

動脈硬化予防薬としてのLOX-1ブロッカーの探索

高谷智英, 岩元 真, 垣野明美, 藤田佳子, 中野厚史, 沢村達也

はじめに

動脈硬化の進行は、生活習慣病を発症する遙か以前の健康な若年時から始まっている。日常生活のなかで動脈硬化の進行を抑制することは、血管機能を健全に保ち、最終的に心筋梗塞や脳梗塞を予防するための重要な課題である。本稿では、動脈硬化予防の試みとして、酸化LDL受容体LOX-1のブロッカー探索と、その効果についての動物実験の結果を紹介する。

I. 動脈硬化性疾患とLOX-1

動脈硬化の進行には、血中の悪玉コレステロールとされるLDLが関与しており、なかでも酸化などの修飾を受けた修飾LDLがその本体と考えられている。LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor-1) は、我々が血管内皮細胞から同定した酸化LDL受容体である^{1, 2)}。

— Key word —

LOX-1
procyanidin
antagonist
atherosclerosis
cardiovascular diseases

Exploration of LOX-1 inhibitors as prophylactics of atherosclerosis

Tomohide Takaya, Shin Iwamoto, Akemi Kakino,
Yoshiko Fujita, Atushi Nakano, Tatsuya Sawamura :
Department of Vascular Physiology, National Cerebral
and Cardiovascular Center Research Institute
国立循環器病研究センター研究所 血管生理学部

内皮細胞に酸化LDLを処理すると、LOX-1を介したアポトーシス、炎症性サイトカインの放出、単球の接着、活性酸素種(ROS)の産生増加と一酸化窒素(NO)の産生低下などの内皮障害が生じる。内皮は血管の緊張性・接着性・透過性などの恒常性維持に機能するが、酸化LDLによるLOX-1の活性化は、内皮細胞を収縮性・炎症性・血栓性にシフトさせる。LOX-1は平滑筋、マクロファージ、血小板でも発現が認められる。これらの細胞におけるLOX-1を介した酸化LDLの取り込みは、平滑筋の増殖、泡沫化細胞の形成、活性化血小板の凝集など、動脈硬化巣を進展させる反応を引き起こす。

*In vivo*でのLOX-1の発現は通常低いが、高脂血症・高血圧・糖尿病といった、心血管疾患の危険因子となる条件下では非常に急速かつ顕著に誘導される。高脂血症モデルであるWatanabe Heritable Hyperlipidemic rabbit (WHHL)やLDL受容体欠損マウスでは、血管壁LOX-1の著明な発現増加が認められる。また、LDL受容体欠損マウスからLOX-1遺伝子を欠失させると動脈硬化巣の形成が抑制される。さらに、各種モデル動物に抗LOX-1抗体を投与すると、高脂血症下での動脈への脂質沈着、CRP依存的な血管透過性の亢進、炎症による好中球の浸潤、動脈損傷に伴う内膜肥厚、心筋虚血再灌流障害における梗塞サイズなどが抑制される。すなわちLOX-1は、動脈硬化性疾患進展の各段階で増悪因子として機能する。

また、LOX-1の発現や活性の制御は悪循

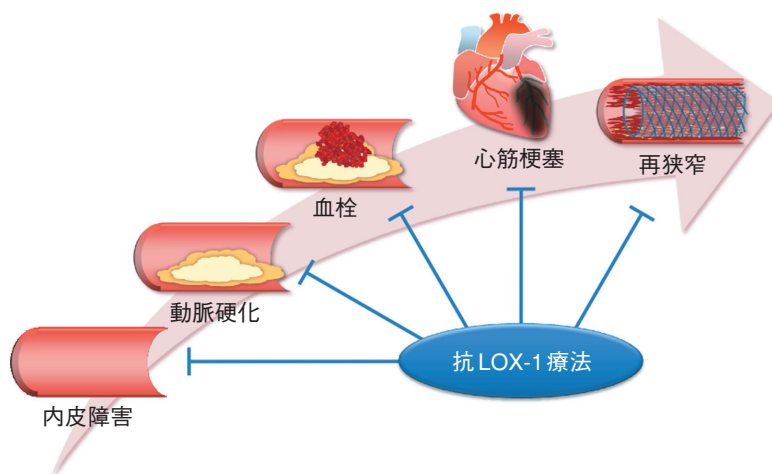


図1. 動脈硬化性疾患の進展と抗 LOX-1 療法

環的で、例えばエンドセリン-1やTNF- α による刺激でLOX-1の発現は亢進するが、逆にLOX-1の刺激により、これらの蛋白質の分泌は増強する。抗LOX-1療法は動脈硬化性疾患のLOX-1の作用を抑制することによって直接各段階を緩和するだけでなく、このような悪循環を断ち切ることににより、動脈硬化性疾患の進展を抑制できる可能性がある(図1)。

