

【総説】

炎症性疾患とオゾン - オゾンは動脈硬化症の発症原因か？ -

三浦敏明

日本医療・環境オゾン研究会会報, Vol.15, No.3, 54-58. (2008)

総説

炎症性疾患とオゾン

- オゾンは動脈硬化症の発症原因か? -

北海道大学大学院薬学研究院 三浦敏明

1. はじめに

前号では、抗体分子が触媒する一重項酸素と水の反応 (Antibody-catalyzed water oxidation pathway: ACWOP) でオゾンが生成し、これらが殺菌作用などの抗原処理に効果的に働いていることを示した Wentworth らの研究を紹介した¹⁾。この一連の研究は、抗体分子が抗原の認識のみならず、その処理にも関与するという「抗体分子の新しい機能の発見」として高く評価されているが、同時に、「生体内でもオゾンが生成し、オゾンも生体内活性酸素種の一つであること」を証明したものである。しかし、オゾンは極めて反応性の高い活性酸素種であり、局所的に生成するオゾンであっても抗原処理だけに選択的に働くとは考え難い。Wentworth さんも「オゾンの障害作用はホストにも及ぶ恐れがあり、ACWOP が *in vivo* で働くには何らかの調節機構が必要である」と考えているが、まだ合理的な説明はできていない。ところが、Wentworth さんのその後の研究で、オゾンの好ましくない作用も見えてきた。どうやら、炎症局所で発生するオゾンは炎症性疾患の発症原因あるいは憎悪因子としても作用しているようである。このようなオゾンの作用として、今回は動脈硬化症との関連について紹介する。

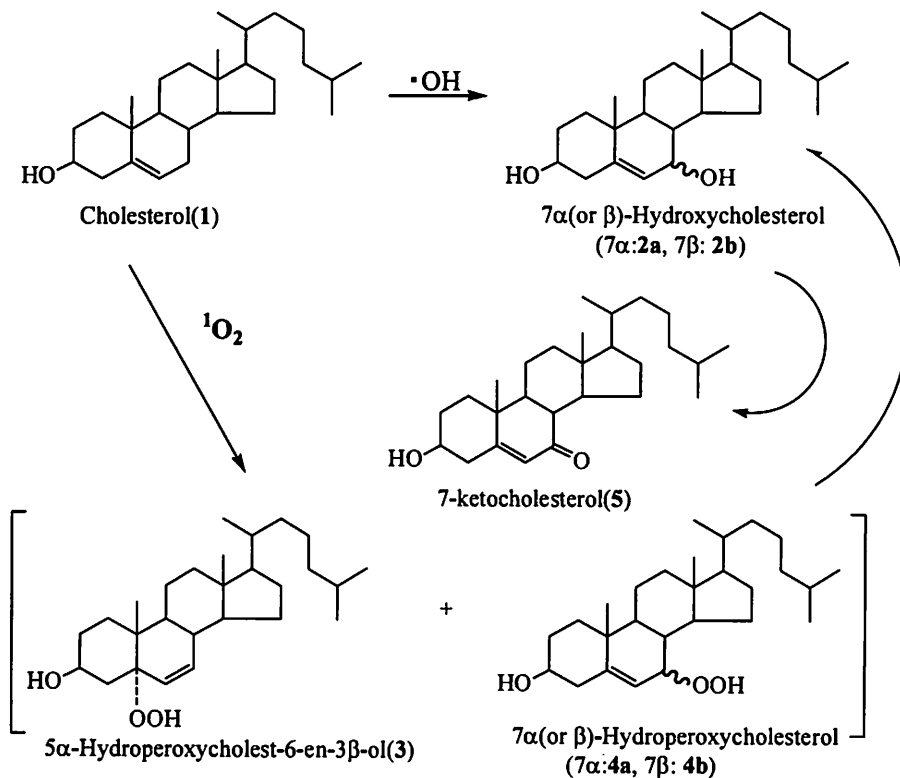


図1 水酸ラジカル、一重項酸素、自動酸化によるコレステロールの酸化

2. コレステロールとオゾンの反応

コレステロールは動脈硬化症と密接な関係にあり、コレステロールやその脂肪酸エステルあるいは低密度リポタンパク質 (LDL) 中のコレステロールの酸化と動脈硬化症との関連を追究した研究報告はすでに膨大な数にのぼっている。しかし、生体内でオゾンが生成するとは誰も予想していなかったため、動脈硬化症とコレステロールのオゾン酸化との関係に注目した研究はほとんどなかった。

動脈硬化症との関連で、これまでに検討されてきたコレステロールの酸化物は自動酸化 (空気酸化) や一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) あるいは水酸ラジカル ($\cdot\text{OH}$) などによる酸化生成物である。すなわち、図1においてコレ

ステロール (1) と水酸ラジカルの反応では 7 位の水酸化体 (2a,4b) が生成し、一重項酸素による反応では 5 位および 7 位のヒドロペルオキシド体 (3, 4a,2b) が生成する。ヒドロペルオキシド体は鉄イオンなどの金属イオンによって分解すると主に 7-ケト体 (5) に変化する。自動酸化では主に 7 位水酸化体 (2a,2b) や 7-ケト体 (5) が生じる。また、不飽和脂肪酸の脂質過酸化反応が進行する反応系にコレステロールが共存すると、7 位水酸化体 (2a,2b) や 7-ケト体 (5) の他に 5,6-エポキシ体 (6a,6b) も生成する (図 2)。5,6-エポキシ体は H_2O_2 /鉄イオン系でも 2a,2b や 5 とともに生成する。

一方、コレステロールとオゾンの反応も古くから知られていた。通常のアレフィンと同様に、コレステロールのオゾン酸化ではオゾニドを経て 5,6-二重結合の開裂が起こり、5,6-セコステロール (環が開裂したステロールの意味) (9) やその分子内アルドール縮合生成物 10 を与える (図 3)。このような二重結合の切断は上記の反応系では起こらないため、9 や 10 はオゾンに特異的な酸化生成物である。したがって、コレステロールも、前回紹介した Indigo carmine や 4-Vinylbenzoic acid と同様にオゾン特異的なプローブとして利用できる。

なお、アレフィンのオゾンによる反応は水やプロトン性溶媒が共存すると Hydroxy(or alkoxy)hydroperoxide を与える²⁾。たとえば、テトラヒドロフランと水の混合溶媒中でコレステロールをオゾン化すると、11 が主に生成する^{3, 4)}。11 は還元されると 9 に変化する。

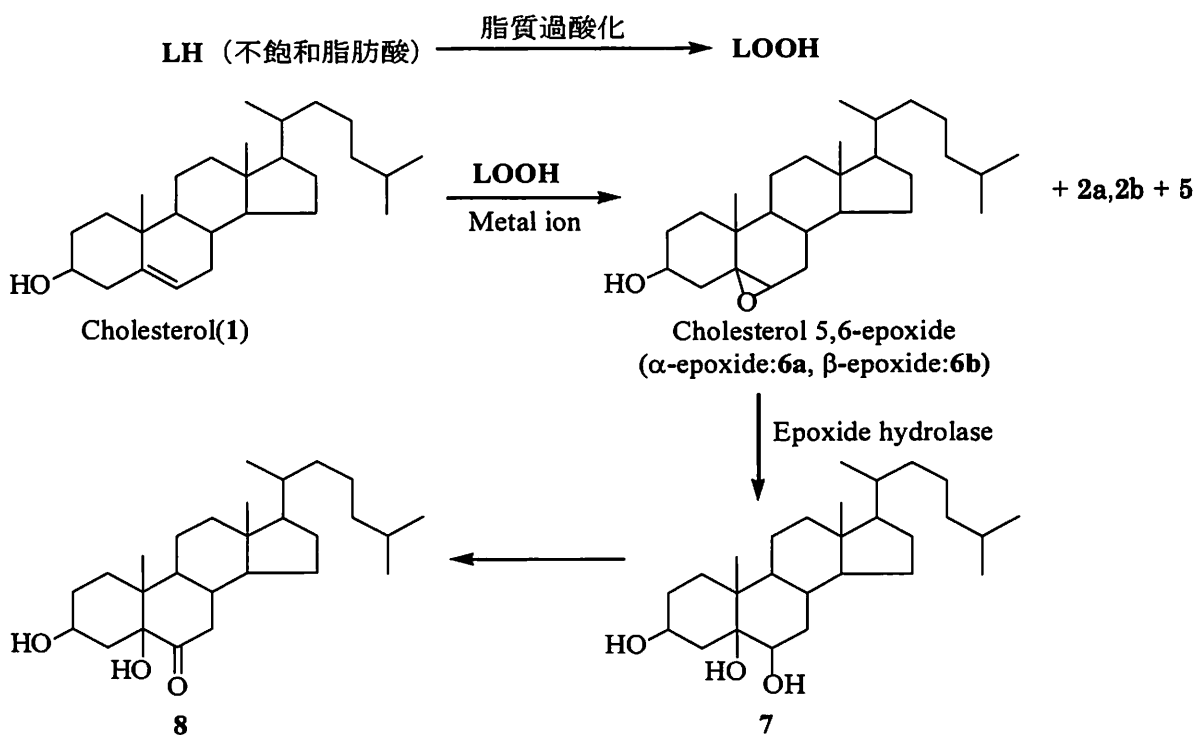


図 2 脂質過酸化系におけるコレステロールの酸化

ところで、筆者が 30 年ほど前に在外研究員として約 1 年間滞在したことのあるルイジアナ州立大学の Pryor 教授の研究室では光化学スモッグの原因物質であるオゾンや NO_x の生体影響を化学の立場で研究していた。彼らはいろいろな生体物質とオゾンの反応について研究していたが、そのうち、コレステロールのオゾン酸化反応についても検討することになった。彼らがコレステロールに注目したのは、肺表面を覆う脂質には、オゾンとの反応性が高いコレステロールが多量に含まれており、コレステロールのオゾン酸化反応生成物がヒトや動物のオゾン曝露のバイオマーカーになるのではないかと考えたからである。実際、1.3 ppm のオゾンに 12 時間曝露したラットの肺組織には 9 とともに、9 の分子内アルドール縮合で生成する 10 が検出されている^{5, 6)}。後に Wentworth らによって Atheronal A および B と命名された 9 および 10 の検出には 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (DNP) によるプレカラム誘導体化 HPLC 法が利用された。次項で述べる動脈病巣中の Atheronal A, B の検出には⁷⁾、この誘導体化法を利用した LC/MS 法が用いられている。

大気汚染物質でもあるオゾンによる呼吸器疾患の研究も多く、オゾン吸入が肺機能の低下や組織の炎症、気管支上皮細胞の壊死などを引き起こすことが知られている。しかし、反応性の高いオゾンがそのままの状態では細胞膜を通過するとは考えられないため、この障害作用を示すのは肺表面脂質とオゾンとの反応で生成する物

質であろうと考えられてきた。このような立場からも、肺表面脂質中のコレステロールとオゾンの反応が検討されてきた⁸⁾。

たとえば、Pulfer らはラット肺胞細胞の洗浄液から調製した肺表面脂質に 0.1 ~ 10 ppm のオゾンを曝露してコレステロール酸化物を分析し、オゾン分解物 (9 と 10) よりもコレステロール β -エポキシド (6b) が主生成物であることを見出している。同様に、ヒト気管支上皮細胞をオゾン曝露しても用量依存的に 6b が生成すること、6b をこの細胞とインキュベートすると、代謝物として少量の 7 とともに 8 が生成することを明らかにしている。また、6b はヒト気管支上皮細胞に対して細胞毒性を示すことも確認している⁸⁾。同グループはまた、0.5 ~ 3.0 ppm のオゾンに 6 時間曝露したマウスの気管支肺胞細胞の洗浄液とその洗浄した細胞および肺組織ホモジネート中にコレステロールのオゾン分解物 9 と 10 の他に、コレステロール β -エポキシド (6b) とその代謝物 8 を検出している⁹⁾。

Pulfer らはこの 2 つの論文を通して、オゾンによる呼吸器障害は、オゾンがイニシエートとする脂質過酸化反応 (ラジカル反応) で生成する 6a と、オゾン分解で生成する 9 および 10 によって引き起こされると考えている。

(注: Pryor らが用いた方法はカルボニル化合物の誘導体化法なので 6b は検出できず、Pulfer らは LC/MS を利用したため、6b が検出できた。)

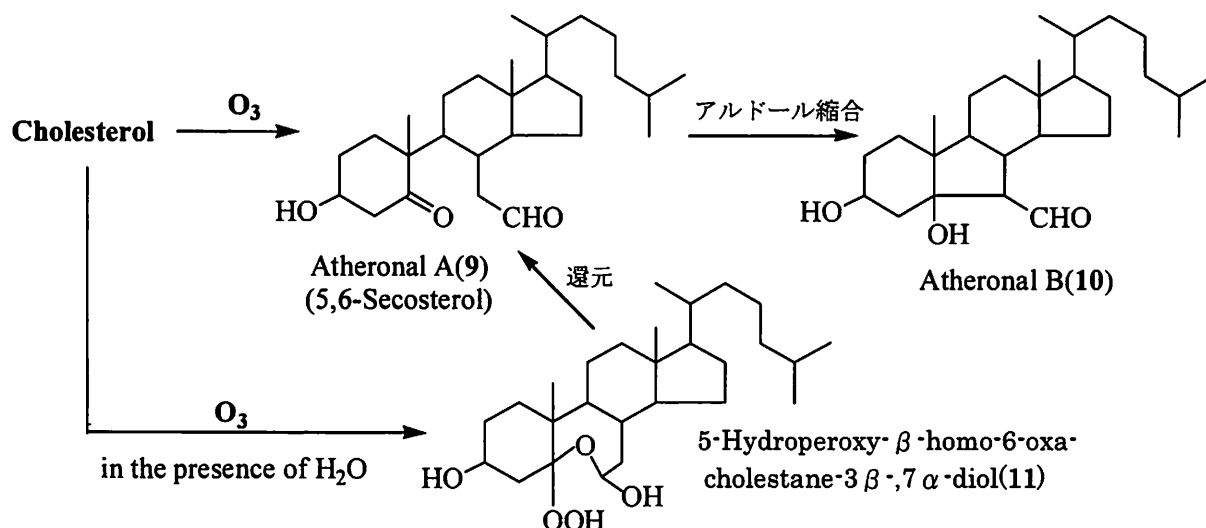


図3 コレステロールのオゾン分解生成物

3. オゾンと動脈硬化症

(1) Wentworthらの実験^{7, 10)}

最近の学説では好中球や抗体分子が関与する炎症反応が動脈硬化症の発症や進展に深く関わっていると考えられている。動脈硬化症に密接な関係のあるコレステロールはオゾンと容易に反応する。また、アテローム性動脈硬化症の動脈病巣も ACWOP に必要な因子がすべて備わっていることから、Wentworth らは ACWOP が動脈硬化症にも関係していると考えた。そこで、患者から切除した頸動脈硬化斑を試料とし、ACWOP の検出を試みた。すなわち、Indigo carmine の共存下で頸動脈硬化斑を PMA (ホルポールエステル的一种) で活性化すると、15 検体中 14 検体で Indigo carmine の脱色がみられ、その生成物である Isatin sulfonic acid が検出された (1.0 ~ 262.1 nmol/mg of plaque)。また、同様な実験を $H_2^{18}O$ 中で行うと、生成した Isatin sulfonic acid には ^{18}O が取り込まれたことから、PMA 刺激された動脈硬化斑では ACWOP が進行することを確認した。

動脈硬化斑ではコレステロールが主要な脂質であり、コレステロールはオゾンに特異的な 5,6-セコステロール (Atheronal-A, 9) を与える。そこで彼らは、頸動脈硬化斑の PMA 処理前後の生成物を HPLC-MS 法 (2,4-ジニトロフェニルヒドラジン [DNP] でプレラベル化) で分析した。その結果、PMA 処理前では 14 検体中 11 検体に 5,6-セコステロールの DNP 誘導体が検出され (6.8 ~ 61.3 pmol/mg of plaque)、PMA 処理後では 14 検体すべてに検出された (1.4 ~ 200.6 pmol/mg of plaque)。平均値で比較すると、5,6-セコステロール量は

PMA 処理で有意に増加した。また、これらの検体中には Atheronal-B(10) および 9 の脱水体 (3-位水酸基が脱水して 3-en-5-one 構造になったもの) の DNP 誘導体も検出された。このように、ACWOP とコレステロールのオゾン化の関連が示された⁷⁾。

重度の動脈硬化症の患者 8 名 (A 群) と、心血管系疾患以外の患者からランダムに選んだ患者 12 名 (B 群) の血漿を調べたところ、A 群の患者の 8 名中 6 名に Atheronal-B(10) が検出された (70 ~ 1690 nM) が、B 群で Atheronal-B が検出されたのは 1 名であった (Atheronal-A が検出されないのは血中のアミノ酸などで Atheronal-B に容易に変化するからである)。これらの結果は Atheronal-B が動脈硬化症のバイオマーカーとして利用できることも示している。

また、マクロファージ (J774.1) 細胞の存在下で低密度リポタンパク質 (LDL) を Atheronal-A とインキュベートすると、動脈硬化症に特徴的な泡沫細胞が生成・増加するとともに、アポリポタンパク質 B-100 の二次構造が時間とともに消失した。また、Atheronal-B も同様の作用を示した。

以上の事実は、アテローム性動脈硬化症の発症過程でオゾンが生成し、オゾンとコレステロールとの反応で生成する Atheronal-A および B が動脈硬化の進展に関わっていることを示している⁷⁾。

上述の結果を受けて、Wentworth らは他の炎症性疾患への ACWOP の関与についても検討を開始したが、彼らおよび他の研究グループによって Atheronal-A や B の作用に注目した研究も展開されている。たとえば、Wachtel らは Atheronal-B が生体膜のホスファチジルエタノールアミンと反応 (Shiff 塩基の生成) して膜にダメージを与えると報告している¹¹⁾。また、Wentworth らは、動脈硬化症の初期の病変発生にかかわるマクロファージの浸潤や単球のマクロファージへの分化あるいは細胞接着分子の発現促進などに対する Atheronal-A および B の影響を明らかにした¹⁰⁾。すなわち、マクロファージ (J774.1 または RAW264.7) 細胞の Atheronal, LDL, Atheronal 結合 LDL などの取り込みを蛍光標識 Atheronal を用いて調べ、Atheronal-B が速やかにマクロファージに取り込まれること、取り込まれた Atheronal-B は時間経過とともに核周辺に集まること、LDL とともにマクロファージを Atheronal-A や B とインキュベートすると、LDL 受容体である CD36 には影響はないが、修飾 LDL や酸化コレステロールの受容体である Scavenger 受容体クラス A の発現が有意に上昇すること、Atheronal-A と B はマクロファージの遊走性を用量依存的に誘導すること、Atheronal-A 結合 LDL を静脈内皮細胞とインキュベートすると接着分子 E-セレクトリンを用量依存的に誘導されること、Atheronal-B 結合 LDL がヒト単球細胞 (THP-1) のマクロファージへの分化を促すこと、などを明らかにした。これらの結果と、すでに明らかにしているマクロファージ毒としての Atheronal の作用を考え合わせ、Wentworth らは、Atheronal が、炎症部位で主要な役割を担っているマクロファージの浸潤、機能低下さらには破壊することによって、動脈硬化症の発症と進展に関わっていると考えている。

