

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07051

研究課題名(和文)酸化変性高密度リポタンパク質(oxHDL)の生成機序と血管壁における役割の解明

研究課題名(英文)Oxidatively modified high-density lipoprotein: its roles in vessel wall tissues and mechanism of its generation.

研究代表者

板部 洋之(ITABE, Hiroyuki)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：30203079

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)：これまでにヒト血中oxLDLがoxHDLを伴う新奇複合体粒子であることを報告してきた。予め重水素標識酸化PCを添加したLDLに、HDLを混和すると酸化PCは酵素的に速やかに加水分解され、生じたリソPCはLCATにより再アシル化されPCとなった。酸化PC、リソPCともLDLからHDLに速やかに移行し、重水素標識PCがHDL中に増加した。血管内皮傷害、血栓形成にも関わる好中球新しい細胞死であるネトーススが、ヒト血漿から分離した生体内oxLDL-oxHDL複合体画分により増強されることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性心筋梗塞などの重篤な循環器疾患を引き起こす重要なリスク因子であるoxLDLが、生体内においてはどのような性状を有するのかを明らかにすることで、疾患の早期発見や有効な治療法開発に向けた糸口を見出すことが可能になる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported the oxidized LDL (oxLDL) isolated from human plasma has a novel structure composed of oxLDL and oxHDL particles. When LDL prelabeled with deuterium-labeled oxidized PC (oxPC) was incubated with HDL, oxPC was quickly hydrolyzed enzymatically and the resulting lysoPC was reacylated by LCAT to form PC. Both oxPC and lysoPC were transferred from LDL to HDL particles spontaneously, and deuterium-labeled PC increased in HDL. NETosis, a novel neutrophil cell death which is related to endothelial damages and thrombosis, was found to be enhanced by the oxLDL-oxHDL complexes isolated from human plasma.

研究分野：薬学生物学

キーワード：酸化LDL 酸化HDL 動脈硬化症 急性心筋後続 LC-MS/MS 好中球細胞外トラップ

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化症は、急性心筋梗塞をはじめとする重篤な循環器疾患を引き起こす原因となる病態である。動脈硬化症の発症・進展には脂質異常症が深く関わっており、スタチン系コレステロール低下薬が広く使われ、冠動脈疾患のイベント発生の減少に効果を発揮してきた。一方で、スタチン系薬剤は血漿コレステロール値を有意に低下させるが、それでも冠動脈疾患のイベント発生の減少は部分的で、血漿 LDL-コレステロール値のみでは説明できない残余リスクが存在することが指摘されている。動脈硬化の発症要因を解明するためには、LDLの質的な変化、HDLの関与、血管組織の炎症、血管の各種細胞の働きなど多様な要因についても検討する必要があると考えられている。

(2) 酸化変性を受けた低比重リポタンパク質 (oxLDL) は、マクロファージのコレステロール蓄積を促し、動脈硬化巣に集積する泡沫細胞形成の原因となりうることから、動脈硬化症の発症進展のリスク因子として考えられてきた。当研究室では、生体内で起こるリポタンパク質の質的变化に注目し、ヒト血漿中に存在する酸化 LDL の実態解明に取り組んできた。これまでに、抗酸化ホスファチジルコリン (oxPC) モノクローナル抗体を利用したサンドイッチ ELISA 法でヒト血漿中の oxLDL 測定系を構築し、ヒト血漿中や動脈硬化巣中に oxLDL が存在し、心筋梗塞の急性期に増加することを明らかにした。さらに、ヒト血漿 LDL 中には電気陰性度の異なる 2 つの oxLDL 画分が存在し、特に電気陰性度の高い oxLDL (LDL(-)画分) が急性心筋梗塞患者で増加していること、そしてこの LDL(-)画分が酸化変性を受けた HDL を伴っており、oxLDL-oxHDL 複合体様の新たな粒子である可能性を見出した¹⁾。

(3) 動脈硬化症のリスク因子として知られる oxLDL は、これまで多くの場合硫酸銅などの酸化開始剤を用いて試験管内の反応で作成したものをを用いて研究されてきた。血漿中の LDL(-)画分を分離できるようになると、銅酸化 oxLDL とは性状が大きく異なることが明らかとなってきた。銅酸化 oxLDL は、ホスファチジルコリン (PC) の多くが酸化反応を受け、脂質組成に占める oxPC、リゾ PC の比率が非常に上昇し、リゾ PC が約 30%にもなる²⁾。それに対して、LDL(-)画分の oxPC、リゾ PC の組成比率は未酸化の LDL からわずかに上昇するのみであるが、apoB-100、apoA1 タンパク質には多数の酸化的修飾が加えられている。

(4) 近年、好中球が自身の DNA を細胞外に放出して NETs を形成し、周囲の細菌を死滅させる生体防御機構が明らかにされた。初期免疫における好中球の新たな役割であるとともに、種々の組織炎症の原因ともなり、リウマチなどの自己免疫疾患をはじめ、急性冠症候群 (特に脂質蓄積が顕著な不安定プラークを伴わない症例)、血栓症を含む種々の疾患のリスクとなることが注目されている。当研究室では、前骨髄性白血病細胞株 HL-60 由来好中球を硫酸銅処理で調製した oxLDL 共存下で NETs 形成率が有意に増加することを見出している³⁾。

2. 研究の目的

動脈硬化症の発症進展のリスク因子として知られている oxLDL には、電荷状態の異なる 2 つの画分があり、そのうち電気陰性度の強い LDL (-)画分には HDL を伴った oxLDL-oxHDL 複合体様粒子が存在することを見出している。この新知見に基づいて、本研究では、生体内 oxLDL の形成過程で LDL-HDL 間にどのような相互作用があるのか、また生体内 oxLDL が血管内でどのような機能を持つのかについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 重水素標識 PC の分析

コリン部分の水素原子 H がすべて重水素 D に置換された d₁₃-ジパルミトイル PC は Avanti 社から購入し、ハチ毒ホスホリパーゼ A₂ 処理にて d₁₃-1-パルミトイル-リゾ PC を、さらに無水グルタル酸との縮合反応にて d₁₃-1-パルミトイル-2-グルタロイル-PC (PGPC) を作成した。

健常ヒト血漿から、KBr を用いた不連続密度勾遠心法で LDL および HDL を分離した。分離した LDL に d₁₃-リゾ PC を添加し、d₁₃-リゾ PC 標識 LDL とした。d₁₃-リゾ PC 標識 LDL をレシチン-アシル CoA 転移酵素 (LCAT) 阻害剤 (ジチオビスニトロ安息香酸: DTNB) 添加、非添加条件下、HDL と 37 °C でインキュベートした。0~4 時間反応後、KBr で比重 1.063 に調整して超遠心し、LDL と HDL を分離し、両画分中の脂質プロファイルを LC-MS/MS で分析した。脱離した d₁₃-ホスホコリンに相当する m/z=197 のフラグメントイオンを生じる脂質を調べることによって d₁₃-リゾ PC に由来する PC 各分子種を網羅的に追跡した。通常の PC 各分子種から生じるフラグメントイオンは m/z=184 なので、内在性リン脂質とは区別して選択的に標識脂質分子の代謝の様子を調べることができる。

また、同様に d₁₃-PGPC 標識 LDL を調製し、DTNB (LCAT 阻害剤) 添加、Lp-PLA₂ 阻害剤 (Pefabloc) 添加条件下、HDL と 37 °C でインキュベートした。0~4 時間反応後、KBr で比重

d=1.063 に調整して超遠心し、LDL と HDL を分離し、両画分中の脂質プロファイルを LC-MS/MS で分析した。

(2) LDL(-)の NETs 形成への効果

ヒト血漿から分離した LDL を陰イオン交換体である HiTrap Q Fast Flow カラム (GE Healthcare) を用いて分画した。LDL は 10mM Tris-HCl (pH 6.8) の緩衝液に置換し、カラムに載せたのちに、NaCl 濃度を 100mM、220mM、500mM と段階的に上昇させ、カラム吸着成分を溶出させた。LDL(-)は 500mM NaCl で溶出する画分であり、ここに oxLDL-oxHDL 複合体様の粒子が含まれている。LDL(-)画分は、超遠心にて濃縮後、透析して塩を除去し、BCA 法でタンパク濃度を測定してから、HL-60 由来好中球に添加した。

ヒト前骨髄性白血球細胞株 HL-60 は、all-*trans*-レチノイン酸添加して 4 日間培養し、好中球用細胞に分化させた。HL-60 由来好中球を 20nM ホルポールミリスレートアセテート (PMA) で 2h 刺激すると、NETs が形成され、細胞外に DNA の放出した像が観察される。培地の DNA を DNase で消化し、蛍光試薬 Sytox green を添加し蛍光強度を測定することで、細胞外に漏れ出た DNA 量を測定し NETs の形成度の指標とした。

4 . 研究成果

d₁₃-リゾ PC 標識 LDL と HDL を混合し、0~4h インキュベートすると、経時的に HDL 中の d₁₃-リゾ PC が増加するとともに、LDL と HDL 双方に d₁₃-ジアシル PC が増加した。このことから、oxLDL と HDL の共存下では、リゾ PC が容易に (おそらく自発な物理化学的な動きで) HDL に移行すること、さらにリゾ PC の一部は再アシル化されてジアシル PC となることが示された。この変化は LCAT 阻害剤の DTNB を添加することで抑制されたことから、リゾ PC のアシル化は、LCAT のもつトランスアシル化活性によるものと考えられた⁴⁾。

d₁₃-PGPC を LDL に添加すると、速やかに分解され多くが d₁₃-リゾ PC になってしまった。リポタンパク質ホスホリパーゼ A₂ (Lp-PLA₂: PAF アセチルヒドロラーゼと同じ酵素) 阻害剤である pefabloc 存在下で d₁₃ リゾ PC 標識 LDL が調製できたことから、d₁₃-PGPC は容易に LDL 中の Lp-PLA₂ で分解されることが分かった。d₁₃-リゾ PC 標識 LDL と HDL を混合し、pefabloc および DTNB 存在下で 0~4h インキュベートすると、緩やかながら経時的に HDL 中の d₁₃-PGPC が増加した。リゾ PC に比べると、リポタンパク質粒子間の移行が遅いものの、粒子間の移行が起こると考えられる。

これらの結果から、oxLDL 中に生じた短鎖型 oxPC やリゾ PC は、HDL 存在下では他のリポタンパク質粒子に移行し、さらに酵素的に代謝され、リゾ PC を経てジアシル PC にリモデリングされることが分かった。生体内 (血中、組織液中) では HDL など種々のリポタンパク質が共存しており、リポタンパク質間の相互作用が常に起こっているものと考えられた。生体内の oxLDL-oxHDL の形成過程で、短鎖型 oxPC やリゾ PC は粒子間を移動し代謝されてしまうため、蓄積しにくいと考えられる。

HL-60 由来好中球を PMA で刺激する際に銅酸化 oxLDL を共存させると、NETs の形成度が増強される。同様の条件で、ヒト血漿から分離した LDL(-)画分を添加して HL-60 由来好中球を刺激したところ、NETs の形成が促進された。このことから、LDL の酸化変性は血管組織の動脈硬化巣で進行すると考えられており、LDL(-)画分は破綻した動脈硬化プラークから血中に遊離してくることも示されている。生体内で産生される oxLDL-oxHDL 複合体様粒子には、血管炎症惹起を促進させる可能性を持つものと考えられた。

< 引用文献 >

- 1 . Sawada N, Obama T, Koba S, Takaki T, Iwamoto S, Aiuchi T, Kato R, Kikuchi M, Hamazaki Y, Itabe H.: Circulating oxidized LDL increased in patients with acute myocardial infarction is accompanied by heavily modified HDL. *J. Lipid Res.* 2020, 61:816-829. doi: 10.1194/jlr.RA119000312.
- 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.*, 2014, 13:48 doi:10.1186/1476-511X-13-48
- 3 . Obama T, Ohinata H, Takaki T, Iwamoto S, Sawada N, Aiuchi T, Kato R, Itabe H.: Cooperative action of oxidized low-density lipoproteins and neutrophils on endothelial inflammatory responses through neutrophil extracellular trap formation. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10:1899. doi: 10.3389/fimmu.2019.01899
- 4 . Sawada N, Obama T, Mizuno M, Fukuhara K, Iwamoto S, Aiuchi Y, Makiyama T, Itabe H.: Transfer and enzyme-mediated metabolism of oxidized phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine between low- and high-density lipoproteins. *Antioxidants* 2020, 9:E1045. doi: 10.3390/antiox9111045.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Hibiki Odanaka, Takashi Obama, Naoko Sawada, Marika Sugano, Hiroyuki Itabe, Matsuo Yamamoto.	4. 巻 53
2. 論文標題 Comparison of protein profiles of the pellicle, gingival crevicular fluid, and saliva: possible origin of pellicle proteins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological Research	6. 最初と最後の頁 3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40659-020-0271-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Naoko Sawada, Takashi Obama, Shinji Koba, Takashi Takaki, Sanju Iwamoto, Toshihiro Aiuchi, Rina Kato, Masaki Kikuchi, Yuji Hamazaki, Hiroyuki Itabe	4. 巻 61
2. 論文標題 Circulating oxidized LDL increased in patients with acute myocardial infarction is accompanied by heavily modified HDL.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 816-829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.RA119000312.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Naoko Sawada, Takashi Obama, Mirei Mizuno, Kiyoshi Fukuhara, Sanju Iwamoto, Toshihiro Aiuchi, Tomohiko Makiyama and Hiroyuki Itabe	4. 巻 9
2. 論文標題 Transfer and enzyme-mediated metabolism of oxidized phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine between low- and high-density lipoproteins.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 E1045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9111045.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takashi Obama, Hiroyuki Itabe	4. 巻 21
2. 論文標題 Neutrophils as a novel target of modified low-density lipoproteins and an accelerator of cardiovascular diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21218312.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Obama Takashi, Ohinata Hitomi, Takaki Takashi, Iwamoto Sanju, Sawada Naoko, Aiuchi Toshihiro, Kato Rina, Itabe Hiroyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Cooperative action of oxidized low-density lipoproteins and neutrophils on endothelial inflammatory responses through neutrophil extracellular trap formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2019.01899	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Obama Takashi, Miyazaki Takuro, Aiuchi Toshihiro, Miyazaki Akira, Itabe Hiroyuki	4. 巻 149
2. 論文標題 Evaluation of protein-protein interactions using an on-membrane digestion technique	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e59733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/59733	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawata Naoto, Kang Dedong, Aiuchi Toshihiro, Obama Takashi, Yoshitake Osamu, Shibata Takanori, Takimoto Masafumi, Itabe Hiroyuki, Honda Kazuho	4. 巻 25
2. 論文標題 Proteomics of human glomerulonephritis by laser microdissection and liquid chromatography tandem mass spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nephrology	6. 最初と最後の頁 351 ~ 359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nep.13676	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Itabe Hiroyuki, Kato Rina, Sawada Naoko, Obama Takashi, Yamamoto Matsuo	4. 巻 26
2. 論文標題 The Significance of oxidized low-density lipoprotein in body fluids as a marker related to diseased conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 1576 ~ 1593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/0929867325666180307114855	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itabe H, Sawada N, Makiyama T, Obama T	4. 巻 9
2. 論文標題 Structure and dynamics of oxidized lipoproteins in vivo: roles of high-density lipoprotein.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9060655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shunji Kato, Yusuke Osuka, Saoussane Khalifa, Takashi Obama, Hiroyuki Itabe, Kiyotaka Nakagawa.	4. 巻 10
2. 論文標題 Investigation of lipoproteins oxidation mechanisms by the analysis of lipid hydroperoxide isomers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10101598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 澤田直子、板部洋之、小濱孝士、木庭新治、巖本三壽、高木孝士、Wirapol Phimarn、牧山智彦、相内敏弘
2. 発表標題 HDLを伴った血中酸化リポタンパク質粒子の生成と動脈硬化症
3. 学会等名 第93回 日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 板部洋之
2. 発表標題 血中酸化リポタンパク質の実態：LDLとHDLの関わりについて
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田直子、小濱孝士、巖本三壽、木庭新治、高木孝士、相内敏弘、板部洋之
2. 発表標題 血中酸化リポタンパク質生成におけるHDLの関わり。
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Naoko Sawada, Takashi Obama, Sanju Iwamoto, Shinji Koba, Toshihiro Aiuchi, Rina Kato, Hiroyuki Itabe
2. 発表標題 Structure and compositional analysis of oxidized low-density lipoproteins present in plasma from healthy subjects and patients with atherosclerosis
3. 学会等名 The 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田直子、小濱孝士、福原潔、水野美麗、巖本三壽、相内敏弘、板部洋之
2. 発表標題 安定同位体リポドミクスを利用したLDL-HDL間の酸化PC代謝解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 澤田直子、小濱孝士、巖本三壽、木庭新治、高木孝士、相内敏弘、板部洋之
2. 発表標題 急性心筋梗塞患者血中に増加している酸化HDL-LDL複合体について
3. 学会等名 第61回日本脂質生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Itabe, N. Sawada T. Obama, S.
2. 発表標題 Involvement of high-density lipoprotein in oxidatively modified forms of low-density lipoproteins in human circulation.
3. 学会等名 SFRR-India 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 澤田直子、小濱孝士、巖本三壽、木庭新治、高木孝士、相内敏弘、板部洋之
2. 発表標題 血中酸化リポタンパク質生成におけるHDLの関わり
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 板部洋之
2. 発表標題 血中酸化リポタンパク質の実態：LDLとHDLの関わりについて
3. 学会等名 第73回日本酸化ストレス学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 板部洋之、小濱孝士
2. 発表標題 感染症とリポタンパク質
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小濱孝士、板部洋之
2. 発表標題 生体内酸化LDL研究の進展
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究内容 http://www10.showa-u.ac.jp/~biolchem/sub2.htm 最近の研究業績 http://www10.showa-u.ac.jp/~biolchem/sub4.htm</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	澤田 直子 (笹部直子) (SAWADA Naoko) (50643566)	昭和大学・薬学部・助教 (32622)	
研究分担者	小濱 孝士 (OBAMA Takashi) (60395647)	昭和大学・薬学部・准教授 (32622)	
研究分担者	牧山 智彦 (MAKIYAMA Tomohiko) (60733102)	昭和大学・薬学部・助教 (32622)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------