

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 25 年 4 月 25 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21590902

研究課題名（和文） グルタチオン化蛋白を用いた新規酸化ストレスマーカーの開発とその有用性の検討

研究課題名（英文） The development and clinical application of a new oxidative stress marker using glutathionylated protein

研究代表者

池田 聡司（IKEDA SATOSHI）

長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：10336159

研究成果の概要（和文）：心血管病の発症・進展には酸化ストレスが深く関与しているが、それを反映する臨床的指標はいまだ確立していない。酸化ストレスの源である活性酸素種は蛋白のチオール基を酸化修飾し、グルタチオン化蛋白となる。この状態ではまだ可逆性があるため、これを指標として早期の動脈硬化を検出できるのではないかと考えた。そこで悪玉コレステロールである LDL コレステロールの構成蛋白であるアポ蛋白 B100 に対するグルタチオン化抗体を作成した。これを用い、動脈硬化の危険因子（高血圧、糖尿病や脂質異常症など）を有する患者血清にて検討したところ、酸化ストレスにて修飾される LDL の陰性荷電度と有意な相関を認めた。またヒト頸動脈の内膜剥離標本にて、本抗体の染色部位は粥状動脈硬化巣よりやや表層の血管内腔側に局在していた。これらのことより、本抗体は比較的早期の動脈硬化を反映する酸化ストレスマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Oxidative stress contributes to the development and progression of atherosclerosis. Reactive oxygen species, major sources of oxidative stress, modifies protein cysteine residues, where a disulfide bond is established between a cysteinyl residue and glutathione, leading to the S-glutathionylation of protein, and this modification can be still reversible. Therefore, we hypothesized a biomarker using S-glutathionylated protein is a good one reflecting an early phase of atherosclerosis. We composed the antibody against S-glutathionylation of apoprotein B100, a component of low-density lipoprotein (LDL) cholesterol. The serum values by immunoblot analysis with this antibody were correlated with negatively charged LDL subfractions, which are induced by oxidative modification, in patients with atherogenetic risks, such as hypertension, diabetes mellitus, and/or dyslipidemia. Immunohistological analysis of carotid endarterectomy sections with the antibody showed S-glutathionylated ApoB100 localized at the site close to the vascular lumen, but not the site of foamy cell accumulation. These suggested that serum S-glutathionylated ApoB100 may be an oxidative stress marker reflecting the relatively early phase of atherosclerosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：臨床心血管病態学

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは心血管病の発症・進展に深く関与していることが示唆されている。その生体内の指標として、8-isoprostane、8-hydroxydeoxyguanosine や酸化 LDL 等が用いられている。しかしながら、例えば、酸化 LDL の測定法は数種類あり、そのエピトープの部位により酸化 LDL の一部しか反映していない可能性があり、8-isoprostane はアラキドン酸代謝系におけるプロスタグランジンの minor product であることより、in vivo における酸化ストレスのすべてを反映しているとは言い難い。さらに酸化ストレスの中心的な役割を担う活性酸素種（Reactive oxygen species: ROS）は生体内で不安定であり、酸化ストレス、特に比較的直近を反映する確固たる指標がない状況であった。

我々は、今までに基礎的実験にて、生理的範囲の ROS 産生は血管内皮細胞の機能を維持するのに必要であることを示してきた。しかしながら、過剰の ROS 産生は、DNA、蛋白や脂質を傷害する。そして、この ROS に酸化的修飾を受けやすいのが蛋白のチオール基である。その修飾の一つの過程として、蛋白のチオール基とグルタチオン(GSH)との間で行われる S-glutathionylation (グルタチオン化) がある。このグルタチオン化は比較的、低濃度の ROS 産生により生じることが知られており、グルタレドキシシンなどを介して蛋白の脱グルタチオン化が生じる。このことは、蛋白のグルタチオン化は軽度の酸化ストレスで生じ、可逆的であることを意味する。つまり、生体内にて、このグルタチオン化した蛋白は比較的早期の酸化ストレスを反映し、治療による改善が見込まれる状況を反映していると推測される。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、動脈硬化の可逆的な状態、すなわち早期の状態を把握できる酸化ストレスマーカーとして、グルタチオン化蛋白に着目した。そこで、本研究ではこのグルタチオン化蛋白を指標とした新たな生体内の酸化ストレスマーカーの開発およびその有用性を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) グルタチオン化蛋白抗体の作成

