LOX-1 リガンド活性を用いた酸化 LDL の測定

内田景博^{*1,4}, 末廣 謙^{*2}, 沢村達也^{*3}, 若林一郎^{*4}

Evaluation of oxidized LDL using LOX-1 ligand activity

Kagehiro UCHIDA^{*1,4}, Akira SUEHIRO^{*2}, Tatsuya SAWAMURA^{*3}, Ichiro WAKABAYASHI^{*4}

Key words: LOX-1, Oxidized LDL

1. はじめに

Low density lipoprotein (LDL) は、アポリポ蛋白 B (apoB) と遊離コレステロール、コレステロールエステル、中性脂肪、ホスファチジルコリンの 1 分子の蛋白質と 4 種の脂質で構成される分子量約 2,000kDa の球状粒子である。この LDL は生体の酸化反応により酸化フォスファチジルコリン、マロンジアルデヒド、4-ヒドロキシ-2-ノネナール、アクロレインなどを生成する。これらの脂質過酸化物は反応性に富み、さらには apoB 蛋白のリジン残基と反応して翻訳後酸化修飾物を生成する。これらの酸化生成物を包含する巨大な集合体が酸化 LDL (OxLDL) である。この OxLDL は細胞に対して強い毒性を有する。これを取り込み泡沫化して、血管内膜に蓄積したマクロファージはアポトーシスにより酸化生成物を放出する。この酸化生成物が、単球・リンパ球の遊走・接着・分化を促進し、平滑筋細胞を増殖させ動脈硬化の進展に働く。従って OxLDL の動態把握は動脈硬化進展の評価に有用である。

2. バイオマーカーとしての OxLDL とその測定法

1990 年代後半から様々な酸化修飾体に対するモノクローナル抗体が作成され、これら抗体と抗 apoB 抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法により血中 OxLDL 値が測定されてきた。この測定方法により、不安定プラークを持つ冠動脈疾患や心筋梗塞急性期の血中 OxLDL は高値を示すことが明らかにされている。

しかしこれら測定法はモノクローナル抗体を使用するため、巨大 OxLDL 粒子の一部分のエピトープしか測定できていない。また標準物質としての OxLDL は銅イオンの触媒下で LDL を人工的に酸化させるため、作製条件による影響を受け易いことも想定される。

3. LOX-1 の発見

血液中の OxLDL がどのようにして内皮機能の障害をきたすのかは不明であったが 1997 年沢村らは OxLDL の結合能を指標にした遺伝子発

^{*1} バイオマーカー・サイエンス [〒 606-8225 京都市左京区田中門前町 103-5]

Biomarker Science [103-5 Tanaka-Monzen-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8225, Japan]

^{*2} 兵庫医療大学共通教育センター [〒 650-8530 神戸市中央区港島 1-3-6]

General Education Center, Hyogo University of Health Science
[1-3-6 Minatojima, Chuou-ku, Kobe, Hyogo 650-8530, Japan]

^{*3} 国立循環器病研究センター 研究所血管生理学部 [〒 565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1]

Department Vascular Physiology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute
[5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan]

^{*4} 兵庫医科大学環境予防医学 [〒 663-8501 西宮市武庫川町 1-1]

Department of Environmental and Preventive Medicine, Hyogo College of Medicine
[1-1 Mukogawa-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8501, Japan]

図1 酸化LDLからアテローム形成までの概略

現クローニング法により、ウシ大動脈内皮細胞からOxLDLに対するレクチン様OxLDL受容体(LOX-1)を同定した¹⁾。LOX-1は273アミノ酸からなる約50kDaの細胞膜一回貫通型のII型受容体である。このLOX-1遺伝子改変マウスによる解析から、その発現の亢進は向炎症性、向動脈硬化性、向血栓性の病態を呈し、LOX-1遺伝子欠損ではこの病態悪化が抑制されることが明らかにされた(図1)。一方、ラット血管のバルーン傷害モデルでは、中膜平滑筋にLOX-1が発現し、内膜の肥厚に伴いLOX-1発現の亢進がみられるが、抗LOX-1抗体やLOX-1遺伝子抑制で制御される。さらにLOX-1は糖尿病、高血圧などで発現が亢進し、血小板にも発現することが見出されており、血管障害と血栓形成に関与することが示唆される。

4. OxLDLの生理活性を反映する血中apoB含有LOX-1リガンド(LAB)の新しい測定法の確立

従来の2種類の抗OxLDLモノクローナルを用いる測定系ではOxLDLの特定の構造しか認識できないという問題があった。そこで抗体に代えてLOX-1蛋白を用い、LABがこの受容体に結合する活性を定量することにより特定の変性LDLではなくOxLDL全体を測定することが可能になった。

