

令和元年6月19日現在

機関番号：24403

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07027

研究課題名(和文) 動脈硬化とリジン付加体の免疫反応

研究課題名(英文) Immune response to lysine adducts in atherogenesis

研究代表者

中村 純 (Nakamura, Jun)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・客員研究員

研究者番号：90804518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：粥状動脈硬化の発生過程において1,4-dihydropyridine型のM2AA-リジン付加体が重要な影響を及ぼしているという報告がある。これまでに我々も粥状動脈硬化の高感受性マウスにおいてM2AAに対する抗体価が上昇することを報告した。本研究では、M2AA以外にも脂質過酸化によって生ずるハイブリッド型のリジン付加体が粥状動脈硬化の発症過程で重要な役割を演じていることを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病に罹患している患者が増加する中で疾病の進展をモニターできるバイオマーカーの確立が求められている。リジン付加体の一つであるM2AAは免疫原性があり、非常に安定な付加体であり、粥状動脈硬化症や非アルコール性肝炎の新しいバイオマーカーとして期待されている。本研究からM2AA以外にもこれら生活習慣病のバイオマーカーとなりうるリジン付加体が存在していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：It has been shown that 1,4-dihydropyridine-type malondialdehyde (MDA)-Acetaldehyde (AA)-lysine (M2AA) adducts are formed during atherogenesis. Previously, we detected an increase in antibody against M2AA in the blood in atherosclerosis-prone ApoE ko mice. We hypothesized that the combination of AA, MDA, and lysine could lead to the formation of additional immunogenic adducts other than M2AA. In the present study, the reaction product of AA, MDA, and 6-aminocaproic acid (6-ACA, a lysine analog) was fractionated by HPLC. Interestingly, we found that the titers of antibodies against all of the fractionated products were increased in the blood of ApoE ko mice, indicating the existence of multiple immunogenic epitopes in the reactant of MDA, FA, and 6ACA. From this, we believe that evaluating serum titers of natural antibodies against various complex MDA-AA-lysine adducts could be used as a biomarker for metabolic syndromes.

研究分野：酸化ストレスと疾病

キーワード：酸化ストレス 動脈硬化 リジン付加体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

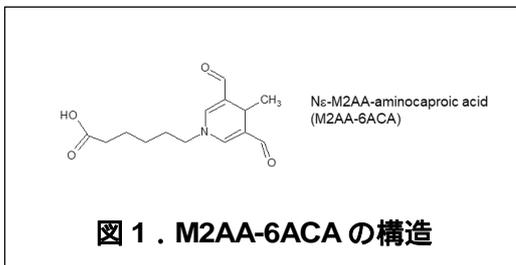
粥状動脈硬化は、その発生過程で低比重リポ蛋白 (LDL) が血管の内皮細胞下に入り、LDL の脂質過酸化が起こる。脂質過酸化はリン脂質を障害し、反応性の高い様々なアルデヒドを産生する。そのアルデヒドが蛋白を修飾する(1)。修飾された蛋白の中には免疫原性や炎症性の反応を起こすものもあり、その炎症が慢性化することにより粥状動脈硬化などの疾病を引き起こす(2)。マロンジアルデヒド (MDA) は脂質過酸化によってできる比較的安定な、反応性のあるアルデヒドで、LDL のアポリポ蛋白 B-100 のリジン側鎖を主に修飾する。MDA で修飾された LDL が粥状動脈硬化の原因となる可能性を提唱する報告があるが、その様な付加体は同定されていない。

2. 研究の目的

MDA ($\text{CH}_2(\text{CHO})_2$) は2つの反応性の高いアルデヒド基を両サイドに持ち、中央の炭素がアルデヒドと結合するため、MDA とタンパクの反応では種々雑多な付加体ができる。MDA で修飾された LDL (MDA-LDL) を用いてきたこれまでの粥状動脈硬化の研究では、その異なる付加体の混合物の影響を理解してきたことになる。最近、我々は MDA と MDA の分解物のアセトアルデヒド (AA) がリジンと反応することでできる 1,4-dihydropyridine タイプの M2AA の精製に成功した(3)。精製した M2AA をキャリアー蛋白に結合させたものは非常に強い免疫原性があることも報告した。本研究では、この M2AA およびその他の MDA-リジン付加体に対する血液中の抗体価の変動を粥状動脈硬化を若齢で起こす ApoE 欠損マウスを用いて明らかにした。

