

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590655

研究課題名(和文) 一粒子レベルでのリポ蛋白質酸化状態解析

研究課題名(英文) Analysis of oxidation level of low-density lipoprotein particles

研究代表者

武田 晴治 (TAKEDA, SEIJI)

北海道大学・保健科学研究所・特任准教授

研究者番号：80374726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：一粒子レベルでLDLの酸化による物性の変化を原子間力顕微鏡で評価する方法について検討した。LDLは酸化の進行に従い表面電位が低下することが判明した。表面電位の分布は酸化前のほうが酸化後より広がっていることが判明した。

また、酸化によりLDL粒子は柔らかくなることも判明した。酸化前では粒子の硬さにばらつきがあり、酸化前でも柔らかい粒子がすでに存在することが示唆された。柔らかい粒子を多く含む試料が血小板を凝集させることも判明しており、柔らかいLDL粒子と心疾患などとの関連性が考えられる。LDLの硬さの分布を調べることにより健康状態を評価することができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Properties of LDL before and after metal induced oxidation were investigated by an atomic force microscopy system. Surface potential of the LDL decreased with increasing oxidation degree of the LDL. The distribution of the potential before oxidation was wider than that of the potential after oxidation.

Stiffness of the LDL before and after oxidation also decreased with increasing oxidation degree. Distribution of the stiffness of the LDL before oxidation was wide and the stiffness of some LDL particles showed soft like oxidized LDL. Gel-filtrated sample of oxidized LDL that included the soft LDL induced aggregations of blood platelet and enhance destruction of red blood cells. It is suggested that soft LDL might be related to cardiac disease and that the distribution the stiffness of the LDL might be a novel tool to evaluate not only oxidation degree of the LDL but also to evaluate the degree of the health condition.

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：低比重リポタンパク質 原子間力顕微鏡 酸化 表面電位 弾性率

1. 研究開始当初の背景

活性酸素は、生体膜や血漿リポ蛋白を構成する高度不飽和脂肪酸を容易に酸化し過酸化脂質とする。一度発生した過酸化脂質は連鎖反応により次々と脂質を酸化する。生体内の抗酸化酵素(グルタチオンペルオキシダーゼなど)やラジカル消去剤(ビタミンEやビタミンC)による酸化制御が崩れると、マクロファージが泡沫化して細胞や組織が障害を受けて冠動脈疾患、脳血管障害、肝炎、腎疾患、関節炎、悪性腫瘍、膠原病などの発症や進展を促進する。特に過酸化脂質を多く含む酸化リポ蛋白は、血液を介して体内を循環するため種々の臓器の酸化ストレス障害と関係するものと推測される。

LDLが酸化されることにより脂質二重結合が減少し、脂質膜の流動性が変化することにより脂質膜の物理的性質も変化すると予想される。しかし、酸化によりリポ蛋白の構造や性質がどのように変化していくのか、どこまで脂質が酸化されると脂質過酸化連鎖反応が開始するのか、また、すべてのリポ蛋白がほぼ同時に様に酸化が進むのか、それとも特定のリポ蛋白の酸化が先行するのか、酸化しやすい(あるいは酸化しにくい)リポ蛋白の条件は何かなど、酸化リポ蛋白研究には多くの課題が残されている。

2. 研究の目的

リポ蛋白質の酸化のメカニズムについては多くの研究報告がなされているが、個々のリポ蛋白質粒子の酸化プロセスや粒子の物理的性質の変化、その制御方法については未知の部分であり、そのため疾患や健康と酸化ストレスとの関係は未だ曖昧である。その際、個々のLDL粒子の酸化過程を調べることが重要であるにもかかわらず、詳細に観察した報告がない。その理由としては、一粒子レベルで酸化リポ蛋白質と未酸化リポ蛋白質を区別する方法が確立していないことが一つの要因である。

個々のリポ蛋白質の酸化状態を物理的視点で観察することにより、物理的状態がどのように変化した酸化リポ蛋白質が疾患と関係があるのかについて詳細に検討することができ、疾患を未然に防ぐ手かがりが得られるものと予想される。本研究では走査型プローブ顕微鏡を用いてケルビン測定、剛性測定を行い、金属酸化させたLDL粒子と未酸化LDL粒子の判別の方法を確立することを第一の目的とした。LDLの酸化状態が一樣なのか、酸化によりどのような分布になるのかについてについて調べることを目的とした。

