

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31日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591165

研究課題名（和文） 酸化ストレス応答とリン脂質酸化変性の意義—単球/マクロファージ
接着亢進機序の解明研究課題名（英文） Oxidative stress and phospholipid oxidation: mechanism for the
facilitation of monocyte/macrophage adhesion

研究代表者

及川 眞一 (OIKAWA SHINICHI)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：30142946

研究成果の概要（和文）：リン脂質フォスファチジルコリンの酸化物フォスファチジルコリンヒドロペルオキシド(PCOOH)によって誘導される THP-1 細胞の ICAM-1 への接着について、その作用メカニズムを解析し、PCOOH→Rac 活性化→アクチン重合促進→LFA-1 局在化→ICAM-1 への結合強化、という一連の接着誘導メカニズムを推定した。また、未酸化のリン脂質フォスファチジルセリンが PCOOH と同様に、THP-1 細胞の ICAM-1 への接着を誘導することを見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanism underlying the induction of THP-1 monocytic cell adhesion to ICAM-1 by phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH), a primary oxidation product of phosphatidylcholine. Our results indicate that PCOOH may induce the cell adhesion via Rac activation, actin polymerization, and localization of LFA-1. We also found that non-oxidized phosphatidylserine induces THP-1 cell adhesion to ICAM-1 as well as PCOOH.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：リン脂質、酸化、単球、接着、脂質代謝異常

1. 研究開始当初の背景

粥状動脈硬化の初期病変である粥腫形成において、主役となる細胞は泡沫化したマクロファージ (M ϕ) である。この病変を形成する過程では末梢血中の単球が血管内皮細胞に接着して内皮下に遊走後、M ϕ に分化して酸化変性した LDL を取り込み泡沫化するという現象が認識されている。粥状動脈硬化病変の形成時には、様々な酸化変性物質が関与しているものと考えられるが、粥腫形成の各過程における単球/M ϕ の動態にどのよう

な酸化変成物質がどの過程で関与しているのかについては不明な点が多い。

我々はこれまでに、生体膜やリポタンパク質表面を構成する主要なリン脂質であるフォスファチジルコリン (PC) の酸化一次生成物であるフォスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) を初期酸化ストレスマーカーとして測定し、高脂血症や糖尿病といった動脈硬化症発症リスクの高い患者の血中 PCOOH レベルが高いことを示してきた [kinoshita M. et al. Clin Chem, 2000;

Nagashima T. et al. Diabetes Res Clin Pract, 2002]。また動脈硬化モデル動物の血中や動脈壁にも PCOOH の蓄積を認めた [Tokita Y. et al. J Atheroscler Thromb, 2005]。

近年我々は、PCOOH が単球細胞 (THP-1) の血管内皮細胞接着分子 (ICAM-1 および VCAM-1) への接着を誘導することを培養細胞モデルで明らかにし [Asai A. et al. J Lipid Res, 2009]、これまで酸化ストレスマーカーとして捉えていた PCOOH が、生体内で動脈硬化惹起的に作用する生理活性分子である可能性を示した。また、PCOOH の分解によって生じる種々の酸化二次生成物については、これまでに血管内皮細胞における接着分子の発現亢進など、動脈硬化促進的に作用することが報告されており、抗酸化機構が脆弱な血管内皮下 (粥腫内) においては、これらの二次生成物が生成・蓄積して単球/Mφ の機能に影響をおよぼす可能性は高いと考えられる。

2. 研究の目的

(1) PC 由来の酸化一次生成物である PCOOH によって惹起されるヒト単球由来細胞 (THP-1) の血管内皮細胞接着分子 ICAM-1 への接着について、その作用メカニズムを解析する。

(2) PC 以外のリン脂質やその酸化物について、単球細胞接着に及ぼす影響を評価し、その作用メカニズムを解析する。

3. 研究の方法

(1) 単球細胞の接着誘導モデル試験

血管内皮細胞表面に発現する各種の接着分子 (ICAM-1、VCAM-1 および E-selectin) を 96-well 培養プレートにコーティング (固定化) する。この接着分子固定化プレートを用いて、ヒト単球由来 THP-1 細胞を各種の接着調節因子 (PCOOH やその他のリン脂質酸化物など) 存在下で培養する。その後、プレートに接着した細胞数を計測することにより THP-1 細胞の各接着分子への接着能の変化を評価する。

(2) 単球細胞接着機序の解明

上記 (1) の接着誘導モデル試験において、接着誘導が認められた物質については、その作用発現機序を探索する。具体的には、細胞の形態学的変化の観察、細胞内シグナル伝達の解析、各種阻害剤や RNAi による接着誘導の抑制試験等を行う。

4. 研究成果

(1) PCOOH による接着誘導機序の解明

これまでの研究 [科研費基盤研究 (C) 18591005] において、この接着誘導がアクチン重合阻害剤や HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) によって抑制されることを見出してきたが、本研究では、ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ阻害剤によっても同様に抑制されることを見出した (図 1)。したがって、ゲラニルゲラニル化によって修飾される低分子量 G タンパク質の機能 (アクチン骨格形成) が PCOOH による接着誘導に関与しているものと推定された。

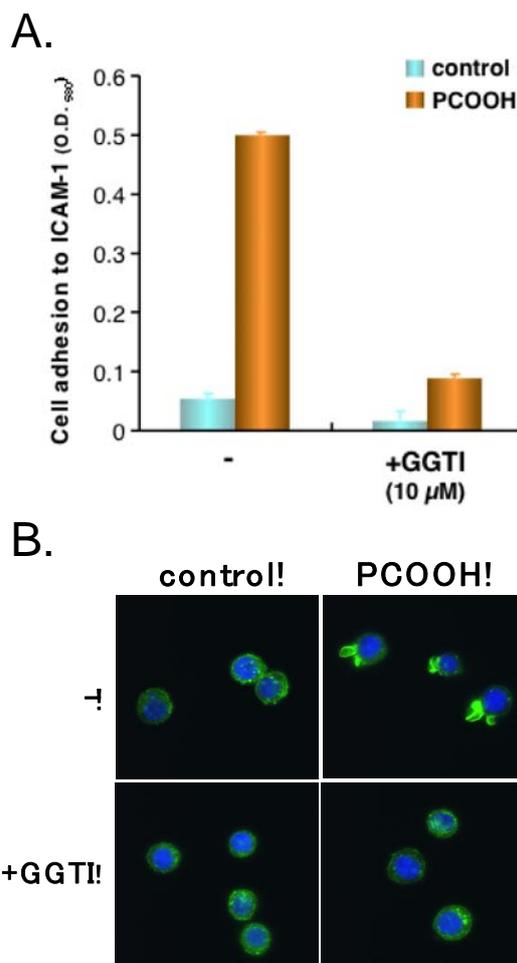


図1 ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ阻害剤 (GGTI) による細胞接着 (A) とアクチン重合による仮足構造形成 (B) の抑制

さらに解析を進めた結果、低分子量 G タンパク質のひとつである Rac1 および Rac2 が PCOOH によって活性化されることを見出し、実際に低分子量 G タンパク質の阻害剤や Rac の選択的阻害剤、さらに Rac1 および Rac2 の siRNA によって、PCOOH による接着誘導が抑制されることを確認した (図 2)。

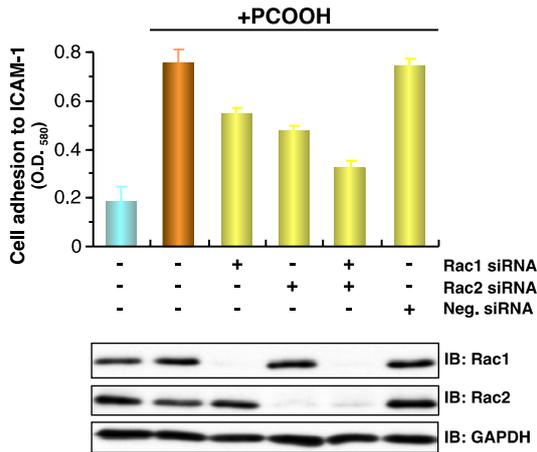


図2 Rac1およびRac2のsiRNAによる細胞接着の抑制

これらの結果から、PCOOH→Rac 活性化→アクチン重合促進→LFA-1 局在化→ICAM-1 への結合強化、という一連の接着誘導メカニズムが推定された (図3)。

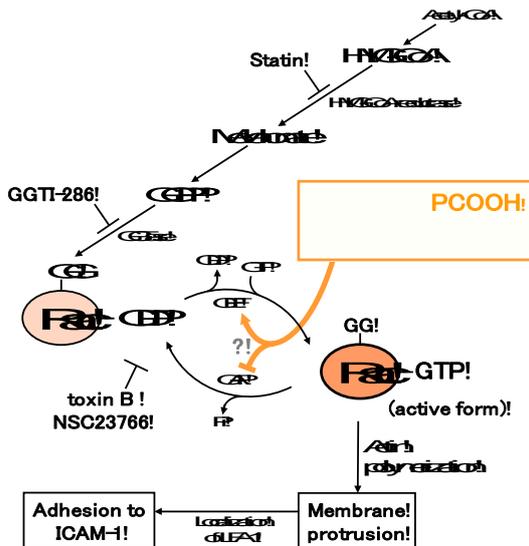


図3 PCOOHによる細胞接着誘導の推定メカニズム

(2) フォスファチジルセリン (PS) による接着誘導

PC 以外のリン脂質やその酸化物について、それらの単球細胞接着に及ぼす影響を探索した結果、生体膜を構成するリン脂質の一種である未酸化のフォスファチジルセリン (PS) が、単球細胞 (THP-1) の ICAM-1 への接着を PCOOH と同様に亢進することを新たに見出した (図4)。PC やフォスファチジルエタノールアミン (PE) には接着亢進作用は認めなかった。

