

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591031

研究課題名（和文） 酸化 LDL 除去による動脈硬化症治療の試み

研究課題名（英文） The impact of oxidized LDL removal on atherosclerosis

研究代表者

石垣 泰（ISHIGAKI YASUSHI）

東北大学・病院・講師

研究者番号：50375002

研究成果の概要：

動脈硬化発症・進展における酸化 LDL の意義を明らかにするために、酸化 LDL のみを低下させることで動脈硬化の進展予防が可能かを検討してきた。我々は、酸化 LDL 受容体 LOX-1 をアデノウィルスを用いて肝臓に特異的に発現させることで、血中から酸化 LDL を取り込ませることに成功し、その結果動脈硬化病変の進行が阻止された。この結果から、動脈硬化の進展には酸化 LDL が重要な役割を果たしており、血中からの酸化 LDL 除去は動脈硬化の進展を阻止する有効な方策であることが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科臨床学・代謝学

キーワード：①動脈硬化②脂質代謝③酸化 LDL

1. 研究開始当初の背景

酸化LDLは、マクロファージに取り込まれ、泡沫化や粥腫の形成を引き起こすほかに、血管内皮細胞にはたらき内皮障害をもたらすことが知られており、高コレステロール血症に伴う動脈硬化の発症・進展において重要な役割を果たしていると考えられている。肥満・糖尿病状態では酸化ストレスが増大しており、またメタボリックシンドロームで増加するsmall dense LDLは酸化変性を受け易いことから、メタボリックシンド

ロームから発症する動脈硬化治療において酸化LDLが最も相応しいターゲットと考えた。現在のところ、薬物等を用いて血液中のLDLを減少させることが、最も有効な動脈硬化の内科的治療法である。しかし、酸化LDLを標的にした治療法はなく、また酸化LDLが動脈硬化発症・進展にどの程度重要であるかを直接検討した報告も存在しない。そこで、血液中から酸化LDLを除去することができれば酸化LDLの動脈硬化発症・進展への寄与度を直接評価でき、ひいては動脈硬

化の新規治療法の開発につながるのではないかと考えた。

酸化LDLの取り込みには、スカベンジャー受容体といわれるいくつかの受容体が関与しており、これら进行操作することで、酸化LDL除去の企てが実現できるのではないかと考えた。その中で、研究代表者らが着目したのは LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1) である。なぜならLOX-1は、マクロファージや血管内皮細胞、血管平滑筋細胞といった血管壁を構成する細胞に発現しており、動脈硬化の発症・進展に深く関わっていると考えたからである。血中の酸化LDLが血管壁構成細胞に作用し、取り込まれるより先に除去するためには、血管以外の組織で酸化LDLを効率的に取り込まなくてはならない。そのため、LOX-1遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作製し、肝臓にLOX-1を異所性に発現させる方法が有効と考えた。

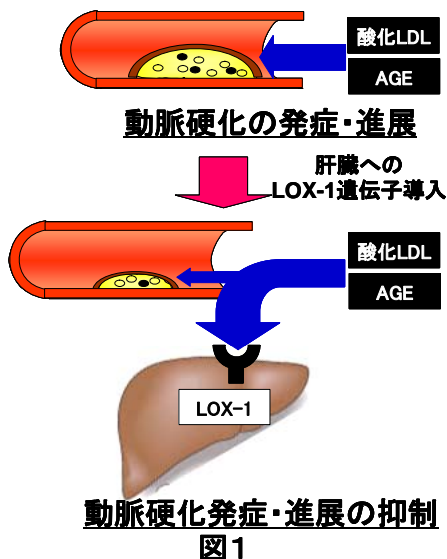
2. 研究の目的

本研究の目的は、肥満・糖尿病状態での動脈硬化の進展・維持における酸化LDL (low-density lipoprotein) の寄与度を明らかにし、異所性に酸化LDLを吸着・除去することによる動脈硬化に対する新規予防・治療法の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

LOX-1 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターとコントロールとして lacZ を組み込んだコントロールベクターを作製した。これらを 46 週齢のアポ E 欠損マウスに対して経静脈的に投与し、肝臓特異的に遺伝子導入をおこなった(図1)。LOX-1 発現の効果をより客観的に評価するために、アデノウイルス導入時と同じ週齢のマウスをベースラインとした。

これらのマウスを用いて、肝臓への酸化LDLの取り込みを検討し、また肝臓に関する生化学的、組織学的な解析をおこなった。次に血清を用いて、脂質プロファイルや炎症性因子を検討し、酸化LDLの変化を定量した。大動脈を採取し、動脈硬化の評価を行なうとともに、mRNA から遺伝子発現を検討した。