3. 研究の方法

健常者から採血を行い遠心により血清を得たのちに、血清に臭化カリウムを添加して比重を変えて超遠心によりLDLの分画を得た。この分画には金属イオンによるLDLの酸化進行を抑制するためにEDTAが含まれている。さら

に保存中の酸化を抑制するために抗酸化物質を添加したLDLも用いた。添加する抗酸化剤を選択するために、抗酸化剤の効果を調べた。抗酸化物質がLDLの酸化を抑制する能力を評価するために、抗酸化剤を添加したLDLと添加していないLDLを金属酸化し、LDLの酸化状態をTBA法や電極などで評価した。水溶性ビタミンEアナログ物質やビタミンCなど多くの抗酸化剤がLDLに対して抗酸化性を示した。AFMの実験条件の最適化のための検討段階では、抗酸化能のあるビタミンCを添加して、使用時に除去したLDLを用いた。本報告書で示した結果はV.Cを添加していない新鮮なLDLを使用して測定した結果である。酸化LDLは未酸化LDL(0.25 mg/ml)に1 μMになるように硫酸銅を添加して37 °Cでインキュベーションすることにより得た。本報告書では硫酸銅処理していないLDLを未酸化LDL、硫酸銅処理したLDLを酸化LDLと呼ぶことにする。

(1)AFMによるLDLの表面電位測定

AFMによる表面電位測定では、未酸化LDLおよび酸化LDLを基板へ吸着後、大気中でLDL吸着跡の表面電位像をトポ像と同時に測定した。吸着させる基板として劈開したmica上に金を蒸着してエピタキシャル成長させた金薄膜基板(Au/mica)を修飾して用いた。金膜はアースつなぎ、AFM探針はイリジウム白金コートしたものをを用いた。AFMはアサイラムリサーチ社(MFP-3D)を用いた。

(2)AFMによるLDLの硬さ測定

Au/mica基板にLDLを吸着させ大過剰の未吸着LDLを基板表面が大気に触れないように注意して洗浄し除去した。固定化されたLDLをリン酸緩衝溶液中(PBS)でAFMの探針により押しつけることによりフォースカーブを測定した。一定量押し付けたときの変形量の測定とヘルツモデルにより個々のLDL粒子の硬さの分布について解析した。フォースカーブ測定時の探針の移動速度は122 nm/s、往路と復路でフォースカーブのズレがほぼない弾性変形の領域であることを確認した。

4. 研究成果

Au/mica上をアミノデカンチオール、カルボキシデカンチオール、メルカプトアンデカンノールで修飾したAuコート水晶振動子センサーを作製して未酸化LDL、硫酸銅で90分インキュベーションした酸化LDLの吸着を水晶振動子により検討した。その結果、メルカプトアンデカンノールにより修飾したセンサーが効率よくLDLを吸着できることが判明した。そこで、1mMメルカプトアンデカンノールで修飾したAu/micaを作製して0.025mg/mlにPBSで希釈したLDLまたは酸化LDLを基板上で3分間吸着させ固定化した。洗浄後、基板を乾燥して大気中、AFMで形状測定した。未酸化LDL、酸化LDLともにAFMのトポ像から約50nm程度の直径の粒子として観察され、高さは約2 nmの高さになっていることがわかった(図1)。

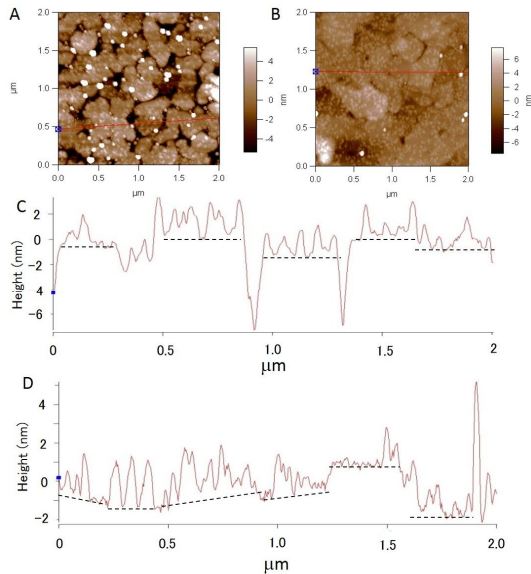


図1. 基板に吸着したLDLのAFMによるトポグラフィー像 A, Bはそれぞれ未酸化LDL、酸化LDLを金基板上に固定化後の洗浄乾燥後のトポ像を示した。CはAのトポ像の赤線部分の断面図、DはBのトポ像の赤線部分の断面図に示した。点線は修飾された金基板表面の推定位置を示している。