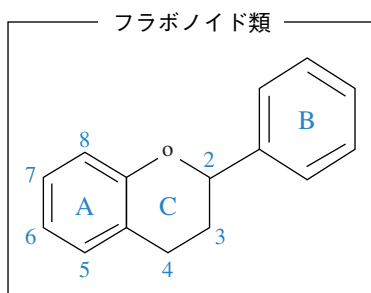
これまでに、LOX-1ブロッカーとして、ヒト型中和モノクローナル抗体の開発を行ってきた。抗LOX-1抗体は細胞に対しては酸化LDL依存的なROS産生の抑制など、*in vivo*では上述の通り、動脈への脂質沈着、心筋梗塞巣拡大抑制、内膜肥厚抑制など、臨床で期待される性質を示す。ただ、動脈硬化のような長期間の治療が必要な疾患に用いるには抗体医薬はコストがかかるという課題がある。しかし現状では、大量生産可能な小分子のLOX-1アンタゴニストはこれまで発見されていない。そこで、予防医学的観点に立ち、日常的に摂取できる食品への応用可能性がある食品素材から、LOX-1と酸化LDLの結合

を阻害する分子の探索を試みた。

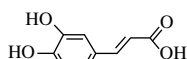
Ⅱ. LOX-1 ブロッカーの探索

LOX-1と酸化LDLの結合を阻害する分子を、食品由来の抽出物(野菜、果物、穀物、豆類、樹皮、茶葉、ハーブ、酵母など)およそ400種類からなるライブラリーから探索した。まず、サンドウィッチELISA法を用いて、LOX-1と酸化LDLの結合を70%以上阻害する食材を選別し、これらのなかからさらにLOX-1発現細胞への酸化LDLの取り込みを70%以上抑制するものを選別した。これらのLOX-1阻害活性が強い食品素材の多くは、ブドウ種子、ピーナッツ種皮、リンゴポリフェノール、マツ樹皮など、高プロシアニジン含有食品として知られるものであった。そこで、組成の70%以上がプロシアニジン類で構成されるリンゴポリフェノール分画を用い、LOX-1阻害成分の同定を行った。リンゴポリフェノール分画は、LOX-1発現細胞への酸化LDL(10 μ g/mL)の結合を用量依存的に抑制した(IC₅₀: 102ng/mL)。リンゴポリフェノール分画を、プロシアニジン/カテ

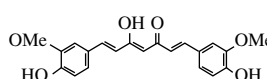
ポリフェノール



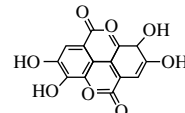
フェノールカルボン酸類



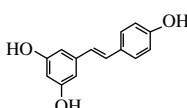
クルクミン酸類



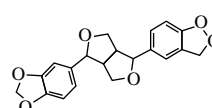
エラグ酸類



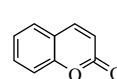
スチルベノイド類



リグナン類

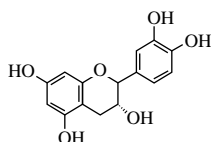


クマリン類

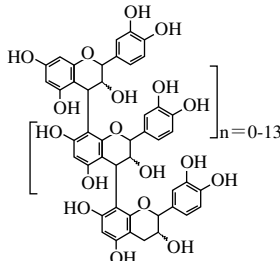


リンゴポリフェノールに含まれるフラボノイド

カテキン・エピカテキン



プロシアニジン



その他フラボノイド

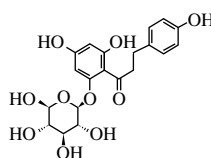


図2. ポリフェノールの代表的な構造とリンゴポリフェノールに含まれるフラボノイドの構造

キンの混合分画，フェノールカルボン酸分画，その他の分画に分離した酸化LDL結合阻害活性を測定したところ，プロシアニジン/カテキン混合分画のみが，LOX-1発現細胞への酸化LDLの結合を阻害した。

