

心血管機能における LOX-1 の意義とその診断治療への応用

高谷 智英、沢村 達也

国立循環器病研究センター研究所 血管生理学部

要旨

動脈硬化の進行は、生活習慣病を発症する遥か以前の健康な若年時から始まっている。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には、早期からの診断と予防が必須である。

血管内皮の酸化 LDL 受容体 LOX-1 は、変性 LDL と結合することで血管内皮障害を惹起し、動脈硬化性疾患の進展と発症を促進する。これまでの研究で、LOX-1 は動脈硬化の初期段階から発現が上昇すること、LOX-1 の抑制は心血管疾患の症状を改善することが明らかになっている。

本稿では、① LOX-1 とリガンドを測定したコホート研究と心血管疾患発症予測マーカーへの応用、② 日常生活の中で動脈硬化を予防する試みとして、食品由来の LOX-1 ブロッカーの探索と動物実験の結果を紹介する。

キーワード LOX-1, LOX index, LAB, procyanidin, cardiovascular diseases

動脈硬化性疾患と LOX-1

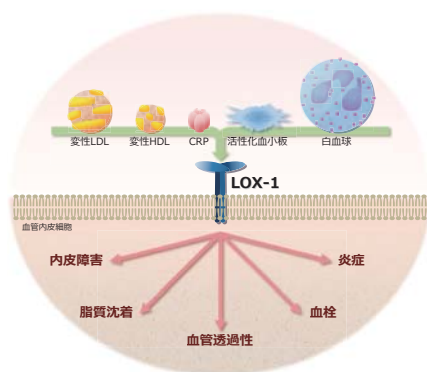


図 1. LOX-1 のリガンドと動脈硬化性疾患
LOX-1 の代表的なリガンドと、LOX-1 を介したその作用（文献 16 から改変）。

動脈硬化の進行には血中の悪玉コレステロールである LDL が関与しており、中でも酸化などの修飾を受けた変性 LDL がその作用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}。LOX-1 と酸化 LDL との結合は、アポトー

シス、炎症性サイトカインの放出、活性酸素種の産生、NO の低下などの内皮障害を誘導する。LOX-1 は平滑筋、マクロファージ、血小板でも発現し、平滑筋の増殖、泡沫化細胞の形成、活性化血小板の凝集といった動脈硬化巣の進展反応を引き起こす。また LOX-1 は、白血球や活性化血小板との接着因子として機能するほか、CRP と結合することで炎症を促進する作用がある（図 1）。各種心血管疾患モデルにおいて LOX-1 を抑制すると、高脂血症下で

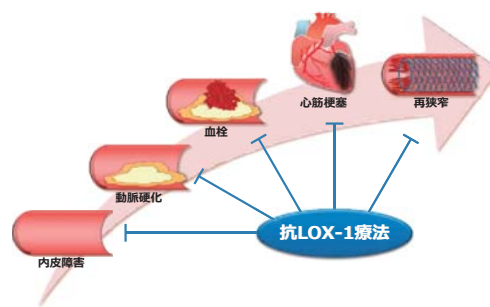


図 2. 動脈硬化性疾患の進展と抗 LOX-1 療法

の動脈への脂質沈着³、CRP 依存的な血管透過性の亢進、炎症による好中球の浸潤、動脈損傷による内膜肥厚、虚血再灌流による心筋障害などが改善される。すなわち LOX-1 は、動脈硬化性疾患の各段階で憎悪因子として機能している（図 2）。

以下では、動脈硬化性疾患の初期段階から発現が上昇する LOX-1 とそのリガンドの測定を利用した疾患マーカーの開発と、LOX-1 ブロッカーによる動脈硬化予防の試みについて紹介する。