グルタチオン化蛋白の候補として、まず動脈硬化の促進因子である LDL を構成するアポ蛋白 B に注目した。

GenBank より得られたアポ蛋白 B100 の塩基配列である

³⁷⁵¹-VPFTDLQVPSCKLDLFREIQIYKKLRTSSFA-³⁷⁸⁰ の下線部のペプチドを用いて、GSH を添加し、システイン残基をグルタチオン修飾し、さらに牛血清アルブミンとホルムアルデヒド/パラホルムアルデヒドを用いて結合させ、抗原を作成した。この抗原をウサギに免疫して抗体を作成した。

(2) 血清グルタチオン化アポ蛋白 B100 の測定

患者より採取した血清は、測定を行うまで -80°C にて保存し、グルタチオン化アポ蛋白 B100 の測定はイムノブロット法を用いた。試料を DTT (dithiothreitol) を付加せずに 7.5% SDS-PAGE にて電気泳動し、5% non-fat dry milk にてブロッキングした後、作成したグルタチオン化アポ蛋白 B100 抗体を 1 次抗体として 4°C で一晩、反応させた。ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼで標識した抗 IgG 抗体と反応させ、ECL (enhanced chemiluminescence) にて発色した。グルタチオン化牛血清アルブミンを内因性のコントロールとして標準曲線を作成し、上記にて得られたバンドを比色して濃度を算出した。

(3) グルタチオン化アポ蛋白 B100 抗体による免疫染色

頸動脈狭窄症を有し、頸動脈内膜剥離術を施行された患者から採取された頸動脈の動脈硬化巣（粥腫）をパラフィン包埋した。その切片を用いて、免疫染色を行った。

脱パラフィンを行い、グルタチオン化アポ蛋白 B100 抗体を 1 次抗体として、1% BSA/PBS を用いて 1200 倍に希釈し、4°C で一晩反応させた。二次抗体として、ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) を用い DAB にて発色した。

同様に、CD34 を血管内皮細胞、CD68 をマクロファージ、 α -SMA を血管平滑筋細胞、そして Cu²⁺ oxidized LDL を酸化 LDL の指標として染色した。

(4) Anion-exchange HPLC (AE-HPLC) を用いた LDL 分画の測定

ProtEx-DES anion-exchange column を用いたクロマトグラフィーにて、LDL を陰性荷電度に応じて 3 つの分画に分離した。陰性荷電度の低い方より、LDL-1, LDL-2, LDL-3 に分画した。すなわち、LDL-1 は native LDL に近く、LDL-3 は陰性荷電度が高い分画となる。LDL 全体の比率にて、各 LDL 分画を検討した。

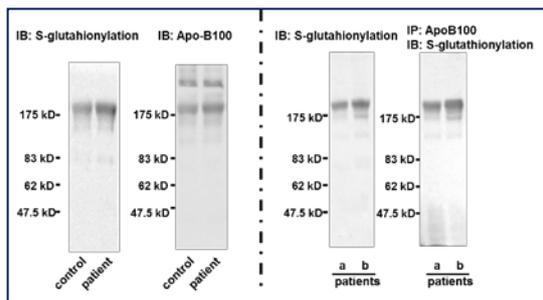
その他の酸化ストレスマーカーとして、血漿中の 8-isoprostane を測定した。

(5) 臨床研究における試料
動脈硬化の危険因子（糖尿病、高血圧や脂質異常症など）を有する患者より、血液を採取し、血清および血漿に分離し、試料の測定を行うまで、 -80°C にて保存した。本研究はヘルシンキ宣言に従い、当大学の倫理委員会の承認を経て行った。

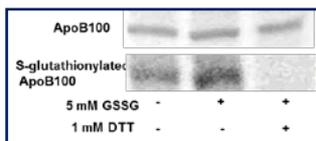
4. 研究成果

(1) グルタチオン化アポ蛋白 B100 の特異性の検討

患者血清を用いて、本抗体にて認識する蛋白をイムノブロット法、免疫沈降法にて確認した。本抗体(S-glutathionylation)によるイムノブロットではアポ蛋白 B100 と同じ分子量にバンドを認めた。またこのバンドはアルブミンとは異なる分子量であることも確かめた(下図参照)。



