

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790087

研究課題名(和文) 生体内由来の酸化LDLの選択的回収とその酸化成分の解析

研究課題名(英文) Isolation and comprehensive analysis of constituents in oxidized low-density lipoprotein in vivo

研究代表者

小濱 孝士 (Obama, Takashi)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60395647

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)：動脈硬化症の発症と進展に関与することが知られている酸化LDLの特徴を明らかにするために、循環血中のLDL画分から酸化LDLを回収するための方法を構築した。陰イオン交換カラムによる分離と抗酸化ホスファチジルコリン抗体によるアフィニティ抽出を組み合わせることにより、酸化リン脂質に富む酸化LDLの効率的な分離に成功した。また様々な酸化を受けたコレステロール類やリン脂質分子種の存在が明らかとなり、銅酸化LDLとは異なった脂質組成が示された。生体内におけるLDL酸化では、他の脂質分子種へのリモデリングなどダイナミックな変化を受けることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) has been known as one of key factors for development of atherosclerosis. However, molecular features of in vivo oxLDL remain to be clarified. To characterize in vivo oxLDL, we performed an effective isolation of oxLDL from plasma followed by LC-ESI-MS/MS analysis of its lipid components. Combination of anion-exchange column separation of electronegative LDL (LDL(-)) and affinity purification using a monoclonal antibody against oxidized phosphatidylcholine (oxPC) revealed that oxLDL was enriched in LDL(-) fraction. In vivo oxLDL showed a different profile of PC molecular species from Cu-induced (in vitro) oxLDL. These data suggests that oxidized lipids in LDL may converted to other molecular species in vivo.

研究分野：生化学

キーワード：酸化LDL 動脈硬化症 リピドミクス リポタンパク質 モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

(1) 低比重リポタンパク質 (low-density lipoprotein: LDL) は、その量的な増加だけでなく、小型化や酸化変性といった質的な変化も、動脈硬化病巣の形成に深く関与することが注目されている。当研究室ではこれまでに、酸化ホスファチジルコリンを認識するモノクローナル抗体 (DLH3) を作製し、ヒトの動脈硬化病巣だけでなく循環血中にも酸化 LDL が存在すること、また心筋梗塞や脳梗塞の急性期で有意に上昇することを示してきた。しかし、血漿中での酸化 LDL は極めて微量で、疾患時においても数倍程度の上昇にとどまるために、これまで酸化 LDL を血中から分離して直接解析した報告は非常に限られており、生体内での酸化 LDL の性状や生成機序についてはいまだ不明な点が多い。

(2) これまで酸化 LDL の構造解析が進まなかった原因の一つとして、その分離や解析を行うための手法が確立されていなかったことが挙げられる。これまでに当研究室では、質量分析法を用いて生体内由来の微量なりポタンパク質成分を高感度で分析するための基盤技術の構築に取り組んできている。

2. 研究の目的

(1) 生体内で生成する酸化 LDL の酸化変性の特徴を明らかにすることを目的として、ヒト血中に含まれる微量な酸化 LDL を分画するための新たな方法を構築する。

(2) 得られた酸化 LDL の脂質成分とタンパク質成分について、酸化変性による構造変化を質量分析法により網羅的に解析する。リポタンパク質に含まれる脂質成分は、大きく分けてコレステロール (Chol) 類などの中性脂質と、ホスファチジルコリン (PC) などのリン脂質成分に大別される。これらの酸化成分を分子種レベルで網羅的に探索する。

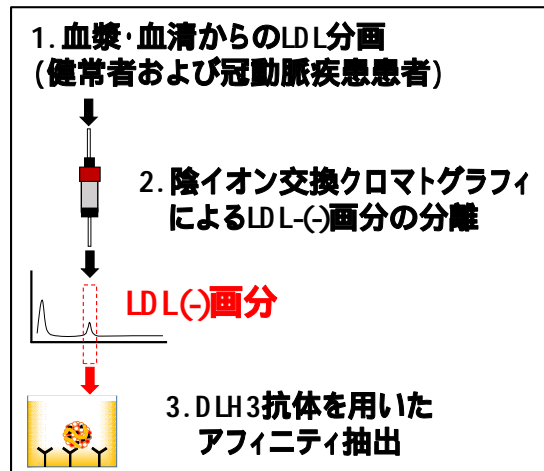
(3) 以上の解析を、健康人および冠動脈疾患患者の血液から得られた LDL 画分に対して行い、動脈硬化性疾患で上昇する酸化 LDL の特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト血漿からの酸化 LDL 分画法の検討：ヒト血液 (健康人の末梢血および冠動脈疾患患者の心臓カテーテル治療により得られた残余血液検体) から、KBr 密度勾配超遠心により LDL 画分を回収した。これを陰イオン交換カラム (HiTrapQ) に流し、NaCl 濃度を段階的に上昇させて吸着成分を溶出させた。得られた各画分の apoB 量と酸化 LDL 量をサンドイッチ ELISA で測定し、酸化 LDL が含まれる画

分を調べた。また特徴的な溶出画分について、アガロースゲル電気泳動や Native PAGE により性状解析を行った。

(2) 酸化 PC に富む成分を回収するために、DLH3 抗体を用いたアフィニティ抽出を行った。あらかじめ DLH3 抗体をコートした 96 穴プレートに LDL 画分を添加して 4 で一晩おき、抗体に捕捉された LDL 粒子から脂質成分を回収し、三連四重極型質量分析装置 (AB Sciex 社製 QTRAP5500) を用いて LC-ESI-MS/MS 解析した。LC システムには Prominence 20A (島津製作所社製)、順相カラムは Inertsil® (SIL100 3 μm 2.1 × 150 mm: GL Sciences inc.)、溶媒は MeCN/MeOH/H₂O = 18:11:1 (0.1%ギ酸アンモニウム) を使用して流速 0.2 mL/min で分析した。Chol 類と PC 類の各分子種を、それぞれ m/z=369 および m/z=184 のフラグメントイオンを指標にした Precursor Ion Scan によって網羅的に探索した。さらに、このとき確認された特徴的な各脂質分子種について、Multiple Reaction Monitoring (MRM) による定量解析を行った。



(3) LDL が酸化を受けた時の LDL 結合型ホスホリパーゼ A₂ (Lp-PLA₂) の役割について調べるために、Lp-PLA₂ 阻害剤 (pefabloc) 存在下において生成する酸化 PC の組成を LC-ESI-MS/MS により測定した。また酸化 LDL 産生量をサンドイッチ ELISA により測定した。

4. 研究成果

(1) 陰イオン交換カラムを用いた陰性荷電 LDL (LDL(-)) の分離と酸化 PC 含有性との関連：超遠心法により分画した LDL を陰イオン交換カラムに流し、NaCl 濃度を段階的に増加させて吸着画分を回収し、LDL(-)を得た。

陰イオン交換クロマトグラフィーの各フラクションにおける apoB と酸化 LDL の分

布をサンドイッチ ELISA により調べた結果、500 mM NaCl で溶出する画分 (LDL(-)) に、酸化 PC を多く含む酸化 LDL が回収されることが見出された。酸化 LDL/apoB 比を算出して酸化 LDL の濃縮率を調べた結果、LDL(-)画分では、カラムへの非吸着成分と比較して健常者では 4-6 倍、また冠動脈疾患患者の LDL ではそれ以上に酸化 LDL 濃縮されていることがわかった。

アガロースゲル電気泳動を行った結果、LDL (-)画分では native LDL より陰性電荷の増加した主要な成分だけでなく、移動度の異なるマイナーなバンドも検出された。これは銅酸化 LDL と異なるものだった。また Native PAGE を行ったときも同様に、LDL(-)画分は銅酸化 LDL と異なった泳動パターンを示した。このことから、LDL (-)は単に陰性電荷が増加したことだけでなく、銅酸化 LDL には見られない成分を有するなどのユニークな特徴を持つことが強く示唆された。

タンパク質成分の LC-ESI-MS/MS 解析から、apolipoprotein B の Lys、Trp 残基において、マロンジアルデヒドやアクロレインといった脂質過酸化生成物による酸化修飾部位が同定された。

- (2)DLH3 抗体を用いたアフィニティ抽出による酸化 LDL の回収と脂質成分の解析：我々がターゲットとしている酸化 PC リッチな酸化 LDL を LDL(-)画分から精製するために、DLH3 抗体を用いたアフィニティ生成を行い、脂質成分を回収して LC-ESI-MS/MS により解析した。

陰イオン交換カラムによる分離によって得られた LDL(-)から脂質成分を回収したときと比較して、DLH3 抗体を用いてさらにアフィニティ抽出すると脂質組成の違いが明確に現れたことから、脂質成分の解析の際には DLH3 抗体を利用したアフィニティ抽出を組み合わせることが有効であることがわかった。DLH3 抗体により捕捉された LDL 粒子からは、非免疫 IgM から得られたものと比較してより多くの酸化脂質が確認され、長鎖型酸化 PC、短鎖型酸化 PC の様々な分子種が検出された。また銅酸化 LDL と比較した結果、銅酸化 LDL では短鎖型酸化 PC が開裂して生成する lysoPC が多く含まれるのに対し、生体内由来酸化 LDL では lysoPC 含量が少ないことが示唆された。