心血管疾患マーカーとしての LOX index

1. LAB（変性 LDL）

悪玉コレステロールの指標として臨床の現場では LDL 量が測定されているが、真の悪玉は酸化修飾を受けた変性 LDL であり、動脈硬化性疾患の正確な診断やリスク評価にはその定量が必須である。従来の酸化 LDL 測定では、その一部のみを認識するモノクローナル抗体が用いられてきたが、この方法では様々な修飾パターンが存在する酸化 LDL の全てを検出することができない。また、酸化はあくまで変性の一種に過ぎず、LDL は他にもマロンジアルデヒド化、アセチル化、カルバミル化、糖化、陰性荷電化などの多様な修飾を受ける。酸化 LDL が動脈硬化巣に存在することはよく知られているが、近年、その他の変性 LDL も、喫煙、糖尿病、慢性腎疾患、急性冠症候群、脳梗塞などによって血中量が増加することが明らかになってきた。

LOX-1 は酸化 LDL を含むこれら変性 LDL と結合し、内皮機能障害を引き起こす。そこで我々は、LOX-1 の受容体機能を利用し、生理活性を持つ多様な変性 LDL を一括測定することで、動脈硬化性疾患のバイオマーカーを開発できないか考えた。具体的には、LOX-1 に結合する apoB 含有リポタンパク質 LAB（LOX-1 ligand containing apoB）を、LOX-1 の細胞外ドメインと抗 apoB 抗体によるサンドイッチ ELISA で検出する（図 3）⁴。動物実験の結果、LAB の血中濃度は高脂血症の apoE 欠損マウスや高コレステロール血症の WHHL ウサギで増加していること、血中の LAB を低下させると動脈硬化巣のサイズが縮小することが明らかとなった。以上の結

果は、LAB が動脈硬化を促進しており、その血中量は疾患の進展を反映している可能性を示唆している。

2. 可溶型 LOX-1

LOX-1 の発現量は健康な状態では低いが、高血圧・高脂血症・糖尿病といった動脈硬化性疾患の危険因子となる条件下では急速かつ顕著に亢進する。発現した LOX-1 の一部は細胞膜上で切断され、可溶型 LOX-1（soluble LOX-1; sLOX-1）として血中に放出される。sLOX-1 の放出は、変性 LDL やサイトカインの刺激によっても促進される。つまり sLOX-1 の血中量は、LOX-1 の発現量とともに動脈硬化や炎症の進展も反映していると考えられる。実際に、sLOX-1 の血中濃度は肥満や糖尿病の患者で増大している。さらに急性冠症候群において sLOX-1 は、現在診断マーカーとして用いられているトロポニン T よりも早期に上昇し、予後とも相関することが報告されている。

3. LOX index による心血管疾患の発症リスク評価

このように、LAB や sLOX-1 は心血管疾患の進展と発症に関係し、あるいはその状態を反映している。そこで我々は、受容体とリガンドの相互作用の指標として、同時に測定した LAB と sLOX-1 の積を LOX index と定義し（図 3）、動脈硬化性疾患の発症リスク評価における有用性を、吹田研究を利用することで検討した⁵。

吹田研究は、国立循環器病研究センターが 1989 年から継続しているコホート研究で、大阪府吹田市

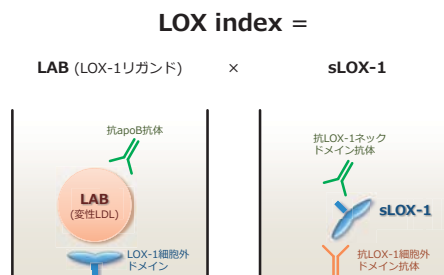


図 3. LAB および sLOX-1 測定法と LOX index
(左) LAB 測定法。固相化した LOX-1 細胞外ドメインタンパク質に結合した LAB（変性 LDL）を抗 apoB 抗体で検出する。
(右) sLOX-1 測定法。固相化した抗 LOX-1 細胞外ドメイン抗体に結合した sLOX-1 を抗 LOX-1 ネックドメイン抗体で検出する。

