◆トピックス◆

外因系凝固インヒビター (TFPI) を阻害する 酸化 LDL 中のリン脂質

大 蔵 直 樹*, 堀 江 修 一*

Phospholipids in oxidized LDL reduce the activity of tissue factor pathway inhibitor

Naoki OHKURA* and Shuichi HORIE*

Key words: TFPI, oxidized LDL, oxidized phospholipid, coagulation, atherosclerosis,

はじめに

酸化 LDL は動脈硬化症の発症・進展に関与することが明らかにされている。すなわち、血流中から血管内皮下に侵入した LDL は、そこで酸化変性を受けて単球由来マクロファージを泡沫化し、中膜平滑筋細胞の増殖や内膜遊走を誘導して粥腫形成に至る。酸化 LDL は血中にも存在し、血管内皮細胞や平滑筋細胞などに対しさまざまな活性を発揮することがわかっている。すなわち、酸化 LDL は血管内皮細胞の組織因子や PAI-1 の発現を促進させ、トロンボモジュリンの発現を抑制させる。また、血小板活性化や凝集能を亢進させるという報告もあり、酸化 LDL は血栓形成に深く関わりと考えられている¹⁾。

TFPI は血管内皮細胞のほかに、平滑筋細胞や心筋細胞、繊維芽細胞など種々の血管壁細胞で産生され、単球や血小板中にも存在することが知られている。血管内に遊離された TFPI は、リポタンパク質結合型、および遊離型として血中に存在するほか、血管壁細胞や組織の TFPI リセプター、あるいは TFPI 結合タンパク質と

結合して血管壁に存在している²⁾。

我々はこれまでに内皮細胞における TFPI の発現や分泌、およびその機能に及ぼす酸化 LDL の影響について検討し、酸化 LDL が血管内皮細胞に作用して TFPI の分泌を低下させること、また、TFPI の C 末端塩基性部位と速やかに結合して TFPI 活性を低下させることを示した^{3), 4)}。このことは、酸化 LDL が TFPI 活性の阻害を介して動脈硬化部位局所での血栓形成に関わる可能性を示すものである。LDL の酸化は分子内できわめて多様な修飾を起こしているが、その中でどのような成分が実際に TFPI 活性を阻害するのかについて探索したので紹介する^{5), 6)}。

TFPI を阻害する酸化 LDL 中の主成分

TFPI 活性を低下させる酸化 LDL 中の成分を調べるために、酸化 LDL および未変性 LDL を脂溶性画分と水溶性画分に分画し、それぞれの成分の TFPI 活性、および TFPI 特異的 ELISA への影響を調べた (図 1)。その結果、酸化 LDL 100 μ g プロテイン /ml に含まれる脂質と同濃度

* 帝京大学薬学部臨床分子生物学教室 [199-0195 神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐 1091-1]

Clinical Molecular Biology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University [1091-1 Suarashi, Sagamiko, Tsukui-gun, Kanagawa 199-0195, Japan]

Tel: 0426-85-3756 Fax: 0426-85-2577 e-mail: n-ohkura@pharm.teikyo-u.ac.jp

(A) TFPI 活性への影響

(B) 抗体との反応性への影響

図1 未変性 LDL, 酸化 LDL の脂溶性画分と水溶性画分, および脂溶性画分が TLC 分画物の (A)TFPI 活性と (B)TFPI 特異的 ELISA におよぼす影響 (文献5より引用・改変)

T: 未変性 LDL または酸化 LDL, A: 水溶性画分, O: 脂溶性画分, 1~10: 酸化 LDL の脂溶性画分を TLC で分離した 10 画分. 結果は TFPI のみに対する相対活性の平均値±標準偏差

の脂溶性画分でも, 活性や抗体との反応性を分画前の酸化 LDL と同程度に低下させた. しかし, 水溶性画分や未変性 LDL 由来の成分では

TFPI の活性や抗体との反応性に影響を与えなかった. さらに, 脂溶性画分を TLC により 10 画分に分離して同様の検討を行ったところ, 酸化 LDL 由来の主に酸化リン脂質を含む TLC 画分 1 の存在下に TFPI の活性および抗体との反応性が共に低下し, それは分画前の酸化 LDL と同程度だった (図1). 一方, 遊離脂肪酸 (画分 2, 3), 7-ケトコレステロール (画分 2), コレステロール (画分 4), トリアシルグリセロール (画分 10), および他の脂質画分 (画分 5~9) は, いずれも TFPI の活性および抗体との反応性にほとんど影響しなかった.

TFPI 活性を低下させるリン脂質酸化体

酸化 LDL 中には複数のリン脂質の多様な修飾物が存在するため, 酸化 LDL を出発材料にして, どのようなリン脂質の酸化生成物が TFPI 活性を低下させるかを特定することは難しい. そこで, LDL 中の主なリン脂質を酸化して調製したリン脂質酸化体を用いて TFPI 活性におよぼす影響を調べた. 図2の灰色枠中に示したものは酸化体の調製に使用したリン脂質で, それぞれ炭化水素の鎖長や二重結合の位置が異なるリン脂質を用意し, 鉄イオン存在下にそれらの酸化体を調製した. なお, 白枠中の Lyso-PC と Lyso-PA は酸化 LDL 中に存在するが, それぞれ PC と PA から生成されることが知られている. 図3には各リン脂質酸化体の TFPI 活性に及ぼす影響を示したが, 酸化調製した各リン脂質酸化体は TFPI 活性を阻害するものと全く阻害しないものの2者に分類された. 図2の構造と対応させてみると, TFPI 活性を阻害した酸化リン脂質の酸化前に共通する構造は, 1位あるいは2位のアシル基の9番目の位置に2重結合が存在すること, すなわち, δ -9 不飽和脂肪酸を含有するリン脂質であることがわかる. また, 実際に 9CHO-PC や 9COOH-PC を PO-PC から調製したところ TFPI 活性を強く阻害した. 従って, LDL 中

