

## 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 25 年 4 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590534

研究課題名（和文） メタボリックシンドロームにおける血漿過酸化脂質代謝の研究

研究課題名（英文） Study of lipid hydroperoxides in metabolic syndrome

研究代表者

惠 淑萍 (Hui Shu-Ping)

北海道大学・大学院保健科学研究院・准教授

研究者番号：90337030

研究成果の概要（和文）：

過酸化コレステリルエステル(CEOOH)、過酸化トリグリセリド(TGOOH)、過酸化リン脂質(PCOOH)を化学合成した。健常者の血漿より、分画した低比重リポ蛋白(LDL)をCuSO<sub>4</sub>存在下に0.5-4時間まで酸化させた。次いで、クロロホルムで抽出したサンプルをoxidized LDL(oxLDL)とした。Orbitrap LC/MS法によりoxLDLにおける6種のCEOOHと11種のTGOOHおよび2種のPCOOHは検出された。また、LC-MS/MSにより各oxLDLにおけるPCOOHを定量したところ、酸化タイムコースは観察された。次いで、上記各種過酸化脂質の存在が確認されたoxLDL及び合成PCOOHをマウスに免疫し、抗体価の比較を行った。合成PCOOHに対する抗体価の上昇は観察されなかったが酸化LDLに対する抗体価の上昇は確認できた。

研究成果の概要（英文）：

Cholesterylester monohydroperoxides (CEOOH), triglyceride monohydroperoxides (TGOOH), and phosphatidylcholine monohydroperoxide (PCOOH) were chemically synthesized. oxLDL was prepared by incubating native LDL from human plasma with CuSO<sub>4</sub> for up to 4 h. The PCOOH levels during oxidation were determined and showed time course consisted of three phases. We then immunized five mice using the synthetic PCOOH and oxLDL, and antibody titers were measured. For synthetic PCOOH, the antibody titer did not show increase, but significant increase for oxLDL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床化学

1. 研究開始当初の背景  
コレステロール、トリグリセリド、リン脂質、

遊離脂肪酸の各過酸化脂質は毒性が強いが、  
リポ蛋白代謝関連酵素や脂質輸送蛋白の基

質となるのが過去の *in vitro* 研究で示されている。しかし、各過酸化脂質の血中動態や、過酸化脂質とリポ蛋白代謝の関係は未だによく分からない。チオバルビツール酸法などの血中過酸化脂質測定法は非特異的であるため、動態学的研究には使えない。一方で、過酸化脂質動態を精密に評価することへの希求が臨床で増大している。国を挙げて対策を講じているメタボリックシンドロームの発症に全身的酸化ストレスの増加が関与することが明らかとなった (Furukawa S et al. *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J Clin Invest* 114: 1752-1761, 2004)。

## 2. 研究の目的

メタボリックシンドロームの発症に全身的酸化ストレスの増加が関与することが明らかとなった。メタボリックシンドロームの病態理解のためには、過酸化脂質動態を明らかにする必要があり、その目的に適した過酸化脂質測定法としてイムノアッセイの開発が必要である。

## 3. 研究の方法

過酸化コレステリルエステル(CEOOH)、過酸化トリグリセリド(TGOOH)、過酸化リン脂質(PCOOH)を光酸化法により合成した。これら過酸化脂質標準物質の構造は核磁気共鳴分光法及び LC/MS により確認された。健常者の空腹時の EDTA 血漿より、分画した低比重リポ蛋白 (LDL) を  $\text{CuSO}_4$  存在下に  $37^\circ\text{C}$  の水浴中 0.5–4 時間まで酸化させた。次いで、ク

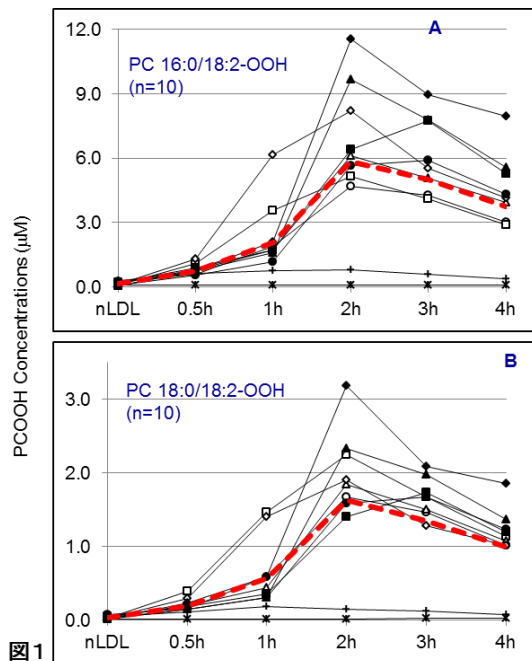


図1

ロロホルムで抽出したサンプルを oxidized LDL (oxLDL) とした。oxLDL における CE-OOH、TGOOH 及び PCOOH の分子種同定を Orbitrap LC/MS 法により行った後、定量分析を LC-MS/MS により行った。次いで、上記各種過酸化脂質の存在が確認された oxLDL 及び合成 PLPCOOH をマウスに免疫した。

## 4. 研究成果

oxLDL に 6 種の CEOOH と 11 種の TGOOH および 2 種の PCOOH は検出された (Hui SP et al. *Anal Bioanal Chem* 405:4981-87, 2013; *Anal Bioanal Chem* 404: 101-112, 2012)。また、各 oxLDL における PCOOH を LC-MS/MS により定量したところ、PCOOH 濃度はいずれもラグタイムを置いてから増加し、2 時間後にピークに達し、その後低下していった (図 1、*Anal Bioanal Chem* 403:1831-40, 2012)。図 2 は oxLDL をアガロース電気泳動で観察したもので、酸化時間が長くなるにつれてバンドは陽極側にシフトしている。

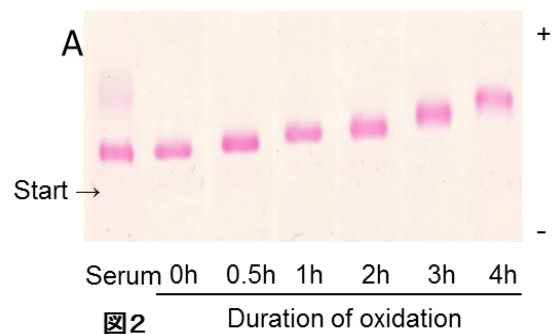


図2 Duration of oxidation

化学合成の PCOOH に対し、キャリアタンパクとなる KLH を結合させ、マウス 3 匹に対して免疫を行った。マウス免疫の結果として、合成 PCOOH に対する反応性は、他の抗原に対する反応性よりも著しく低く、リポタンパク成分を認識した抗体が多く産生されているものと推測された。一方、oxLDL に対する

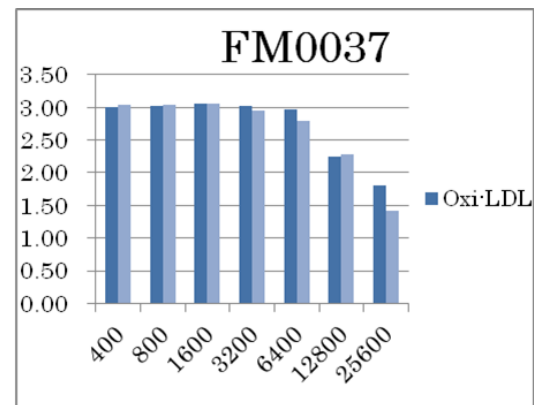


図3

抗体価の上昇は確認できた(図 3)。今後、過酸化脂質特異的な抗体の産生を確認する予定である。

#### 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 11 件)

1. Hui SP, Sakurai T, Takeda S, Jin S, Fuda H, Kurosawa T, Chiba H. Analysis of triacylglycerol hydroperoxides in human lipoproteins by Orbitrap mass spectrometer. Anal Bioanal Chem 405:4981-87. 2013. 査読有
2. Takeda S, Hui SP, Fukuda K, Fuda H, Jin S, Sakurai T, Ishii A, Mukasa K, Sueoka K, Chiba H. Evaluation of various electrode materials for detection of oxidized low-density lipoproteins. J Biomed Nanotech 9:303-306, 2013. 査読有
3. Hui SP, Sakurai T, Ohkawa F, Furumaki H, Jin S, Fuda H, Takeda S, Kurosawa T, Chiba H. Detection and characterization of cholesteryl ester hydroperoxides in oxidized LDL and oxidized HDL by use of an Orbitrap mass spectrometer. Anal Bioanal Chem 404: 101-112, 2012. 査読有
4. Hui SP, Taguchi Y, Takeda S, Ohkawa F, Sakurai T, Yamaki S, Jin S, Fuda H, Kurosawa T, Chiba H. Quantitative determination of phosphatidylcholine hydroperoxides during copper oxidation of LDL and HDL by liquid chromatography/mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 403:1831-40, 2012. 査読有
5. Sakurai T, Ichikawa A, Furukawa H, Wada N, Nagasaka A, Takahashi Y, Fujikawa M, Ikuta A, Furumaki H, Shiga M, Shimizu C, Hui SP, Jin S, Takeda S, Fuda H, Nagasaka H, Kobayashi S, Chiba H. Novel monoclonal antibody recognizing triglyceride-rich oxidized LDLs associated with severe liver disease and small oxidized LDLs in normal subjects. Ann Clin Biochem 49:456-462, 2012. 査読有
6. Takeda S, Hui SP, Fukuda K, Fuda H, Jin s, Sakurai T, Ishii A, Mukasa K, Sueoka K, Chiba H. Detection of oxidized LDL using a carbon nanotube electrode. Sensor Actuator B Chem 167:833-836, 2012. 査読有
7. Watanabe M, Fuda H, Jin S, Sakurai T, Hui SP, Takeda S, Watanabe T, Koike T, Chiba H. A phenolic antioxidant from the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) inhibits oxidation of cultured human hepatocytes mediated by

diphenyl-1-pyrenylphosphine. Food

Chemistry 134:2086-2089, 2012. 査読有

8. Nagasaka H, Yorifuji T, Takatani T, Okano Y, Tsukahara H, Yanai H, Hirano K, Hui SP, Hirayama S, Ito T, Chiba H, Miida T. CD36 deficiency predisposing young children to fasting hypoglycemia. Metabolism. Vol. 60: 881-7, 2011. 査読有
9. Hui SP, Chiba H, Kurosawa T. Liquid chromatography mass spectrometric determination of plasmalogens in human plasma. Anal Bioanal Chem. 400: 1923-31. 2011. 査読有
10. Hui SP, Chiba H, Jin S, Nagasaka H, Kurosawa T. Analyses for phosphatidyl choline hydroperoxides by LC/MS. J Chromatogr B. 878: 1677-82, 2010. 査読有
11. Sakurai T, Trirongjit- moah S, Nishibata Y, Namita T, Tsuji M, Hui SP, Jin S, Shimizu K, Chiba H. Measurement of lipoprotein particle sizes using dynamic light scattering. Ann Clin Biochem. 47: 476-81, 2010. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

1. 大川 芙多葉, 武田晴治, 惠 淑萍, 武笠幸一, 櫻井俊宏, 神 繁樹, 布田博敏, 末岡和久, 千葉仁志. CNT 電極センサーによる抗酸化物質の LDL 酸化抑制能測定法. 第 80 回日本電気化学会, 仙台 (東北大学), 2013. 3. 31
2. 武田晴治, 惠 淑萍, 武笠幸一, 櫻井俊宏, 神 繁樹, 布田博敏, 末岡和久, 千葉仁志. ケルビン測定を利用した低比重リポ蛋白質の酸化状態の評価. 第 80 回日本電気化学会, 仙台 (東北大学), 2013. 3. 31
3. 布田博敏, 渡邊貢, 神 繁樹, 惠 淑萍, 武田晴治, 櫻井俊宏, 渡辺孝之, 千葉仁志. マガキ由来の新規抗酸化物質における肝保護作用. 日本農芸化学会, 仙台 (東北大学), 2013. 3. 25.
4. 惠 淑萍, 櫻井俊宏, 神 繁樹, 布田博敏, 武田晴治, 千葉仁志. リポタンパク質の金属酸化時の phosphatidyl choline hydroperoxides 及び TBARS の経時変化. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会, 京都 (国立京都国際会館), 2012. 11. 30.
5. 田口裕大, 惠 淑萍, 櫻井俊宏, 黒澤隆夫, 千葉仁志: リポタンパク質の金属酸化における phosphatidylcholine hydroperoxides の経時変化. 第 45 回日本臨床検査医学会北海道支部総会, 旭川 (旭川医科大学), 2011. 11. 5.
6. 惠 淑萍, 櫻井俊宏, 古牧宏啓, 黒澤隆夫, 千葉仁志: LDL and HDL におけるコ

レステリルエステル過酸化脂質の LC/MS による分析. 第 45 回日本臨床検査医学会北海道支部総会, 旭川 (旭川医科大学), 2011. 11. 5.

7. 山木志展, 惠 淑萍, 神 繁樹, 黒澤隆夫, 千葉仁志: LC-MS/MS による血中エタノールアミン型を含むプラズマローゲンの新規定量法の開発. 第 45 回日本臨床検査医学会北海道支部総会, 旭川 (旭川医科大学), 2011. 11. 5.

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: CNT センサーによる過酸化物を電気的に測定する方法

発明者: 千葉仁志、武田晴治、石井睦、中村基訓、武笠幸一、惠 淑萍、黒澤隆夫  
権利者: 北海道大学、北海道医療大学

種類: G01N 27/416 (2006.01)

G01N 27/30 (2006.01)

番号: W02011/007582 A1

出願年月日: 2010/7/16

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

惠 淑萍 (Hui Shu-Ping)

北海道大学・大学院保健科学研究所・

准教授

研究者番号: 90337030