Chol 類に注目したところ、生体内由来酸化 LDL では、未酸化体の CholE 類であるリノール酸やアラキドン酸エステルは極めて少なかった。このことから生体内

由来酸化 LDL では native LDL と比較して CholE の酸化物が増加していることが示唆された。そこで次に MRM 測定により各脂質成分について一斉分析を行った結果、上記 CholE の酸化物であると考えられる種々の成分 (hydroxy、hydroperoxy、keto 型) が多く検出された。銅酸化 LDL とは異なり、CHO 型、COOH 型の酸化 CholE は生体内由来酸化 LDL ではごくわずかだった。

- (3)生体内由来の酸化 LDL では lysoPC 含量が低かったことについて検討するため、短鎖型酸化 PC を基質として lysoPC を産生する Lp-PLA₂ の酸化 LDL 産生への寄与について調べた。LDL の銅酸化反応を、Lp-PLA₂ 阻害剤の存在下または非存在下で行った結果、pefabloc 存在下では lysoPC 産生が著しく抑制され、短鎖型酸化 PC が蓄積した。さらに、DLH3 抗体を用いたサンドイッチ ELISA により酸化 LDL の産生を定量的に測定したところ、pefabloc 存在下では酸化 LDL 産生が亢進することが分かった。

(4)まとめ

生体内で生成する酸化 LDL を回収するための新たな方法として、陰イオン交換クロマトグラフィーとアフィニティ抽出を組み合わせた方法を構築した。酸化脂質成分の組成が銅酸化 LDL と大きく異なることから、生体内では酸化を受けた後に他の脂質分子種に再構築されることが強く示唆された。生体内において LDL は、直接的な酸化を受けた後に、種々の脂質代謝酵素により多様なモデリングを受けてダイナミックに変化する粒子の総体であることが推測される。

Lp-PLA₂ は、LDL 粒子における酸化反応によって生じた酸化 PC の代謝を介することにより、生体内において酸化 LDL 産生を抑制する働きを有することが示唆された。これまでに、Lp-PLA₂ 阻害剤として dalapradib が開発され、急性冠疾患イベントに有効であるかどうか検討されてきたが、効果は認められなかった (*N Engl J Med* (2014) 370:1702-1711, *JAMA* (2014) 312:1006-1015)。Lp-PLA₂ は LDL の酸化により生成する酸化 PC を lysoPC に変換することで酸化 PC の蓄積を抑制する働きを担うが、dalapradib 投与によって酸化 PC リッチな酸化 LDL の産生が亢進したことにより、心血管イベントのリスクを下げられなかった可能性が考えられる。

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 3 件)

小浜孝士、板部洋之、生体内酸化 LDL 中のバイオマーカー網羅的探索、昭和学芸雑誌、査読有、2015、Vol. 75、No. 2

Sasabe N, Keyamura Y, Obama T, Inoue N, Masuko Y, Igarashi Y, Aiuchi T, Kato R, Yamaguchi T, Kuwata H, Iwamoto S, Miyazaki A, Hara S, Yoshikawa T, Itabe H., Time course-changes in phosphatidylcholine profile during oxidative modification of low-density lipoprotein., *Lipids Health Dis.*, 査読有, (2014) 13:48., doi: 10.1186/1476-511X-13-48

Noguchi E, Kato R, Ohno K, Mitsui A, Obama T, Hirano T, Itabe H, Yamamoto M. The apolipoprotein B concentration in gingival crevicular fluid increases in patients with diabetes mellitus., *Clin Biochem.*, 査読有, (2014) 47(1-2):67-71., doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.09.016.

