

機関番号：32622

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790092

研究課題名(和文) 心筋梗塞患者血漿中の変性リポタンパク質の修飾構造と相互作用因子の解析

研究課題名(英文) Analysis of modified low-density lipoproteins in plasma of myocardial infarction

研究代表者

小濱 孝士 (OBAMA TAKASHI)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60395647

研究成果の概要 (和文)：生体内で生じる LDL の酸化的変性の性質を明らかにするために、冠動脈疾患患者の心臓カテーテル治療により得られた血液から LDL を分画して解析を行った。健常者と比較して酸化 LDL レベルが 2～3 倍上昇しているものが存在した。また免疫沈降法により回収された酸化 LDL のタンパク質成分は脂質過酸化物による修飾を受けており、酸化リン脂質の修飾を受けた apoB-100 では 100～250kDa の特徴的な断片が見出された。

研究成果の概要 (英文)： To explore modifications in oxidized low-density lipoprotein (OxLDL) formed in vivo, we analyzed LDL fractions obtained by cardiac catheterization from patients with coronary artery disease. OxLDL was enriched by immunoprecipitation using monoclonal antibody against oxidized phosphatidylcholine (oxPC). Western blot analysis revealed that the OxLDL in vivo was modified by lipid peroxidation products such as 4-hydroxynonenal, acrolein and oxPC, but showed a different pattern from Cu²⁺-induced OxLDL. These data suggest the structural aspects of oxLDL in vivo different from in vitro oxidation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

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 LDL、プロテオーム、モノクローナル抗体、酸化ストレス、リポタンパク質、LDL

1. 研究開始当初の背景

脳血管疾患や虚血性心疾患といった動脈硬化性疾患は、今なお主要な死因を占めていることから、その発症や進展のメカニズムを探ることは重要である。血中における低比重リポタンパク質 (low-density lipoprotein: LDL) レベルの上昇は、動脈硬化性疾患の発症リスクを上昇させる独立した危険因子として認められているが、近年では LDL の酸化変性によって生じる酸化 LDL も、動脈硬化の発症に深く関与する危険因子であることが注目されている。酸化 LDL は、単球や血管平滑筋由

来のマクロファージに取り込まれてこれらを泡沫化させ、動脈硬化病巣内に蓄積することから、動脈硬化性疾患の発症・進展に深く関与することが知られている。これまでの国内外の研究結果から、循環器疾患と酸化 LDL との関連性が確かなものとなっている。当該研究者の所属する研究室ではこれまでに、酸化 LDL 中の酸化ホスファチジルコリン(酸化 PC) を特異的に認識するモノクローナル抗体 (DLH3) を作成して血漿中酸化 LDL の定量法を構築し、世界に先駆けて酸化 LDL の変動と種々の疾患との密接な関連を示してきた

(Itabe H. *et al*, *J Lipid Res.*, (1996) **37** 45-53; Ehara S. *et al.*, *Circulation*, (2001) **103** 1955-1960)。しかし、酸化 LDL は生体内において極めて微量（血漿 LDL 中の数千分の1）であるため、これまでに構造などについて十分な解析が進んでいなかった。特に、生体内から酸化 LDL を分離して解析した研究はなく、酸化 LDL の発生機序や性状・挙動と動脈硬化病巣形成との関連について分子レベルでの解析が進んでいるとは言えない。

当該研究者はこれまでに、ヒト LDL の主要タンパク質成分である apoB-100 中の酸化修飾構造を、質量分析法 (LC-MS/MS) によって解析する新たな手法を構築している (Obama T *et al.*, *Proteomics* (2007) **7** 2132-2141)。これにより測定に必要な LDL の微量化に成功し、脂質過酸化物などによる修飾部位の同定を可能としてきた。

2. 研究の目的

これまで、銅酸化や脂質過酸化物などによる修飾により人工的に調製した酸化 LDL が、生体内酸化 LDL のモデルとして使用されていた。しかし生体内で産生される酸化 LDL の実体についてはほとんど明らかとなっていない。これは、血中の微量な酸化 LDL の回収法が確立しておらず、解析に十分な量を得ることが困難だったことが理由として挙げられる。そこで本研究では、DLH3 を利用した免疫沈降法によって酸化 LDL を血中 LDL 画分から選択的に回収して解析を行い (図 1)、生体内で生じる酸化 LDL の性状を明らかにすることを目的とする。本研究では、冠動脈疾患患者の心臓カテーテル治療によって得られる血液サンプルを用いることとした。冠動脈において形成された狭窄部位の近傍付近から採取されるものであるため、動脈硬化病巣由来の成分が末梢血よりも多く含まれると考えられる。

[酸化 LDL / LDL ≒ 数千分の1]