さらに、右下図に示すように、GSSG にて酸化修飾するとバンドの濃度は増強し、DTT (dithiothreitol)などにより還元状態するとバンド濃度が減弱することを認めた。



これらのことより、本抗体が酸化ストレスにて増強するグルタチオン化したアポ蛋白 B100 を認識しているものと考えた。

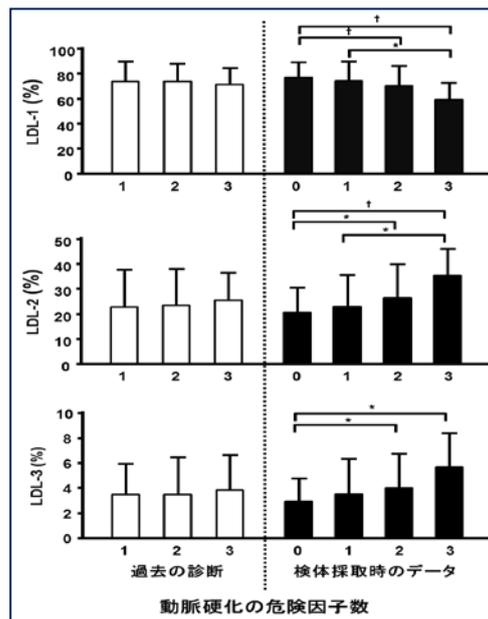
(2) AE-HPLC による LDL 分画の意義の検討

AE-HPLC にて分画された、LDL-1, -2, -3 の臨床的意義について、動脈硬化の危険因子として少なくとも高血圧症を有する 98 人の患者において検討した。

次表に示すように、LDL-1 は肥満度、血圧、non-HDL コレステロール、8-イソプロスタンと負の相関を、逆に LDL-2, -3 は正の相関を認めた。LDL-3 に関しては空腹時血糖、HbA1c との相関も認めた。

	LDL-1		LDL-2		LDL-3	
	r	P value	r	P value	r	P value
BMI(肥満度)	-0.384	p < 0.001	0.396	p < 0.001	0.267	p = 0.012
収縮期血圧	-0.457	p < 0.001	0.439	p < 0.001	0.481	p < 0.001
拡張期血圧	-0.492	p < 0.001	0.483	p < 0.001	0.447	p < 0.001
Non-HDL-C	-0.403	p < 0.001	0.398	p < 0.001	0.357	p < 0.001
空腹時血糖	-0.187	p = 0.067	0.165	p = 0.106	0.274	p = 0.007
HbA1c	-0.143	p = 0.207	0.120	p = 0.288	0.244	p = 0.029
尿酸	0.125	p = 0.237	-0.125	p = 0.235	-0.091	p = 0.591
高感度 CRP	0.088	p = 0.390	-0.097	p = 0.343	-0.035	p = 0.733
8-イソプロスタン	-0.415	p < 0.001	0.412	p < 0.001	0.337	p = 0.001

このように、複数の動脈硬化の危険因子と相関を認めたため、合併した動脈硬化の危険因子数を過去の診断に基づいた場合と検体採取時のデータに基づいた場合において検討した。



上図のように、検体採取時のデータに基づいた危険因子数の増加とともに、LDL-1 は低下し、LDL-2, -3 は増加した。

以上のことより、AE-HPLC による LDL 分画は、最近の動脈硬化を促進する状態を反映する指標となることが示唆された。

(この結果は、The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2010、第 33 回日本高血圧学会総会、2010、第 58 回日本心臓病学会学術集会、2010、第 42 回日本動脈硬化学会・学術集会、2010 の学会にて発表し、Heart and Vessels, 2012 に掲載された。)

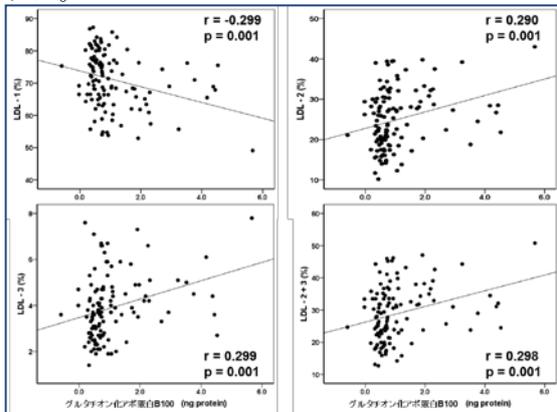
(3) グルタチオン化アポ蛋白 B100 の臨床的検討

先述のグルタチオン化アポ蛋白 B100 抗体の臨床的な有用性について、動脈硬化の危険因子（高血圧症、脂質異常症、糖尿病など）を有する 120 人の患者を対象に検討した。

