、様々な生体成分と容易に反応し、その機能に障害をもたらすことにより、免疫防御やアレルギー、炎症などの疾患において、重要な役割を果たしている可能性がある。事実、オゾン様活性酸素とコレステロールの反応で生成する atheronal-A と atheronal-B は、ヒト動脈硬化巣やアルツハイマー病患者の脳組織 (Wentworth et al., Science, 302,1053-1056,2003; Zhang et al., PNAS, 101, 4752-4757, 2004) やオゾンに曝露させたマウス肺組織 (Pulfer et al., JPharmacol Exp Ther, 312, 256-264, 2005) において検出されている (図-1)。さらに、最近、atheronal-A と B は、心筋や神経細胞に対して強い毒性やアポトーシス誘導性を有すること (Sathishkumar et al., FEBS Lett 579, 6444-6450, 2005; Free Radic Res 41, 82-88, 2007)、また、amyloid β や α synuclein などのタンパク質と反応して凝集、異常折りたたみや線維化を誘導することが報告されている (Zhang et al., PNAS, 101,

4752-4757, 2004; Bosco et al., Nat Chem Biol 2, 249-253, 2006)。これらの結果は、炎症部位で生成するオゾン様活性酸素と生体成分の反応だけでなくコレステロールのオゾン酸化物そのものが、動脈硬化症、認知症など様々な疾患の原因である可能性を示唆している。しかしながら、生体内におけるオゾン様活性酸素および atheronal-A や B の生成機構、生物活性、疾病での役割等については、不明な点が多い。

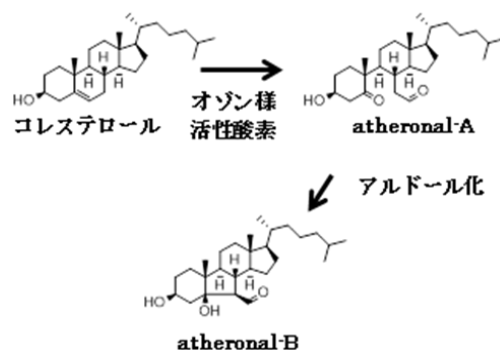


図-1 : オゾン様活性酸素によるコレステロールから atheronal-A と atheronal-B の生成

2. 研究の目的

本研究においては、atheronal-A と B に関して、(1) LC-MS/MS による高感度特異的分析法の開発、(2) ヒト好中球による生成機構の解明、(3) 各種疾病モデル動物からの生体試料 (血液、組織など) の分析、(4) ヒト血液の分析と疾病との関連、(5) 細胞毒性誘発機構の解明、(6) 生体成分 (核酸、タンパク質など) との反応および生体機能への影響、などについて研究を行う。

3. 研究の方法

(1) LC-MS/MS による atheronal-A と atheronal-B の高感度特異的分析法の開発：市販の安定同位体を含むコレステロールを出発材料とし、安定同位体を含む atheronal-A と B を合成し、それを内部標準物質として用いて、LC-MS/MS による高感度特異的分析法の開発を行った。atheronal-A と B は、ともにアルデヒド基を含むので、共同研究者の東が開発した 2-hydrazino-1-methylpyridine (HMP) (Higashi et al., J Chromatogr B, 825, 214-222, 2005; 846, 195-201, 2007) と反応させ、誘導体を LC-MS/MS 分析する方法について検討を行った。

(2) ヒト好中球様分化細胞によるオゾン様活性酸素と atheronal-A および-B の生成機構の解明：すでに、本研究室における先行研究により、DMSO で好中球様細胞に分化した

HL-60 を PMS で活性化させると、atheronal-A および-B を生成することが明らかになった。この生成は、外部から添加したコレステロール濃度に依存し、また、抗体 (IgG) の存在によりさらに増加することから、Wentworthらが提唱する、抗体 (イムノグロブリン) が触媒的にオゾン様活性酸素 (三酸化二水素、 H_2O_3) を生成する機構を支持するものである。しかし、IgG の非存在下でも atheronal-A および-B が生成することから、好中球様細胞による atheronal-A と-B の生成には、複数経路存在する可能性がある。そこで、さらに生成機構を解明するため、NADPH oxidase や xanthine oxidase (XO)、myeloperoxidase (MPO) など活性酸素生成酵素の阻害剤の影響、MPO 欠損マウス (横浜市立大学大学院 国際総合科学研究科荒谷康昭教授より提供) から作成した好中球を使用して、atheronal-A と-B の生成についてさらに詳細に検討した。

