

—平成17年度 岐阜薬科大学特別研究費（奨励）—

酸化高密度リポタンパクによる動脈硬化発症および 進展機序の解明

松永俊之

1. 緒言

動脈硬化発症および進展時には、血中活性酸素種が顕著に増加することによる生体成分の酸化修飾やそれに伴う構造的および機能的異常がある。特に、動脈硬化促進作用を有する低密度リポタンパク (LDL) は血中で容易に酸化され、その酸化修飾体は血管壁細胞に対して脂肪の蓄積を促すのみならず、細胞内活性酸素種の増加等を介して種々の血管系細胞のアポトーシスを誘導することにより粥状動脈硬化の進展とそのプラーク破綻を誘発する。それに対し、高密度リポタンパク (HDL) は生体内において LDL の酸化を抑制するだけでなく、細胞内一酸化窒素 (NO) 量の増加等を介して酸化 LDL による細胞毒性を軽減することにより抗動脈硬化効果を発現するとされている。近年、*in vitro* において HDL は LDL よりも早く酸化されることが明らかになったことを端緒に、*in vivo* においても HDL が酸化されることが生物学的および化学的に明らかになってきている。

私は今までに、HDL の酸化修飾体と動脈硬化発症の関連性を臨床的に検討し、健常人血中と比較して動脈硬化患者血中には酸化 HDL が高値に存在すること¹⁾だけでなく、酸化 HDL はヒト動脈硬化巣の血管内皮細胞近傍のみに局在すること²⁾を明らかにしている。また、*in vitro* で調製した酸化 HDL は細胞内活性酸素種の増加等を介して血管内皮細胞のアポトーシスを誘起することを見出している^{3,4)}。このように、HDL の酸化修飾は本来 HDL が有する抗動脈硬化作用を失うだけでなく、さらに、血管内皮細胞のアポトーシスを誘発することから、酸化 HDL は動脈硬化の発症および進展過程において、酸化 LDL と同様に重要な位置を占めることを明らかにしている。

そこで今回、酸化 HDL による血管内皮細胞アポトーシスの機序の詳細を解明する一環として、*in vitro* において酸化修飾した HDL 粒子中の脂質成分の変化を調べることにより酸化 HDL 中のアポトーシス関連因子の同定を試み

た。また、酸化 HDL 処理により誘起される血管内皮細胞アポトーシスの細胞内シグナリングに MAP キナーゼ経路および NO 産生が関与するかどうか検討を行った。

2. 実験

リポタンパクは健常人および動脈硬化患者血清中から臭化ナトリウムを用いた段階的浮上分画法にて分離し、リポタンパクの酸化修飾体は、それぞれのリポタンパク溶液に硫酸銅を添加して 37°C で 18 時間インキュベートすることにより調製した。リポタンパク粒子中の脂質成分の構造変化は、除タンパク後のリポタンパク成分を LC/MS にて分離同定した⁵⁾。また、酸化リポタンパク粒子中のタンパク質成分を HPLC にて分取、透析した後、培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) にそれぞれのタンパク成分を添加して毒性効果を WST-1 を用いて測定した。

in vitro で調製した酸化 HDL で培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を刺激した後に細胞ホモジネートを調製し、そのサイトゾル画分をウエスタンブロット分析に、核画分をゲルシフトアッセイに供することにより、細胞内 MAP キナーゼ経路の活性化を測定した。細胞内での NO 産生は蛍光プローブとしてジアミノフルオレッセイン 2 を用いて蛍光顕微鏡下にて検出し、培地中に放出された NO は 2,3-ジアミノナフタレンと反応して生成する 1-(H)-ナフトトリアゾールの蛍光を測定することにより検出した。本研究におけるヒト血清の使用は埼玉医科大学倫理委員会において承認を受けており、研究内容および趣旨を十分に説明した後に、インフォームドコンセントを得て健常人および動脈硬化患者から血液を採取した。

3. 結果・考察

1. 酸化 HDL 粒子中の脂質成分の変化

健常人血中から単離した HDL 粒子の脂質成分の LC/MS 分析を行ったところ、構成する脂質成分の約 80% がホスファチジルコリン (PC) であり、それ以外にリゾ

ホスファチジルコリン (lyso-PC)、スフィンゴミエリンおよびホスファチジルエタノールアミンがそれぞれ検出された。それに対し、*in vitro* において銅イオンで酸化修飾した HDL では、PC 含量が顕著に減少すると同時に lyso-PC が著増し、ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PC-OOH) やリゾホスファチジルコリンアルデヒドエステル (PC-CHO) 等の lyso-PC 生成時の中間体も少量検出された。また、動脈硬化患者血中から単離した HDL を用いた場合、有意ではないが若干の lyso-PC 含量の増加が認められた。このように、HDL の酸化修飾時には主に PC のリゾ体生成反応が進行し、HDL 粒子中に lyso-PC が蓄積することが示された。次に、HDL 粒子を構成する主要タンパク成分であるアポリポタンパク A-I や A-II の酸化修飾体を銅酸化 HDL から単離して HUVEC に対する毒性効果を検討した結果、100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度のそれぞれの酸化タンパク成分においても酸化 HDL 刺激で認められるような細胞毒性は認められなかった。Lyso-PC は血管内皮細胞をはじめとした種々の血管系細胞に直接作用して活性酸素種を介したアポトーシスを誘導することが知られているため、酸化 HDL による血管内皮細胞アポトーシスは主に粒子中で著増した lyso-PC によって誘導されることが示唆されるが、酸化 HDL 粒子中に存在する PC-OOH や PC-CHO による毒性効果は現時点では未知であるため、これらを用いた更なる検討が必要である。

2. 酸化 HDL によるアポトーシスへの MAP キナーゼ系の関与

私は今までに、酸化 HDL による血管内皮細胞アポトーシス機序として、細胞内活性酸素種の増加およびミトコンドリア機能障害に伴うカスパーゼ経路の活性化について明らかにしてきた。その中で、ミトコンドリアの膜電位低下に関わる bax の発現調節をすることが知られる p53 の細胞内レベルの増加とその核への移行を見出している。また、p53 は MEK-Jun キナーゼ系によって活性化されることが知られているため、酸化 HDL で刺激した HUVEC 中のリン酸化 c-Jun 量をウエスタンブロット法にて検出した。Fig. 1 に示すように、HDL 刺激ではほとんど変化は見られなかったのに対し、酸化 HDL 処理ではリン酸化 c-Jun 量は

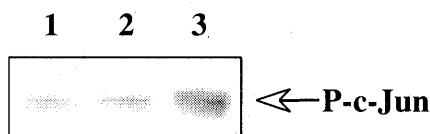


Fig. 1 Western blotting of phosphorylated c-Jun

HUVEC were treated without (lane 1) or with 200 $\mu\text{g/ml}$ of HDL (lane 2) or oxidized HDL (lane 3). Cytosolic phosphorylated c-Jun (P-c-Jun) was detected by Western blotting.

顕著に増加した。また、ゲルシフトアッセイの結果から、HUVEC の核中の AP-1 量も酸化 HDL 処理により著増した (Fig. 2)。これらの結果から、酸化 HDL による内皮細胞アポトーシス機序に MAP キナーゼの活性化および AP-1 の核への移行が関与することが示された。

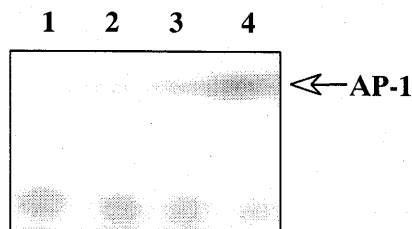


Fig. 2 Gel shift assay of AP-1 in nuclear fraction

HUVECs were treated with 200 $\mu\text{g/ml}$ oxidized HDL, and nuclear AP-1 was detected by gel shift assay using AP-1 consensus oligonucleotide. The lane labels are (1) oligonucleotide alone and mixtures of oligonucleotides with each nuclear fraction of HUVECs treated with (2) untreated control; (3) native HDL; and (4) oxidized HDL.

3. 酸化 HDL によるアポトーシスへの NO の関与

HDL は内皮細胞型 NO 合成酵素 (eNOS) 量を増加させるだけでなく、スカベンジャー受容体 BI を介して eNOS を活性化することが知られている。そこで、酸化 HDL による NO 量の変化をモニターしたところ、酸化 HDL の調製に用いた銅イオン濃度が増加するにつれて、つまり、HDL の酸化度が進むにつれて細胞外 NO 量は減少し、細胞内 NO 濃度についても同様な結果が認められた。また、eNOS 量については、HDL での刺激は eNOS 量を増加させたのに対し、酸化 HDL では eNOS 量は減少した。酸化 HDL による細胞内 NO の減少とアポトーシス誘導との関連を調べるために、外因性 NO ドナー 3,3-Bis(aminoethyl)-1-hydroxy-2-oxo-1-triazene (DETA/NO) で前処理した HUVEC に酸化 HDL を処理して細胞生存率を測定したところ、酸化 HDL による細胞生存率の低下は DETA/NO の前処理により顕著に抑制された。このように、酸化 HDL によるアポトーシス機序に細胞内 NO 量の減少も関与することが示された。

4. 引用文献

- 1) T. Nakajima, T. Matsunaga, *et al. Ann. Clin. Biochem.*, **41**, 309 (2004).
- 2) T. Nakajima, N. Origuchi, T. Matsunaga, *et al. Ann. Clin. Biochem.*, **37**, 179 (2000).
- 3) T. Matsunaga, *et al. Metabolism*, **52**, 42 (2003).
- 4) T. Matsunaga, *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **303**, 313 (2003).
- 5) T. Matsunaga, *et al. J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **781**, 331 (2002).