

種々の動脈硬化疾患における 血漿中酸化LDL値の動態とその意義

成子 隆彦^{*1} 上田真喜子^{*2} 土師 一夫^{*1} 江原 省一^{*3} 山下 啓^{*3}
伊倉 義弘^{*2} 生田 剛士^{*4} 末広 茂文^{*4} 吉川 純一^{*3}

要 旨：動脈硬化の進展における酸化LDLの意義が注目されている。われわれは、不安定狭心症（UAP）における血漿中酸化LDL値の動態を解析したところ、有意狭窄性UAP群では冠攣縮性UAP群に比べ、血漿中酸化LDL値が有意に高値であった。また、UAPを合併した糖尿病例のほうが合併のない糖尿病例に比べ血漿中酸化LDL値が高値であった。以上より血漿中酸化LDL値の上昇は、動脈硬化性プラークの進展や不安定性と密接に関連していることが強く示唆される。（J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, 43: 155-159）

Key words: Atherosclerosis, Oxidant stress, Lipoprotein

はじめに

スーパーオキシドや過酸化水素に代表される活性酸素の生体内での過剰な産生亢進は、炎症、癌化、虚血、最近では老化に至るまで、種々の病態の成因に関与していることが明らかにされてきている。なかでも、酸化ストレスの亢進によりその生成が増大すると考えられている酸化LDLは、血管内皮細胞の傷害や炎症性細胞の集積等を介して、ヒト冠動脈プラークの発症・進展のみならず、プラーク不安定化にも関与するのではないかと想定されており、最近、その関連性について注目が集まっている¹⁾。

従来、酸化LDLは、実験的研究では動脈硬化の発生に関与する物質と考えられ、血中では、ビタミンを始めとする抗酸化物質の作用により、測定は困難と考えられていた。しかしItabeら¹³⁾が開発した測定系を用いて血漿中酸化LDLの測定が可能となり、種々の動脈疾患における酸化LDLの意義が注目されてきている。本項では、酸化LDLの基礎的データ、われわれの病理病態学的データ、および種々の動脈硬化疾患における血漿中酸化LDL値の意義について報告する。

(1) 動脈硬化性プラークの進展における 酸化LDLの関与

A. 実験的研究からみた酸化LDLの意義

ヒト冠動脈プラークでは、時に多数の泡沫細胞の形成が認められる。この泡沫細胞は免疫組織化学的にマクロファージ由来であることが示されており、*in vitro*の培養細胞系でもマクロファージが泡沫化することが明らかにされている。マクロファージはnative LDLを取り込んで泡沫化することはない。しかし、マクロファージはアセチルLDLなどの変性LDLを認識するスカベンジャー受容体を有しており、この受容体を介して変性LDLを無制限に取り込むことにより、マクロファージの泡沫化が起こることが明らかにされた^{2,3)}。ただし、アセチルLDLのような変性LDLが生体内に存在する可能性がほとんどないと考えられたため、生体内に存在しうる変性LDLとして酸化LDLが注目されるようになった。これまでの実験的研究から、LDLは内皮細胞、平滑筋細胞やマクロファージなどにより酸化変性をうけることが証明されており^{4,5)}、また酸化LDLの局在は動脈硬化巣でも確認されている^{6,7)}。

酸化LDLはマクロファージの泡沫化以外にも、血液中の単球を遊走させて血管壁に引き込むとともに、一旦血管壁内に侵入した単球がマクロファージに変化した後には、その遊走を抑制して血中に戻るのを阻止す