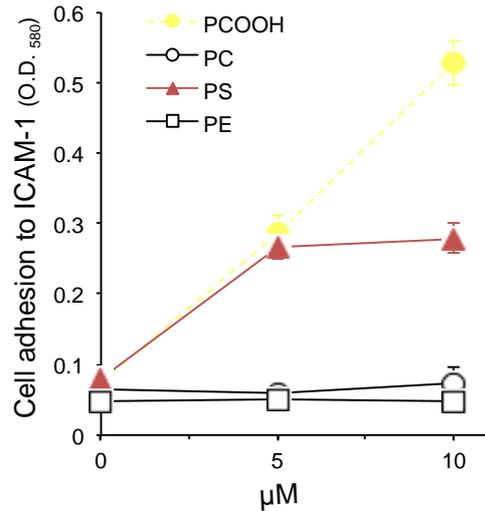


図4 PSによる細胞接着誘導

また PS で処理した THP-1 細胞では、PCOOH 処理で認められたものと同様のアクチンフィラメント・仮足構造の形成が認められた (図5)。

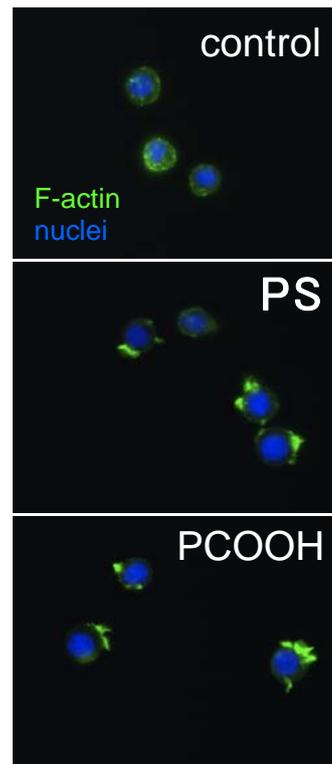


図5 PSによるアクチン重合・仮足構造の誘導

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2件)

- ① A. Asai, F. Okajima, Y. Nakajima, M. Nagao, K. Nakagawa, T. Miyazawa, S. Oikawa. Involvement of Rac GTPase activation in phosphatidylcholine hydroperoxide-induced THP-1 cell adhesion to ICAM-1. *Biochem Biophys Res Commun* 406. 273-277 (2011) 査読有
Doi: 10.1016/j.bbrc.2011.02.032
- ② 浅井明、及川眞一、動脈硬化性疾患におけるリン脂質フォスファチジルコリンの酸化変性、*オレオサイエンス* 11. 419-424 (2011) 査読無

〔学会発表〕(計8件)

- ① 浅井明、仲川清隆、宮澤陽夫、及川眞一、フォスファチジルセリンはTHP-1細胞のICAM-1への接着を亢進する、日本過酸化脂質・抗酸化物質学会第19回年会、2011年12月17日、仙台
- ② 浅井明、仲川清隆、永島和幸、宮澤陽夫、及川眞一、Biochemistry and measurement of phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH): implications for atherosclerosis (シンポジウム)、第43回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2011年7月16日、札幌
- ③ A. Asai, K. Nakagawa, F. Okajima, Y. Nakajima, M. Nagao, T. Miyazawa, S. Oikawa. Phosphatidylcholine hydroperoxide-induced Rac activation: its involvement in THP-1 cell adhesion to ICAM-1 via actin polymerization. 79th European Atherosclerosis Society Congress. 28 Jun. 2011. Gothenburg, Sweden
- ④ 浅井明、岡島史宜、仲川清隆、宮澤陽夫、及川眞一、Phosphatidylcholine hydroperoxide(PCOOH)によるRac GTPasesの活性化:THP-1細胞におけるアクチン骨格形成と接着誘導への関与、第18回生体パーオキシド研究会、2010年8月21日、仙台
- ⑤ A. Asai, K. Nakagawa, F. Okajima, K. Tanimura, Y. Nakajima, M. Nagao, M. Sudo, T. Harada, T. Miyazawa, S. Oikawa. Involvement of Rac1 activation on actin polymerization and cell adhesion to intracellular adhesion molecule-1 in phosphatidylcholine hydroperoxide-treated THP-1 cells. 1st International Conference on Lipid Hydroperoxide Biology and Medicine. 4-6 Nov. 2009. Sendai. Japan
- ⑥ S. Oikawa. Lipid hydroperoxide and atherosclerosis. 1st International Conference on Lipid Hydroperoxide Biology and Medicine. 5 Nov. 2009. Sendai. Japan
- ⑦ A. Asai, F. Okajima, K. Tanimura, Y. Nakajima, M. Nagao, M. Sudo, T. Harada, K.

Nakagawa, T. Miyazawa, S. Oikawa. Involvement of Rho family proteins on phosphatidylcholine hydroperoxide-induced polymerization and cell adhesion in THP-1 cells. 8th International Congress of Coronary Artery Disease. 13 Oct. 2009. Prague, Czech Republic

- ⑧ 及川眞一、酸化ストレスと動脈硬化(シンポジウム)、第63回日本栄養・食糧学会大会、2009年5月21日、長崎

6. 研究組織

(1)研究代表者

及川 眞一(OIKAWA SHINICHI)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号:30142946