LDLはほぼ球状で平均直径は21から23 nmの物質であることが知られている。しかし、AFMの探針の形状を考慮すると直径約40 nm、高さ2 nmの物質が吸着していることとなり、LDLの体積を考えると60から70%程度に減少していた。このことより、LDLは金基板に吸着後、洗浄により一部崩壊脱離して、つぶれた状態になっていると考えられた。

(1)表面電位による評価

次にケルビン法により未酸化LDL、酸化LDLを固定化、乾燥後の表面電位を測定した結果を図2に示した。その結果、酸化の進行により電位が低下していることが分かった。

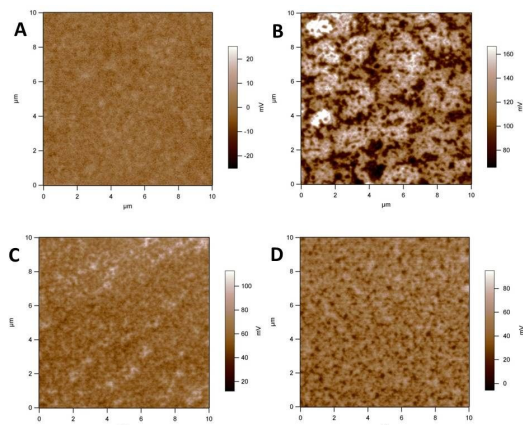


図2. ケルビン法で測定した表面電位のイメージ AはLDLの代わりにPBS緩衝液を添加した金表面、B, C, Dはそれぞれ、未酸化LDL、酸化LDL(30分酸化)、酸化LDL(90分酸化)を添加後の表面電位の結果である。

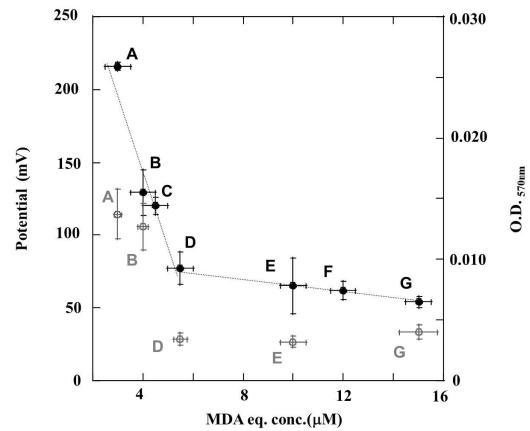


図3. LDLの酸化による表面電位とニンヒドリン反応の変化

TBA法で測定した各MDA濃度における、黒点は表面電位、灰丸はニンヒドリン反応による570nmでのO.D.値を表した。

そこで、LDLの酸化状態を評価するとき用いられるTBARS量と表面電位を比較した(図3)。表面電位は得られた画像の電位の平均値を示した。TBARS値が酸化前の3 μMから約4 μMに増加した状態(酸化初期)では電位は酸化前と比較すると大きく減少した。

しかし、更に酸化が進みTBARSが10 μM以上になっても、電位はわずかの低下のみが観察された。一方、各サンプルをニンヒドリンでアミノ基の含量を測定したところ、酸化初期でほとんどなくなっていることが判明した(図3)。表面電位の低下はLDLに含まれるapoB-100のリジン側鎖などが修飾されたことによるものである可能性が示唆された。

次に、表面電位の分布についての解析を行った。硫酸銅を添加せずに37 °CでインキュベーションしたLDL、硫酸銅を添加して37 °Cで30分、90分インキュベーション後の酸化LDLの電位の分布を図4に示した。未酸化LDLの場合、酸化LDLの場合と比較すると電位の分布に広がりがあることが判明した。個々の未酸化のLDL粒子に電位の広がりがある可能性があることが考えられるが、測定しているLDLが乾燥時に崩壊しており、LDLの粒子の一部を測定していると考えられることより、個々の表面電位を反映しているかどうかについて慎重な判断が必要であると考えられる。

(2)硬さによる評価

未酸化LDLまたは酸化LDLを基板上に固定化して、溶液中でAFMの探針で押しつけ、LDLの変形量を測定することにより、酸化前後でのLDLの硬さの変化についての評価を行った。

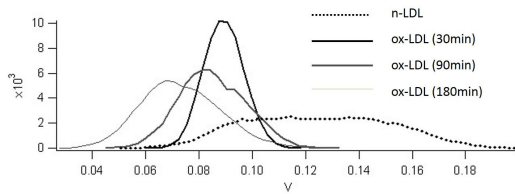


図4. 酸化によるLDLの表面電位の分布の変化
硫酸銅を加えず加熱したLDL(n-LDL)、硫酸銅を添加して30分(ox-LDL 30min)、90分(ox-LDL 90min)、180分(ox-LDL 180min)加熱して酸化した後のLDLの表面電位の分布を示している

Mica表面を3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)で修飾した基板について検討したが、APTESでの修飾時に20 nmから100 nm程度のAPTESの会合体がmica基板上に形成されることがあり、LDLとの区別が困難となった。そこで、劈開したmica上に金のエピタキシャル成長させた薄膜(金膜厚100 nm)を蒸着法により作製した基板を用いた。酸化LDLは未酸化LDL(0.25 mg/ml)に1 μ Mになるように硫酸銅を添加して37 $^{\circ}$ Cで30分、60分、90分、150分インキュベーションすることにより得た。金基板上に0.025 mg/mlのLDLおよび酸化LDLを滴下して室温で約3分吸着させ、PBS緩衝溶液で洗浄後にトポグラフィー像をACモードで測定した。図5に未酸化LDLおよび150分間インキュベーションした酸化LDLのトポグラフィー像を示した。図5A、Cより未酸化LDLの場合、直径約30 nm、高さ10から12 nmの粒子が固定化されていることが判明した。体積を計算するとほぼ報告値と同じであることよりLDLが壊れることなく吸着していると考えられた。

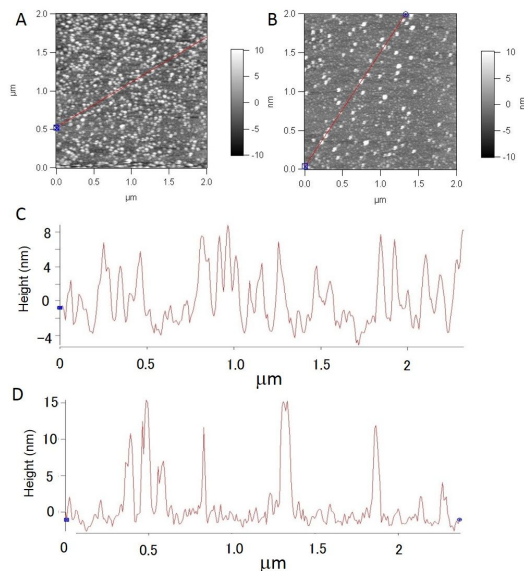


図5. 溶液中で基板に吸着したLDLのAFMによるトポグラフィー像
A, Bは、それぞれ未酸化LDL、酸化LDLを基板上に固定化後の溶液中でのトポ像を示した。トポ像A, Bの赤線部分の断面図を、それぞれC, Dに示した。

30分、60分酸化した場合のトポ像は未酸化LDLと大きな差は観察されなかった。しかし、150分間酸化したLDLについては固定化粒子の数が減少して体積が50%程度大きい粒子が観察された(図5B, D)。これらは酸化により変性したLDLが凝集していると考えている。LDLの金基板への吸着はapoB-100のリジン由来のアミノ基が関与していると考えられるが、酸化LDL(150分酸化)の場合、リジンが修飾を受けたため吸着量が減少したと考えられる。

次にフォースカーブ測定によりLDLをAFMチップで5 nm押し込んだときのAFMチップの実際のたわみ量を含んだ移動距離を求め、LDLの変形量を図6右に示したように求めた。変形量が0の場合は全く変形しない硬い物質であり、変形量が1の場合は押し込んだ量が、そのまま変形していることになり柔らかいサンプルになる。ばね定数が0.1 nN/mのカンチレバーを使用して変形量を測定した結果を図6に示した。図6より未酸化LDLでは変形量が0.93から0.975の比較的広い範囲で分布していることがわかる。一方、酸化時間30分では変形量が0.927から0.988までになり、柔らかくなっている可能性があると考えられた。酸化時間90分、150分では0.975から1の範囲で観察され柔らかくなっていることが推察できた。

