

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 2日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21590073

研究課題名（和文） 動脈硬化症の原因となる発症初期の血漿酸化LDLの生成機序解明とその抑制

研究課題名（英文） Generation of plasma oxidized LDL in the early stages of atherosclerosis

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

研究成果の概要（和文）： 粥状硬化巣がほとんど見られない10週齢 apoE ノックアウトマウスの大動脈で、脂質過酸化物の沈着が内膜および中膜平滑筋部分にも認められた。この大動脈のタンパク質プロファイルを調べた。動脈硬化好発部位を含む起始部および弓部に対して、初期には病巣形成がほとんど見られない胸部および腹部の大動脈を比較したところ、抗酸化酵素ペルオキシレドキシシン2 (Prx2)、平滑筋細胞の分化マーカーである SM22 の発現が起始部・弓部<胸部・腹部下部であり、好発部位の平滑筋細胞の脱分化傾向が高く、酸化ストレスに対する抵抗性が低下している可能性が注目された。大動脈起始部の Prx2 発現は、4週齢に比べ10および20週齢で低下していた。中膜で Prx2 発現が高い部位では、隣接する内膜へのマクロファージの浸潤はほとんどみられなかった。内膜にごく少数のマクロファージの浸潤がみられた部位では中膜 Prx2 の発現が極めて低く、中膜 Prx2 の発現低下によりマクロファージが浸潤し易くなる可能性が考えられた。マクロファージが集積し内膜肥厚が進行し始めた部位では内膜、中膜とも Prx2 の発現も増強していた。内膜へマクロファージの浸潤が進行し、炎症性細胞の増加とともに中膜の Prx2 の発現は上昇する傾向があるのではないかと推察された。これらの結果から、大動脈に動脈硬化が進展する初期過程において、中膜平滑筋細胞で抗酸化タンパク質の Prx2 の発現低下が生じ酸化ストレスが亢進することが、脂質過酸化を引き起こし、動脈硬化進展の引き金を引く初期イベントとして重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： Deposition of lipid peroxidation products was found in intimal and medial regions in aortas of apoE-knockout mice at 10 week old in which very little atherosclerotic lesion was formed. The protein profiles of the two aortic tissues, aortic origin and aortic arch which are prone to atherosclerotic lesion formation, and thoracic and abdominal aortas which form atherosclerotic lesions much later, were examined. We found that peroxiredoxin 2 (Prx2), an anti-oxidative stress enzyme, and SM22, a marker for smooth muscle cell differentiation, were reduced expressions in the athero-prone tissues, suggesting a possibility that athero-prone tissue reduces its anti-oxidative stress potential and increase smooth muscle differentiation status. In aortic origin, Prx2 expression was high at 4 weeks of age and lower at 10 and 20 weeks of age. At sites of medial layer with high expression of Prx2, migration of macrophages into adjacent intima was scarcely observed. When a few macrophages are present in intima, the adjacent medial tissue has very low expression of Prx2. It is possible that transmigration of macrophages into intima may be facilitated by reduction of medial Prx2 expression. In the lesions with intimal thickening with a number of accumulated macrophages Prx2 expression increased in both medial and intimal tissues. Accumulation of inflammatory cells in intima could enhance Prx2 expression in media. From these observations, in the very early stages of atherosclerosis in mouse aortas, decrease in anti-oxidative enzyme Prx2 expression could increase oxidative stress in the tissues and induce lipid peroxidation. Such a temporal change would be important event as a trigger of the early steps of atherosclerosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,500,000	450,000	1,950,000
22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
23年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：動脈硬化症、酸化ストレス、酸化 LDL、ペルオキシレドキシン、血管平滑筋、apoE-ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症は、心筋梗塞や狭心症、あるいは脳梗塞、脳塞栓などの循環器疾患を引き起こす病態である。日本では、高齢化社会の到来とライフスタイルの変化により、患者数が増加しつつあり、また虚血性心疾患と脳血管障害を合わせれば死因の第一位を占める。動脈硬化症の発症・進展機序には多くの要因が関わっているが、酸化ストレスとそれにより生成する変性リポタンパク質（酸化 LDL）は重要な病態マーカーであり、また発症・進展要因の一つであると考えられている。