4. 研究成果

(1) 肝臓におけるLOX-1の発現と機能解析

アデノウイルスを静脈投与し、3日後に肝臓における蛋白発現を検討したところ、LOX-1アデノウイルス投与マウス(LOX-1群)でLOX-1蛋白の発現を認めた。一方、LacZウイルス投与群(LacZ群)の肝臓ではLOX-1蛋白は認められなかった。

酸化LDLを調整し両群のマウスに静脈投与後採取した肝臓で、抗酸化LDL抗体にて免疫染色を行なったところ、LOX-1群で強い酸化LDLの沈着を認めた。また同様に蛍光ラベルした酸化LDLを投与したところ、LOX-1群でLacZ群に比べ7.4倍の蛍光強度を示し、明らかな酸化LDLの取り込みが認められた(図2)。

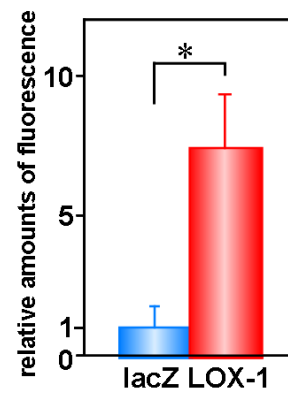


図2

肝臓への酸化LDLの取り込み

以上から、アデノウイルスを用いて異所性に発現したLOX-1は酸化LDL受容体として機能的に発現していると考えられた。

(2) 酸化LDL取り込みによる肝臓の変化

酸化LDLを取り込むことによって、肝臓がいかなる影響を受けているかを解析した。LacZ群に比較してLOX-1群の肝臓の組織像、酵素の値に大きな変化を認めなかった。肝臓の遺伝子発現を半定量RT-PCRで検討したところ、酸化ストレス消去系の各分子の発現上昇を認め、酸化LDL取り込みに伴って肝臓における酸化ストレスが増強していると考えられた。しかし、CRPやIL-6といった炎症性因子の発現は変化を認めず、酸化LDLの取り込みは明らかな肝臓の炎症を引き起こす程度ではないと考えられた。

(3) 血清パラメーターの検討

血清総コレステロール、中性脂肪の値は両群で差を認めず、HPLCにて解析したリポタンパク組成に関しても、LDLコレステロールを含め変化を認めなかった。しかし、酸化LDLの変化をサンドイッチELISAで検討したところ、LOX-1群でウイルス投与1,2週間後の著明な低下を認め(図3)、肝臓LOX-1は血中から酸化LDLを除去していると考えられた。

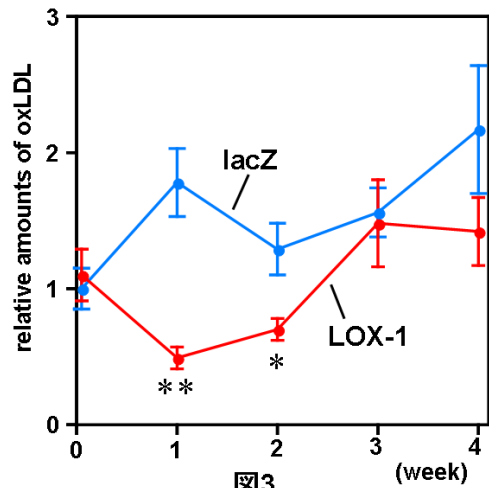


図3 血中酸化LDLの推移

この変化を反映してか、血清過酸化脂質も大幅に低下していた。また炎症性因子である血中 MCP-1 は低下し、善玉のアディポサイトカインと考えられるアディポネクチンは上昇していた。これはの変化の背景には全身の酸化ストレスの軽減が関与しているものと考えられた。