3. 研究の方法

本研究では、粥状動脈硬化になりやすい ApoE 欠損マウスを用い、動脈硬化発症にともない抗 M2AA 抗体価が上昇し、その上昇が継続するか否かを明らかにした(実験 A)。さらに、M2AA 以外のハイブリッド型リジン付加体の存在とその重要性を理解するため、新規のリジン付加体を探索するとともに、MDA、AA、6 ACA の反応液を分画化し、各分画に対する抗体価の上昇が見られるかを検討した(実験 B)。



(実験 A) ApoE 欠損マウスの血液中の抗 M2AA 抗体の変動

M2AA 付加体の精製: AA を MDA の存在下でリジンアナログであるアミノカプロン酸 (6ACA) とを生理食塩水中で 37 度、7 日間反応させ、反応物から HPLC-DAD 法を用いて M2AA-6ACA を精製した(図 1)。なお、MDA は以前に報告されたように(4)、1,1,3,3-テトラメトキシプロパン (TMP) を酸性下で加水分解し、反応後、

水酸化ナトリウムを用いて中和した。

M2AA 抗原の作製: 精製された M2AA-6ACA の末端のカルボキシ基(図 1)を使い、キャリアー蛋白であるウシ血清アルブミン (BSA) 中のアミノ基と化学的に結合させ、高純度の M2AA-6ACA が結合している BSA (M2AA-6ACA-BSA) を作製した。簡単に、M2AA-6ACA を凍結乾燥後、BSA に EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride) を用いて結合させ、さらに透析を行い、ELISA に用いる抗原を作製した。

M2AA-6ACA-BSA を用いた ELISA: M2AA 抗原は一定量 96 穴プレートに固相化し、スキンミルクを用いてブロッキングした後、マウス血清と一晩反応させた。その後、パーオキシダーゼをラベルした二次抗体(抗マウス IgG 抗体-HRP; 抗マウス IgM 抗体-HRP; 抗マウス IgG1 抗体-HRP) に反応させ、最後にパーオキシダーゼの基質であるテトラメチルベンジジン (TMB) と反応させ、発色させ、水酸化ナトリウム添加後に 450nm の波長でプレートリーダーを用いて定量した。

血清サンプル: 粥状動脈硬化感受性マウスの ApoE 欠損マウスと野生型マウスの血清は米国のノースカロライナ大学の Xianwen Yi 博士から入手した。入手したサンプルは以下の条件で採材した。ApoE ko と野生型マウスの血中の抗体価を経時的にモニターするために、4 週齢からマウスを通常食で飼育し、3 か月齢以降、月 1 回血液を採取し、血清を分離し、-70 度に保存した。

(実験 B) M2AA 以外の MDA-AA-リジン付加体の存在とその生物学的重要性

M2AA 以外のハイブリッド型リジン付加体の精製および部分精製: 実験 A 同様、AA、を MDA の存在下で 6ACA と生理食塩水中で 37 度、7 日間反応させ、反応物から HPLC-DAD 法を用いて反応物の解析を行った。1,1,3,3-テトラメトキシプロパン (TMP) を加水分解する過程で beta-methoxyacrolein などの不純物が産生されることが以前に報告されている(5)。そこで、不純物による反応物を HPLC-DAD を用いて除外するため、1,1,3,3-テトラエトキシプロパン (TEP) を加水分解することで作製した MDA を用いた AA、と 6ACA との反応物を比較し、共通の産物を MDA 由来のリジン付加体と考え精製ないしは部分精製した。

AA、MDA と 6ACA の反応物の分画物の作製: 実験 A 同様、AA、を MDA の存在下で 6ACA と生理食塩水中で 37 度、7 日間反応させ、反応物を HPLC-DAD 法を用いて無作為に 9 分画(分