より詳細に検討するためにヘルツモデルによりLDL、酸化LDLの弾性率の解析を行った。未酸化LDLの場合、フォースカーブ測定により得られた弾性率の分布は0.4, 1.0, 1.4 MPa付近に分布のピークを持ち、0.2から2 MPaの広い範囲で観察された。酸化1時間のLDL粒子ではトポ像では未酸化LDLと区別がつかないが、弾性率は0.8から2 MPaの範囲の粒子は減少し、0.5 MPa以下のものが多く観察された。酸化3時間のものは80%以上の粒子で0.5 MPa以下となり、酸化が進行するに従いLDLの粒子が柔らかくなることがわかった。また、図5より酸化が進行するにつれて粒子の大きさの変化するものが観察されたことより、ゲル濾過法および限外濾過フィルターを用いることにより酸化LDLを粒子サイズで分画した。未酸化LDLでは一つのピークのみ観察されたが、酸化LDLでは大きく3本のピークが観察された。酸化LDLの中には、分子量3000以下、未酸化LDLとほぼ同じサイズ、未酸化LDLより大きいサイズの粒子が存在することが判明した。分子量3000以下の分画を基板に吸着させて弾性率を測定したところ数十Mpa程度とLDLより固い値が得られた。未酸化LDLとほぼ同じサイズの粒子の場合、弾性率の分布は0.5 MPa付近にピークを持ち、0.1から2 MPaの広範囲に分布していることが判明した。未酸化LDLより大きい50 nmから100 nm程度の粒子は酸化LDLの会合体と考えられ0.5 MPa以下であることが判明した。

以上の結果より、LDLの固さの変化がLDLの酸化状態と関係している結果が示唆され、酸化の進行により柔らかくなることが示唆された。

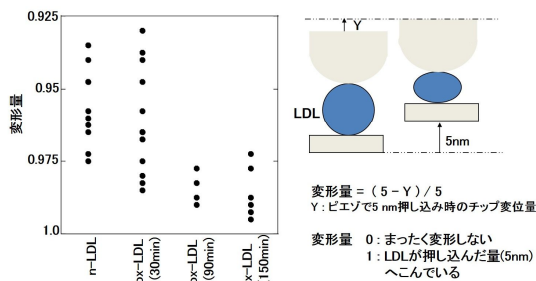


図6. AFMチップでLDLを押し込んだときの変形量

酸化LDLの弾性率の分布と未酸化LDLの弾性率の分布を比較すると未酸化LDLのほうが分布に広がりがあった。未酸化LDLのなかには20%程度柔らかい粒子が含まれており、すでに酸化が進行している粒子が存在している可能性があると考えられる。硫酸銅非存在下、一日37 インキュベーションしたLDLでは未酸化LDL同様に広い範囲の分布を示したが、柔らかい領域の粒子が増加する傾向が観察された。これらの結果は未酸化LDLの粒子の酸化状態が粒子によって異なっていることを示している可能性がある。酸化により粒子が柔らかくなる理由として以下のことが考えられる。

LDLを構成するapoB-100に含まれるトリプトファンなどが酸化剤由来のラジカルにより修飾されることが報告されており、また、分解されることも報告されている。タンパク質の弾性率は数百MPaから数GPaで、細胞などは数百kPa以下であるので、タンパク質の分解で柔らかくなった可能性が考えられる。このほか、酸化によりLDLが柔らかくなる原因としては脂質膜の変化などの可能性が考えられる。詳細については今後の検討課題となる。

酸化LDLが血小板を凝集させることが報告されている。そこで、分子サイズにより分画した酸化LDLのうち、どの分画が血小板の凝集に関与するのかについて検討をした。

ゲル濾過カラムにより分離した酸化LDLのうち、分子量がLDLとほぼ同じ、またはLDLより大きなサイズのもは血小板を強く凝集させ、赤血球も溶血させることが判明した。これらの弾性率は0.5 MPa付近を中心に分布をもつことから、柔らかいLDLが血小板活性化や溶血に関与している可能性が考えられる。一方、分子量3000以下のものも、弱いながら同様の作用が観察された。

これらの結果からLDLの硬さの状態は粒子により異なっており、酸化されることで柔らかくなっている。また、これら柔らかいLDLが血小板凝集などに関与している可能性が考えられる。疾患状態ではこれらのLDLの硬さの分布が変化している可能性があると考えら、健康状態の評価に応用できる可能性がある。本研究の次のステップとして非アルコール性肝炎(NASH)、冠動脈疾患患者のLDLの硬さを評価することにより病態の予測できるかについ

て検討したい。また、病気の状態ではなく、健康状態の評価に結びつく可能性があると考えられる。脂質の酸化プロセスと疾患との関係を解明することが次の課題になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- Futaba Ohkawa; Seiji Takeda; Shu-Ping Hui; Toshihiro Sakurai; Shigeki Jin; Hirotooshi Fuda; Kazuhisa Sueoka; Hitoshi Chiba, Evaluation of Antioxidant Activity of Natural and Synthetic Compounds Against LDL oxidation Using CNT electrode, 査読あり, IEEE SENSORS JOURNAL, vol.14, No12, 2014, 532-537 ページ
DOI. 10.1109/JSEN.2013.2285408
Seiji Takeda; Futaba Ohkawa; Shu-Ping Hui; Toshihiro Sakurai; Shigeki Jin; Hirotooshi Fuda; Kazuhisa Sueoka; Hitoshi Chiba, Evaluation of Oxidized-Low-Density Lipoproteins Using Kelvin Force Microscopy, 査読あり, IEEE SENSORS JOURNAL, vol.13, No9, 2013, 3449-3453 ページ
DOI. 10.1109/JSEN.2013.2265014
Seiji Takeda; Futaba Ohkawa; Toshihiro Sakurai; Shigeki Jin; Hirotooshi Fuda; Shu-Ping Hui; Kazuhisa Sueoka; Hitoshi Chiba, Application of Kelvin force microscopy for evaluation of oxidized low-density lipoprotein, 査読なし Proceeding of IEEE SENSORS 2012, 1751-1754 ページ,

〔学会発表〕(計 8 件)

- 武田晴治、武笠幸一、惠淑萍、布田博敏、神繁樹、布田博敏、末岡和久、千葉仁志 走査型プローブ顕微鏡を利用した一粒子レベルでの低比重リポ蛋白質の酸化状態の評価, 2014.03.30 第 81 回電気化学会 大阪 29-31
Seiji Takeda; Shu-Ping Hui; Futaba Ohkawa; Shigeki Jin; Hirotooshi Fuda; Koichi Mukasa; Kazuhisa Sueoka; Hitoshi Chiba, Investigation of antioxidant activity of compounds against LDL oxidation using a CNT electrode, 2014.03.24, SFRR12014, 京都 3/23-26
Syun Terashima; Seiji Takeda; Shu-Ping Hui; Futaba Ohkawa; Shigeki Jin; Hirotooshi Fuda; Koichi Mukasa; Kazuhisa Sueoka; Hitoshi Chiba, Properties of oxidized LDL were investigated by a carbon nanotube based electrode, 2014.03.24, SFRR12014,

京都 3/23-26

武田晴治, 大川芙多葉, 櫻井俊宏, 神繁樹, 布田博敏, 惠淑萍, 千葉仁志

原子間力顕微鏡による LDL 酸化状態評価
第 2013.08.31, 53 回日本臨床化学会年次
学術集会 徳島 8/30-9/1

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, 2013.03.31, 第
80 回電気化学会 仙台

Seiji Takeda; Futaba Ohkawa; Toshihiro
Sakurai; Shigeki Jin; Hirotohi Fuda;
Shu-Ping Hui; Kazuhisa Sueoka; Hitoshi
Chiba, Application of Kelvin force
microscopy for evaluation of oxidized
low-density lipoprotein,
2012.10.30, IEEE SENSORS 2012 台北 台湾

山田理絵, 武田晴治, 大川芙多葉, 櫻井
俊宏, 神繁樹, 布田博敏, 惠淑萍, 千葉
仁志, 酸化 LDL 由来物質に関する物理化学
的研究, 2012.10.06, 日本臨床化学会
北海道支部例会 旭川

武田晴治, 大川芙多葉, 櫻井俊宏, 神繁
樹, 布田博敏, 惠淑萍, 千葉仁志, 原子
間力顕微鏡を用いた酸化 LDL の電位変化
測定, 2012.09.08, 第 52 回日本臨床化学
会年次学術集会 盛岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
北海道大学高度脂質分析ラボの共用機器に
リンクしたページを作成予定

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 晴治 (TAKEDA, Seiji)

北海道大学・大学院保健科学研究院

・特任准教授

研究者番号: 80374726

(2) 研究分担者

千葉 仁志 (CHIBA, Hitoshi)

北海道大学・大学院保健科学研究院

・教授

研究者番号: 70197622

(3) 研究分担者

末岡 和久 (SUEOKA Kazuhisa)

北海道大学・情報科学研究科

・教授

研究者番号: 60250479