(4) 動脈硬化病変の検討

アデノウイルス投与後 4 週後に採取した、大動脈内腔をオイルレッドで染色したとこ

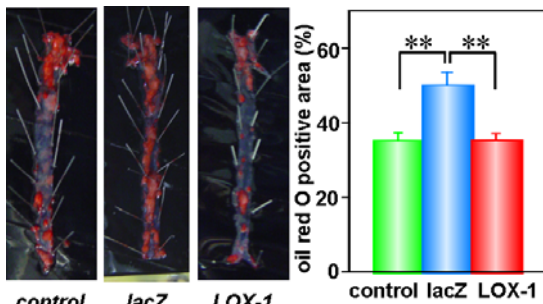


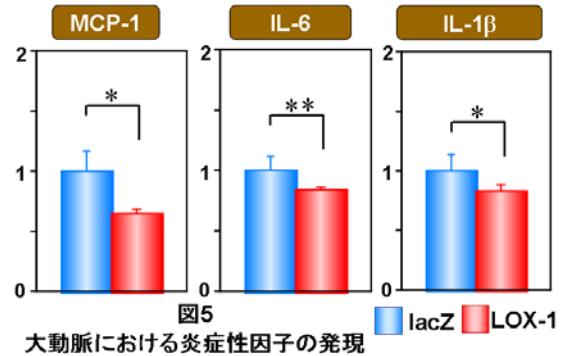
図4 動脈硬化病変の評価

ろ、LOX-1 群の動脈硬化面積は投与時(46 週齢)とほぼ同等で、lacZ 群に比べ著明に進展が抑制されていた (46 週齢 35.2±6.4% vs lacZ 49.8±12.4% vs LOX-1 35.3±6.4%) (図 4)。また、免疫組織学的な解析では両群のプラークにおけるマクロファージの沈着に差をみとめなかったものの、LOX-1 群のプラーク表面には多くの平滑筋細胞が存在し、プラークの安定化を示唆するものと考えられた。

(5) 大動脈における遺伝子発現の検討

ウイルス投与 4 週後の大動脈の遺伝子発現を半定量 RT-PCR で検討したところ、LOX-1 群において酸化ストレス消去系の各分子の発現が低下しており、酸化ストレスの軽減が示唆された。また MCP-1 や IL-6 といった炎症性因子の発現も著明に抑制されており (図

5)、血中から酸化 LDL を除去することは、血管の酸化ストレスや炎症をも軽減させることが示唆された。



以上の研究結果から、これまで動脈硬化のマーカーとして考えられてきた血中の酸化 LDL は、動脈硬化の進展にも重要な役割を果たしていると考えられた。また血中から酸化 LDL を除去することは動脈硬化の進展予防に有効な方策であると考えられ、今後の治療法の開発に結びつく可能性が示された。

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 3 件)

- 1, Kaneko K, Yamada T, Tsukita S, Takahashi K, Ishigaki Y, Oka Y, Katagiri H. Obesity alters circadian expressions of molecular clock genes in the brainstem. *Brain Research* 1263: 58-68, 2009. 査読有
- 2, Imai J, Katagiri H, Yamada T, Ishigaki Y, Suzuki T, Kudo H, Uno K, Hasegawa Y, Gao J, Kaneko K, Ishihara H, Nijima A, Nakazato M, Asano T, Minokoshi Y, Oka Y. Regulation of pancreatic β cell mass by neuronal signals from the liver. *Science* 322(5905): 1250-4, 2008. 査読有
- 3, Ishigaki Y, Katagiri H, Gao J, Yamada T, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Kaneko K, Ogihara T, Ishihara H, Sato Y, Takikawa K, Nishimichi N, Matsuda H, Sawamura T, Oka Y. Impact of Plasma Oxidized LDL Removal on Atherosclerosis. *Circulation*. 118(1): 75-83, 2008. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- 1, 石垣 泰 他 15 名、インスリン抵抗性における CHOP の役割の検討、日本糖尿病学会学術総会、平成 20 年 5 月 23 日、東京
- 2, 石垣 泰 他 11 名、糖尿病患者と健常者における頸動脈血管弾性の検討、日本糖尿病合併症学会、平成 19 年 10 月 25 日、つくば
- 3, 石垣 泰 他 10 名、頸動脈血管弾性からみた肥満と動脈硬化の関係、日本肥満学会、

平成19年10月19日、東京

4, 石垣 泰 他9名、反応性内臓肥厚におけるCHOPの役割、日本動脈硬化学会、平成19年7月14日、大阪

5, 石垣 泰、Involvement of apolipoproteinE in excess fat accumulation and insulin resistance. 日本動脈硬化学会、平成19年7月13日、大阪

6, 石垣 泰 他2名、肥満管理の重要性、日本糖尿病学会学術総会、平成19年5月26日、仙台

7, 石垣 泰 他11名、動脈硬化惹起性リポタンパク除去による動脈硬化治療の試み、日本糖尿病学会学術総会、平成19年5月25日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石垣 泰 (ISHIGAKI YASUSHI)

東北大学・病院・講師

研究者番号：50375002

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

荻原 健英 (OGIHARA TAKEHIDE)

東北大学・大学院・准教授

研究者番号：40361608

山田 哲也 (YAMADA TETSUYA)

東北大学・病院・助教

研究者番号：90400374