画/分)に分画化した。

AA、MDA と 6ACA の反応物の分画物を用いた抗原の作製：9 分画をそれぞれ凍結乾燥後、BSA に実験 A 同様結合させ、抗原を作製した。

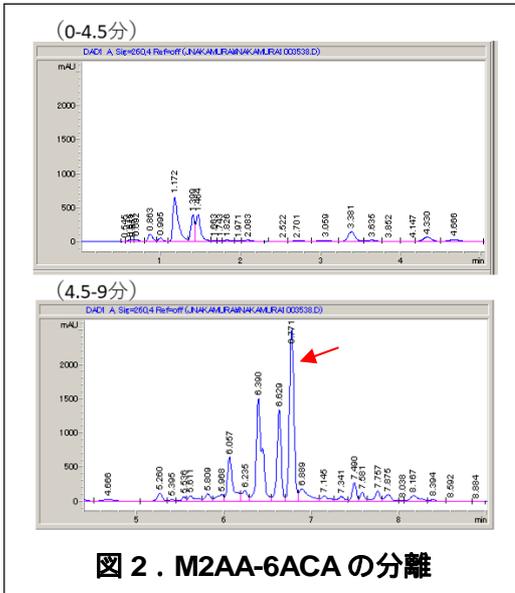


図 2 . M2AA-6ACA の分離

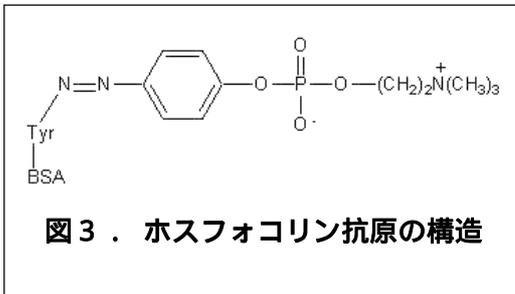


図 3 . ホスフォコリン抗原の構造

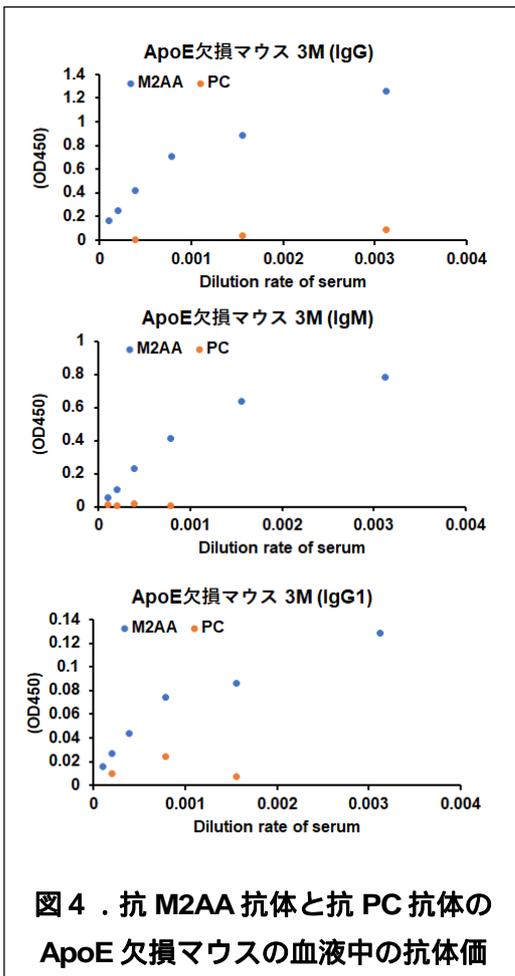


図 4 . 抗 M2AA 抗体と抗 PC 抗体の ApoE 欠損マウスの血液中の抗体価

4 . 研究成果

(実験 A) ApoE 欠損マウスの血液中の抗 M2AA 抗体の変動

粥状動脈硬化の発生機序において酸化 LDL が重要な役割を演じている。LDL の酸化により、LDL 上のリン脂質に脂質過酸化が起こる。脂質過酸化はリン脂質を障害することで、リン脂質の断片化とそれに伴い反応性の高い様々なアルデヒドを産生する。最近、リン脂質の脂質過酸化により、リン脂質の頭部のホスフォコリン (PC) が抗原性を示し、マクロファージを活性化したり動脈硬化の慢性炎症を亢進させるとの報告がある(6)。さらに、PL を認識するモノクローナル抗体(クローン名: EO6、抗体タイプ: IgM) を粥状動脈硬化感受性マウス (Ldlr 欠損マウス) に発現させることで動脈硬化が軽減することが明らかになり、PC が粥状動脈硬化において重要なエピトープであると唱えるグループがある。一方、リン脂質の過酸化脂質にともなう産生されるアルデヒドの中で MDA が最も注目されている。実験 A では、MDA と MDA の分解物である AA とリジンの反応で産生される M2AA が粥状動脈硬化において重要なエピトープであると考え、M2AA に対する抗体価の変動と PC に対する抗体価の変動を ApoE 欠損マウスの血液を用いて比較した。いずれの抗原も精製物を用いたということで世界的にも類のない実験である。

