様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２７　年　　５　月　　８　日現在

機関番号：　３２６２２
研究種目：　基盤研究(C)
研究期間：　2012～2014
課題番号：　２４５９００９４

研究課題名（和文）酸化ストレス・病態マーカーとなる酸化リン脂質の高感度定量系の構築

研究課題名（英文）Sensitive measurement of oxidized phospholipids as markers of oxidative stress and diseases.

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,200,000円

研究成果の概要（和文）：動脈硬化症の発症要因である生体内の酸化LDLは、これまでその性状がほとんど分かっていなかった。本研究では、①LC-MS/MSを用いて酸化ホスファチジルコリン（PC）の高感度定量法を構築し、LDL酸化過程で生じる種々酸化PCやリゾPCを検出できるようにした。②陰イオン交換カラムとモノクローナル抗体を用いて、電気泳動度の増加、抗酸化PC抗体陽性を示すヒト血漿中の酸化LDLの分離に初めて成功した。酸化LDLは、全身性あるいは組織局所での酸化ストレスを評価するマーカーとなる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) present in vivo, which is involved in atherogenesis, has not been well characterized. In this study, we introduced LC-MS/MS procedure to quantify various oxidized phosphatidylcholine (oxPC) and lysoPC species with high sensitivity. With this technique we elucidated molecular species of oxPC and lysoPC produced during LDL oxidation process. In addition, we successfully separated in vivo oxLDL from human plasma for the first time using an anion-exchange column and a monoclonal antibody against oxidized PC. The in vivo oxLDL was revealed to be a particle with anionic charges and modification with oxPC. oxLDL could potentially be a marker to evaluate oxidative stresses in systemic diseases and/or local tissues.

研究分野：　生化学

キーワード：　酸化LDL　動脈硬化症　糖尿病　歯周病　ELISA　酸化リン脂質　酸化ストレス　リポタンパク質

１．研究開始当初の背景

高齢化社会の到来とライフスタイルの変化により、高脂血症、耐糖能異常、高血圧、肥満などの代謝異常を併せ持つ人が増え、それが動脈硬化症、糖尿病を進展させてさまざまな合併症を引き起こす土台になっている。さらに、歯周病が糖尿病や高脂血症と互いに増悪因子として作用することが、基礎・臨床の両面から報告され注目されつつある。このことは、感染、炎症、酸化ストレスなどの要因が全身性の代謝バランスにも大きく影響することを示していると考えられる。

酸化低比重リポタンパク質（酸化 LDL）は虚血性心疾患の重要な疾患マーカーである。研究代表者は、酸化ホスファチジルコリン（酸化 PC）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微量の酸化 LDL が存在することを明らかにした(Itabe H, et al, 1996, J Lipid Res. 37:45)。血漿酸化 LDL は、虚血性心疾患の予後診断因子としての可能性が示された(Naruko T, et al, 2006, ATVB 26:877)。動脈硬化のモデル動物である apoE ノックアウトマウスでは、大動脈の病変形成初期に血漿中の酸化 LDL が一過的に上昇することが分かり、酸化 LDL が病変の形成進展要因であることが示唆された(Kato R, et al, 2009, ATVB 29:33)。また近年、歯と歯肉の間隙から非侵襲的に採取できる歯肉溝浸出液中に酸化 LDL が高濃度に含まれることを見出してきた(Sakiyama Y, et al. 2010, J Periodont. Res. 45:216)。

DLH3 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法は高感度に酸化 LDL を測定できる優れた方法であるが、各血漿サンプル中の LDL を分画する必要があること、サンプルの凍結保存が困難なこと、標準酸化 LDL の定義が難しいことなど、測定法を実用化するための課題も残されている。また、ヒト血漿中の酸化 LDL の実態がまだ十分に解明されていないため、LDL 中の何を検出することが最も意味のある指標となるかという理解も進んでいない。

近年、質量分析装置の著しい技術的進歩があり、生体成分の網羅的解析・高感度定量が可能になってきた。液体クロマトグラフ・タンデム質量分析装置（LC-MS/MS）を用いた酸化 PC の高感度定量系を導入することにより、これらの課題を発展的に解決できる可能性があると考えた。

２．研究の目的

酸化ストレスはさまざまな疾患に関わる生体への病的刺激であり、全身性あるいは組織局所での酸化ストレス状態を評価できるマーカーが求められている。動脈硬化症の発症要因である酸化 LDL は、LDL の酸化変性により生じるため、生体内での酸化ストレスを反映する可能性がある。本研究では、LC-MS/MS を用いた酸化ホスファチジルコリンの高感度定量法を構築して、血漿酸化 LDL に代わる新たな虚血性心疾患診断法の開発につなげることを目的とする。併せて、疾患マーカーとなりうる酸化リン脂質分子種を探索し、局所酸化ストレス状態の評価系を構築する。

３．研究の方法

(1)　酸化 LDL 中の酸化 PC 分子種の分析と高感度定量系の構築

LC-MS/MS 装置（ABSciex 社、QTRAP5500）を用いて、酸化 LDL 中のリン脂質分子種を網羅的に解析する。ヒト LDL はヘパリン採血後、EDTA を添加し、小型超遠心機を用いて LDL を分画する。種々条件下で硫酸銅処理により調製した酸化 LDL 中の脂質をクロロホルムとメタノールを用いて抽出し、LC-MS/MS にて分析する。これまでの予備的な検討で、PC および酸化 PC の各分子種 1pmol の検出が可能であった。異なる m/z 値のピークが多数得られるが、特に酸化反応により生じた産物の同定を進める。さらに、主要な酸化 PC 産物のピークを選定し、これらに関して MRM モードによる高感度検出を試みる。1fmol 程度の酸化 PC 検出を目指し、これにより従来の酸化 LDL のサンドイッチ ELISA に優る微量分析を実現することも可能である。

(2)　LDL の酸化過程における LDL 中の PC 分子種の経時変化

ヒトおよびウサギ LDL 画分(0.2mg/mL)に、硫酸銅（5μM）を添加し 37℃でインキュウベートした。経時的に酸化 LDL サンプルを採取し、総脂質を抽出後、LC-MS/MS にて含まれている脂質成分を網羅的に解析する。PAf アセチルハイドロラーゼの効果を確認するためには、PAF アセチルヒドロラーゼの関与を調べるために、LDL を Pefabloc（PAF アセチルヒドロラーゼ阻害剤）で前処理後、脱円からムで Pefabloc を除去してから、硫酸銅処理した。

(3)　血漿酸化 LDL の分離と性状解析

ヒト血漿 LDL を陰イオン交換カラム HiTrapQ（1mL のカートリッジを 2 本直列につないで用いる）に吸着させ、0～1000mM NaCl を含む緩衝液で段階的に溶出した。溶出液は約 40 個のフラクションに分画して回収した。各フラクション中のタンパク濃度はナノドロップで測定し、また apoB 量、oxLDL 量はサンドイッチ ELISA で求めた。主要な LDL 亜画分の電気陰性度はアガロース電気泳動の移動度で、また酸化 PC による修飾は、ウエスタンブロット法で検討した。また、酸化 PC やリゾ PC 各分子種は LC-MS/MS で検出した。

apoB タンパク質の修飾ペプチド構造の解

析は、分画した LDL を 5㎜ 角の PVDF 膜小片状に吸着させ、PDVF 膜上で脱脂、還元アルキル化、トリプシン消化を行った後、ESI-LC-MS/MS（QTof5600）で行った。

(4)　歯肉溝浸出液中の酸化 LDL の検出

健常者および歯周病患者の歯肉溝浸出液中の LDL および酸化 LDL の分析を試みる。また、歯周病を合併し易いことが最近注目されている糖尿病患者からも歯肉溝浸出液を採取し、LDL および酸化 LDL 分析を試みる。歯肉溝浸出液は、昭和大学附属東病院あるいは昭和大学歯科病院にて、専門の歯科医師によって採取する。歯科診療で用いる針状に成型したろ紙であるペーパーポイントを用いる。ペーパーポイントを歯肉溝にそっと差し入れ 1 分間吸わせることで歯肉溝浸出液が採取できる。採取部位はエアー十分に清めて唾液の混入、血液の混入の無いように操作する。サンドイッチ ELISA 法により LDL および酸化 LDL を分析する。

４．研究成果

(1)LC-MS/MS を用いた酸化 PC の高感度定量法の構築

硫酸銅酸化した LDL から総脂質を抽出し、LC-MS/MS にて含まれているさまざまな分子種の検出を試みた。親イオンの開裂により PC の極性頭部であるホスホコリンに相当する、m/z＝184 のフラグメントイオンが選択的に生じることを利用して、プリカーサーイオンスキャンの手法で、各種 PC 分子種を pmol レベルで検出できることが分かった。分子種ごとにイオン化効率に差があるため、厳密な定量分析条件を設定するためには、標的とするすべての分子について標準物質が必要である。これらすべてを合成することは困難なため、同じ分子種についての変動を定量的に評価することとした。

(2)　LDL の酸化過程における LDL 中の PC 分子種の経時変化

ヒト LDL 酸化過程における経時的な変化を分析した。酸化変性の進行に伴い、急激な PUFA 含有 PC 分子種の消失とリゾ PC の生成を検出した。LDL を予め PAF アセチルハイドロラーゼ阻害剤の Pefabloc 処理をしておいた場合、このリゾ PC 生成が顕著に抑制され、PAF アセチルハイドロラーゼ依存的であることを確認した。PUFA 含有 PC→酸化 PC→リゾ PC の順に変化していくことが想定されたが、Pefabloc でリゾ PC 生成を抑制しても酸化 PC の増加は限定的であった。一方で、Pefabloc 処理した LDL の方が、硫酸銅処理後のサンドイッチ ELISA 抗原性が高かったことから、酸化 PC はそのまま蓄積するよりは、分解されるかあるいはタンパク質の付加物形成などに消費され易いものと考えられた。（図 1）

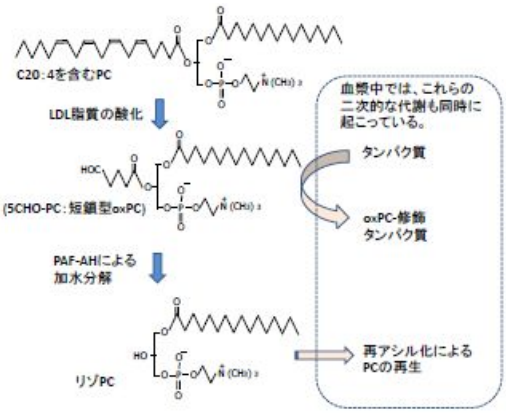


図 1　LDL 酸化に伴う PC の変化

硫酸銅処理ウサギ LDL でもほぼ同様の経過をたどることが分かったが、リゾ PC の生成量はヒト LDL よりも少なく、ウサギでは動脈硬化がヒトよりも進展し難いこととの関連が考えられる。（Sasabe N., et al. Lipids Health. Dis. 2014,13:48）

(3)　血漿酸化 LDL の分離と性状解析

ヒト LDL 中には負電荷に富む LDL(-)亜画分が含まれて、陰イオン交換カラムで分離されることが報告されている。そこで、陰イオン交換カラム HiTrapQ を用いて LDL 粒子の陰性荷電の程度の差による分画を行った。NaCl の段階的溶出で約 40 個のフラクションに分けたところ、陰性荷電のやや強い 500mM NaCl 溶出画分に、サンドイッチ ELISA 陽性の酸化 LDL が回収された。この画分の LDL はアガロースゲル電気泳動での易動度が高く、また酸化 PC による修飾が進んでいることがウエスタンブロットで示された。この画分は、急性心筋梗塞患者 LDL についても同様の条件で分画したところ、非吸着画分に対する 500mM NaCl 溶出画分の oxLDL/LDL 比がさらに大きく、約 20 倍になった。（図 2）病態に伴って血漿中での LDL の酸化変性が進んでいる可能性が示された。生体内酸化 LDL の選択的回収に成功し、今回その性状が生化学的に初めて解析されたものである。

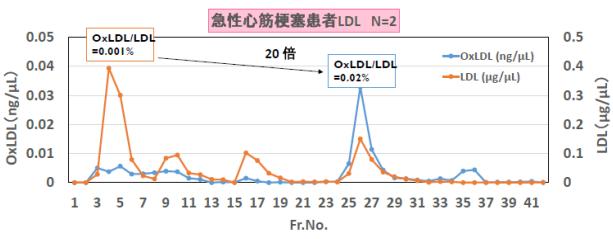


図 2　HiTrapQ カラムによる急性心筋梗塞患者 LDL の分画（青：OxLDL、橙：LDL）

この電気陰性度の高い LDL 粒子から酸化 PC で修飾されている粒子をさらに濃縮するため、抗酸化 PC モノクローナル抗体による固相抽出を行い、回収された画分のリン脂質プロファイルを LC-MS/MS で分析した。硫酸銅処理して調製した酸化 LDL とは異なり、糖尿

病血漿から分離した酸化 LDL 中の酸化 PC、リゾ PC の顕著な蓄積はみられなかった。血漿中では酸化 LDL 中に生じたリゾ PC が速やかに再アシル化を受けて再び PC 分子となるため、過剰な蓄積が起こり難い可能性が考えられた。

生体内での酸化 LDL 中の脂質代謝の動きを明らかにするため、安定同位体標識脂質プローブの作成の準備を始めている。9CHO-PC のような比較的安定な酸化 PC 分子や apoB タンパク質の修飾構造も検出されており、酸化ストレスのマーカーとなる可能性について、多くのヒト血漿サンプルの分析例を集めて検証したい。

(4)　歯肉溝浸出液中の酸化 LDL の検出

歯と歯肉の隙間に浸出してくる体液である歯肉溝浸出液（GCF）は、歯科診療に於いて非侵襲的に採取できる体液であり、近年新たな検査対象として関心が持たれている。糖尿病患者は歯周病を発症しやすく、また GCF 量が増加することが知られている。そこで、教育入院した糖尿病患者 18 名から採取した GCF 中の LDL、および酸化 LDL 値をサンドイッチ ELISA 法にて測定してみたところ、健常者 GCF に比べ有意に高かった。（図 3）特に GCF 中の LDL 値は、患者群で 10 倍以上の高値となり、糖尿病患者における GCF の状態が何らかの変化をしていることが示唆された。GCF 中の LDL および酸化 LDL 値は、HbA1c 値との相関も確かめられた。(Noguchi E, et al. Clin. Biochem. 2014, 47:67-71.)

糖尿病患者および健常者の GCF 中 LDL 値について ROC 解析したところ、cut-off 値を 138ng/mL とした時に感度 86%、特異度 94%と非常に良好に糖尿病患者群を選別できる結果が得られた。

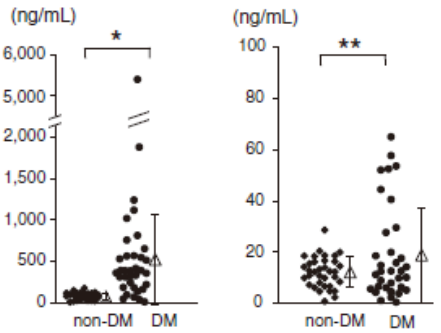


図 3　糖尿病患者および健康対象者から採取した GCF 中の LDL 値（左）と酸化 LDL 値（右）

(5)　考察

動脈硬化症の発症要因として注目されてきた血漿酸化 LDL が、どのような修飾を受けた粒子なのか、その実態はこれまでほとんどわかっていなかった。本研究において、血漿中の酸化 LDL を選択的に回収することができ、変性体としての生化学的実態の解明に一歩近づいた。LDL の陰イオン交換体吸着画分は、LDL(-)とも呼ばれてきた画分であるが、少なくともその一部に酸化 PC 陽性の酸化 LDL が存在した。しかも、心筋梗塞患者血漿、あるいは糖尿病患者血漿に於いて、この画分の酸化 LDL が増加する傾向がみられた。今後さらに嶺数を増やして検討を加えたい。血漿酸化 LDL 中の酸化 PC 含量が、予想とは異なり比較的少なかったことから、一旦生じた酸化 PC が apoB タンパク質の修飾に消費されている可能性も考えられた。今後、脂質プロファイルに加えて、タンパク質の修飾構造もさらに検討する必要がある。

GCF は歯科診療時、非侵襲的に採取可能な浸出液であり、この LDL は血漿に由来する。糖尿病患者 GCF 中 LDL の著増は、歯肉の毛細血管の血管透過性の変動を強く反映している可能性が考えられ、GCF が局所血管の状態を知るバイオマーカーとなる可能性が示された。

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 9 件）

1. Keyamura Y, Nagano C, Kohashi M, Niimi M, Nozako M, Koyama T, Itabe H, Yoshikawa T: Dietary-cholesterol atherogenesis drastically changed during the juvenile period in rabbits. Biol. Pharm. Bull. 査読あり vol.38, 2015, 785-788. doi.org/10.1248/bpb.b14-00775

2. Keyamura Y, Nagano C, Kohashi M, Niimi M, Nozako M, Koyama T, Yasufuku R, Imaizumi A, Itabe H, Yoshikawa T: Add-on effect of probucol in atherosclerotic, cholesterol- fed rabbits treated with atorvastatin. PLoS ONE, 査読あり vol.9 2014, e96929. doi:10.1371/journal.pone.0096929

3. Sasabe N, Keyamura Y, Obama T, Inoue N, Masuko Y, Igarashi Y, Aiuchi T, Kato R, Yamaguchi T, Kuwata H, Iwamoto S, Miyazaki A, Hara S, Yoshikawa T, Itabe H: Time course-changes in phosphatidylcholine profile during oxidative modification of low-density lipoprotein. Lipids Health Dis. 査読あり vol.13, 2014, 48 doi: 10.1186/1476-511X-13-48

4. Noguchi E, Kato R, Ohno K, Mitsui A, Obama T, Hirano T, Itabe H, Yamamoto M: The apolipoprotein B concentration in gingival crevicular fluid increases in patients with diabetes mellitus. Clin. Biochem. 査読あり vol.47, 2014, 67-71. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2013.09.016.

5. Kitabayashi C, Naruko T, Sugioka K, Yunoki K, Nakagawa M, Inaba M, Ohsawa M, Konishi Y, Imanishi M, Inoue T, Itabe H, Yoshiyama M, Haze K, Becker AE, Ueda M: Positive association between plasma levels of oxidized low-density lipoprotein and myeloperoxidase after hemodialysis in patients with diabetic end-stage renal disease. Hemodial. Int. 査読あり vol.17, 2013, 557-567.
doi: 10.1111/hdi.12049

6. Kawakami Y, Hosokawa T, Morinaka T, Irino S, Hirano S, 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 1 12-lipoxygenase activity. Food Chem. 査読あり vol.131, 2012, 1069-1075.
doi:10.1016/j.foodchem.2011.10.011

7. Tamura H, Ohgami N, Yajima I, Iida M, Ohgami K, Fujii N, Itabe H, Kusudo T, Yamashita H, Kato M: Chronic exposure to low frequency noise at moderate levels causes impaired balance in mice. PLoS ONE, 査読あり vol.7, 2012, e39807.
doi: 10.1371/journal.pone.0039807

8. Suzuki M, Tsujikawa M, Itabe H, Du Z-J, Xie P, Matsumura N, Fu X, Zhang R, Sonoda K, Egashira K, Hazen SL, Kamei M: Chronic photo-oxidative stress and subsequent MCP-1 activation as causative factors for age-related macular degeneration. Journal of Cell Science, 査読あり vol.125, 2012, 2407-2415.
doi: 10.1242/jcs.097683.

9. Itabe H: Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of in vivo oxidative stress: from atherosclerosis to periodontitis. J. Clin. Biochem. Nutr. 2012, 51:1-8. (Review)
doi: 10.3164/jcbn.11-00020R1

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 笹部直子、毛谷村由佳、小浜孝士、井上望、増子幸志、五十嵐優、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、桑田浩、原俊太郎、吉川智博、板部洋之：酸化 LDL 生成時におけるリン脂質プロファイルの経時変化と Lp-PLA2 の役割、日本薬学会第 135 年会　2015 年 3 月 26-28 日　神戸

2. 笹部直子、小浜孝士、矢澤快、大坪茉莉子、羽田幸代、井上望、相内敏弘、木庭新治、加藤里奈、山口智広、板部洋之：ヒト血漿中から分離した酸化 LDL の apoB 変性とリン脂質分子種の解析、日本薬学会第 135 年会　2015 年 3 月 26-28 日　神戸

3.笹部直子、板部洋之、井上望、和田暁、梅宮大貴、佐々木愛紗、相内敏弘、加藤里奈、小浜孝士、山口智広：ヒト血漿中の酸化 LDL の性状　～質量分析計を用いた脂質プロファイルの検討～、第 56 回日本脂質生化学会　2014 年 6 月 6-7 日　大阪

4. 笹部直子、和田暁、梅宮大貴、佐々木愛紗、小浜孝士、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、板部洋之：ヒト血漿中から分離した変性 LDL の酸化変性とリン脂質分子種の解析、日本薬学会第 134 年会　2014 年 3 月 28 日　熊本

5. 井上望、増子幸志、小浜孝士、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、板部洋之：ヒト血漿酸化 LDL の分離と酸化リン脂質の LC-MS/MS 解析、第 14 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、2013 年 6 月 1 日東京

6. 板部洋之：新たな生活習慣病・歯周病とリポタンパク質、第 5 回コレステロールダイナミクス研究会　2013 年 5 月 25 日　東京（招待講演）

7. 板部洋之：酸化 LDL のこれまでとこれから、第 5 回レドックス・ライフイノベーション・シンポジウム　2013 年 3 月 7-8 日　川崎（招待講演）

8. 守谷瑠梨子、伊藤綾花、小浜孝士、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、板部洋之：酸化 LDL 中の酸化修飾リポタンパク質の LC-MS/MS 解析、第 56 回日本薬学会関東支部大会　2012 年 10 月 13 日

9. 井上望、増子幸志、小浜孝士、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、板部洋之：生体内酸化 LDL に現れる特異的脂質成分の解析、第 56 回日本薬学会関東支部大会　2012 年 10 月 13 日

10. Itabe H, Obama T, Koba S, Aiuchi T, Kato R, Yamaguchi T: Separation and character- rization of oxidized LDL from human plasma, ICBL, Banff, Canada 2012 9/5-9

11. Obama T, Takahashi A, Kusunose Y, Kanoh A, Tanabe K, Hamasaki Y, kato R, Aiuchi T, Yamaguchi T, Koba, Yoichi Kobayashi Y, Itabe H: Characterization of oxidized phospholipids and cholesterol esters in human oxidized low-density lipoproteins by LC-ESI-MS/MS、第 44 回日

本動脈硬化学会　2012 年 7 月 19-20 日　福岡

12．板部洋之：生体内酸化ストレスのマーカーとしての酸化 LDL、第 65 回日本酸化ストレス学会　2012 年 6 月 7-8 日　徳島（招待講演）

13．小浜孝士、高橋あい理、楠ノ瀬雄也、木庭新治、濱崎裕司、小林洋二、相内敏弘、加藤里奈、山口智広、板部洋之：ヒト血漿から分離した酸化 LDL に存在する酸化脂質の網羅的解析、第 54 回日本脂質生化学会　2012 年 6 月 7-8 日　福岡

〔図書〕（計 1 件）
1．グリケーション　「酸化ストレスの医学」改訂第 2 版（吉川敏一監修、内藤裕二、豊國伸哉編集）p.130-136　診断と治療社　2014 年　東京

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）

○取得状況（計０件）

〔その他〕

６．研究組織
(1)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

(2)研究分担者
加藤　里奈（KATO, Rina）
昭和大学・薬学部・助教
研究者番号：３０３９２４００

小浜　孝士（Obama, Takashi）
昭和大学・薬学部・助教
研究者番号：６０３９５６４７

(3)研究協力者
野口　江美子（NOGUCHI, Emiko）