(3) atheronal -A による神経型及び血管内皮型一酸化窒素合成酵素の阻害： 合成した atheronal -A および-B、市販のコレステロール酸化物 5-hydroxycholesterol, 5 β ,6 β -epoxycholesterol, 7-ketocholesterol について、3種類 (神経型、血管内皮型及び誘導型) の一酸化窒素合成酵素の活性に及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

(1) LC-MS/MSによる atheronal-A及び-B の高感度特異的分析法の開発： atheronal-Aと atheronal-Bの標品や安定同位体を含む内部標準物質を合成し、dansylhydrazine (DH) や 2-hydrazino-1-methylpyridine (HMP) の誘導体としてLC-MS/MSにより高感度分析する方法を開発した。特に、atheronal類をHMP誘導体とし、LC-MS/MS分析することにより、従来の誘導体に比べて、約100倍検出限界を向上させることに成功した (Tomono et al., Biochem. Biophys. Res Commun 383, 222-227, 2009; J Chromatogr. B, 879, 2802-2808, 2011) (図-2)。

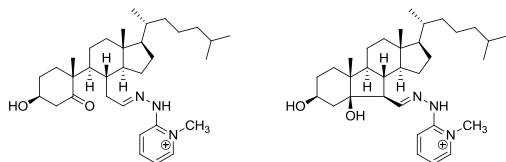


図-2 : atheronal-Aと atheronal-BのHMP誘導体

(2) これらの分析方法を用いて、atheronal-A及び-B が、試験管内において、過酸化水素 (H_2O_2) と塩化物イオン (Cl^-) の存在下、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) の酵素反応に

より生成されることを見出した (Tomono et al., Biochem. Biophys. Res Commun 383, 222-227, 2009)。

(3) フォルボールエステル (PMA) により活性化されたヒト好中球様分化HL-60細胞が、MPO 依存的に、オゾン様活性酸素を産生し、コレステロールを酸化して atheronal-A及びBを生成すること、MPO 欠損マウスから調製した好中球は、PMA で活性化しても、atheronal-A及びBを生成しないこと、また、野生型マウスの肝臓、肺などの組織ではリポ多糖 (LPS) 誘発炎症により atheronal 類の濃度が増加するのに対して、MPO 欠損マウスでは増加がみられないこと、さらに、atheronal-A及びBは、細胞内では速やかに代謝されて、アルデヒド基がカルボキシル基に酸化された代謝物 (secoA-COOH, secoB-COOH) 及び α,β -unsaturated atheronal -Bが新たに生成されることを見出し、それぞれの代謝物の LC-MS/MS による新規分析法を開発した (図-3)。次に、atheronal 類およびその酸化体の生成量をマーカーとして、フォルボールエステルで活性化したヒト好中球細胞によるコレステロール酸化物生成機構について検討を行った。atheronal-Aは、様々な活性酸素種の中でも特にオゾン特異的なコレステロール酸化によって生成することが報告されており、また、ヒト好中球による atheronal-Aの生成がオゾン消去剤の存在下で阻害されることから、活性化されて酸化パースト状態にあるヒト好中球は、オゾン様活性酸素を生成していると考えられた (Tomono et al., J Lipid Res 52, 87-97, 2011)。

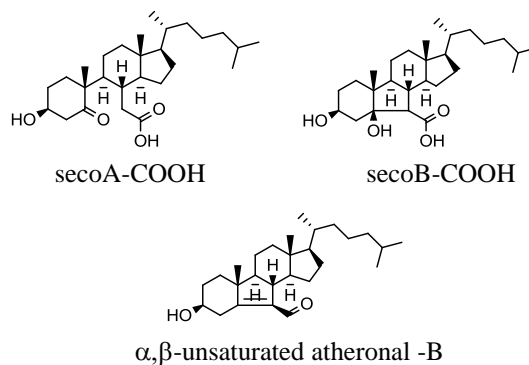


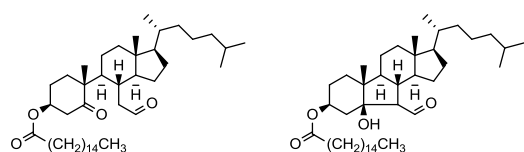
図-3 : 新規に同定された atheronal-A及び-B の代謝物

(4) 低濃度の atheronal -A は、神経型及び血管内皮型の一酸化窒素合成酵素を強く阻害することを見出した。NOの合成阻害は、動脈硬化症、心筋梗塞などを発症させる可能性があり、今回得られた結果は、反応性の高い atheronal-A が生体成分のタンパク質と反応して、タンパク質の機能障害を誘発させる可能性を示している。今後、atheronal 類とタンパク質の反応で生じる付加体を