まず、M2AA を精製するため、AA を MDA の存在下で 6ACA と生理食塩水中で 37 度、7 日間反応させた。MDA は TMP を加水分解することで作製した。AA、MDA と 6ACA の反応物から M2AA-6ACA の精製物を HPLC-DAD 法を用いて分離した (図 2)。M2AA-6ACA のピーク (赤矢印) が検出されたが、M2AA-6ACA 以外にもいくつかの主要なピークが認められた。M2AA-6ACA を分取後、上記方法に従ってキャリアー蛋白である BSA に M2AA-6ACA を結合させ、抗原を作製した。PC 抗原については、PC を化学的に BSA に結合させたものを Biosearch Technologies から購入した (図 3)。M2AA-BSA および PC-BSA を 96 穴プレートに固相化させ ELISA を確立した。

我々の先行研究によって ApoE 欠損マウスの 3 か月齢の血液中に抗 M2AA 抗体 (IgG および IgM) が上昇することが分かっていたことより (3)、ApoE 欠損マウスの 3 か月齢の抗 PC 抗体の抗体価を比較検討した。その結果、抗 M2AA 抗体は IgG、IgM、および IgG1 について明らかな上昇を認めたのに対し、抗 PC 抗体の抗体価の上昇はいずれのタイプおよびサブタイプについても認められなかった (図 4)。この結果から、M2AA は PC より抗原性が強い可能性が示唆されるとともに、M2AA が PC より粥状動脈硬化に関与している可能性が推察された。一旦上昇した ApoE 欠損マウスの抗 M2AA 抗体は 4 か月齢まで上昇が続き、5 か月齢時に低下傾向を示した (図 5)。この抗 M2AA 抗体の推移は酸化 LDL

の推移と良く類似していた(7)。一方、抗 PC 抗体の抗体価の上昇は4及び5週齢の ApoE 欠損マウスにおいても認められなかった。

(実験 B) M2AA 以外の MDA-AA-リジン付加体の存在とその生物学的重要性

実験 A の図 2 に示すように、M2AA 以外にもいくつかの主要な付加体のピークが認められたことより、M2AA 以外の MDA-AA-リジン付加体の中にも免疫原性があるエピートプが存在する可能性があった。そこで、AA と MDA(TMP 由来) と 6ACA の反応物の 9 分画のフラクションを BSA に個別に結合させ、96 穴プレートに固相化させた ELISA を確立した。その ELISA が正しく働いているかを確認するため、M2AA を特異的に認識すると考えられているモノクローナル抗体(クローン 1F83、IgG)を陽性対照サンプルとして、PC を特異的に認識すると考えられているモノクローナル抗体(クローン EO6、IgM)を陰性対照サンプルとして、それぞれのモノクローナル抗体の反応を確認した。1F83 抗体は M2AA を含む第 7 分画に加え第 6 分画に対しても反応性があり、M2AA 以外にも 1F83 抗体に親和性がある付加体があることが明らかになった。また EO6 は PC 抗原に対して強い反応性があるものの、精製 M2AA 抗原に反応を示した。次に、ApoE 欠損マウスの血清中にこれらの抗原に対する抗体が存在するかを検討した。その結果、全ての分画に対する抗体が ApoE 欠損マウスの血清中に存在することが明らかになった。

上述のように、AA と MDA(TMP 由来) と 6ACA の反応物には M2AA 以外にもいくつかの主要なピークが認められたことより、この反応で産生されるハイブリッド型のリジン付加体の精製ないしは部分精製を試みた。TMP 由来の MDA には TMP を加水分解する過程でβ-メトキシアクロレイン(β-MA)などの不純物が産生されることが以前に報告されている(5)。一方、1,1,3,3-テトラエトキシプロパン(TEP)由来の MDA には TEP を加水分解する過程でβ-エトキシアクロレイン(β-EA)などの不純物が産生される。β-MA およびβ-EA が MDA と 6ACA と複雑に反応することにより、AA と MDA と 6ACA の反応物中に、β-MA およびβ-EA に起因したピークが生じることが予想された。そこで、AA と MDA(TMP 由来) と 6ACA の反応物と AA と MDA(TEP 由来) と 6ACA の反応物を比較し、同一の Retention time のピークで、かつ HPLC-DAD を用いた解析で同じ性状であることを確認できたものを AA と MDA と 6ACA の真のハイブリッド付加体と考え(図 6、赤矢印)それらを分離、精製ないしは部分精製を行った。さらにマイナーなハイブリッド型付加体を含め 16 付加体について、それぞれの精製物から抗原を作製し、ApoE 欠損マウスの血液中の抗体価を調べる予定である。