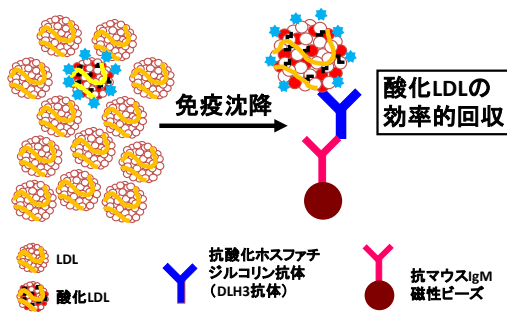


図 1. 免疫沈降法による酸化 LDL の回収

3. 研究の方法

健康者から得られた末梢血液、および冠動

脈疾患患者の心臓カテーテル治療から採取された末梢血液から、超遠心法によりリポタンパク質を分画して LDL 画分を得た。次に LDL 画分について、DLH3 を用いた sandwich ELISA を行い、健康者および冠動脈疾患患者サンプル中の LDL 画分に含まれる酸化 LDL 量を比較した。また、DLH3 を用いた免疫沈降法により LDL 画分中に含まれる酸化 LDL を選択的に回収し、得られた免疫沈降物について Western blot を行い、脂質過酸化物や酸化 PC による修飾を受けたタンパク質について性状解析を行った。

4. 研究成果

(1) 心臓カテーテル治療血液サンプルからの LDL 分画：健康者の末梢血サンプルでは、VLDL 画分と LDL 画分が明確に分離され、その中間にはリポタンパク質画分は観察されなかったのに対し、患者サンプルの中には、VLDL と LDL の間に不規則な画分を含むサンプルが多く確認された (図 2)。これらは比重的には IDL 画分であると考えられるが、冠動脈の狭窄形成部位に蓄積していたリポタンパク質由来の成分である可能性が考えられた。

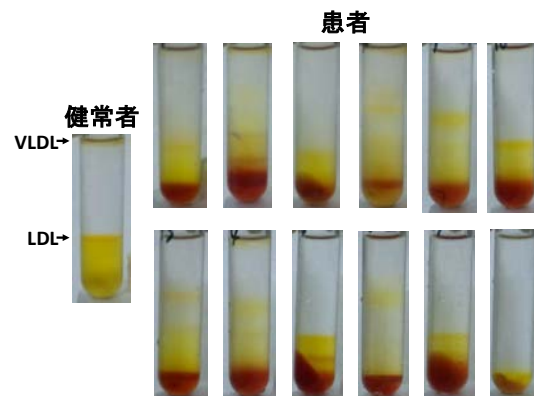


図 2. 血中 LDL の分画

さらに、回収された LDL 画分について SDS-PAGE を行った結果、健康者サンプルではおもに apoB-100 のバンドのみが検出されたのに対し、患者サンプルの中には apoE や apoC といった分子量の小さいアポリタンパク質を含むものがあつた (図 3)。この結果は、図 2 で示した中間リポタンパク質画分の存在と対応が見られたことから、中間画分のリポタンパク質に由来する成分であることがわかつた。

(2) サンドイッチ ELISA による酸化 LDL の定量：得られた LDL 画分中に含まれる酸化 LDL を定量的に解析した。5 μg の LDL 中に

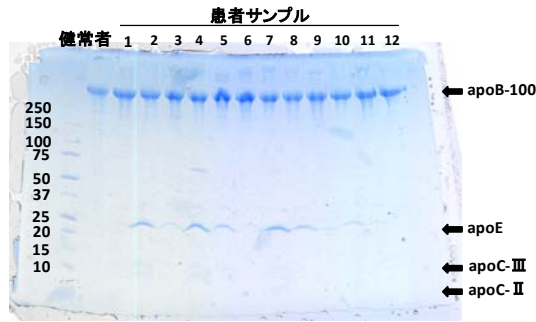


図 3. LDL 画分の SDS-PAGE

含まれる酸化 LDL は、健常者ではおよそ 0.5 ~ 1 ng であった。一方、冠動脈疾患患者から得た LDL では、大部分は健常者と同じであったが、2~3.5 ng に上昇しているものもあった (図 4)。当研究室ではこれまでに、末梢血サンプルを用いてサンドイッチ ELISA を行っており、急性心筋梗塞では高いもので 6 倍、狭心症では 2~3 倍に上昇することを報告しているが、今回の実験結果から心臓カテーテル治療の血液サンプルでも同じような傾向を示すことがわかった。