我々は、酸化変性した低比重リポタンパク質（酸化 LDL）に対する特異的モノクローナル抗体（DLH3）を用いた血漿酸化 LDL の測定法を構築し、世界に先駆けて血漿中に酸化 LDL が存在すること、循環器疾患のマーカーとしての有用性を示してきた（Ehara S, et al, 2001, *Circulation* 103:1955; Naruko T, et al, 2006, *ATVB* 26:877）。これまでの研究から、血漿酸化 LDL 値が心筋梗塞や不安定狭心症などの疾患に伴って高値となること、心筋梗塞や脳梗塞急性期の血漿酸化 LDL 値上昇は一過的であること、さらに一旦上昇した血漿酸化 LDL 値が低下しない心筋梗塞患者は、再狭窄リスクが非常に高いことなどを見出している。これまで我々を含む複数のグループ（Tsimikas S, et al, 2004, *Circulation*, 109:3164; Holvoet P, et al, 2001, *ATVB* 21:844）の報告から、酸化 LDL と循環器疾患との関連性が証明されている。

しかしながら、生体内での酸化 LDL 生成機構は未だ明らかではない。我々は最近、マウス血漿酸化 LDL の測定系を構築し、動脈硬化症モデルマウスで病巣形成過程における酸化 LDL の経時的変動を初めて明らかにできた（Kato R, et al, 2009, *ATVB* 29:33）。動脈硬化モデル動物であるアポ E ノックア

ウトを用いた検討から、酸化 LDL が動脈硬化の進展に先立って生じていること、そして大動脈中膜において酸化ストレスが亢進していることを見出したことから、動脈硬化発症のごく初期に注目した研究により、生体内で酸化 LDL の生成機構を解明できる可能性に注目している。

2. 研究の目的

本研究では、動脈硬化発症につながる脂質過酸化反応の進行が生体内でいつどのように起こるのか、その最初の変化が起こるしくみを明らかにすることを目的とした。それにより、動脈硬化発症の最初の引き金になるイベントが何であるのか、そしてその後の発症進展の機構を明確化することにもつながると考えた。さらには、動脈硬化症の予防的薬物治療への可能性を示すことができるかもしれないと考えている。

3. 研究の方法

プロテオミクス解析

10 週齢の apoE ノックアウトマウスの大動脈を起始部から腎動脈との分岐部付近まで摘出し、外膜を除去した。動脈硬化好発部位である起始部および弓部と、初期には病巣形成がほとんど見られない胸部および腹部大動脈の 2 サンプルに分けて、ホモジェネートを調製し、二次元電気泳動によるタンパク質プロファイルを比較した。二次元電気泳動で検出された 100 個以上のスポットのタンパク質を MALDI-TOF MS により同定した。

免疫組織化学染色

10 週齢の apoE ノックアウトマウスの大動脈を起始部から腎動脈との分岐部付近まで、

異なる4つの部位に分けて切片を作成し、脂質沈着はオイルレッドO染色、以下の種々抗原物質は免疫組織染色をおこない、その分布を比較した。LDLは抗apoB抗体で、マクロファージは抗CD68抗体、脂質過酸化反応産物は、DLH3抗体（抗酸化ホスファチジルコリン）と抗アクロレイン抗体、そして抗酸化酵素ペルオキシレドキシニン、平滑筋細胞の分化マーカーSM22に対する抗体も用いた。

4. 研究成果

動脈硬化の進行度は大動脈の部位により異なり、起始部から大動脈弓にかけては進行が早く、胸部から腹部にかけての大動脈では進行が遅い。10週齢の大動脈では、起始部に粥状硬化巣がわずかにできている程度で、胸部、腹部大動脈では病変はほとんど見られない。この傾向は、組織切片で観察した脂質沈着の他、マクロファージ、apoB、の分布とも一致し、マクロでの所見が確認された。

一方、酸化ホスファチジルコリンを認識するDLH3抗体で組織染色した結果、内膜のみならず中膜部分にも沈着が認められた。脂質過酸化反応産物のアクロレインに対する抗体を用いた検討でも、内膜および中膜部分が陽性であった。また、これらの抗体とapoBに対する抗体との二重染色では、内膜において一部の抗原は共局在を示したものの、apoBとは一致しない過酸化脂質の抗原物質も沈着していた。

これらの結果から、apoEノックアウトマウスの動脈硬化の粥状硬化巣が進展する以前の初期病変では、既に過酸化脂質の沈着が認められ、酸化ストレスの充進が病変の形成に関わっている可能性が示唆された。過酸化脂質はapoB沈着のない中膜平滑筋層でも認められ、リポタンパク質のみならず、細胞膜等の脂質の酸化変性も重要である可能性が考えられた。

