

酸素ラジカルと動脈硬化（その1）

腸溶性ラクトフェリン研究会

常任理事 安藤邦雄

1. 銅イオンとラクトフェリン

今回は動脈硬化に関する腸溶性ラクトフェリン研究会の意見を発表する場として本誌をお借りすることにした。意見とは、ラクトフェリンのように“ミトコンドリア指向性があり、しかも、2 価の銅イオンと強固な錯化合物をつくる化合物は、動脈硬化を制御・改善する性質があるはずだ”というものである。この

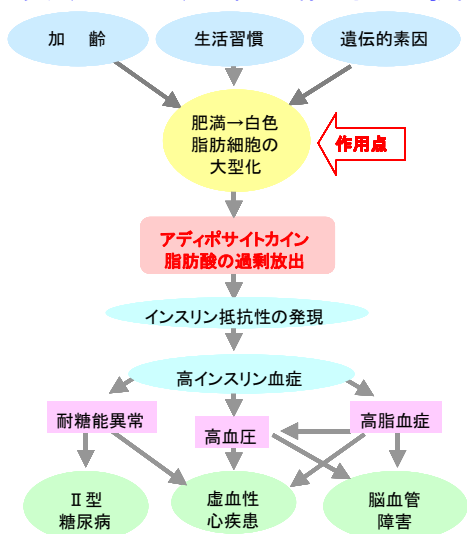


図 1. メタボリック症候群の成因

メタボリック症候群は、加齢、生活習慣および遺伝的な素因が重なって発症する。過食により中性脂肪を貯えて脂肪細胞が大型化すると、TNF- α を放出して末梢組織のインスリン感受性を低下させる。それに伴って高インスリン血症を招来し、耐糖能異常、高血圧、高脂血症を発症するとする考え方である。

のような意見は、“何を馬鹿なことを”と専門家からは一笑に付されるかもしれない。しかし、筆者は半世紀にわたり動脈硬化の予防・治療の研究に携わり、このような確信を抱くに至った。このミニレビューで、その証拠を提示する。

動脈硬化とがんは、人類の二大死亡原因をなす典型的な生活習慣病である。動脈硬化は身体の中の動脈にも起こりうるが、特に危険なのは脳血管と心臓の冠動脈に起こる動脈硬化である。ここ四半世紀、メタボリック症候群を始めとして色々な角度から動脈硬化の研究が進展して来たので、まず、その成果を簡単に要約する。

1987 年、リーヴェン(Reaven⁽¹⁾)は、虚血性心疾患 (CHD) の発症にとって、もっとも相関が高い危険因子である高コレステロール血症の他に、「肥満」「高血圧」「脂質代謝異常」「インスリン抵抗性」の四つが揃うと、個々の異常は軽度であっても突

然死のリスクが数倍上昇するという疫学調査を基に、シンドローム X、別名“死の四重奏”と命名する新しい疾病の概念を提唱した(図 1)。事実、II 型糖尿病患者は、発症初期には肥満しており、約 7 割が高血圧であること、脂質代謝異常とインスリン抵抗性に基づく糖・脂質代謝異常を呈し、同一年齢で比較すると健常者と比べ虚血性心疾患 (CHD) を発症する危険率は約 3 倍である。つまり、肥満、高血圧、脂質代謝異常、インスリン抵抗性は、個々にも循環器疾患の危険因子とみなされていたので、それらが相互に影響しあって循環器病の悪化を加速させるというシンドローム X の概念が、活発な研究対象となったのは当然だった。リーヴェンの提唱から 20 年以上が経過し、シンドローム X は、わが国では“メタボリック症候群”、あるいは“内臓脂肪症候群”と呼ばれ、重要な生活習慣病の一つとして健康診断の定番になっている。

メタボリック症候群の概念が確立する研究の過程で、動脈硬化の発生機序に関し三つの大きな発見があった。第一の発見は、動脈硬化を起こす“アテローム・プラック(アテローム)”の形成過程が明らかになったことである。しかし、残念なことに、多くの研究者が活性酸素と酸素ラジカルを同一視する誤りを犯したため、未だにアテローム形成を的確に予防・治療する方法は見つかっていない。二つ目は、炎症性サイトカイン $\text{TNF-}\alpha$ が、循環器疾患の発症・悪化に一役かっているのがわかったことである。過食により中性脂肪を多量に貯蔵して大型化した腹腔内の脂肪細胞は、正常な脂肪細胞と比べ $\text{TNF-}\alpha$ のメッセンジャーRNA 発現量が 2.5 倍に増加し、血中への $\text{TNF-}\alpha$ 分泌量も増加する。つまり、多量の中性脂肪を腹部の腸間膜に貯蔵すると、身体は常時軽い炎症状態なのである。三つ目として心筋梗塞や脳梗塞は、アテロームが盛り上って動脈を塞ぐためではなく、炎症を起こしたアテロームの血管内血管が破綻し、出血が凝固して血液の流路を閉塞することがわかったことである。

2. 動脈硬化の発生機序

かつて脳血管障害と虚血性心疾患は動脈壁にコレステロールが沈着し、プラックとなって動脈内腔に盛り上がり、血流を妨げるために起こると考えられていた。血流の途絶が心筋とか脳の一部に起こり組織が死ぬと、致命的な心筋梗塞あるいは脳梗塞が起こると考えていたのである。しかし、今ではこの説明を信ずるものはほとんどいなくなった。血管は単なるパイプではなく、生きた細胞から成り立っており、血管の細胞は他の細胞及び周囲の組織と緊密に情報交換しているのである。これらの細胞と組織は動脈硬化の発生と進行に関与しており、アテロームは血管表面ではなく血管の内部に発生する。さらに、最初は



図 2. 血管内血管の破綻による動脈の梗塞
アテロームに栄養と酸素を送る血管内血管が、炎症のために破綻・出血し、凝固した血液塊が動脈内腔を閉塞して血流を途絶させる。

小さい凝血塊である血栓が大きく成長し、血流を途絶させることもあることがわかってきた。心筋梗塞と脳梗塞は、動脈壁に生じたプラックが突如として破綻し、出血した血液の凝固が引き金となって血栓を発生させ、血流を止めるのである(図 2)。

さらに動脈硬化では炎症が大きな役割を果たすことも明らかになった。動脈の炎症は小さなプラックが次第に成長し、最終的に破裂・出血に至るまで、どの過程でも起こっている。動脈硬化発症における炎症の役割を明瞭に解き明かしたのは、LDL の研究であった。培養細胞と動物実験は、血液の酸化 LDL が動脈内膜に集まったと

きにトラブルが起こることを証明したのである。

では、高 LDL 血症が如何なる機序で動脈硬化を引き起こすのであろうか。病理学的検討から、初期病変の中心をなすのは、動脈中膜への“泡沫細胞”の集積であり、泡沫細胞の起源は、血中の単球由来のマクロファージ (Mφ) であることがわかっていった。さらに生化学的検討から、泡沫細胞の主成分は、LDL 由来のコレステロールであり、またアテロームに含まれる蛋白として、LDL の主要構造蛋白であるアポ蛋白 B-100 の存在が確認されていた。ところが、Mφには LDL を取り込む機構がなく、Mφが泡沫化するためには、LDL 受容体以外の経路を介して LDL が Mφに取り込まれることを証明する必要があった。

1979 年、Goldstein と Brown⁽²⁾は、LDL が化学修飾を受けると Mφを泡沫化させる可能性があることを証明し、ノーベル賞を受賞した。彼らは、LDL を無水酢酸と反応させて得たアセチル LDL が、in vitro で特異的な受容体を介して Mφに取り込まれ、取り込んだ Mφは泡沫化することを証明したのである。彼等の発見は、Mφの泡沫細胞化には、LDL が何らかの化学的修飾を受けることが必須であり、それによってはじめて Mφを泡沫化し得るという新しい概念となった。しかし、生体内に存在する真の変性 LDL がどのようなものかは、謎に包まれたままであった。

1981 年 Henriksen 等⁽³⁾は、血管内皮細胞と LDL を一定時間培養した後、再び LDL を取り出して Mφと培養したところ、泡沫化することを報告した。LDL、内皮細胞どちらも生体に存在するので、この変性 LDL が真の修飾 LDL と考えられるようになった。ところが数年後に、北等⁽⁴⁾、培養液中に存在していた Cu²⁺が重要な役割を果たしていることが明らかにした。すなわち、Cu²⁺が触媒するフェントン反応により、細胞から発生した活性酸素はラジカルに転換され、ラジカルは LDL リン脂質の不飽和脂肪酸を過酸化し、さらに LDL の構造蛋白アポ B-100 も酸化・切断することが明らかになったのである(図 3)。

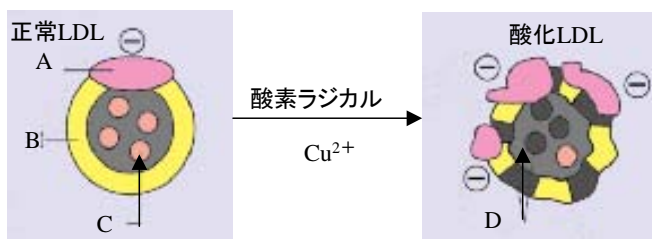


図 3. 酸素ラジカルによる酸化 LDL の生成

正常 LDL は均一な球形だが、酸化 LDL は不均一な球形で、アポ蛋白 B が切断されているため内部構造の崩壊が起こっている。

A ; アポ蛋白 B-100、B;リン脂質層、C ; コレステロールと中性脂肪。リン脂質が酸化されたため、アルデヒドと過酸化脂質が多量に含まれている。

結果として、この LDL の酸化が起こると、全体として、LDL は陰性荷電を増し、Mφの修飾 LDL 受容体に認識され取り込まれる事実が証明された。酸素ラジカルで酸化された LDLこそが動脈硬化の原因物質だったのである。後にこの物質は、酸化 LDL と呼ばれるようになった、

従来、酸素ラジカルによる酸化ストレス説は、色々な病態で提唱されてきたので、酸化 LDL は酸化ストレス分野

の研究者の関心を集めることになった(図 4)。しかし、酸化 LDL 説が広く承認されるためには、生体内に酸化 LDL が存在し、その生成を抑制すれば、アテローム発生が阻止されることを証明する必要があった。

正当性を立証する道具になったのは、高コレステロール血症の治療薬プロブコールである。プロブコールは、ダウケミカル(当時)が抗酸化作用ある血清コレステロール低下剤として開発した古い脂溶性の薬物であり、ペニシラミンと同様に Cu^{2+} と錯体を形成する性質がある。発端は、プロブコール内服によって黄色腫が消失することが発見されたことである。黄色腫は難治性で家族性高コレステロール血症を呈するホモ接合体患者に発生する。

黄色腫は、 $\text{M}\phi$ が泡沫化した泡沫細胞の集積体である。プロブコールは黄色腫の形成抑制、また退縮促進することにより、黄色腫を消失させる可能性があることを示唆する臨床データである。また Parasathary 等⁽⁵⁾ は、本剤服用患者の LDL は、コントロールに比して酸化を受け難いことを報告し、その結果、*in vitro* で $\text{M}\phi$ の泡沫化も起こさないと報告した。

これらの結果を考え合わせると、もしも酸化 LDL が生体内に存在し、 $\text{M}\phi$ を泡沫化する

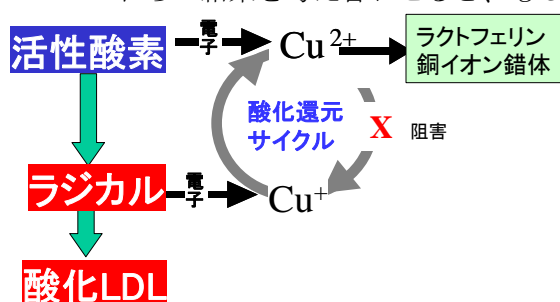


図 4. ラクトフェリンによるフェントン反応の阻害

遊離の銅イオンは細胞内に活性酸素が存在する限り、連鎖反応で酸素ラジカルを発生させ続ける。ラクトフェリンが存在すると 2 価の銅イオンはラクトフェリンと錯体を形成するので、銅イオンの酸化・還元サイクルは遮断される。

作用があると考えた場合、抗酸化作用を有するプロブコールは生体内での LDL の酸化を抑制する結果、 $\text{M}\phi$ の泡沫化も起こらず、動脈硬化の進展を抑制し得る可能性を示唆すると考えられる。そこで北等⁽⁶⁾は、遺伝的にアテローム性動脈硬化を起こす家族性高コレステロール血症モデル動物 WHHL ウサギに、まだ病変の起こっていない 2 カ月齢でプロブコールを投与開始し、大動脈の約 40~50%がアテローム病変で覆われる 8 カ月齢まで投与を続け、酸化 LDL 仮説の証明を試みた。結果は、プロブコール投与群では、大動脈全体面積の 7%が病

変であったのに対し、コントロール群では、54%が病変で占められていた。この事実は、酸化 LDL が生体内に存在することを間接的ではあるが示したことになる。さらに北等は、抗酸化 LDL 抗体を用いて、WHHL ウサギの病変部を免疫組織学的に検討したところ、直接的にその存在を確認できた。他の研究者達によっても追試が行われ、もはや酸化 LDL が動脈のアテローム変性にさいし引金となることを疑う研究者はいなくなった。

3. 動物実験におけるラクトフェリンの酸化ストレス抑制効果

ラクトフェリン (LF) は「免疫を賦活する母乳成分」として知られているが、ラクトフェリンの酸化ストレスを抑制する作用は知られているとはいえない⁽⁷⁾。2006 年 11 月に開催された第二回ラクトフェリンフォーラムで、慈恵医大の坪田等は b-LF の抗酸化ストレス作用について画期的な研究成果を発表した。彼らはヒト・ウイルソン病のモデル動物、LEC-ラットを使い、b-LF が酸化ストレスを緩和して延命させることを発見し、酸化ストレス緩

和のメカニズムを明快に証明したのである。LEC ラットは、遺伝的に肝臓からの銅イオン (Cu^{2+}) 排泄が障害され、肝臓と脳神経系に蓄積して劇症肝炎から肝臓癌を発症する。したがって、それは単にウイルソン病の病態モデルにとどまらず、普遍的な酸化ストレスのモデルとして重要視される。

① LEC ラットは Cu^{2+} の過剰蓄積による多量の酸素ラジカル発生に由来する強烈な酸化ストレスを起こす。それにより生後 12 週あたりから肝障害が発症し始め、生後 17~18 週で雌性では 70%、雄性で 50% が劇症肝炎で死亡、生き残りも生後 1 年以内に 100% が肝臓がんで死亡する。坪田等は生後 4 週令の雌性 LEC ラットに 2% の b-LF を混入した飼料を与え続けると、劇症肝炎による死亡を有意に阻止する(図 5)。

② 一方、b-LF は強力な銅イオンキレーター⁽⁸⁾ であるにもかかわらず肝臓への銅蓄積を阻害せず、AST, ALT の上昇を抑制しない。

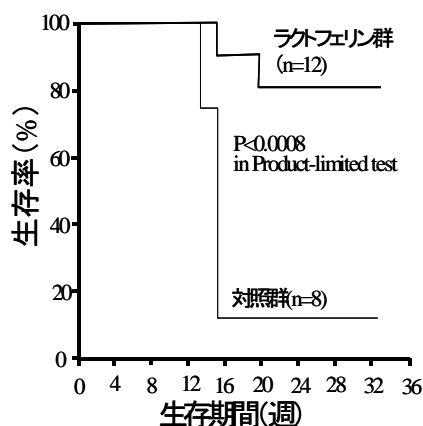


図 5. b-LF は LEC ラットの劇症肝炎による死亡を抑制する

③ 肝臓切片の顕微鏡観察では、対照群は特徴的な多形成変性と脂肪変性を呈するが、b-LF 群はこれらの変化が抑制された。また、透過型電子顕微鏡所見では、対照群においてミトコンドリアのクリステ数の減少、生体膜の不鮮明化が散見され、生体膜を構成する高度不飽和脂肪酸の過酸化促進を示唆したが、b-LF 群はミトコンドリアの分布密度が高く、対照群に見られた病理組織学的変化が抑制された。

④ 酸化ストレス下のミトコンドリア DNA における代表的な酸化傷害の指標、8-hydroxy-2'

-deoxyguanosine (8-OHdG) は、対照群で大きく増加したのに対し、b-LF 群は増加が有意に抑制された。

⑤ 肝組織内における DNA 修復酵素の一つ OGG1 の mRNA は、対照群と比べ b-LF 群のほうが 2.3~3.2 倍高値であった。

⑥ OGG1 遺伝子プロモーター領域の CpG island におけるシトシンのメチル化度は、対照群で 25 ヶ所の CpG 部位すべてがメチル化をされていたのに対し、b-LF 群は 13 部位がメチル化を受けていたが、残りの 12 部位はメチル化されていなかった。

⑦ 肝障害により死亡直前の対照群における肝組織内カスパーゼ-3 は大きく上昇していたが、b-LF は上昇を有意に阻止した。

上記の事実は、ラクトフェリンが肝臓における Cu^{2+} の過剰蓄積による酸化ストレスを予防できることを示唆している。

4. 銅イオン・キレーターの動脈硬化抑制効果

ここで筆者等が 1971 年に行った銅キレーターの実験結果⁽⁸⁾を紹介したい。銅キレーターとして使用したのは、筆者が単離し X 線回折法による構造を決定した抗生物質のアスコクロリンである⁽⁹⁻¹⁰⁾。この物質はミトコンドリアに高い親和性を示し、強い呼吸阻害作用を持っている。そこで、呼吸阻害効果を減弱するため芳香環 4 位の水酸基にメチル基を導入した 4-O-メチルアスコクロリン (MAC) を実験に用いた。

表 1. 高コレステロール飼料で 9 ヶ月飼育したウズラ大動脈の Fatty Streak 面積

個体番号	MAC 混合群 (%)				対照群	
	0.0025		0.16		性別	指数
	性別	指数	性別	指数		
1	F	0	F	0	M	II
2	F	0	F	0	M	I
3	F	0	F	0	M	IV
4	F	I	M	0	M	0
5	F	0	M	0	M	I
6	M	I	M	0	F	II
7	M	I	M	0	F	III
8	M	I	M	0	F	IV
平均値		0.5		0		2.1

MAC の飼料添加量、高用量は 0.16% (飼料摂取量から換算すると 64mg/kg)、低用量 ; 0.0025% (1 mg/kg)。M; ♂, F; ♀、指数 ; アテローム指数で大動脈表面が 76-100%、Fatty Streak で覆われている場合、指数IV、51-75%、指数III、26-50%、指数II、1-24%、指数 1 として表示。Fatty Streak が存在しない場合、指数 0。

実験動物は、日本原産の小型鳥類“ウズラ”である。ウズラは小型かつ丈夫で狭い面積で飼育可能、しかも、飼料に 2% のコレステロールを混入し自由摂取させ 1 年もすると、大動脈にアテロームに類似した fatty streak 病変を起こさせることができる。ウズラは 9 ヶ月後に屠殺して、大動脈を心臓の基始部から下肢の分岐部まで切り取り、表面の Fatty streak 面積を計測し表 1 に示した。MAC 高容量群では fatty streak は全く認められず、1/64 の低用量群でも病変は有意に抑制された。さらに、家兎を高コレステロール飼料で 2 ヶ月飼育して大動脈にアテロームを発生させる実験もこころみた。MAC 0.2% を含有する高コレステロール飼料を与えたところ、対照群は 6 羽中 2 羽が循環障害で死亡したのに対し、MAC 群は死亡しなかった。さらに、対照群は強度の大動脈のアテローム変性および冠動脈の梗塞による心筋の壊死が認められたが、MAC 群ではアテローム変性が有意に抑制され、心筋の壊死は認められなかった。ちなみに、MAC が属するオルセニル・アルデヒド誘導体は、表 2 に示すように 2 価銅イオンに対し高い親和性をもって錯体を形成する。

表 2. オルセニルアルデヒド誘導体の銅イオン親和性

Ligands (M : Cu ²⁺)	Coefficient (K)	
	K ₁	K ₂
Ascochlorin	4 x 10 ⁹	3 x 10 ⁵
ascofuranon	7 x 10 ⁹	2 x 10 ⁵
MAC	5 x 10 ⁶	2 x 10 ⁶
2,4-dihydroxybenzaldehyde	5 x 10 ⁹	2 x 10 ⁶



M: Transient metal ions L: Ligand

する糖鎖が N-グリコシド結合しているが、 δ -LF のそれは O-グリコシド結合しているだけである。

ミトコンドリアが多量の活性酸素を発生させるのは、アセチル CoA を酸素で燃焼させエネルギーを取り出すためである。ミトコンドリアの呼吸は、TNF- α により阻害され、サイトクローム c の流出が始まると細胞はアポトーシスを起こす。その結果、たんぱく質とキレートしていた Cu²⁺は遊離し、フェントン反応により活性酸素を酸素ラジカルに転換する。これは連鎖反応であって、過酸化水素・一重項酸素等の活性酸素が存在する限り、酸素ラジカルをつくり続ける。細胞がアポトーシスを起こして内容物が流出した際、銅イオンを遊離にしないことが酸素ラジカル産生の抑制に必須であろう。

自然科学は時としてとんでもない陥穽に落ち込むことがある。迷路に迷い込んだ活性酸素の研究は、抗酸化ビタミンで活性酸素をトラップすれば、エイジングを予防し生活習慣病発生を抑制できると勘違いして 20 年以上の歳月を無駄に費やしてしまった。エネルギーを生み出すプロセスで過酸化水素、一重項酸素のような活性酸素が発生するのは避けがたい。ヒトの血液には過酸化水素を瞬時に水と酸素に分解するカタラーゼを含んでいる。活性酸素は水に転換されれば無害である。既に Cu²⁺が犯人である証拠は揃っているのに、酸素ラジカルを発生させる触媒である Cu²⁺を活性化させないことである。ミトコンドリア指向性があり、安全無害で 2 価の銅イオンと強固な錯化合物をつくる化合物を探し出せば、動脈硬化をコントロールできる薬物を実用化できるのではあるまいか。

最近、乳汁、好中球の顆粒、涙等の外分泌液に含まれるラクトフェリンの他に新しいラクトフェリンの存在が明らかになり、 δ -ラクトフェリン (δ -LF) と命名された。興味深いのは、 δ -LF がミトコンドリアに局在することである。いずれにせよ、通常の LF と δ -LF の構造上の差異は僅かで、LF は、結合

引用文献

- (1) Reaven GM. *Metabolism*. 1987; 36(2 Suppl 1): 1-8.
- (2) Goldstein JL et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76: 333-7.
- (3) Henriksen T et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78: 6499-503.
- (4) 北徹 *生化学*. 1988; 60: 1163-8.
- (5) Fruebis J et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89: 10588-92.
- (6) Kita T et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84: 5928-31.
- (7) Tsubota A et al. *J Hepatol*. 2008 Mar;48(3):486-93.
- (8) 安藤邦雄他、*J Antibiotics (Tokyo)*. 1968; 21: 539-544.
- (9) *ibid.* 1969; 1969; 22: 511-512.
- (10) 安藤邦雄他、未発表