その測定操作は以下の通りである。まずLOX-1がLABに結合する領域を含む細胞外ドメインの組換え蛋白をELISAプレートに添加し4℃で約12時間保温し固相化する。プレートを生理食塩リン酸緩衝液(PBS)で洗浄したのち、

1. LOX-1のコーティング
2. サンプルアプライ
3. 抗apoBチキン抗体
4. HRP標識抗チキンIgY抗体
5. TMB基質反応
6. 450nm測定

図2 血中apoB含有LOX-1リガンド(LAB)の測定法

非特異吸着を防ぐために1時間以上室温でブロッキングする。プレートの洗浄後にリガンドを含む血清検体またはOxLDL標準液を添加して2時間後PBSで洗浄したのち、プレートにニワトリ抗apoBモノクローナル抗体(HUC20)を添加して1時間室温に置く。洗浄後にペルオキシダーゼを結合したヤギ抗ニワトリIgYを添加しさらに1時間室温に置く。PBSで洗浄後、TMB基質を添加し30分後、硫酸の添加により反応を停止した後、450nmの吸光度を測定し、標準液から作成した検量線を用いて検体中に含まれるLABの値を算出する(図2)。この測定系を用いて人工OxLDLを測定したが、標準液として従来用いられてきた人工OxLDLは不安定で、測定間誤差が20%以上と大きかった。この問題を解決するため脂質部分を含まず、LOX-1とOxLDLの結合を阻害するモノクローナル抗体の可変領域とapoBの一部のアミノ酸配列を用いた融合蛋白を開発してOxLDLの標準液として用いることにした²⁾。その結果、測定間誤差を3%以下に低減することができ臨床に用いることのできる測定法が確立された。

5. 確立された方法によるヒト検体の測定

健康人男性血清中のLAB値(19-4520ng/mL)は正規分布しなかったが、対数変換後に正規分布を示した³⁾。

LABと脳梗塞および虚血性心疾患のリスクとの間に関連性が認められ、その強さは血圧、喫煙と同等であった⁴⁾。また脂質異常症へのピタバ

図3 健常男性236名における喫煙，血圧，中性脂肪，臍周囲径のLog (LAB) に及ぼす影響³⁾ それぞれ平均値±SEを示す。* $p<0.05$ ，** $p<0.01$

スタチン投与によりLABは有意に低下したが，LAB値とLDL値の減少率には強い相関はみられず，LDL非依存性にLABが低下したと考えられ，スタチンによる抗酸化作用が示唆された⁵⁾。健常者におけるLAB値は，中性脂肪および喫煙歴と有意な関連を示した(図3)。喫煙は動脈硬化の主要な危険因子であり，喫煙者では非喫煙者に比べて酸化LDL値が高いことが知られているが，喫煙は他の動脈硬化リスク要因と独立してLAB値と有意な正の相関を示した。また，メタボリック症候群を有する群ではLABが高値を示した³⁾。

6. おわりに

LABは動脈硬化の病態生理と関連した血中酸化ストレスを反映していることが推測され，今回確立された測定法によるLAB値は動脈硬化の一次予防マーカーとして有用であると考えられる。

Disclosure of Conflict of Interests

The authors indicated no potential conflict of interest.

文 献

- 1) Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T: An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* **386**: 73-77, 1997.
- 2) Iwamoto S, Fujita Y, Kakino A, Yanagida K, Matsuda H, Yoshimoto R, Sawamura T: An Alternative Protein Standard to Measure Activity of LOX-1 Ligand Containing apoB (LAB)-Utilization of Anti-LOX-1 Single Chain Antibody Fused to apoB Fragment. *J Atheroscler Thromb* **18**: 818-828, 2011.
- 3) Uchida K, Suehiro A, Nkanishi M, Sawamura T, Wakabayashi I: Associations of atherosclerotic risk factors with oxidized low-density lipoprotein evaluated by LOX-1 ligand activity in healthy men. *Clinica Chimica Acta* **412**: 1643-1647, 2011.
- 4) Inoue N, Okamura T, Kokubo Y, Fujita Y, Sato Y, Nakanishi M, Yanagida K, Kakino A, Iwamoto S, Watanabe M, Ogura S, Otsui K, Matsuda H, Uchida K, Yoshimoto R, Sawamura T: LOX index, a novel predictive biochemical marker for coronary heart disease and stroke. *Clin Chem* **56**: 550-558, 2010.
- 5) Matsumoto T, Fujita M, Sawamura T, Kakino A, Sato Y, Fujita Y, Matsuda H, Nakanishi M, Uchida K, Nakae I, Kanda H, Yoshida A, Miwa K, Hayashi H, Mitsunami K, Horie M: Pitavastatin Reduces Lectin-Like Oxidized Low-Density Lipoprotein Receptor-1 Ligands in Hypercholesterolemic Humans. *Lipids* **45**: 329-335, 2010.