プロシアニジン類および(エピ)カテキンは，ポリフェノールの一種であるフラボノイド類に属する化合物である(図2)。ポリフェノールは複数のフェノール性水酸基を持つ分子で，5,000種類以上の骨格構造が確認されており，配糖体も多い。したがって，ポリフェノールと一口に言っても実体はかなり多様な物質の総称である。そのうちフラボノイド類は，2つのベンゼン環(A環，B環)が3個の炭素原子で繋がったジフェニルプロパン構造(図2のC環部分)を持つ化合物で，配糖

体を含むと7,000種以上の構造が知られている。フラボノイドのC環3位に水酸基が結合したものがフラバノール類で，フラバノールのA環およびB環にさらに水酸基が付加されたものがカテキン類である。プロシアニジン類は(エピ)カテキンが4-6位もしくは4-8位で繰り返し縮合したオリゴマーで，2～15量体を形成する。

プロシアニジン類の重合度とLOX-1阻害活性の関係を調べるため，カテキン含有プロシアニジン分画から，(エピ)カテキンと，2～7量体のプロシアニジンそれぞれ調整した。3量体以上のプロシアニジン類は，用量依存的にLOX-1発現細胞への酸化LDL(10 μ g/mL)の結合を阻害した(IC₅₀: 61ng/mL[3量体]～27ng/mL[7量体])。2量体プロ

シアニジンの阻害活性は3量体以上と比較して弱かったが(IC_{50} : 330ng/mL), それでも1 μ g/mLの投与でLOX-1と酸化LDLの結合を完全に抑制した。一方, (エピ)カテキンにはLOX-1阻害活性が全く認められなかった。

カテキン類のC環2位と3位は不斉炭素であるため, その重合体であるプロシアニジン類には多様な光学異性体が存在する。リンゴポリフェノール分画には6種類の3量体プロシアニジンが含まれるが³⁾, そのうち, 代表的な異性体4種についてLOX-1阻害活性を検討した。いずれの異性体も, LOX-1発現細胞への酸化LDL(10 μ g/mL)の結合を同程度に阻害した(IC_{50} : 41~73ng/mL)。血中の酸化LDL濃度により近い3 μ g/mL, あるいは1 μ g/mLでは3量体プロシアニジンの IC_{50} は26ng/mLおよび7ng/mLであった。このことから, かなりの低濃度でプロシアニジンが酸化LDL結合阻害効果を示すことが明らかとなった。

プロシアニジン類の重合度はそれらを含む食材によって異なるが⁴⁾, プロシアニジン類のLOX-1阻害活性が3量体以上の重合度や光学異性体間で大きく変化しなかったことから, 高プロシアニジン含有食品はいずれもLOX-1阻害効果を示し得ると考えられ, 食品素材のスクリーニング結果とも合致する。これらの結果から, リンゴポリフェノール分画が示したLOX-1阻害活性の成分はプロシアニジン類であると結論した⁵⁾。LOX-1と酸化LDLの結合を低濃度で阻害する化合物の報告はこのプロシアニジンが初めてである。

Ⅲ. *In vivo*におけるプロシアニジンの効果

1. SHRSPラット動脈壁への脂質沈着モデル

*In vivo*におけるLOX-1ブロッカーの効果の評価するには, 動脈硬化症と類似し, 短期間で病態作成と薬効評価ができ, かつLOX-

1の阻害効果を観察するのに適した動物モデルが必要である。そこで, 高血圧ラット(SHRSP)を用いた血管壁への脂質沈着モデルについて, その有用性をまず検討した⁶⁾。このモデルはSHRSP系統を樹立した家森らによる, SHRSPへの高脂肪・高食塩食負荷により, 腸間膜および脳底動脈にリング状脂質沈着が起こることを示した報告に基づくものである⁷⁾。このモデルで見られる脂質沈着は動脈硬化そのものとは病態が若干異なるものの, 初期のアテロームで認められる脂肪線条と似ており, 早期動脈硬化の病変形成を解析する上で有用なモデルである。

この高血圧ラット腸間膜動脈脂質沈着にLOX-1が関与している可能性を考え, LOX-1の発現をSHRSPと正常血圧ラットWKYとで比較してみると, SHRSPでは腸間膜動脈のLOX-1のmRNAおよび蛋白質の発現が著しく亢進していることが分かった(図3A, B)。

次にSHRSPおよびWKYに高脂肪食・食塩水の負荷1, 2, 5週間後の腸間膜動脈を観察すると, SHRSPにのみ負荷期間の長さに応じた脂質沈着が認められた(図3C)。高脂肪食・食塩水を負荷したSHRSPでは, 腸間膜動脈の内皮細胞および平滑筋層の一部にLOX-1が強く発現しており, その局在は酸化LDLとよく一致していた。血管壁内にマクロファージが観察されないことから, この動物モデルでは, 平滑筋での脂質の取り込みが亢進していると考えられる。

そこで, このモデルで, 高脂肪食・食塩水負荷直前よりLOX-1と酸化LDLとの結合を阻害する抗LOX-1抗体をSHRSPに繰り返し投与してみると, 負荷1週間後の観察で, 血管壁への脂質沈着の著明な抑制を認めた。SHRSPに酸化LDLを尾静脈より投与すると, 腸間膜動脈への分布が1時間後には認められるが, これは抗LOX-1抗体の前投与で抑制された。また, 摘出腸間膜動脈を用いた灌流

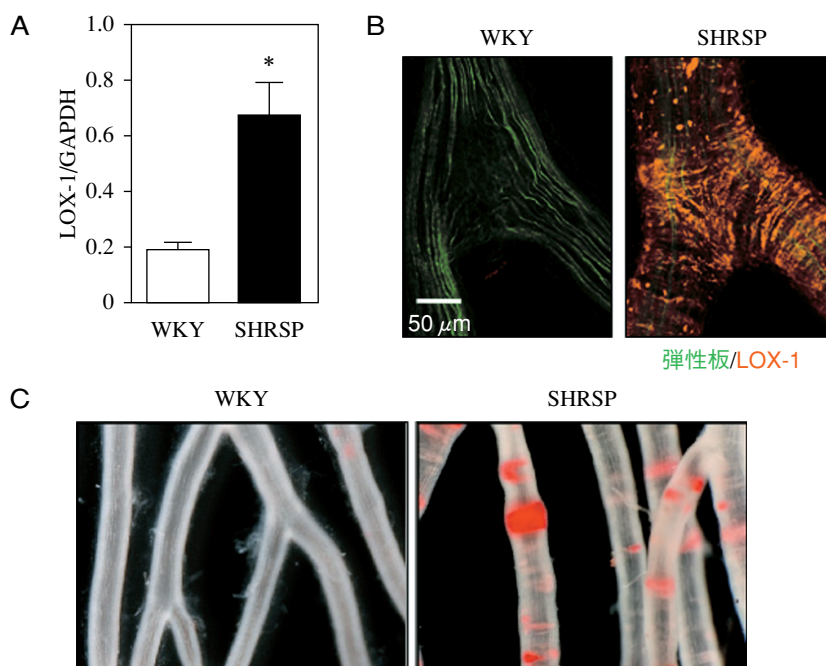


図3. SHRSPおよびWKYの腸間膜動脈におけるLOX-1の発現と脂質沈着

A: 定量的PCRによるLOX-1 mRNA量. $n = 11$, $*P < 0.005$.

B: ホールマウント免疫染色によるLOX-1蛋白質(橙). 緑色は自家蛍光由来の弾性繊維.

C: 高脂肪食・食塩水負荷2週間後の腸間膜動脈のオイルレッドO染色像.

実験でも同様の結果が得られた。このことから、LOX-1を介した酸化LDL取り込み能がSHRSPで観察される腸間膜動脈への脂質沈着に関与している可能性が強く示唆された。

2. プロシアニジンによる脂質沈着の抑制

次に、LOX-1ブロッカーとして見出したプロシアニジン類のSHRSP腸間膜動脈脂質沈着モデルでの効果を検討した。2量体以上のプロシアニジン類混合物を生理食塩水に溶解し(0.5%), 2週間飲料水の代わりにSHRSPに与えた。その結果、動脈壁脂質沈着は、プロシアニジン処置群で有意に抑制されていた(図4)。なお、試験期間中、プロシアニジン処置群と対照群の間には、摂餌量、体重、血

圧、心拍数、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪、および過酸化脂質の指標であるTBARSに差は認められなかった。

試験終了時における3量体のプロシアニジンC1、および2量体のプロシアニジンB2の血中濃度は、それぞれ 4.9 ± 1.9 および $7.9 \pm 1.8 \text{ ng/mL}$ であった。プロシアニジンC1の量はリンゴポリフェノール内の全プロシアニジン類の6%程度であることを考慮すると⁸⁾、血中には酸化LDLとLOX-1の結合を阻害できるプロシアニジン類がさらに存在すると推定される。また、SHRSPの血中酸化LDL濃度は約 200 ng/mL であるため⁶⁾、プロシアニジンC1が単独でLOX-1と酸化LDLの結合を十分に阻害していることも考えられる。

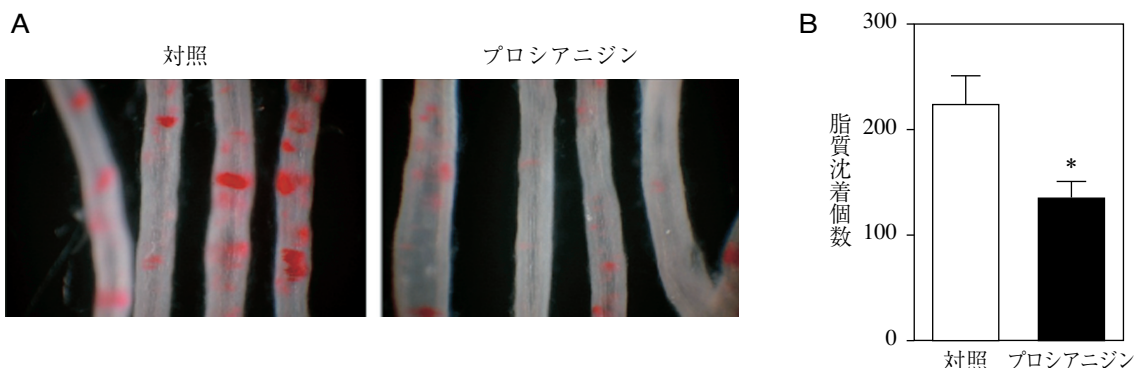


図4. SHRSFの腸間膜動脈脂質沈着に対するプロシアニジンの効果

A: 高脂肪食・食塩水負荷2週間後の腸間膜動脈のオイルレッドO染色像。

B: 腸間膜動脈への脂質沈着個数。n = 8, * $P < 0.05$ 。

プロシアニジン類は降圧作用、脂質低下作用、抗酸化作用を示すことがこれまで報告されている^{9~11)}。しかし本試験では、プロシアニジン類は血圧、血中脂質量、TBARSに影響を与えなかったことから、上記の作用を介して血管壁への脂質沈着を抑制した可能性は低いと考えている。本動物モデルで見られたプロシアニジン類の効果が血管壁上のLOX-1と酸化LDLの結合阻害によるものなのか、あるいは他の作用機序によるものかについては、今後さらに検討していきたい。

3. プロシアニジンとフレンチパラドックス

フランスではコレステロールや飽和脂肪酸を多く摂取しているにもかかわらず、相対的に冠動脈疾患による死亡率が低く、フレンチパラドックスとして知られている。その理由が赤ワインの摂取にあるのではないかという仮説があり、有効成分については、レスベラトロールやプロシアニジンがその候補として報告されている¹²⁾。

レスベラトロールはスチルベノイド類に属する化合物で(図2)、LDLの酸化、血小板の凝集、平滑筋や内皮細胞の増殖、動脈硬化巣の形成などを抑制することが報告されてい

る。またレスベラトロールは、SIRT1やIGF1、AMPKなどの経路を調節することでカロリー制限の効果を模倣するが、直接の標的分子は不明である¹³⁾。

一方、プロシアニジンも赤ワインやココアなど、心血管保護作用があると言われる食品に多く含まれる⁴⁾。Corderらは、エンドセリン-1の血管内皮細胞からの分泌を赤ワインの成分が抑制し、その物質を同定したところプロシアニジンであったこと、プロシアニジン含量の多い赤ワイン産地では、飲酒量が女性より多い男性の寿命が他の地域に比べ長く、虚血性心疾患が少ないことから、プロシアニジンがフレンチパラドックスをもたらす物質であるという説を提唱している¹⁴⁾。フレンチパラドックスの機序が、プロシアニジンによるLOX-1と酸化LDLの結合阻害によって説明できるとすれば興味深い。