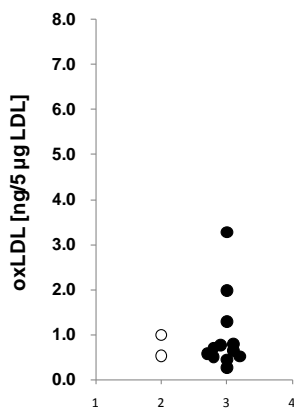


図 4. サンドイッチ ELISA による酸化 LDL の定量 (健常者の末梢血 (○)、および冠動脈疾患患者の心臓カテーテル治療による血液サンプル (●) の LDL 画分 (5 μg) に含まれる酸化 LDL 量[ng])

(3)免疫沈降法により得られた酸化 LDL の性状解析: 免疫沈降では、酸化 PC を認識する DLH3 を用いたものと同時に、非特異的な沈降を調べるための対照実験として、非免疫 IgM を用いたものも並行して行った。

①脂質過酸化物による修飾を受けたタンパク質の Western blot 解析: 健常者の LDL から回収された免疫沈降物について、脂質過酸化物である HNE または acrolein による修飾を受けたタンパク質を Western blot により解析

した。図 5 に示すように、DLH3 による沈降物には、IgM を用いたときの沈降物と比較して、より多くの HNE または acrolein 修飾タンパク質が検出され、免疫沈降法により酸化 LDL の成分が回収されていることが確認できた。また、これら脂質過酸化物により修飾を受けたタンパク質は、apoB-100 に相当する分子量のものが大部分で、銅酸化 LDL で見られる大きい分子量のものは少ないことがわかった。以上のことから、酸化 LDL に含まれる apoB-100 には HNE や acrolein といった脂質過酸化物による修飾を受けていること、また架橋などにより分子量が大きくなったものは比較的少なく、銅酸化 LDL と異なった特徴を示すことが明らかとなった。

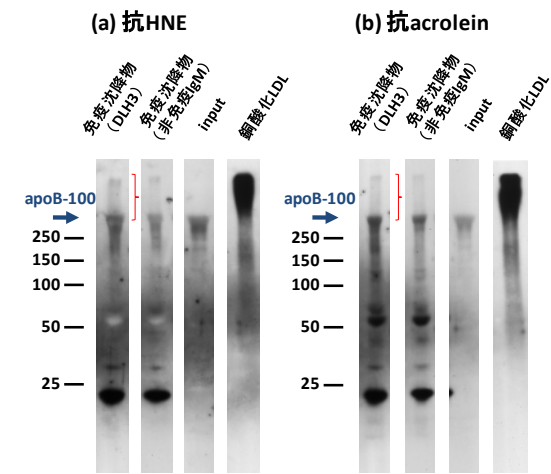


図 5. 免疫沈降物中の酸化修飾 ((a) HNE 修飾、(b) acrolein 修飾を含むタンパク質の検出)

②酸化 PC 修飾の検出: 健常者の LDL から回収された免疫沈降物について、酸化 PC 修飾を受けたタンパク質成分を Western blot により解析した。LDL の主要タンパク質成分である apoB-100 は、分子量が約 550 kDa の巨大なタンパク質である (図 6(a))。一方、DLH3 に

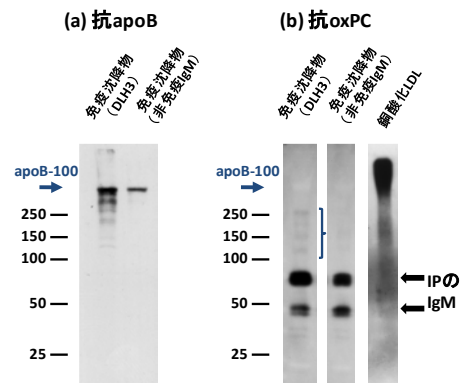


図 6. 免疫沈降物の酸化 PC 修飾 ((a) 抗 apoB、(b)抗酸化 PC

よる沈降物には、apoB-100 が架橋してより大きな分子量となったものはほとんど検出されていなかった。また、apoB-100 の分子量(約 550 kDa) よりも小さいバンドが確認され、これらが酸化 LDL に由来するタンパク質成分であると考えられた(図 6(b))。これらは apoB-100 が断片化して分子量が小さくなったものであることが示唆された。同様の解析を患者由来サンプルについても行った結果、酸化 PC 修飾を受けたバンドが健常者サンプルより濃く検出される傾向が見られた(図 7)。

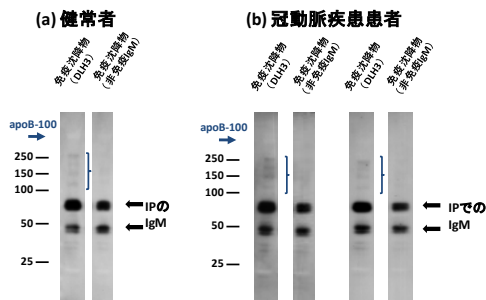


図 7. 患者サンプルの免疫沈降物の酸化 PC 修飾

本研究により示された生体内由来酸化 LDL の性状は、従来使用されていた銅酸化 LDL とは異なった特徴であることを示唆するものである。特に、末梢血中ではなく狭窄部位近傍の血液サンプルから酸化 LDL を回収して解析することにより、冠動脈疾患の発症に関する手がかりがさらに得られる可能性がある。今後、質量分析装置を用いた解析により、修飾構造とその部位について詳細な解析を進めて行く予定である。

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 5 件)

- ① Itabe H, Obama T and Kato R, The dynamics of oxidized LDL during atherogenesis, *Journal of Lipids* (2011) Article ID 418313, 査読有
- ② 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** :2571-2580, 査読有
- ③ Obama T, Kikuchi M, Shiraiwa T, Kato R,

Itabe H, Immunoprecipitation and LC-MS/MS analysis of human oxidized low-density lipoprotein from plasma, *Chemistry and Physics of Lipids* (2010) **163S**, S42, 査読有

- ④ Suzuki K, Sakiyama Y, Usui M, Obama T, Kato R, Itabe H and Yamamoto M, Oxidized Low-Density Lipoproteins enhances IL-8 production in Human Gingival Epithelial Cells, *J Period Res.* (2010) **45**, 488-495, 査読有
- ⑤ 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**, 33-39, 査読有

[学会発表] (計 5 件)

- ① 林暢孝、加藤里奈、宮越由佳、天日雅行、荒田悟、小濱孝士、山口智広、板部洋之、apoE ノックアウトマウス大動脈の動脈硬化初期段階における脂質過酸化物の出現、日本薬学会第 130 年会(岡山) 2010 年 3 月 29 日
- ② 小濱孝士、赤木和貴、長岡彩香、堀内尚美、加藤里奈、山口智広、板部洋之、肝トリグリセリド合成の制御機構の解析～コレステロール摂取による lipin 発現の抑制、第 52 回日本脂質生化学会(群馬) 2009 年 6 月 14 日
- ③ 林暢孝、加藤里奈、宮越由佳、天日雅行、小濱孝士、山口智広、板部洋之、動脈硬化の発症と大動脈組織の脂質過酸化物沈着、第 11 回 Pharmac-Hematology シンポジウム(東京) 2010 年 6 月 19 日
- ④ Obama T, Kikuchi M, Shiraiwa T, Kato R, Itabe H, Immunoprecipitation and LC-MS/MS analysis of human oxidized low-density lipoprotein from plasma, 51st International Conference on the Bioscience of Lipids (Bilbao, Spain) 2010 年 9 月 9 日
- ⑤ 小濱孝士、白岩誉裕希、楠ノ瀬雄也、加藤里奈、山口智広、板部洋之、生体内で生じた酸化 LDL の脂質過酸化物による修飾、日本薬学会第 131 年会(静岡) 2011 年 3 月 30 日

[産業財産権]

○取得状況 (計 3 件)

- ① 名称: タンパク質又はペプチドのスルホン酸誘導体化された N 末端ペプチドフラグメントを質量分析する方法

発明者：乗岡茂巳、山口 実、九山浩樹、小濱孝士、安藤英治、中澤 隆、上山憲一、岡村高明
権利者：株式会社島津製作所
種類：特許
番号：特許第 4576972 号
取得年月日：2010 年 9 月 3 日
国内外の別：国内

②

名称：タンパク質又はペプチドをスルホン酸誘導体化する方法、及びタンパク質又はペプチドのアミノ酸配列を決定する方法

発明者：小濱 孝士、山口 実、九山 浩樹、安藤英治

権利者：株式会社島津製作所

種類：特許

番号：特許第 4569236 号

取得年月日：2010 年 8 月 20 日

国内外の別：国内

③

名称：Methods for derivatizing protein or peptide with sulfonic acid groups

発明者：乗岡茂巳、山口 実、九山浩樹、小濱孝士、安藤英治、中澤 隆、上山憲一、岡村高明

権利者：株式会社島津製作所

種類：United States Patent

番号：7,579,165

取得年月日：2009 年 8 月 25 日

国内外の別：国外（米国）

〔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

小濱 孝士 (OBAMA TAKASHI)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60395647

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

板部 洋之 (ITABE HIROYUKI)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：30203079

加藤 里奈 (KATO RINA)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：30392400

木庭 新治

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：20276546

小林 洋一 (KOBAYASHI YOICHI)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：70158905

巖本 三寿 (IWAMOTO SANJU)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：

宮崎 章 (MIYAZAKI AKIRA)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：70253721