Nose F, Yamaguchi T, Kato R, Aiuchi T, Obama T, Hara S, Yamamoto M, Itabe H., Crucial role of perilipin-3 (TIP47) in formation of lipid droplets and PGE2 production in HL-60-derived neutrophils. *PLoS One.*, 査読有, (2013) 8(8):e71542

〔学会発表〕(計 14 件)

笹部直子、小浜孝士、矢澤快、大坪 茉莉子、羽田幸代、井上望、相内敏弘、木庭新治、加藤里奈、山口智広、板部洋之、ヒト血漿中から分離した酸化 LDL の apoB 変性とリン脂質分子種の解析、2015 年 3 月 25-28 日、日本薬学会第 135 年会(神戸学院大学(神戸))

笹部直子、毛谷村由佳、小浜孝士、井上望、増子幸志、五十嵐優、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、桑田浩、原俊太郎、吉川智博、板部洋之、ヒト血漿中から分離した酸化 LDL の apoB 変性とリン脂質分子種の解析、2015 年 3 月 25-28 日、日本薬学会第 135 年会(神戸学院大学(神戸))

Itabe H, Sasabe N, Obama T, Inoue N, Aiuchi T, Kato R, Koba S, Yamaguchi T, OxPC/lysoPC profiles in oxidized LDL separated from in human circulating plasma, 2015 年 2 月 10-12 日、PLM2015 (京王プラザホテル(東京))

小浜孝士、笹部直子、井上望、相内敏弘、

木庭新治、加藤里奈、山口智広、板部洋之、ヒト血漿中からの酸化 LDL 分離とリン脂質プロファイルの解析、2015 年 1 月 9-10 日、第 26 回ビタミン E 研究会(北里大学薬学部(東京))

板部洋之、笹部直子、井上望、相内敏弘、木庭新治、加藤里奈、小浜孝士、山口智広、ヒト血漿中酸化 LDL のリン脂質プロファイル、2014 年 9 月 4-5 日、第 67 回日本酸化ストレス学会(同志社大学今出川キャンパス(京都))

笹部直子、板部洋之、井上望、和田暁、梅宮大貴、佐々木愛紗、相内敏弘、加藤里奈、小浜孝士、山口智広ヒト血漿中の酸化 LDL の性状～質量分析計を用いた脂質プロファイルの検討～、2014 年 6 月 6-7 日、第 56 回日本脂質生化学会(近畿大学東大阪キャンパス(大阪))

笹部直子、和田暁、梅宮大貴、佐々木愛紗、小浜孝士、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、板部洋之、ヒト血漿中から分離した変性 LDL の酸化変性とリン脂質分子種の解析、2014 年 3 月 27-30 日、日本薬学会第 134 年会(熊本大学(熊本))

井上望、増子幸志、小浜孝士、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、板部洋之、ヒト血漿酸化 LDL の分離と酸化リン脂質の LC-MS/MS 解析、2013 年 6 月 1 日、第 14 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム(日本薬学会会長井記念ホール(東京))

守谷瑠梨子、伊藤綾花、小浜孝士、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、板部洋之、酸化 LDL 中の酸化修飾リポタンパク質の LC-MS/MS 解析、2012 年 10 月 13 日、第 56 回日本薬学会関東支部大会(昭和大学薬学部(東京))

井上望、増子幸志、小浜孝士、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、板部洋之、生体内酸化 LDL に現れる特異的脂質成分の解析、2012 年 10 月 13 日、第 56 回日本薬学会関東支部大会(昭和大学薬学部(東京))

Itabe H, Obama T, Takahashi A, Kusunose Y, Aiuchi T, Kato R, Yamaguchi T, Immunoprecipitation and LC-MS/MS analysis of human oxidized low-density lipoprotein from plasma, Sep 4-9, 2012, 53st International Conference on the Bioscience of Lipids (Banff, Canada)

小浜孝士、高橋あい理、楠ノ瀬雄也、加納明日香、田辺佳那子、濱寄裕司、加藤里奈、相内敏弘、山口智広、木庭新治、小林洋一、

板部洋之、Characterization of oxidized phospholipids and cholesterol esters in human oxidized low-density lipoproteins by LC-ESI-MS/MS、2012年7月19-20日、第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会(ヒルトン福岡シーホーク(福岡))

小浜孝士、楠ノ瀬雄也、高橋あい理、加納明日香、田辺佳那子、木庭新治、濱寄裕司、小林洋一、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、板部洋之、ヒト血漿からの酸化LDLの分離と酸化脂質の分子種解析、2012年6月15-16日、第13回Pharmaco-Hematologyシンポジウム(日本薬学会長井記念ホール(東京))

小浜孝士、高橋あい理、楠ノ瀬雄也、木庭新治、濱寄裕司、小林洋一、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、板部洋之、ヒト血漿から分離した酸化LDLに存在する酸化脂質の網羅的解析、2012年6月6-8日、第54回日本脂質生化学会(九州大学医学部百年講堂(福岡))

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.showa-u.ac.jp/sch/pharm/major/biolchem/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小浜 孝士 (OBAMA, Takashi)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：24790087

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし