

アルデヒドによるハイブリッド型蛋白付加体と生活習慣病

研究分担者 中村 純 大阪府立大学

研究要旨

加熱式および電子たばこのエアロゾルに含まれるアセトアルデヒド (AA) およびホルムアルデヒド (FA) の健康におよぼす影響についての懸念が広がっている。この種のアルデヒドは炎症性のあるハイブリッド型の蛋白付加体を産生する可能性があるが、その構造については不明な点が多い。本研究では、AA および FA 由来の付加体の中で、生活習慣病の病態に重要な影響を及ぼす付加体を明らかにする目的で、種々のハイブリッド型付加体の精製を行った。さらに、異なるハイブリッド型付加体に対する抗体が粥状動脈硬化症の早期に上昇することを疾患モデルマウスを用いて明らか

A. 目的

たばこ煙あるいは環境中の微粒子の慢性的な暴露が動脈硬化などの生活習慣病の発症に深く関与していることが疫学的および実験的に証明されている (1-4)。さらに、機序は未だ不明だが、慢性的な肺の炎症が心血管系疾患を引き起こすことも明らかになってきている (5)。本研究では、加熱式および電子たばこのエアロゾルなどに含まれる AA および FA が蛋白と反応してハイブリッド型付加体を産生することに注目し、その付加体の中で、生活習慣病の病態に影響を及ぼす可能性のあるものを特定する。本年度は、付加体の精製を行うことに加え、それら付加体に対する抗体価の測定法を確立し、免疫反応のターゲットとなりうる付加体を明らかにすることを目指した。

B. 方法

ハイブリッド型リジン付加体の精製および部分精製: AA ないし FA をマロンジアルデヒド (MDA) の存在下でリジンアナログであるアミノカプロン酸 (6ACA) と生理食塩水中で 37 度、7 日間反応させた。その後、反応物からリジン付加体の精製物および部分精製物を HPLC-DAD 法を用いて分離した (図 1 および 2)。

付加体を用いた抗原の作製: ハイブリッド型リジ

ン付加体を凍結乾燥後、キャリアー蛋白に結合させ (図 3)、さらに透析を行い、**Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)** に用いる抗原を作製した。

リジン付加体抗原を用いた ELISA: リジン付加体抗原は一定量 96 穴プレートに固相化し、スキンミルクを用いてブロッキングした後、マウス血清と一晚反応させた。その後、パーオキシダーゼをラベルした二次抗体に反応させ、最後にパーオキシダーゼの基質と反応させ、プレートリーダーで定量を行った。

血清サンプル: 粥状動脈硬化感受性マウスの ApoE 欠損マウスと野生型マウスの血清は米国ノースキャロライナ大学の Xianwen Yi 博士から入手した。また、大阪府立大学の井澤武史准教授との共同研究で実施中の生活習慣病 (非アルコール性脂肪性肝炎) のラットを用いた実験において、ラットの血清を入手した。

(倫理面への配慮)

動物実験は大阪府立大学の実験動物委員会の承認を得て行なった。

C. 結果および D. 考察

ハイブリッド型リジン付加体の精製: 加熱式および電子たばこのエアロゾルなどに含まれる AA およ

よび FA は単独でリジン側鎖のアミノ基と反応するが、安定な付加体を形成することはない。そのため、AA および FA 単独のリジン付加体は良いバイオマーカーとはなり難い。一方、AA および FA は組織中でグルタチオンを枯渇し、脂質過酸化を引き起こす。その脂質過酸化によってリン脂質からマロンジアルデヒド (MDA) が産生される。MDA (OHC-CH<sub>2</sub>-CHO) の両側のアルデヒドは蛋白のアミノ基などに反応することに加え、MDA の中央の炭素が AA や FA などのアルデヒドと反応することで多種多様な安定なハイブリッド型リジン付加体が産生される (6-7)。これまでに MDA が AA とリジン側鎖のアミノ基と反応して、ハイブリッド型の M2AA 付加体ができることを我々を含む研究者が報告してきている (図 1) (6, 8)。この M2AA は粥状動脈硬化の原因となる付加体の一つとも推察されている (8)。AA と同様に、FA が MDA とリジン側鎖のアミノ基と反応して、ハイブリッド型の M2FA 付加体を産生することを最近我々が初めて報告した (図 2) (7)。そこで、本研究では、AA を MDA の存在下で 6ACA と生理食塩水中で 37 度、7 日間反応させ、安定なリジン付加体ができるか否かを HPLC-DAD 法で検討した。その結果、2 分子の MDA、1 分子の AA と 6ACA からなる M2AA (7) のピークが約 6.8 分の Retention time を持って検出された (図 4)。また、M2AA 以外にもいくつかの主要なピークが認められた。同様に、MDA、FA と 6ACA を反応させたところ、2 分子の MDA、1 分子の FA と 6ACA からなる M2FA (7) のピークが約 6.4 分の Retention time を持って分離された (図 4)。AA の場合と同様、M2FA 以外にもピークが散見された。M2AA 以外の主要なピークが認められたため、個々の付加体の特徴を理解する目的で HPLC を用いた分離条件を変更した。その結果、MDA、AA と 6ACA 反応物から M2AA を含む 8 種類の主要な物質を精製あるいは部分精製することに成功した (図 5)。現在その分子量を測定する実験を行っている。また、AA、MDA、6ACA

の反応物中には主要なピーク以外にも数多くの小さなピークが検出されたことより、HPLC-DAD 法を用いて MDA、AA と 6ACA 反応物を無作為に 9 分画 (分画/分) に分離し (図 6)、ノンターゲット法による ELISA 解析を行うこととした。

#### ハイブリッド型リジン付加体に対する抗体価の上昇と動脈硬化

: たばこ煙あるいは環境中の微粒子を ApoE 欠損マウスに吸入暴露させることで粥状動脈硬化が悪化することが報告されている (9,10)。今年 3 月に行われた米国毒性学会においても ApoE 欠損マウスを用いてたばこ煙と加熱式タバコのエアロゾルの粥状動脈硬化への影響を比較した結果がフィリップスモリスから報告されていた (11)。この様に ApoE 欠損マウスは環境中の大気汚染物質の動脈硬化への影響を明らかにするために頻繁に使われている。我々は最近、ApoE 欠損マウスの血液中に M2AA および M2FA に対する抗体が動脈硬化発症時に上昇することを明らかにした (6,7)。しかし、M2AA や M2FA 以外の AA および FA 由来のリジン付加体の中にも免疫原性があるエピトープが存在する可能性があった。そこで、AA と MDA と 6ACA の反応物の 9 分画のフラクションを BSA に個別に結合させ、ApoE 欠損マウスの血清中にこれらの抗原に対する抗体が存在するかを検討した。その結果、全ての分画に対する抗体が ApoE 欠損マウスの血清中に存在することが明らかになった (図 6)。さらに、程度の差が有るものの、野生型マウスに比較してその抗体価の上昇が確認された (図 6)。一方、これまでに粥状動脈硬化の原因の一つではないかと推察されていたホスフォコリン (PC) 抗原 (12) に対する抗体価の上昇は認められなかった。これらの疾患モデルマウスの実験結果から、粥状動脈硬化症の発症初期に M2AA 以外の AA 由来のハイブリッド型リジン付加体が存在し、その付加体が抗原性を示すことにより免疫機構を刺激していることが強く示唆された。また、これまでに同定されていない炎症性を示すハイ

ブリッド型付加体が生活習慣病の発症機序に関与している可能性が示唆された。この成果は今年3月に開かれた米国毒性学会で口頭発表に選ばれ、その結果は高く評価された。

#### **加熱式および電子たばこのエアロゾルの欧米で**

**の毒性研究の最近の知見**：今年3月上旬に米国、ボルチモアで開催された米国毒性学会（SOT）に参加した際に、加熱式および電子たばこのエアロゾルの欧米での毒性研究の最近の知見を得たのでその一部を報告する。加熱式および電子たばこの使用は、従来の紙巻たばこの使用よりも安全であるとたばこメーカーは主張しているが、発生したエアロゾル自体が安全か否かは十分な証拠がない。さらに、エアロゾルの安全性を判断する上での問題を難しくしているのが、電子タバコの使用における多様なバリエーション（電子タバコのデバイスタイプ、ワット数または温度設定、香味料、ニコチン濃度など）である。このような多様性によって、毒性試験の一般的方法が確立されていない。SOTでは、エアロゾルの毒性に関して、大学関連の研究機関から28演題、FDAから1演題、たばこ企業から24演題、その他の企業から8演題、計61演題が発表された。たばこ企業からは大がかりな動物実験あるいは臨床試験の結果などが報告された。また、たばこ企業からの研究は、そのほとんどが燃焼型たばこ煙と比較して加熱式および電子たばこのエアロゾルの毒性が低いといった報告であり、加熱式および電子たばこのエアロゾルの毒性とコントロールエア暴露とを詳細に比較したものは少なかった。一方、大学の研究は小規模な培養細胞レベルの実験が主体であった。動物を用いたエアロゾルの生体への影響をアカデミアが公平な立場で評価する研究が望まれる。また、大学関連の研究機関からは、エアロゾルに含まれるフレーバーが酸化ストレスを起こしたり、白血球を刺激したり、血管内皮細胞に影響を及ぼしたりする可能性を示すものが多く報告されていた。ワークショップでは、妊

婦が加熱式および電子たばこを使用するケースが増えていることを取り上げ、その使用が胎児ないしは出生後に起こる可能性がある肥満などの生活習慣病を危惧するセッションが設けられた。

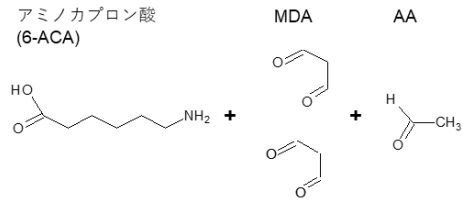
#### **E. 結論**

加熱式および電子たばこのエアロゾルなどに含まれるAAおよびFAが酸化ストレス下で多種多様なハイブリッド型リジン付加体を産生することが明らかになった。その付加体の中には免疫原性を示すものがあり、生活習慣病の炎症反応を促進する可能性がある。今後、ハイブリッド型付加体の構造を明らかにするとともに、その生物学的重要性を明らかにすることに加え、新たなバイオマーカーになりうるかを検討する。

#### **引用文献**

- 1) Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L. Smoking in relation to atherosclerosis of the coronary arteries. *N Engl J Med.* 1965;273(15):775-9.
- 2) Sackett DL, Gibson RW, Bross ID, Pickren JW. An autopsy study. *N Engl J Med.* 1968;279(26):1413-20.
- 3) Künzli N, Jerrett M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, Thomas D, Peters J, Hodis HN. Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environ Health Perspect.* 2005;113(2):201-6.
- 4) Sun Q, Wang A, Jin X, Natanzon A, Duquaine D, Brook RD, Aguinaldo JG, Fayad ZA, Fuster V, Lippmann M, Chen LC, Rajagopalan S. Long-term air pollution exposure and acceleration of atherosclerosis and vascular inflammation in an animal model. *JAMA.* 2005;294(23):3003-10.
- 5) Van Eeden S, Leipsic J, Paul Man SF, Sin DD. The relationship between lung inflammation

- and cardiovascular disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(1):11-6.
- 6) Shimomoto T, Collins LB, Yi X, Holley DW, Zhang Z, Tian X, Uchida K, Wang C, Hörkkö S, Willis MS, Gold A, Bultman SJ, Nakamura J. A purified MAA-based ELISA is a useful tool for determining anti-MAA antibody titer with high sensitivity. *PLoS One.* 2017; 21;12(2):e0172172.
- 7) Nakamura J, Shimomoto T, Collins LB, Holley DW, Zhang Z, Barbee JM, Sharma V, Tian X, Kondo T, Uchida K, Yi X, Perkins DO, Willis MS, Gold A, Bultman SJ. Evidence that endogenous formaldehyde produces immunogenic and atherogenic adduct epitopes. *Sci Rep.* 2017;7(1):10787.
- 8) Antoniak DT, Duryee MJ, Mikuls TR, Thiele GM, Anderson DR. Aldehyde-modified proteins as mediators of early inflammation in atherosclerotic disease. *Free Radic Biol Med.* 2015;89:409-18.
- 9) Lo Sasso G, Schlage WK, Boué S, Veljkovic E, Peitsch MC, Hoeng J. The Apoe(-/-) mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *J Transl Med.* 2016;14(1):146.
- 10) Fetterman JL, Pompilius M, Westbrook DG, Uyeminami D, Brown J, Pinkerton KE, Ballinger SW. Developmental exposure to second-hand smoke increases adult atherogenesis and alters mitochondrial DNA copy number and deletions in apoE(-/-) mice. *PLoS One.* 2013;8(6):e66835.
- 11) Phillips B, Szostak J, Titz B, Schlage WK, Guedj E, Leroy P, Vuillaume G, Martin F, Buettner A, Elamin A, Sewer A, Sierro N, Choukrallah MA, Schneider T, Ivanov NV, Teng C, Tung CK, Lim WT, Yeo YS, Vanscheeuwijck P, Peitsch MC, Hoeng J. A six-month systems toxicology inhalation/cessation study in ApoE-/- mice to investigate cardiovascular and respiratory exposure effects of modified risk tobacco products, CHTP 1.2 and THS 2.2, compared with conventional cigarettes. *Food Chem Toxicol.* 2019;126:113-141.
- 12) Que X, Hung MY, Yeang C, Gonen A, Prohaska TA, Sun X, Diehl C, Määttä A, Gaddis DE, Bowden K, Pattison J, MacDonald JG, Ylä-Herttuala S, Mellon PL, Hedrick CC, Ley K, Miller YI, Glass CK, Peterson KL, Binder CJ, Tsimikas S, Witztum JL. Oxidized phospholipids are proinflammatory and proatherogenic in hypercholesterolaemic mice. *Nature.* 2018 Jun;558(7709):301-306.
- F. 健康危険情報 なし
- G. 研究発表
1. 論文発表 なし
2. 学会発表 (1 件)  
米国毒性学会 (SOT) 年次総会、J. Nakamura J, Kawanishi M, Okada T, Yagi T, and Kunugita N. Blood Titers of Antibody against Complex Malondialdehyde-Acetaldehyde-Lysine Adducts as a Biomarker for the Very Early Stage of Metabolic Syndromes, Such as Atherosclerosis.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