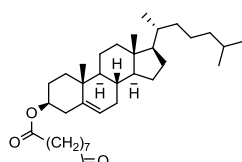
単離・精製し、その構造の解析を行う必要がある。

(Lai et al., *J Clin Biochem Nutr.*, 50, 84-89, 2012)。

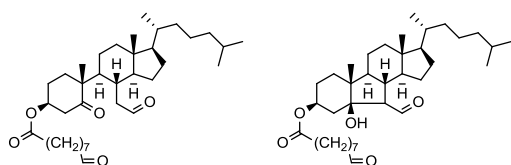
(5) 生体内においては、コレステロールの多くは、コレステロール脂肪酸エステル(CE)として存在しているが、CE のオゾン酸化物に関する報告は全くされていない。そこで、CE のオゾン酸化物の合成、構造決定、分析法の開発、細胞毒性に関して検討し、パルミチン酸コレステロール(C16:0-CE)などの飽和脂肪酸 CE のオゾン酸化により、ステロイド骨格の 5,6 位の 2 重結合が開裂したエステル型 secosterol 類が生成すること、一方、リノール酸コレステロール(C18:2-CE)及びオレイン酸コレステロール(C18:1-CE)をオゾン酸化すると、既に報告されている 9-oxononanoyl cholesterol に加えて、今回新規に 9-oxonanoate atheronal-A とそのアルドール化により生成する 9-oxonanoate atheronal-B の生成されることを見出した(図-4)。さらに、上記 DH 誘導体化法を用いてエステル型 atheronal-A 及び-B の分析法を確立し、健康なヒト血液(n=6)から調製した LDL を分析したところ、全試料から、10~20 pmol/LDL mg protein のエステル型 atheronal-A 及び B (遊離型 secosterol 類の 1/2~1/5 の濃度)を検出した(投稿準備中)。



atheronal-A と-B のパルミチン酸エステル



9-oxononanoyl cholesterol



9-oxonanoate atheronal-A と-B

図-4 : 脂肪酸エステル型 atheronal-A 及び-B

(6) コレステロールのオゾン酸化物である atheronal 類 は、神経細胞など様々な細胞に対して非常に強い毒性を示す化合物であり、最近、ヒト粥状動脈硬化巣やアルツハイマー

病患者の脳組織において検出されたことから、炎症に関連した生活習慣病発症の原因物質として注目を浴びている。本研究では、atheronal 類の細胞毒性誘発機構を解明することを目的として、atheronal 類のアルデヒド基がアルコールあるいはカルボン酸に置換した化合物を合成し、様々な細胞に対する毒性を調べたところ、atheronal 類と同様に強い毒性を有することが明らかになった。

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 21 件)

1. Mabuchi R, Kurita A, Miyoshi N, Yokoyama A, Furuta T, Goda T, Suwa Y, Kan T, Amagai T, Ohshima H. Analysis of N^ε-ethyllysine in human plasma proteins by gas chromatography-negative ion chemical ionization/mass spectrometry as a biomarker for exposure to acetaldehyde and alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, (2012) *in press* 査読有

DOI:10.1111/j.1530-0277

2. Lai YL, Tomono S, Miyoshi N, Ohshima H. Inhibition of endothelial- and neuronal-type, but not inducible-type, nitric oxide synthase by the oxidized cholesterol metabolite secosterol aldehyde: Implications for vascular and neurodegenerative diseases. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, (2012) **50**, 84-9. 査読有

DOI:10.3164/jcbn.11-31

3. Tomono S, Miyoshi N, Ito M, Higashi T, Ohshima H. A highly sensitive LC-ESI-MS/MS method for the quantification of cholesterol ozonolysis products secosterol-A and secosterol-B after derivatization with 2-hydrazino-1-methylpyridine. *J. Chromatogr. B*, (2011) **879**, 2802-8. 査読有

DOI:10.1016/j.jchromb.2011.08.004

4. Tomono S, Miyoshi N, Shiokawa H, Iwabuchi T, Aratani Y, Higashi T, Nukaya H, Ohshima H. Formation of cholesterol ozonolysis products *in vitro* and *in vivo* through a myeloperoxidase-dependent pathway. *J.*

Lipid Res., (2011) **52**, 87-97. 査読有
DOI: 10.1194/jlr.M006775

5. Tomono S, Miyoshi N, Sato K, Ohba Y, Ohshima H. Formation of cholesterol ozonolysis products through an ozone-free mechanism mediated by the myeloperoxidase-H₂O₂-chloride system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009) **383**, 222-7. 査読有

DOI:10.1016/j.bbrc.2009.03.155,

[学会発表] (計 43 件)

1. 頼盈伶、伴野勸、三好規之、大島寛史、オゾン酸化コレステロールによる eNOS 及び nNOS 活性の阻害、第 9 回日本 NO 学会学術集会、2009.12.9-12. 静岡
2. 伴野勸、三好規之、佐藤和昭、大場好弘、荒谷康昭、大島寛史、ミエロペルオキシダーゼによるオゾン酸化コレステロールの生成機構、第 62 回日本酸化ストレス学会学術集会、2009.6.11-12. 福岡
3. Susumu Tomono, Noriyuki Miyoshi, Hidemi, Shiokawa, Megumi, Ito, Yasuaki, Aratani, Hiroshi Ohshima. The myeloperoxidase-H₂O₂-chloride system produces cholesterol ozonolysis products via an ozone free mechanism. SFRR Europe meeting Rome 2009. 2009. 8.26-29. Roma, Italy
4. Ying-Ling Lai, Susumu Tomono, Noriyuki Miyoshi, Hiroshi Ohshima. Secosterol-A, an oxidized cholesterol metabolite, may contribute to atherosclerosis and neurodegenerative diseases through inhibition of eNOS and nNOS. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 2010.6.14-18. Kyoto, Japan
5. 岩崎希、三好規之、伴野勸、大島寛史、エステル型コレステロールのオゾン酸化物の HL-60 細胞に対する細胞毒性作用、第 63 回日本酸化ストレス学会、2010.6.24-25. 横浜
6. 伴野勸、三好規之、荒谷康昭、大島寛史、ミエロペルオキシダーゼによる secosterol 型コレステロール酸化物の生成、第 63 回日本酸化ストレス学会、2010.6.24-25. 横浜

7. 三好規之、伊藤萌、伴野勸、東達也、大島寛史、Secosterol 型コレステロール酸化物の LC-MS/MS による高感度検出法の開発、第 63 回日本酸化ストレス学会、2010.6.24-25. 横浜

8. 伴野勸、岩崎希、三好規之、大島寛史、エステル型 secosterol 類のヒト LDL コレステロールからの検出と細胞毒性、第 75 回日本生化学会中部支部例会、2011.6.20-21. 静岡

9. 三好規之、伴野勸、頼盈伶、東達也、荒谷康昭、大島寛史、Secosterol 型コレステロール酸化物の生体内生成機構と生理活性、第 64 回日本酸化ストレス学会、2011.7.2-3. 北海道

[図書] (計 4 件)

1. Ohshima H, Miyoshi N, et al., Inflammation Induced Carcinogenesis and Chemoprevention. Chemoprevention of Cancer and DNA Damage by Dietary Factors, WILEY-BLACKWELL, pp.145-152 (2009)
2. 大島寛史、三好規之ら、がん予防と酸化ストレス、酸化ストレスの医学、診断と治療社、p.329-337、2008 年

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
<http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/cellbioc/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
大島 寛史 (OHSHIMA HIROSHI)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号：80433209
- (2) 研究分担者
三好 規之 (MIYOSHI NORIYUKI)
静岡県立大学・食品栄養科学部・助教
研究者番号：70438191
合田 敏尚 (GODA TOSHINAO)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号：70195923
東 達也 (HIGASHI TATSUYA)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号：90272963
糠谷 東雄 (NUKAYA HARUO)
静岡県立大学・食品栄養科学部・客員教授
研究者番号：00094342