Ⅳ. LOX-1 ブロッカーの臨床的意義

LOX-1は酸化LDL以外にも、アセチル化LDLやカルバミル化LDLといった他の修飾LDLとも結合する。我々が開発した、固相化LOX-1と抗apoB抗体を用いたサンドウィッチELISA法によって、これら生体内で

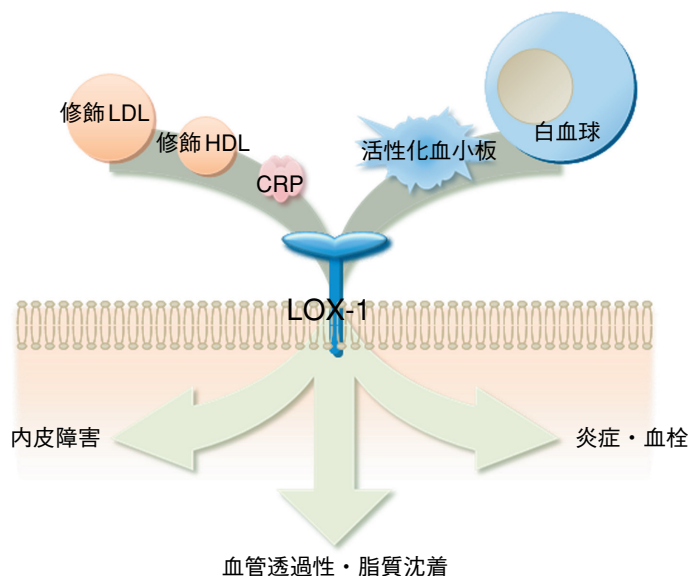


図5. LOX-1のリガンドと動脈硬化性疾患とのかかわり

生理的に修飾されたLDLをLOX-1リガンド(LAB)として検出することができる¹⁵⁾。コホート研究(吹田研究)でヒトの血中LAB濃度を測定すると、LAB値が高い群では脳卒中や冠動脈疾患など、心血管イベントのハザード比が高くなることが分かった¹⁶⁾。LOX-1リガンドは循環器疾患の進行に関与しており、発症予測マーカーとしても有用であると考えられる。

最近、善玉コレステロールと考えられていたHDLも、修飾を受けることで内皮機能を障害することが報告された¹⁷⁾。冠動脈疾患患者のHDLは健常者に比べて多くのマロンジアルデヒドと結合しており、LOX-1を介して内皮障害を亢進する。これは、HDLの量ではなく質こそが重要であることを示唆する。これまで臨床的には、HDL値を上げれば心疾患の発症リスクが減少するとされてきたが、コレステロールエステル輸送蛋白質(CETP)阻害薬によって、HDL値が70%以上増加したにもかかわらず、心血管イベント発

生率が有意に増加したという報告もある¹⁸⁾。HDLの単純な増加が必ずしも心血管疾患リスクを低減するとは限らないのであれば、LDL/HDL量のコントロールだけでは動脈硬化対策として不十分である。その意味で、修飾LDL/HDLをリガンドとし、LDL/HDLの質に依存して作用するLOX-1を標的分子とする意義は大きい。

またLOX-1は、修飾LDL/HDLだけではなく、構造的に相関のない様々なリガンドとも結合する。LOX-1は単球を含む白血球や活性化血小板を認識するが、これらの細胞と内皮の接着はアテローム形成の初期段階と考えられる。実際に内皮細胞では、単球との接着によってROSの産生増加、活性化血小板との接着によってエンドセリン-1の放出増加とNOの産生減少が生じる。さらに、炎症の急性期から血中に放出され、内皮障害を誘導することで知られるCRPもLOX-1のリガンドであることが明らかになった¹⁹⁾。内皮でのLOX-1とCRPの結合は炎症性サイトカイン