^{*1}大阪市立総合医療センター循環器内科

^{*2}大阪市立大学大学院医学研究科病理病態学

^{*3}大阪市立大学大学院医学研究科循環器病態内科学

^{*4}大阪市立大学大学院医学研究科心臓血管外科学

2003年5月16日受理

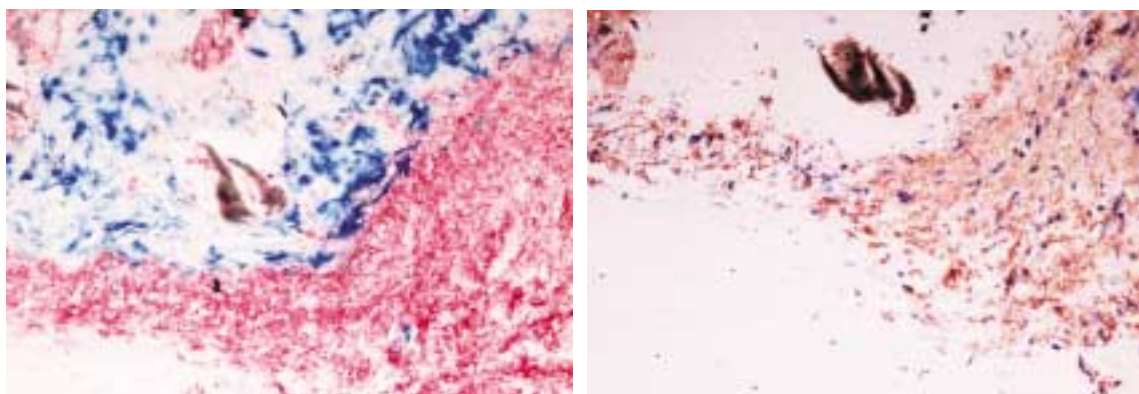


Figure 1 不安定プラークにおける酸化LDLの局在

A: プラーク内には平滑筋細胞(青)の他、マクロファージ(赤)の集積・泡沫化が認められる。平滑筋細胞(青)とマクロファージ(赤)の免疫二重染色

B: 高度に集積したマクロファージにほぼ一致して酸化LDLの局在が認められる。抗酸化LDLを用いた免疫単染色

る働きがあることが知られている。また、酸化LDLはTリンパ球を活性化させたり、強い内皮細胞傷害を引き起こすことが明らかにされている⁵⁾。これらの実験的データは、酸化LDLがヒト動脈硬化の進展、特に動脈硬化病変における炎症性プロセスの進展に関して重要な役割を担っていることを強く示唆している。

B. ヒト冠動脈プラークにおける酸化LDLの局在

近年、種々の変性LDLに対するモノクローナル抗体を用いて、生体内での変性LDLの存在が示されている。Itabeらは、抗酸化LDLモノクローナル抗体であるDLH3抗体を開発した⁸⁾。われわれはヒト冠動脈プラークにおける酸化LDLの局在について免疫組織化学的に検索し、プラーク内のマクロファージ由来泡沫細胞にほぼ一致して酸化LDLが局在することを明らかにしている⁹⁾。

われわれはさらに、この抗体を用いて、安定狭心症例と不安定狭心症例より得られた冠動脈アテレクトミー組織標本における酸化LDLの局在について検索し、安定狭心症例の責任病変部位では、一部の散在する泡沫化マクロファージに酸化LDLが局在しているのみであったが、不安定狭心症例の責任病変部位では、集積する多数の泡沫化マクロファージに酸化LDLが高度に陽性であることを明らかにしている(Fig. 1)⁹⁾。

また、急性心筋梗塞症の剖検例の梗塞責任部位でも、プラーク破裂部位およびプラークびらん部位に集

積した泡沫化マクロファージに酸化LDLが陽性であることを明らかにしている(Fig. 2)¹²⁾。

したがって、従来から指摘されているようなマクロファージの集積、酸化LDLの取り込み、泡沫細胞化というプロセスが、実際にヒト冠動脈のプラーク形成・進展、さらには不安定化に関わっていることは事実と考えられる。

(2) 種々の動脈硬化疾患における血漿中酸化LDL値の意義

A. 急性冠症候群と血漿中酸化LDL値

われわれは最近、Itabeら¹³⁾が開発した測定法を用いて、血漿中酸化LDL値の測定に成功している。この血漿中酸化LDL値は、LDLを画分した後、5 μ g LDLあたりの酸化LDL (ng/ 5 μ g LDL protein) を測定するものである。われわれはこの測定法を用いて、血漿中酸化LDL値と急性冠症候群の各病態との関連性について検討し、急性心筋梗塞症群では不安定狭心症群、安定狭心症群、健常者群に比し、血漿中酸化LDL値が有意に高値であることをはじめて明らかにしている(各群の血漿中酸化LDL値; 急性心筋梗塞群: 1.95 ± 1.42 ; 不安定狭心症群: 1.19 ± 0.74 ; 安定狭心症群: 0.89 ± 0.48 ; 健常者群: 0.58 ± 0.23 ng/ 5 μ g LDL protein)¹⁰⁾ (Fig. 3)。さらにわれわれは、冠動脈造影を施行した不安定狭心症例を詳細に解析して、有意狭窄群と冠攣縮群の2群に分類し、有意狭窄群では冠攣群に比べ、有意に血漿中酸化

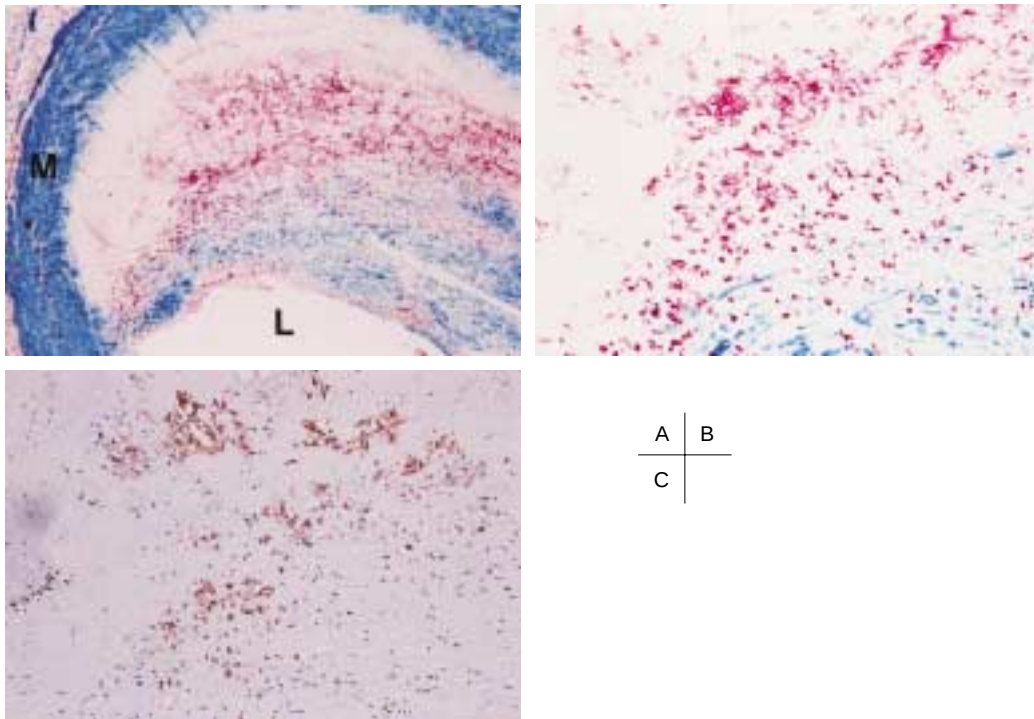


Figure 2 ヒト冠動脈のプラークびらん部位における酸化LDLの局在
A：内腔面には壁在血栓の付着がみられ，プラーク内には多数のマクロファージ(赤)の集積がみられる。M：中膜，L：内腔，平滑筋細胞(青)とマクロファージ(赤)の免疫二重染色。
B：拡大像。プラーク内には多数のマクロファージ(赤)の集積とその泡沫化がみとめられる。平滑筋細胞(青)とマクロファージ(赤)の免疫二重染色。
C：泡沫化したマクロファージにほぼ一致して酸化LDLの局在が認められる。抗酸化LDLを用いた免疫単染色。

LDL値が高値であることを明らかにしている¹¹⁾。これらの結果より，血漿中酸化LDL値の上昇が冠動脈プラークの不安定性を示す有用な指標である可能性が示唆される。

B．糖尿病と血漿中酸化LDL値

糖尿病患者では以前より，健常人に比較して血液中の種々の酸化ストレス指標が増加していることが報告されている。多くの実験的データより，糖尿病患者では血管組織で活性酸素の産生が亢進し，LDLが酸化されやすい状況にあると考えられる。*In vitro*の培養血管内皮細胞を用いた検討では，比較的高濃度のグルコース下で培養すると細胞内の O_2^- が増大しLDLの過酸化が起こることが報告されている¹⁴⁾。さらに，高グルコースはレドックス感受性を有する転写因子の活性化を増大し，炎症に関わる遺伝子の発現を増大させると考えられている¹⁵⁾。

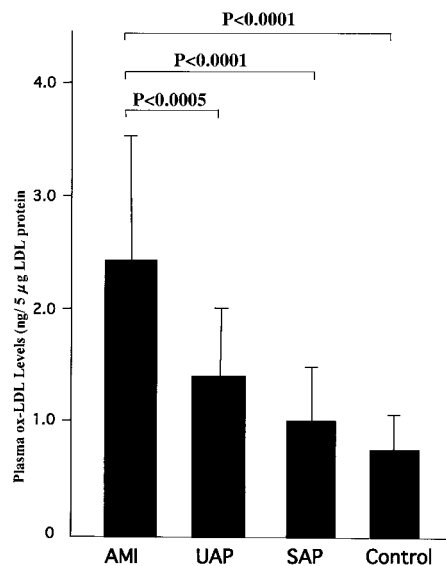


Figure 3 急性心筋梗塞症(AMI群)，不安定狭心症(UAP群)，安定狭心症(SAP群)，健常人(Control群)の血漿中酸化LDL値。

われわれが最近、虚血性心疾患を合併した糖尿病症例と、虚血性心疾患を合併していない糖尿病症例の血漿中酸化LDL値を比較したところ、糖尿病のある不安定狭心症群においては、糖尿病のある安定狭心症群、および虚血性心疾患のない糖尿病群に比して、有意 ($P<0.001$) に血漿中酸化LDL値が高値であった。また、その酸化LDL値はHbA1cと関連していた。これらの研究成果より、糖尿病患者においても、酸化LDLは動脈硬化の発症・進展にとどまらず、急性冠症候群発症の一因としても重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

われわれがこれまで研究を推進してきているヒトにおける血漿中酸化LDL値の測定法は、2日間かけてLDLを画分した後に5 μ gLDLあたりの酸化LDLを測定する方法であり、1回の血漿中酸化LDL測定に計4日間を費やすという難点はあるものの、他の方法に比較して、より精度の高い測定法である。今後、この方法を用いて検討を続けることにより、ヒトにおける種々の血管疾患と血漿中酸化LDL値の動態との関連性がさらに明らかになるものと考えられる。

文 献

- 1 Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, et al: Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, 1989, **320**: 915-924.
- 2 Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, et al: Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 333-337.
- 3 Kodama T, Freeman M, Rohrer L, et al: Type 1 macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature*, 1990, **343**: 531-535.
- 4 Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, et al: Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**: 3883-3887.
- 5 Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM: Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*, 1984, **4**: 357-364.
- 6 Palinski W, Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, et al: Low density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 1372-1376.
- 7 Yla-Herttuala S, Palinski W, Butler SW, et al: Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 32-40.
- 8 Itabe H, Takeshima E, Iwasaki H, et al: A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes foam cells in atherosclerotic lesions. Complex formation of oxidized phosphatidylcholines and polypeptides. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 15274-15279.
- 9 Tsukamoto Y, Ueda M, Naruko T, et al: Immunolocalization of oxidized phosphatidylcholine and apolipoprotein B in association with inflammatory processes in human coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 1999, **33**: 256A.
- 10 Ehara S, Ueda M, Naruko T, et al: Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*, 2001, **103**: 1955-1960.
- 11 Yamashita H, Ueda M, Naruko T, et al: Plasma levels of oxidized low-density lipoprotein (OX-LDL) directly relate to unstable angina. *Circulation*, 2000, **102**: II-711.
- 12 Ehara S, Ueda M, Naruko T, et al: Pathophysiological role of oxidized low-density lipoprotein in plaque instability in coronary artery diseases. *J Diabetes Complications*, 2002, **16**: 60-64.
- 13 Itabe H, Yamamoto H, Imaoka T, et al: Sensitive detection of oxidatively modified low density lipoprotein using a monoclonal antibody. *J Lipid Res*, 1996, **37**: 45-53.
- 14 Graier WF, Simecek S, Kukovetz WR, et al: High D-glucose-induced changes in endothelial Ca^{2+} /EDRF signaling are due to generation of superoxide anions. *Diabetes*, 1996, **45**: 1386-1395.
- 15 Pieper GM, Riaz-ul-Haq: Activation of nuclear factor- κ B in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1997, **30**: 528-532.

Circulating Oxidized Low Density Lipoprotein is a Useful Marker for Identifying Plaque Instability

Takahiko Naruko^{*1}, Makiko Ueda^{*2}, Kazuo Haze^{*1}, Shoichi Ehara^{*3}, Hajime Yamashita^{*3}, Yoshihiro Ikura^{*2}, Takeshi Ikuta^{*4}, Shigefumi Suehiro^{*4}, and Junichi Yoshikawa^{*3}

^{*1}Department of Cardiology, Osaka City General Hospital, ^{*2}Department of Pathology, ^{*3}Department of Internal Medicine and Cardiology, and ^{*4}Department of Cardiovascular Surgery, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka; Japan.

Key words: Atherosclerosis, Oxidant stress, Lipoprotein

Oxidized low density lipoprotein(ox-LDL) is thought to play a key role in the progression of atherosclerosis. With the use of our highly sensitive method to measure ox-LDL in circulating plasma, we demonstrated that plasma levels of ox-LDL in patients with acute myocardial infarction (AMI) are significantly higher ($P<0.0001$) than in patients with unstable angina pectoris, stable angina pectoris (SAP), or in control subjects (Ehara S et al. *Circulation* **103**, 1955-1960, 2001). In patients with UAP, plasma levels of ox-LDL in patients with significant stenosis were significantly higher ($P<0.05$) than in patients with vasospastic angina. Moreover, in cases with diabetes mellitus (DM), plasma levels of ox-LDL in UAP/DM patients were significantly higher ($P<0.001$) than in SAP/DM patients. These observations suggest an important role for ox-LDL in the genesis of plaque instability in human coronary atherosclerotic lesions.

(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, **43**: 155-159)