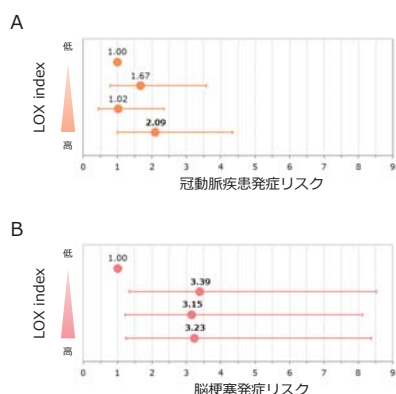


図4. LOX index と心血管疾患の発症リスク
(A) LOX index の第4四分位における冠動脈疾患の発症率が2倍以上と有意に高い。
(B) LOX index の第2～4四分位における脳梗塞の発症率がいずれも3倍以上と有意に高い。

の都市部住民（30～79歳の男女6485人）を対象とし、心血管疾患の発症と予後を調査している。我々は、1994年度の定期健診受診者から、冠動脈疾患もしくは脳卒中の既往歴のある者を除いた2295人（男性1094人、女性1201人）について追跡調査を行った。エンドポイントは、①冠動脈疾患または脳卒中の初発、②死亡、③吹田市からの転居、④2007年12月31日とした。平均11年の追跡期間中に、冠動脈疾患68人、脳卒中91人（うち脳梗塞60人）の発症を認めた。

被験者の血清を測定したところ、LAB濃度の平均値は男性516.1 ± 17.1 ng/mLおよび女性782.3 ± 23.7 ng/mL、sLOX-1濃度の平均値は男性1060.1 ± 8.6 pg/mLおよび女性797.8 ± 0.2 pg/mLであった。LABおよびsLOX-1の測定値を低いものから第1～4四分位に分け、健診結果との関連を調べた。男女ともsLOX-1高値であるほど喫煙率が高かったが、LABおよびsLOX-1ともに、高血圧および糖尿病の有病率との相関は認められなかった。

次に、疾患発症に対するLAB、sLOX-1、LOX indexの各相対危険度を、性別、年齢、高血圧、糖尿病、脂質低下薬の服用、BMI、喫煙、飲酒、non-HDLについて多変量調整した比例ハザードモデルを用いて求めた。その結果、LABの第4四分位における発症率は、脳卒中2.09倍、脳梗塞3.11倍、心血管疾患（冠動脈疾患+脳卒中）1.91倍と有意に高くなっており、LAB高値がこれらの疾患の危険因子であ

ることが示唆された。一方、sLOX-1は第3四分位でのみ冠動脈疾患の発症率が2.13倍となっていたが、第4四分位では有意差が認められなかった。

LOX indexの第4四分位における発症率は、冠動脈疾患2.09倍、心血管疾患1.83倍と有意に高くなっていた。特筆すべきことに、脳梗塞の発症率はLOX indexの第2～4四分位の全てで3倍以上であった（図4）⁵。吹田コホートを利用した別の研究では、適正血圧と比較して高血圧で脳卒中の発症率が男性で約3倍、女性で約2倍になることが報告されている⁶。LOX index高値は、脳梗塞の最大危険因子である高血圧に匹敵する発症リスクであるといえる。上述のように、LABおよびsLOX-1の血中濃度は高血圧の有病率と関連がなく、LOX indexと高血圧は独立した危険因子であることが示唆される。今後、両指標を併用することで、脳梗塞の発症リスクをさらに精確に評価できるようになるかもしれない。

現時点では、脳梗塞の発症予知マーカーは確立されていない。吹田を含む複数のコホート研究で、総コレステロール（TC）、LDL、non-HDLは脳梗塞の発症と関連がないことが報告されている⁷。コレステロールが指標として有用でない中、LABやLOX indexが脳梗塞の発症と強い関連を示す事実は大変興味深い。