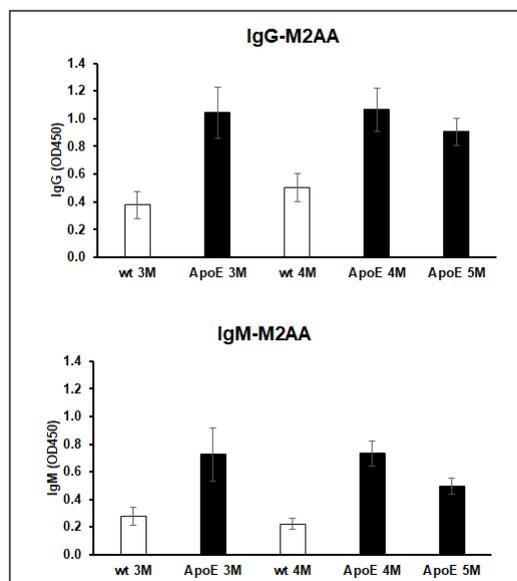


図 5 . ApoE 欠損マウスの血液中の抗 M2AA 抗体価の推移

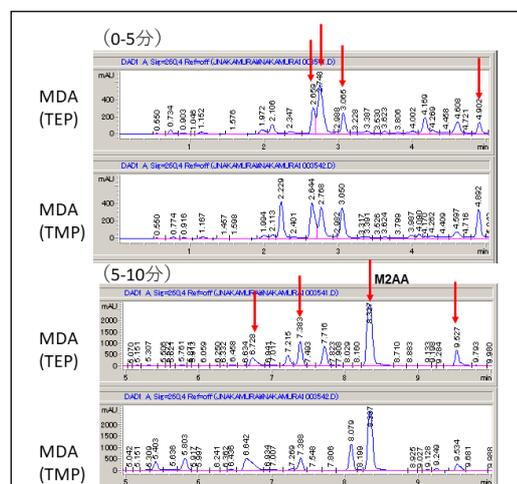


図 6 .MDA/AA/6ACA からハイブリッド型の分離

<引用文献>

- (1) Domingues RM, Domingues P, Melo T, Pérez-Sala D, Reis A, Spickett CM. Lipoxidation adducts with peptides and proteins: deleterious modifications or signaling mechanisms? J Proteomics. 2013;92:110-31.
- (2) Holvoet P, Collen D. Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. Atherosclerosis. 1998;137 Suppl:S33-8.
- (3) Shimomoto T, Collins LB, Yi X, Holley DW, Zhang Z, Tian X, Uchida K, Wang C, Hökkö

- S, Willis MS, Gold A, Bultman SJ, Nakamura J. A purified MAA-based ELISA is a useful tool for determining anti-MAA antibody titer with high sensitivity. PLoS One. 2017; 21;12(2):e0172172.
- (4) Robertson AK, Zhou X, Strandvik B, Hansson GK. Severe hypercholesterolaemia leads to strong Th2 responses to an exogenous antigen. Scand J Immunol. 2004;59(3):285-93.
- (5) Marnett LJ, Tuttle MA. Comparison of the mutagenicities of malondialdehyde and the side products formed during its chemical synthesis. Cancer Res. 1980;40(2):276-82.
- (6) Que X, Hung MY, Yeang C, Gonen A, Prohaska TA, Sun X, Diehl C, Määttä A, Gaddis DE, Bowden K, Pattison J, MacDonald JG, Ylä-Herttuala S, Mellon PL, Hedrick CC, Ley K, Miller YI, Glass CK, Peterson KL, Binder CJ, Tsimikas S, Witztum JL. Oxidized phospholipids are proinflammatory and proatherogenic in hypercholesterolaemic mice. Nature. 2018;558(7709):301-306.
- (7) Kato R, Mori C, Kitazato K, Arata S, Obama T, Mori M, Takahashi K, Aiuchi T, Takano T, Itabe H. Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009 Jan;29(1):33-9.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

Nakamura J, Kawanishi M, Okada T, Yagi T, and Kunugita N. Blood Titers of Antibody against Complex Malondialdehyde-Acetaldehyde-Lysine Adducts as a Biomarker for the Very Early Stage of Metabolic Syndromes, Such as Atherosclerosis. 米国毒性学会 (SOT) 年次総会 (2019)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕 ○出願状況 (計0件)

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし