

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07069

研究課題名(和文)好中球細胞外トラップ形成への酸化変性リポタンパク質の寄与と血管炎症誘導機構の解析

研究課題名(英文) Effects of oxidized lipoproteins on neutrophil extracellular trap formation followed by vascular inflammation

研究代表者

小濱 孝士 (Obama, Takashi)

昭和大学・薬学部・准教授

研究者番号：60395647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：NETsとLDLまたは銅酸化LDLで引き起こされる血管内皮細胞の形態変化には、エンドサイトーシスと内皮間葉転換が関与することを見出した。生体内酸化LDLは、銅酸化LDLよりも穏やかではあるがHL-60由来好中球のNETs形成を促進した。銅酸化LDLとその構成成分である酸化リン脂質とlysoPCにより促進されるNETs形成は、HDLの共存により抑制された。銅酸化HDLではこの抑制作用が消失しただけでなく、銅酸化LDLと同様にNETs形成を促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

循環器系疾患の危険因子である酸化LDLの生理的役割について、これまでに知られているマクロファージの泡沫化を介した血管壁での脂質蓄積促進作用に加えて、好中球のNETs形成の促進とともに血管内皮の炎症惹起と形質変化を促す新たな機序が見出される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that endocytosis and endothelial-mesenchymal transition are involved in the morphological changes of vascular endothelial cells induced by NETs and LDL or copper-oxidized LDL. In vivo oxidized LDL promoted NET formation of HL-60-derived neutrophils more mildly than copper-oxidized LDL. Enhanced NET formation induced by copper-oxidized LDL and its components, oxidized phospholipids and lysoPC, was inhibited by the coexistence of HDL. Oxidation of HDL not only abolished these inhibitory effects but also promoted NETs formation similarly to copper-oxidized LDL.

研究分野：脂質生化学

キーワード：好中球細胞外トラップ 血管内皮細胞 酸化LDL HDL 動脈硬化症

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 好中球細胞外トラップ (neutrophil extracellular traps: NETs) は、自身の染色体 DNA を細胞外に投網のように放出して外来病原菌を絡めとる現象で、初期免疫応答の一つとして解析されてきた。しかし一方で NETs は非感染性の多くの疾患でも見いだされることが次第に明らかとなり、血管組織では血栓や動脈硬化病巣にも見出されるようになった。NETs は、周辺の細胞や組織を傷害し様々な疾患の要因となることが注目されており、動脈硬化病巣が形成される過程にも影響を及ぼすといわれている。動脈硬化病巣にはマクロファージのみならず好中球も浸潤することが知られているが、好中球の活性化や NETs 形成がどのような仕組みで病巣形成に関わるのかは未だ十分には解明されていない。特に NETs 形成に対するリポタンパク質の影響については報告が極めて少なく、不明な点が多い。

(2) 酸化 LDL は、動脈硬化病巣に蓄積するだけでなく循環血中にも存在し、炎症惹起性が強く循環器系疾患の発症に繋がる因子として認識されてきた。これまで動脈硬化病変の形成過程における酸化 LDL の役割については、主にマクロファージによる取込みで引き起こされる血管壁での脂質蓄積の促進と、血管内皮細胞に対する炎症惹起性が主な作用機序として理解されてきた。しかし好中球とその NETs 形成に対する酸化 LDL の影響については未解明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、組織傷害をもたらす NETs 形成と炎症惹起性を有する酸化 LDL とが相乗的に血管障害を引き起こすのではないかと仮説を立てて検討を進めた。血管組織では特に内膜が循環血中の好中球とリポタンパク質に暴露されやすいことから、ヒト大動脈血管内皮細胞 (HAECs) に NETs とリポタンパク質を作用させたときの応答を解析した。

(2) 当研究室ではこれまでに、in vitro で利用される銅酸化 LDL だけでなく、ヒト血漿から分離した in vivo 酸化 LDL についても構造解析を進めてきた。本研究では、in vitro および in vivo の酸化 LDL を用いて、両酸化 LDL の好中球 NETs 形成への寄与を比較した。また酸化 LDL を構成する酸化リン脂質や lysoPC による NETs 形成について、さらに HDL の影響についても解析した。

3. 研究の方法

(1) HL-60 細胞を all-*trans* retinoic acid で 4 日間処理して好中球様細胞に分化誘導した。この細胞を poly-L-Lysine コートした well に播種した後、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で 30 min 刺激した。培養上清を除去して培地で wash することで PMA を除去した後、LDL または銅酸化 LDL を含む培地に置換してさらに 2 hr incubate した。回収した培養上清を用いて HAECs を刺激した。LDL の HAECs への取り込みについて、蛍光標識した LDL (DiI-LDL) を用いて刺激した後の HAECs を蛍光顕微鏡で観察した。また HAECs タンパク質の発現変動を western blot で解析した。

(2) NETs 形成に対するリポタンパク質および酸化リン脂質の影響: poly-L-Lysine コートした well に播種した好中球用細胞を Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で 30 min 刺激し、さらにリポタンパク質やリン脂質を含む培地で刺激した。銅酸化 LDL や酸化リン脂質、lysoPC をあらかじめ HDL と 37°C で 4 hr インキュベートした。培養上清中に放出された NETs 由来 DNA を Micrococcal Nuclease で部分切断し、SYTOX Green を混和して定量解析した。また培養上清中に放出されたミエロペルオキシダーゼ (MPO) を western blot により解析した。

(3) 生体内酸化 LDL の調製: 健常ヒト血漿から LDL を分画し、さらに陰イオン交換カラムで 0.5 M NaCl で溶出される画分を LDL (-) として回収し、NaCl を透析除去して用いた。好中球様細胞の NETs 形成への影響について、銅酸化 LDL や酸化リン脂質、lysoPC と比較した。

4. 研究成果

(1) NETs 形成により放出されるプロテアーゼによる LDL の変性

HL-60 由来好中球を PMA で刺激して NETs を誘導した後、その培養上清を健常ヒト血漿から分画した LDL と混和してインキュベートした。Western blot により apoB を検出した結果、NETs を含む培養上清の共存により 200 kDa 未満の多くの apoB 断片が生じた。次に、好中球の代表的なプロテアーゼであるカテプシン G とエラスターゼの寄与について各阻害剤の有無で比較した。その結果、エラスターゼ阻害剤により apoB 断片化が顕著に抑制されたことから、NETs による LDL 変性にはエラスターゼの寄与が大きいことを見出した。

(2) NETs 形成による放出物と LDL で誘導される HAECs の応答

- ①エンドサイトーシスの関与：エンドサイトーシス初期に機能する調節因子である Rab5 の機能消失型変異体 (dnRab5) を過剰発現させた HAECs では、蛍光色素で標識した LDL (DiI-LDL) の取り込みが消失したことから、HAECs のエンドサイトーシスが抑制されたことを確認した。この細胞を用いて、NETs と LDL で刺激したときに引き起こされる応答を解析した。その結果、エンドサイトーシス抑制 HAECs では NETs と LDL による細胞伸長がほぼ消失したことから、NETs と LDL により引き起こされる応答には HAECs のエンドサイトーシスが関与することが示唆された。
- ②内皮間葉転換の関与：NETs と LDL または酸化 LDL を用いて HAECs を刺激すると、VE-cadherin の減少や転写因子 Snail-1 発現の上昇、さらに α SMA の増加が観察された。これらの結果から、HAECs の応答には内皮間葉転換が関与するシグナル系を介して進行する可能性が強く示唆された。

(3) 生体内酸化 LDL と酸化リン脂質、HDL の NETs 形成への影響

①生体内酸化 LDL と銅酸化 LDL による NETs 形成促進の比較

健康ヒト血漿から分画した LDL (-) と銅酸化 LDL を用いて、HL-60 由来好中球を PMA 刺激して誘導される NETs 形成に対する影響を解析した。LDL (-) は NETs 形成を促進したが、銅酸化 LDL による促進のおよそ 60% と穏やかだった。銅酸化 LDL は単独でも有意に NETs 形成を誘導したのに対し、LDL (-) では単独刺激での NETs 誘導は検出されなかった (図 1)。LDL (-) の酸化脂質と lysoPC 含量は銅酸化 LDL よりも少ないことから (1)、両者の酸化 LDL における酸化リン脂質量が影響すると考えられたため、lysoPC や酸化リン脂質 (POVPC, PGPC, PAzPC) の NETs 形成への影響を解析した結果、これらリン脂質による NETs 形成促進が観察された。

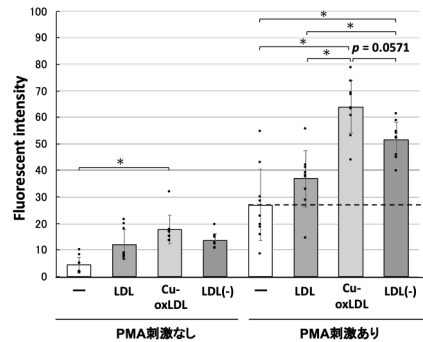


図 1. 銅酸化 LDL と LDL (-) による NETs 形成促進

②HDL による NETs 形成の抑制

LDL (-) は銅酸化 LDL よりも酸化 PC や lysoPC の含量が少ないものの、LDL 粒子と HDL 粒子がともに酸化変性を受けて共存することを当研究室で見出した (1)。そこで次に、酸化 LDL による NETs 形成促進における HDL の影響を解析した。銅酸化 LDL による NETs 形成の促進は、native HDL との共存により容量依存的に部分的に抑制された (図 2)。一方、POVPC および lysoPC をあらかじめ HDL と混合すると、NETs 形成の促進がほぼ消失した。これらの結果から、HDL は酸化を受けた LDL やリン脂質による NETs 形成促進を抑制する働きを持つことが示された。

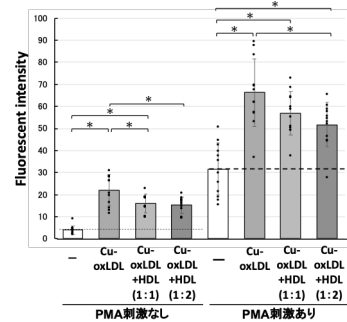


図 2. 銅酸化 LDL NETs 形成促進と HDL による抑制

③HDL の酸化による NETs 形成抑制の消失

次に、HDL を銅酸化して調製した酸化 HDL を用いて、NETs 形成への影響を解析した。銅酸化 HDL では、酸化 LDL や酸化 PC、lysoPC に対して示された NET 形成抑制効果がほぼ消失した。さらに、酸化 HDL は銅酸化 LDL と同様に単独でも NETs 形成を促進することが見出された (図 3)。HDL は lysoPC や酸化 PC による NETs 形成促進を完全に消失させた。これらリン脂質が HDL の脂質層へ取り込まれたことや apoA-I と結合した可能性が考えられた。銅酸化 LDL による NETs 形成促進は部分的な抑制だったことから、酸化 LDL のタンパク質成分も NETs 形成促進に寄与する可能性が考えられる。

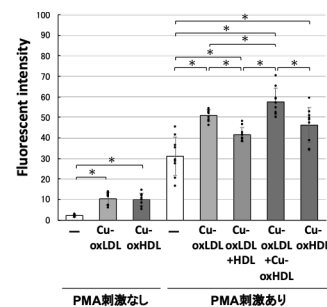


図 3. HDL の酸化による NETs 形成促進能の消失

<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 Jun;61(6):816-829.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12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 Itabe H, Sawada N, Makiyama T, Obama T.	4. 巻 9(6)
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 Obama T, Itabe H.	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 Int J Mol Sci .	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 Sawada N, Obama T, Koba S, Takaki T, Iwamoto S, Aiuchi T, Kato R, Kikuchi M, Hamazaki Y, Itabe H.	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 J Lipid Res .	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 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 小濱孝士、板部洋之	4. 巻 9
2. 論文標題 動脈硬化とNETs：酸化LDLとの相乗的作用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thrombosis Medicine	6. 最初と最後の頁 304 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Ohinata Hitomi、Obama Takashi、Makiyama Tomohiko、Watanabe Yuichi、Itabe Hiroyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 High-Density Lipoprotein Suppresses Neutrophil Extracellular Traps Enhanced by Oxidized Low-Density Lipoprotein or Oxidized Phospholipids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13992 ~ 13992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232213992	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、Obama Takashi	4. 巻 24
2. 論文標題 The Oxidized Lipoproteins In Vivo: Its Diversity and Behavior in the Human Circulation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5747 ~ 5747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24065747	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 Kato Shunji, Osuka Yusuke, Khalifa Saoussane, Obama Takashi, Itabe Hiroyuki, Nakagawa Kiyotaka	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 ~ 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 -

1. 著者名 小瀨孝士、板部洋之	4. 巻 48
2. 論文標題 血管炎症誘導における酸化変性リポタンパク質と好中球細胞外トラップ形成の相乗作用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 300-302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小瀨孝士、板部洋之
2. 発表標題 好中球細胞外トラップ：感染防御から血管疾患の増悪へ
3. 学会等名 第21回 Pharmaco-Hematologyシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小瀨孝士、澤田直子、牧山智彦、板部洋之
2. 発表標題 好中球細胞外トラップ形成におけるLysoPCの関与
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小瀨孝士、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

1. 発表者名 小瀨孝士、板部洋之
2. 発表標題 血管疾患における好中球細胞外トラップの役割と酸化LDLの関与
3. 学会等名 第62回日本脂質生化学会ミニシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Obama, Naoko Sawada, Toshihiro Aiuchi, Rina Kato and Hiroyuki Itabe
2. 発表標題 Oxidatively modified low-density lipoproteins enhance endothelial inflammatory responses through accelerated neutrophil extracellular trap formation
3. 学会等名 The 9th SFRR-Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小瀨孝士、大日方瞳、高木孝士、澤田直子、相内敏弘、板部洋之
2. 発表標題 酸化LDLによる好中球細胞外トラップ形成促進と血管内皮細胞の応答
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 小瀨孝士、大日方瞳、高木孝士、澤田直子、相内敏弘、板部洋之
2. 発表標題 好中球細胞外トラップ形成を介した酸化LDLの血管内皮細胞炎症誘導
3. 学会等名 第20回Pharmaco-Hematologyシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石田麻育花、太田彩美、石原季歩、重松拓弥、佐藤智香子、相内敏弘、澤田直子、小瀨孝士、板部洋之
2. 発表標題 好中球細胞外トラップ由来プロテアーゼによるLDL変性の解析
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石原季歩、小河実花、石田麻育花、太田彩美、高木孝士、相内敏弘、澤田直子、小瀨孝士、板部洋之
2. 発表標題 HL-60由来好中球細胞外トラップの電子顕微鏡による観察
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小瀨孝士、高木孝士、澤田直子、相内敏弘、板部洋之
2. 発表標題 好中球細胞外トラップ形成によるリポタンパク質変性の促進
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 小瀨 孝士、大日方 瞳、澤田 直子、渡邊 雄一、牧山 智彦、板部 洋之
2. 発表標題 生体内酸化LDLおよび酸化PCの好中球細胞外トラップ形成の増強作用とHDLの影響
3. 学会等名 第32回ビタミンE研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大日方 瞳、小瀨 孝士、牧山 智彦、渡邊 雄一、板部 洋之
2. 発表標題 好中球細胞外トラップ (NETs) 形成におけるリポタンパク質の作用
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大日方 瞳、小瀨 孝士、渡邊 雄一、牧山 智彦、板部 洋之
2. 発表標題 HDLが好中球細胞外トラップ形成に与える影響
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 雄一、小瀨 孝士、牧山 智彦、板部 洋之
2. 発表標題 ステロールが好中球細胞外トラップに与える影響
3. 学会等名 第64回日本脂質生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 雄一、小瀨 孝士、牧山 智彦、板部 洋之
2. 発表標題 ステロール類が及ぼす好中球細胞外トラップへの影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>昭和大学薬学部基礎薬学講座生物化学部門 http://www10.showa-u.ac.jp/~biolchem/ 昭和大学薬学部基礎薬学講座生物化学部門 研究内容 http://www10.showa-u.ac.jp/~biolchem/sub2.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
研究協力者	牧山 智彦 (Makiyama Tomohiko)		

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
---------	---------