4. 今後の展望

これまで、酸化LDLと疾患発症リスクの関係を解析し、一定の結果を得ているコホート研究は、酸化LDL高値でメタボリックシンドロームの発症率が2倍以上になるというオランダの報告のみであった⁸。だが最近になって、健常な日本人男性のLAB血中濃度が、喫煙、腹囲、高トリグリセリド血症、メタボリックシンドロームと正の相関を示すことが報告された⁹。また、LABを治療指標として活用する試みも始まっている。高コレステロール血症患者に対する介入試験では、ピタバスタチンによってTC、LDL、トリグリセリドとともにLABが低下することが報告されている¹⁰。LDLとLABの減少量には相関がなかったため、LABの減少はLDL低下作用とは別のメカニズムによるものと考えられる。スタチンには多面的な効果があり、LABはその複合的な結果を反映している可能性がある。今後も、多くの試験でLABが測定され、疾患や薬効との関

係が明らかになることが期待される。

動脈硬化性疾患の早期診断を実現するには、コレステロール指標を病態にさらにあつたものにする必要がある。LAB や LOX index は、LDL の量だけでなくその変性状態を反映する指標としてユニークな存在といえる。今後、さらにエビデンスを重ねていく中で、バイオマーカーとしての LOX index の有用性を高めていきたいと考えている。

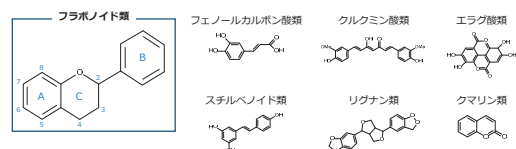
動脈硬化予防薬としての LOX-1 ブロッカー

LOX index が心血管疾患の発症をよく予測することを紹介した。これは同時に、LOX-1 を標的とした措置が疾患発症の予防に重要であることを示唆する。既に LOX-1 ブロッカーとしてヒト型中和抗体があるが、長期間の使用にはコストがかかる。そこで予防医学的観点に立ち、日常的に摂取できる食品素材の中から、LOX-1 と酸化 LDL の結合を阻害する低分子の探索を試みた。

1. LOX-1 ブロッカーの探索

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）約 400 種類のライブラリーから LOX-1 阻害分子を探索した。LOX-1 と酸化 LDL の結合を阻害する食材をサンドイッチ ELISA 法で選別後、さらに LOX-1 発現細胞への酸化 LDL の取り込みを抑制するものを選別した。LOX-1 阻害活性が強い食品素材の多くは、高プロシアニジン含有食品（リンゴポリフェノール、ブドウ種子、ピーナツ種皮、マツ樹皮など）であった。プロシアニ

ポリフェノール



リンゴポリフェノールに含まれるフラボノイド

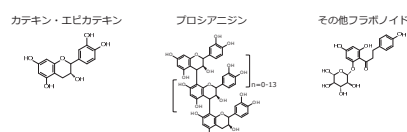


図 5. リンゴポリフェノールに含まれるフラボノイド類の構造

ジン類は、ポリフェノールの一種であるフラボノイド類に属する分子である（図 5）。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 5 の C 環部分）を持つ分子で、配糖体を含む 7000 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。

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は、LOX-1 発現細胞と酸化 LDL（10 $\mu\text{g/mL}$ ）の結合を用量依存的に抑制した（ IC_{50} : 102 ng/mL ）。そこで、リンゴポリフェノール分画をさらに、成分により分画し、活性を測定した結果、カテキン含有プロシアニジン分画が強い LOX-1 阻害活性を示すことがわかった。この分画から調整した 3～7 量体プロシアニジンは、用量依存的に LOX-1 発現細胞と酸化 LDL の結合を阻害した（ IC_{50} : 61 ng/mL [3 量体]～27 ng/mL [7 量体]）。2 量体プロシアニジンの LOX-1 阻害活性は 3 量体以上と比較して弱く（ IC_{50} : 330 ng/mL ）、単量体の（エピ）カテキンには全く活性が認められなかった。

プロシアニジン類には多様な光学異性体が存在し、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¹²。そのうち、代表的な異性体 4 種について測定したところ、いずれも LOX-1 発現細胞と酸化 LDL の結合を同程度に阻害することがわかった（ IC_{50} : 41～73 ng/mL ）。以上の結果から、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¹¹。LOX-1 と酸化 LDL の結合を阻害する低分子の報告は、プロシアニジンが初めてである。

2. 脂質沈着に対するプロシアニジンの効果

In vivo でのプロシアニジンの効果を、高血圧ラット SHRSP を用いた血管壁への脂質沈着モデルで検討した。このモデルは、SHRSP への高脂肪・高食塩負荷で腸間膜および脳底動脈のリング状の脂質沈着が生じるという家森らの報告に基づく¹³。

正常血圧ラット WKY に比べ、SHRSP では腸間膜動脈における LOX-1 の発現が著明に亢進してい

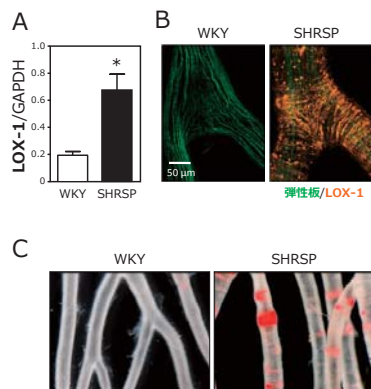


図 6. 腸間膜動脈における LOX-1 の発現と脂質沈着
(A) 定量的 PCR による LOX-1 mRNA 量。n = 11。* P < 0.005。
(B) 腸間膜動脈の免疫染色像。橙色が LOX-1 タンパク質。
緑色は弾性板の自家蛍光。
(C) 高脂肪食・食塩水負荷 2 週間後の腸間膜動脈のオイル
レッド O 染色像。

る (図 6A、B)。SHRSP および WKY に高脂肪食・食塩水を負荷すると、SHRSP にのみ負荷期間に応じた脂質沈着が生じる (図 6C)。負荷後の SHRSP では、腸間膜動脈の内皮および平滑筋に LOX-1 が強く発現し、その局在は酸化 LDL とよく一致している。血管壁内にマクロファージが認められないため、この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。SHRSP に負荷直前より抗 LOX-1 抗体を繰り返し投与すると、負荷 1 週間後における血管壁への脂質沈着が抑制される。また、SHRSP に標識酸化 LDL を投与すると、1 時間後には腸間膜動脈への分布が認められるが、これは抗 LOX-1 抗体の前投与で抑制される。これらのことから、LOX-1 を介した酸化 LDL の取り込みが、SHRSP における腸間膜動脈への脂質沈着に関与していることがわかる³。

このモデルにプロシアニジン類を投与し、脂質沈着に与える影響を調べた。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%)、SHRSP に 2 週間与えたところ、腸間膜動脈壁の脂質沈着はプロシアニジン群で有意に抑制された (図 7)。対照群とプロシアニジン群との間に、摂餌量、体重、血圧、心拍数、TC、HDL、中性脂肪、および過酸化脂質の指標 TBARS に有意な差は認められなかった。

試験終了時における 3 量体プロシアニジン C1 お

よび 2 量体プロシアニジン B2 の血中濃度は、それぞれ 4.9 ± 1.9 ng/mL および 7.9 ± 1.8 ng/mL であった。プロシアニジン C1 はリンゴポリフェノール内の全プロシアニジン類の約 6% を占めるに過ぎないことを考えると¹⁴、血中には LOX-1 と酸化 LDL 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³、プロシアニジン C1 単独でも LOX-1 と酸化 LDL の結合を十分に阻害し得ると考えられる。

プロシアニジン類には降圧、脂質低下、抗酸化作用があるとされるが、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、これらの作用によって血管壁への脂質沈着が抑制された可能性は低いと考えられる。本研究で認められた効果が、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

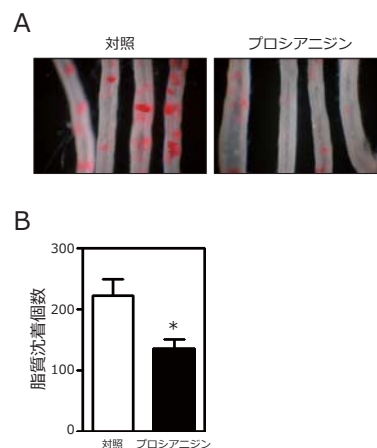


図 7. SHRSP の腸間膜動脈脂質沈着に対するプロシアニジンの効果

(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。

作用機序があるのかについては、今後さらに検討していきたい。

3. 今後の展望

フランスでは、コレステロールの多量摂取にも関わらず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。Corder らは、血管内皮細胞からのエンドセリンの分泌を赤ワイン中のプロシアニジンが抑制すること、プロシアニジン

含量の多い赤ワイン産地では他の地域と比較して男性が長命で虚血性心疾患も少ないことから、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はないかと提唱している¹⁵。プロシアニジンは、ココアなど心血管保護作用があるとされる食品にも多く含まれる。その機序が、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。

ポリフェノール類の薬理作用を抗酸化能に求める研究は数多いが、実際に機序が明らかになっているものは極めてわずかである。これらの中から有用な生理活性物質を効率的にスクリーニングするには、LOX-1 と酸化 LDL の結合のような標的分子と生理作用をあらかじめ明確に設定した系を用いることが重要であろう。現在我々は、プロシアニジンより強力な LOX-1 阻害効果を有する物質を探索しており、幾つかの候補を得ている。今後、LOX-1 ブロッカーのさらなる探索と解析を通じて、動脈硬化予防の実現、疾患発症機構の解明につなげ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* 386: 73-77, 1997.
- 2) Yoshimoto R, Fujita Y, Kakino A, et al. The discovery of LOX-1, its ligands and clinical significance. *Cardiovasc Drugs Ther* 25: 379-391, 2011.
- 3) Nakano A, Inoue N, Sato Y, et al. LOX-1 mediates vascular lipid retention under hypertensive state. *J Hypertens* 28: 1273-1280, 2010.
- 4) 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* 200: 303-309, 2008.
- 5) Inoue N, Okamura T, Kokubo Y, et al. LOX index, a novel predictive biochemical marker for coronary heart disease and stroke. *Clin Chem* 56: 550-558, 2010.
- 6) Kokubo Y, Kamide K, Okamura T, et al. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease in a Japanese urban cohort: the Suita study. *Hypertension* 52: 652-659, 2008.
- 7) Okamura T, Kokubo Y, Watanabe M, et al. Low-density lipoprotein cholesterol and non-high-density lipoprotein cholesterol and the incidence of cardiovascular disease in an urban Japanese cohort study: the Suita study.
- 8) Hovoet P, Lee DH, Steffes M, et al. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA* 299: 2287-2293, 2008.
- 9) Uchiba K, Suehiro A, Nakanishi M, et al. Association of atherosclerotic risk factors with oxidized low-density lipoprotein evaluated by LOX-1 ligand activity in healthy men. *Clin Chim Acta* 412: 1643-1647, 2011.
- 10) Matsumoto T, Fujita M, Sawamura T, et al. Pitavastatin reduces lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 ligands in hypercholesterolemic humans. *Lipids* 45: 329-335, 2010.
- 11) 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* 87: 104-113, 2011.
- 12) 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* 1102: 206-213, 2006.
- 13) Yamori Y, Horie R, Sato M, et al: Hypertension as an important factor for cerebrovascular atherogenesis in rats. *Stroke* 7: 120-125, 1976.
- 14) 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* 54: 884-892, 2006.
- 15) Corder R, Mullen W, Khan NQ, et al. Oenology: red wine procyanidins and vascular health. *Nature* 444: 566-566, 2006.
- 16) 高谷智英, 岩元真, 垣野明美ほか. 動脈硬化予防薬としての LOX-1 ブロッカーの探索. 循環器病研究の進歩 32: 81-88, 2011.