↓ 37度, 7日間, pH7.4で反応後  
 HPLC-DAD法にて精製

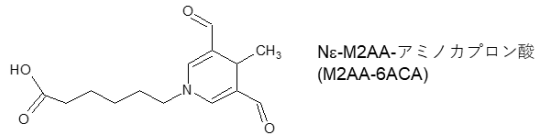
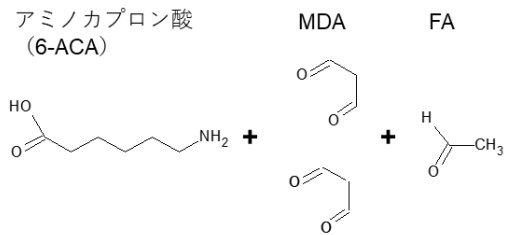


図1 M2AA-6ACAの合成



↓ 37度, 7日間, pH7.4で反応後  
 HPLC-DAD法にて精製

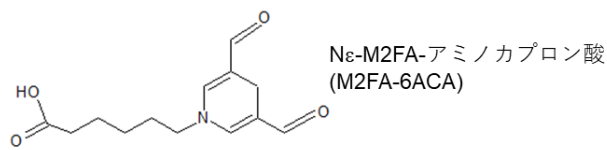


図2 M2FA-6ACAの合成

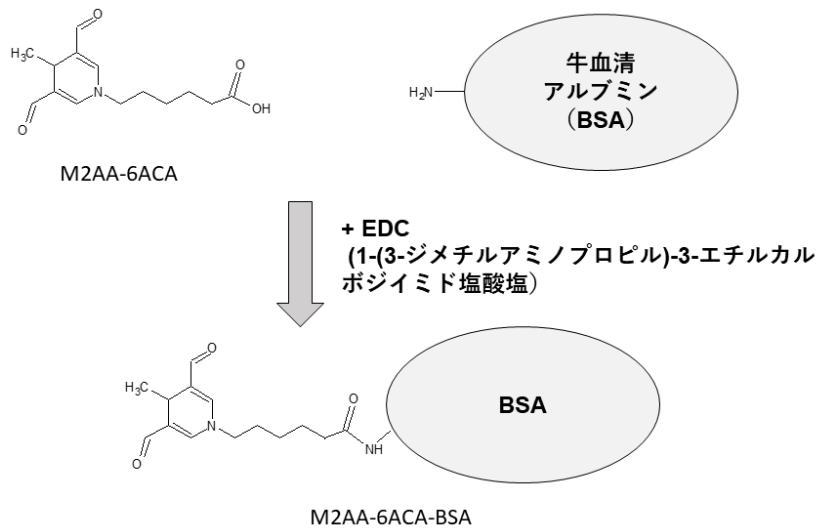


図 3 M2AA-6ACA と BSA の結合反応

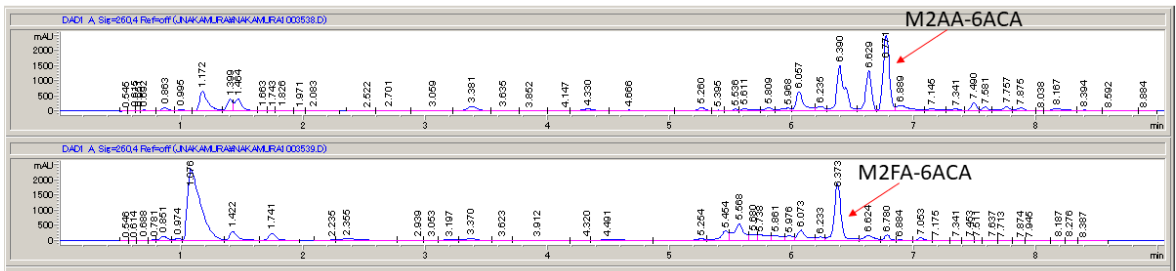


図4 M2AA-6ACAおよびM2FA-6ACAのHPLC-DADを用いた分離

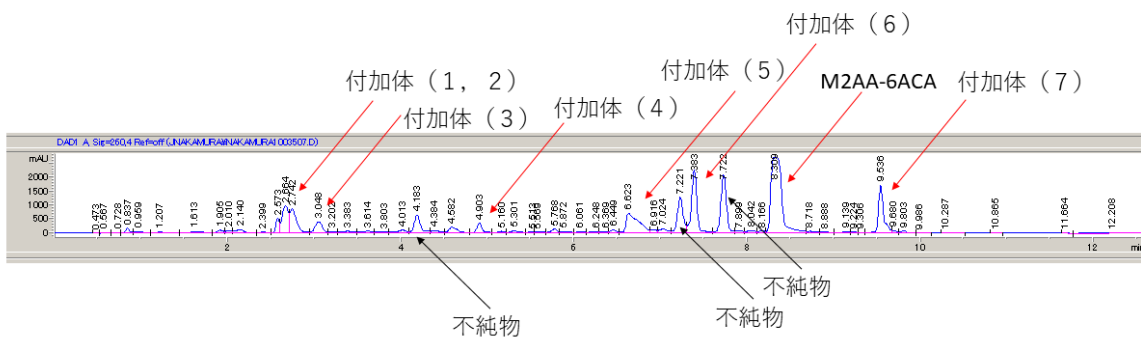


図5 AAとMDAと6ACAの反応物からの付加体の精製および部分精製

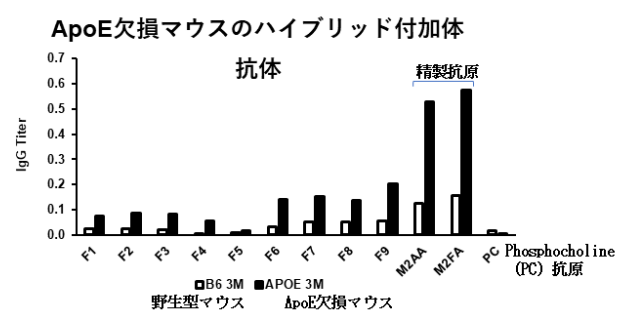
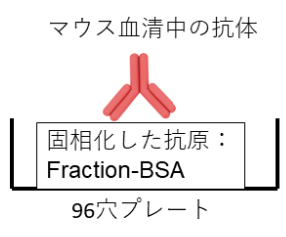
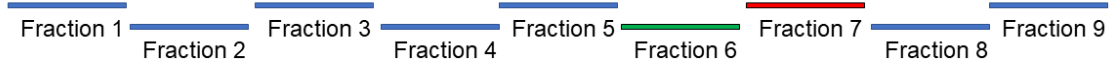
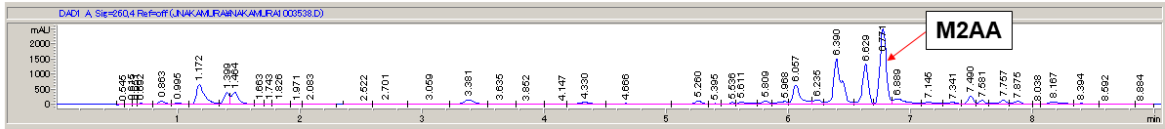


図 6 AAとMDAと6ACAの反応物の各分画に対するApoE欠損マウスの抗体価