10週齢のapoEノックアウトマウスの大動脈ホモジェネートを調製し、二次元電気泳動によるタンパク質プロファイルを求めた。動脈硬化好発部位を含む起始部および弓部に対して、初期には病巣形成がほとんど見られない胸部および腹部の大動脈を比較した。二次元電気泳動で分離した100個以上のスポットのタンパク質をMALDI-TOF MSにより同定した。大動脈の異なる部位間で発現量に差が見られたスポットについて注目したところ、いくつかの興味あるタンパク質を見出すことができた。特に、①抗酸化酵素の一つであるペルオキシレドキシニン2 (Prx2) の発現は、上部大動脈<下部大動脈であり、組織抗酸化能の低下が動脈硬化の発症に先立って起こっている可能性が示唆された。②平滑筋細

胞の分化マーカーであるtransgelin (SM22) の発現が上部大動脈<下部大動脈であり、好発部の平滑筋細胞の脱分化傾向が高いこと、の2つの変化が注目された。

抗酸化酵素の一つであるPrx2の発現が動脈硬化好発部位で低下していることを、ウェスタンブロット、免疫組織染色で確認した。Prx2の発現分布を調べたところ、胸部大動脈の中膜は全体的にPrx2が強く発現していたのに対し、大動脈起始部の中膜ではPrx2が胸部大動脈と同程度に発現する領域と発現が低い領域が混在していた。大動脈起始部のPrx2発現は、4週齢に比べて10および20週齢で低く、抗酸化タンパク質が病巣形成期前には発現が高かったもののその後経時的に減少する可能性が示された。

10週齢の大動脈起始部で中膜のPrx2の発現部位とCD68陽性マクロファージの内膜への浸潤部位を比較した。中膜でPrx2発現が高い部位では、隣接する内膜へのマクロファージの浸潤はほとんどみられなかった。内膜にごく少数のマクロファージの浸潤がみられた部位では中膜Prx2の発現が極めて低く、中膜Prx2の発現低下により、マクロファージの浸潤が起り易くなる可能性が考えられた。

マクロファージが集積し内膜肥厚が進行し始めた部位を調べると、多数のマクロファージが集まっている内膜にPrx2が強く発現しているだけでなく、隣接する中膜でもPrx2の発現も増加していた。内膜へマクロファージの浸潤が進行し、炎症性細胞の増加とともに中膜のPrx2の発現は上昇する傾向があるのではないかと推察された。

これらの結果から、大動脈に動脈硬化が進展する初期過程において、中膜平滑筋細胞で抗酸化タンパク質のPrx2の発現低下が生じ酸化ストレスが充進することが、脂質過酸化を引き起こし、動脈硬化進展の引き金を引く初期イベントとして重要である可能性が示唆された。

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15件)

① 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, 29(1):33-39.

② Nishihira K, Imamura T, Ishikawa T,

Yamashita A, Shibata Y, Itabe H, Kitamura K, Asada Y.: Interleukin-10 correlates with oxidized low density lipoprotein in coronary culprit plaques. **Thromb. Res.** 2009, 124:335-337.

③ Shibata N, Toi S, Shibata T, Uchida K, Itabe H, Sawada T, Kawamata T, Okada Y, Uchiyama S, Kobayashi M.: Immunohistochemical detection of 13(R)-hydroxyoctadecadienoic acid in atherosclerotic plaques of human carotid arteries using a novel specific antibody. **Acta Histochem. Cytochem.** 2009, 42:197-203.

④ Sakiyama Y, Kato R, Inoue S, Suzuki K, Itabe H, and Yamamoto M.: Detection of oxidized low-density lipoproteins in gingival crevicular fluid from dental patients. **J. Periodont. Res.** 2010, 45(2):216-222.

⑤ Suzuki K, Sakiyama Y, Usui M, Obama T, Kato R, Itabe H, Yamamoto M.: Oxidized low-density lipoproteins increases IL-8 production in human gingival epithelial cell line Ca9-22. **J. Periodont. Res.** 2010, 45(4):488-495.

⑥ Itabe H.: Oxidative modification of LDL: Its pathological role in atherosclerosis. **Clin. Rev. Allergy Immun.** (2009) 37:4-11.

⑦ Itabe H.: Circulating oxidized lipoproteins and Cardiovascular Risk. **Cur. Cardiovasc. Risk Rep.** (2009) 3:18-22.

⑧ Hoshino S, Konishi M, Mori M, Shimamura M, Nishitani C, Kuroki Y, Koyanagi, Kano S, Itabe H, Ishizaka Y.: HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. **J. Leukocyte Biol.** 2010, 87:1133-1143.