や接着因子の発現を促進し、CRPをラットに投与するとLOX-1を介した血管透過性の亢進が認められる。

すなわちLOX-1は、修飾LDLのエンドサイトーシス受容体、白血球や血小板の接着因子、細胞内へのシグナル伝達経路を兼ねる、マルチリガンドの多機能受容体であり、心血管疾患で認められる広範な症状にかかわっている(図5)。抗LOX-1療法は動脈硬化性疾患の進展を予防するだけでなく、これらの様々な症状を同時に抑制できる可能性があり、医薬としての応用可能性が考えられる。LOX-1ブロッカーの動脈硬化予防・治療効果に期待するとともに、それらの作用機序の解明を通じて疾患の発症機構にも迫っていきたいと考えている。

§ 文 献

- 1) Sawamura T, Kume N, Aoyama T, et al : An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 1997;386:73-7.
- 2) Yoshimoto R, Fujita Y, Kakino A, et al : The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance. *Cardiovasc Drugs Ther* (in press).
- 3) Shoji T, Masumoto S, Moriichi N, et al : Apple (*Malus pumila*) procyanidins fractionated according to the degree of polymerization using normal-phase chromatography and characterized by HPLC-ESI/MS and MALDI-TOF/MS. *J Chromatogr A* 2006; 1102:206-13.
- 4) Gu L, Kelm MA, Hammerstone JF, et al : Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *J Nutr* 2004;134:613-7.
- 5) Nishizuka T, Fujita Y, Sato Y, et al : Procyanidins are potent inhibitors of LOX-1 : a new player in the French Paradox. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2011;87:104-13.
- 6) Nakano A, Inoue N, Sato Y, et al : LOX-1 mediates vascular lipid retention under hypertensive state. *J Hypertens* 2010;28:1273-80.
- 7) Yamori Y, Horie R, Sato M, et al : Hypertension as an important factor for cerebrovascular atherogenesis in rats. *Stroke* 1976;7:120-5.
- 8) Shoji T, Masumoto S, Moriichi N, et al : Apple procyanidin oligomers absorption in rats after oral administration : analysis of procyanidins in plasma using the Porter method and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2006;54:884-92.
- 9) Bas JMD, Ricketts ML, Vague M, et al : Dietary procyanidins enhance transcriptional activity of bile acid-activated FXR in vitro and reduce triglyceridemia in vivo in a FXR-dependent manner. *Mol Nutr Food Res* 2009;53:805-14.
- 10) Busserolles J, Gueux E, Balasinska B, et al : In vivo antioxidant activity of procyanidin-rich extracts from grape seed and pine (*Pinus maritima*) bark in rats. *Int J Vitam Nutr Res* 2006;76:22-7.
- 11) Magos GA, Mateos JC, Paez E, et al : Hypotensive and vasorelaxant effects of the procyanidin fraction from *Guazuma ulmifolia* bark in normotensive and hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 2008;117:58-68.
- 12) Das DK, Sato M, Ray PS, et al : Cardioprotection of red wine : role of polyphenolic antioxidants. *Drugs Exp Clin Res* 1999;25:115-20.
- 13) Lekli I, Ray D, Das DK : Longevity nutrients resveratrol, wines and grapes. *Genes Nutr* 2010;5:55-60.
- 14) Corder R, Mullen W, Khan NQ, et al : Oenology : red wine procyanidins and vascular health. *Nature* 2006;444:566.
- 15) Sato Y, Nishimichi N, Nakano A, et al : Determination of LOX-1-ligand activity in mouse plasma with a chicken monoclonal antibody for ApoB. *Atherosclerosis* 2008;200:303-9.
- 16) Inoue N, Okamura T, Kokubo Y, et al : LOX index, a novel predictive biochemical marker for coronary heart disease and stroke. *Clin Chem* 2010;56:550-8.
- 17) Besler C, Heinrich K, Rohrer L, et al : Mechanisms underlying adverse effects of HDL on eNOS-activating pathways in patients with coronary artery disease. *J Clin Invest* 2011;121:2693-708.
- 18) Barter P, Caulfield M, Eriksson M, et al : Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Eng J Med* 2007;357:2109-22.
- 19) Fujita Y, Kakino A, Nishimichi N, et al : Oxidized LDL receptor LOX-1 binds to C-reactive protein and mediates its vascular effects. *Clin Chem* 2009;55: 285-94.