図2 リン脂質酸化体の調製に使用した各種リン脂質の構造 (文献6より引用・改変)

OP-PC : 1-oleoyl-2-palmitoyl PC, PL-PC : 1-palmitoyl-2-linoleoyl-PC, PO-PE : 1-palmitoyl-2-oleoyl PE, SA-PC : 1-stearoyl-2-arachidonoyl PC (以下同様のリン脂質の略), lysoPC : Lysophosphatidylcholine, LysoPA : 1-oleoyl phosphatidic acid, PA : 1,2-dioleoyl phosphatidic acid, 9CHO-PC : PC containing a 9-carbon chain with a terminal aldehyde in the sn-2 position (oxononanoyl PC, 1-palmitoyl/stearoyl-2-nonyl-aldehyde PC); 9COOH-PC : PC containing a 9-carbon chain with a terminal carboxylic acid in the sn-2 position (1-palmitoyl/stearoyl-2-nonoic acid PC), 5CHO-PC : PC containing a 5-carbon chain with a terminal aldehyde in the sn-2 position (oxovaleroyl PC, 1-palmitoyl/stearoyl-2-pentyl aldehyde PC), 5COOH-PC : PC containing a 5-carbon chain with a terminal carboxylic acid in the sn-2 position (1-palmitoyl/stearoyl-2-pentanoic acid PC)

9CHO-PC, 9COOH-PC は PO-PC 酸化物から 5CHO-PC, 5COOH-PC は SA-PC 酸化物からそれぞれ精製した。

図3 各種リン脂質酸化体の TFPI 活性に及ぼす影響 (文献5より引用・改変)

50 $\mu\text{g/ml}$ の酸化 LDL に含まれるリン脂質に相当する各酸化リン脂質を 10 ng/ml の rTFPI と 3 時間インキュベーションした後, TFPI 活性を測定した。

9CHO-PC および 9COOH-PC は, 10 ~ 50 $\mu\text{g/ml}$ の酸化 LDL 相当量を rTFPI とインキュベーション後, TFPI 活性を測定した。結果は平均値±標準偏差

ox-PhL: 酸化 LDL 由来リン脂質

のリン脂質が酸化されて産生される 9 番目の二重結合部位のアルデヒド体やカルボン酸体リン脂質が, TFPI 活性を阻害する本態であると推測される。一方, 2 位のアシル基の δ 位 5 番目に 2 重結合が存在する δ -5 不飽和脂肪酸含有リン脂質から調製した酸化リン脂質やそれらから調製した 5CHO-PC, 5COOH-PC は, いずれも TFPI 活性を阻害しなかった。

おわりに

9CHO-PC や 9COOH-PC は血中の酸化 LDL や動脈硬化部位に存在することが示唆されており⁷⁾, これらが実際に TFPI 活性を阻害し血栓形成に関わる可能性が考えられる。現在, 酸化 LDL 由来の酸化リン脂質を HPLC によってさらに分画する研究を進めているが, 9CHO-PC や 9COOH-PC に加え, 他のリン脂質酸化体も TFPI 活性の阻害に関わることを示すデータも

得られている。動脈硬化の進展に関わる酸化 LDL の多様な作用が, 本研究で示唆されたリン脂質酸化体とどのような関係にあるのか興味深い。

謝辞: 本研究は(財)化血研 羽室強博士, 帝京大学薬学部 板部洋之先生らに日々御助言, 御協力戴きました。この場を借りて御礼申し上げます。また, 本稿執筆の機会を与えて頂きました国立循環器病センター研究所, 宮田敏行先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 大村寛敏, 空野浩司: 酸化 LDL と血栓形成. *Thrombosis and Circulation* **9**: 54-59, 2001.
- 2) 加藤久雄: TFPI 研究の最近の進歩. *日本血栓止血学会誌* **14**: 220-226, 2003.
- 3) Horie S, Hiraishi S, Hirata Y, Kazama M, Matsuda J: Oxidized low-density lipoprotein impairs the anti-coagulant function of tissue-factor-pathway inhibitor through oxidative modification by its high association and accelerated degradation in cultured human endothelial cells. *Biochem J*

- 352** : 277-285, 2000.
- 4) Horie S, Hiraishi S, Hamuro T, Kamikubo Y, Matsuda J: Oxidized low-density lipoprotein associates strongly with carboxy-terminal domain of tissue factor pathway inhibitor and reduces the catalytic activity of the protein. *Thromb Haemost* **87** : 80-85, 2002.
 - 5) Hiraishi S, Horie S, Seyama Y: Oxidation products of phospholipid-containing δ -9 fatty acids specifically impair the activity of tissue factor pathway inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* **298** : 468-473, 2002.
 - 6) Ohkura N, Hiraishi S, Itabe H, Hamuro T, Kamikubo Y, Takano T, Matsuda J, Horie S: Oxidized phospholipids in oxidized low-density lipoprotein reduce the activity of tissue factor pathway inhibitor through association with its carboxy-terminal region. *Antioxid Redox Signal* 2004. accepted
 - 7) Itabe H: Oxidized low-density lipoproteins: What is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull* **26** : 1-9, 2003.