グルタチオン化アポ蛋白 B100 は、弱いながらも、AE-HPLC で分画された LDL-1 とは負の、LDL-2, -3 とは正の有意な相関を認めた。

(下図を参照)

このことより、グルタチオン化蛋白 B100 濃度は最近の動脈硬化の危険因子の状態を部分的に反映する指標となることが示唆された。



(この結果は、AHA Scientific Sessions 2010、The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2011 の学会にて発表した。)

(4) 頸動脈の動脈硬化巣における免疫組織学的検討

頸動脈狭窄症を有し、頸動脈内膜剥離術を施行された患者の頸動脈の動脈硬化巣(粥腫)を用いて、グルタチオン化アポ蛋白 B100 抗体にて免疫染色を行った。

下図に示すように、グルタチオン化アポ B100 蛋白は、一部、CD68 (マクロファージ) と共局在しているが、その主たる部位である粥腫の部位よりも比較的、血管内腔側に局在していた。このことは、グルタチオン化したアポ蛋白 B100 はまだ LDL が酸化修飾され泡沫化される前の比較的早期の動脈硬化を反映している可能性が示唆された。



以上の結果より、我々が作成した抗体は、グルタチオン化アポ蛋白 B100 を認識し、その血清中の抗体価は検体採取時の動脈硬化の促進状態を反映し、さらには組織学的検索にて早期の動脈硬化を示唆する指標である可能性が示唆された。今までにない抗体での評価のため、既存の指標との比較が困難で、正確に何を反映するのかはさらなる検討が必要である。今後、薬剤による変化の検討や心血管系イベントの発症などをアウトカムにした縦断的な研究により、さらにグルタチオン化アポ蛋白 B100 の臨床的意義が解明されることになると考えられる。

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 1 件)

- ① Urata J, Ikeda S, Koga S, Nakata T, Yasunaga T, Sonoda K, Koide Y, Ashizawa N, Kohno S, Maemura K. Negatively charged low-density lipoprotein with atherogenic risk in hypertensive patients. *Heart and Vessels*, 27, 2012, 235-242. DOI 10.1007/s00380-011-0139-z

[学会発表] (計 5 件)

- ① Ikeda S, Koga S, Urata Y, Urata J, Nakata T, Yasunaga T, Maemura K. S-glutathionylated Apoprotein B100 is related with electronegativity of LDL in patients with atherogenic risks. The 75th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2011.8.3. Yokohama
- ② Ikeda S, Koga S, Urata Y, Urata J, Nakata T, Yasunaga T, Maemura K. Is S-glutathionylated Apoprotein B100 a potential marker for atherogenic risk? AHA Scientific Sessions 2010, 2010.11.14, Chicago, US
- ③ 池田聡司、古賀聖士、浦田淳吾、安永智彦、中田智夫、前村浩二. Anion-exchange high performance liquid chromatography を用いた陰性荷電 LDL の臨床的意義の検討. 第 33 回日本高血圧学会総会, 2010.10.15. 福岡.
- ④ 池田聡司、古賀聖士、浦田淳吾、安永智彦、中田智夫、前村浩二. 高血圧患者における Anion-exchange HPLC を用いた陰性荷電 LDL 分画の臨床的意義の検討. 第 58 回日本心臓病学会学術集会, 2010.9.17. 東京.
- ⑤ Ikeda S, Koga S, Urata J, Yasunaga T, Nakata T, Maemura K. Low-density lipoprotein subfractions isolated by anion-exchange high-performance chromatography are associated with recent atherogenic risk factors in hypertensive patients. 第 42 回日本動脈硬化学会・学術集会, 2010.7.16. 岐阜.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 聡司 (IKEDA SATOSHI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 講師
研究者番号：10336159

(2)研究分担者

前村 浩二 (MAEMURA KOJI)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 教授
研究者番号：90282649

浦田 芳重 (URATA YOSHISHIGE)
長崎大学・医歯薬学総合研究科 助教
研究者番号：30185087

(3)連携研究者

該当なし