⑨ Takahashi K, Sasabe N, Ohshima K, Kitazato K, Kato R, Masuda Y, Tsurumaki M, Obama T, Okudaira S, Aoki J, Arai H, Yamaguchi T, Itabe H.: Glucagon regulates intracellular distribution of adipose differentiation-related protein during triacylglycerol accumulation in the liver. **J. Lipid Res.** 2010, 51(9): 2571-2580.

⑩ Itabe H, Obama T, Kato R.: The dynamics of oxidized LDL during atherogenesis. **J.**

Lipids, 2011 (2011), Article ID 418313, 1-9.

⑪ Shibata T, Shimozu Y, Wakita C, Shibata N, Kobayashi M, Machida S, Kato R, Itabe H, Zhu X, Sayre LM, Uchida K.: Lipid peroxidation modification of protein generates N ϵ -(4-oxononoyl)lysine as a pro-inflammatory ligand. **J. Biol. Chem.** 2011, 286(22)19943-19957.

⑫ Koyama S, Ohtani K, Fukuzawa J, Yao N, Fukuda M, Jang SJ, Hasebe N, Kikuchi K, Itabe H, Yoshida I, Suzuki Y, Wakamiya N.: The induction of human CL-P1 expression in hypoxia/reoxygenation culture condition and rat CL-P1 after ischemic/reperfusion treatment. **Biochim. Biophys. Acta**, 2011, 1810:836-842.

⑬ Obama T, Nagaoka S, Akagi K, Kato R, Horiuchi N, Horai N, Aiuchi T, Arata S, Yamaguchi T, Watanabe M, Itabe H.: Dietary cholesterol reduces plasma triacylglycerol in apolipoprotein E-null mice: Suppression of lipin-1 and -2 in the glycerol-3-phosphate pathway. **PLoS ONE**, 2011, 6:e22917

⑭ Nagahama Y, Obama T, Usui M, Kanazawa Y, Iwamoto S, Suzuki K, Miyazaki A, Yamaguchi T, Yamamoto M, Itabe H: Oxidized low-density lipoprotein induced periodontal inflammation is associated with up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin synthase 1 in human gingival epithelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2011, 413(4):566-571.

⑮ Kawakami Y, Hosokawa T, Morinaka T, Irino S, Hirano H, Kobayashi H, Yoshioka A, Suzuki-Yamamoto T, Yokoro M, Kimoto M, Tsuji H, Yamashita H, Doi S, Yutani C, Kato R, Itabe H, Kanada T, Hada T, Takahashi Y.: Antiatherogenic effect of guava leaf extracts inhibiting leukocyte-type 12-lipoxygenase activity. **Food Chem.** 2012, 131: 1069-1075.

[学会発表] (計 6 件)

① H. Itabe: Oxidized phospholipids appear in aortic tissue and in plasma in apolipoprotein E-knockout mice prior to atherosclerotic lesion formation. The 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators, 2009年5月、東京

② 板部洋之：血漿リポタンパク質から見た脂質代謝調節と疾患、第10回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、2009年6月、東京

③ H. Itabe：Behavior of oxidized LDL in plasma and in arterial tissue during atherosclerosis. The 1st International Conference on Lipid Hydroperoxide Biology and Medicine Sendai, 2009年11月、仙台

④ 板部洋之：血漿リポタンパク質の変性と動脈硬化症、第149回日本獣医学会学術集会、2010年3月、東京

⑤ H. Itabe, et al.：Glucagon regulates intracellular redistribution of ADRP between ER and lipid droplets in the liver. Keystone Symposium “Lipid Biology and Lipotoxicity” 2011年5月、キラニー、アイルランド

⑥ 板部洋之：心血管系疾患の発症・進展と酸化LDL、第12回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、2009年6月、富山

〔図書〕(計3件)

① 板部洋之：「コレステロール---基礎から臨床へ---」(寺本民夫編、総ページ286) pp.113-116 (2009) ライフサイエンス出版、東京

② 板部洋之：「新老年学(第3版)」(大内尉義、秋山弘子編、総ページ2109) pp.42-50 (2010) 東京大学出版会、東京

③ 板部洋之：「試料分析講座4巻 脂質」(田口良ら編、総ページ223)、pp.188-201、丸善、東京

〔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

<http://www10.showa-u.ac.jp/~biolchem/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板部 洋之 (ITABE HIROUKI)
昭和大学・薬学部・教授
研究者番号：30203079

(2) 研究分担者

小浜 孝士 (OBAMA TAKASGHI)
昭和大学・薬学部・助教
研究者番号：60395647

加藤 里奈 (RATO RINA)
昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：30392400

(3) 連携研究者