(2) Pengらの実験¹²⁾

動脈硬化症は好中球と抗体が関与する慢性炎症性疾患と考えられており、脂質の酸化的障害とそれに引き続く泡沫細胞の生成が発症の進展に関係している。また、過酸化水素は動脈硬化の発症リスクを高め、上述したように、オゾンによるコレステロールの酸化も組織マクロファージを泡沫化する。ACWOP では H_2O_2 と O_3 が生成することから、Peng らは、ヒト白血病単球 (THP-1 細胞) を用い、どちらが動脈硬化症の発症に主にかかわっているか調べ、以下のような結果を得ている。

- ① THP-1 細胞を PMA およびヒト IgG と 37℃ で 48 時間インキュベートしたところ、IgG 非存在下の場合に比較して H_2O_2 生成量は有意に増加した。また、 O_3 プローブである indigo carmine が共存すると、その顕著な脱色が認められたことから、この系では O_3 が生成していると考えられた。しかし、この脱色は 1O_2 でも起こるので、この結果だけから O_3 生成を断定することはできない。
- ② しかし、上記の indigo carmine の脱色の度合いは、 O_3 に対してより特異的なプローブである 4-vinylbenzoic acid の添加で有意に低下したことから、 O_3 生成が確認された。一方、indigo carmine 脱色の度合いはカタラーゼの添加によりわずかに上昇した。これは、 H_2O_2 による O_3 の分解がカタラーゼ添加により抑制されたためと考えられる。なお、PMA あるいは IgG を除くと、indigo carmine の脱色はみられなかった。
- ③ THP-1 細胞を PMA, IgG および LDL とインキュベートすると、対照に比べ、細胞内の総コレステロール、遊離およびエステル型コレステロール、過酸化脂質 (TBA 値) は有意に増加し、この系に 4-vinylbenzoic acid を添加すると、これらパラメータは明らかに低下したが、カタラーゼの添加はわずかな影響を示すの

みであった。

- ④ 上記の系では多数の泡沫細胞が生成し、その割合は 4-vinylbenzoic acid の添加で有意に低下したが、カタラーゼ添加の影響は軽度であった。

以上のように、抗体共存下、THP-1 細胞を PMA で活性化すると O_3 と H_2O_2 が生成して LDL が酸化的損傷を受けて細胞は泡沫化する。これらの作用は主に O_3 によることが示された。

4. おわりに

これまで予想もされていなかった抗体分子の新たな機能、すなわち ACWOP による抗原処理機能が明らかにされたことによって、オゾンも生体内で生成する活性酸素種の一つであることが証明されたが、生体内で生成するオゾンとはいえ、両面の作用を有することも明らかになってきた。すなわち、局所ではあれ、生体内で生成するオゾンが炎症性疾患の発症因子や増悪因子として働いているらしい。その例として、今回は動脈硬化症とオゾンの関係について紹介した。これまでもコレステロールと動脈硬化症の研究は多いが、そのほとんどが酸化コレステロールに注目したもので、オゾン分解生成物である Atheronal に注目した研究は始まったばかりである。この分野の研究は今後急速に進むものと予想される。また Atheronal と他の炎症性疾患との関連についての研究報告も増えてきた。次の機会には、このような内因性オゾンに関する研究の進捗状況を紹介したいと考えている。

文献

- 1) P.Wentworth, J.E.McDunn, A.D.Wentworth, C.Takeuchi, J.Nieva, T.Jones, C.Bautisa, J.M.Ruedi, A.Gutierrez, K.D.Janda, B.M.Babior, A.Eschenmoser and R.A.Lerner (2002) Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science*, **298**, 2195-2199.
- 2) L.L.Smith, E.L.Ezell and K.Jaworski, On the ozonization of cholesterol 3-acyl esters in protic media. *Steroids*, **61**: 401-406(1996).
- 3) M.K.Pulfer and R.C.Murphy (2004) Formation of biologically active oxysterols during ozonolysis of cholesterol present in lung surfactant. *J.Biol.Chem.*, **279**, 26331-26338.
- 4) M.K.Pulfer, K.Harrison and R.C.Murphy (2004) Direct electrospray tandem mass spectrometry of the unstable hydroperoxy bishemiacetal product derived from cholesterol ozonolysis. *J.Am.Soc.Mass.Spectrom.*, **15**, 194-202.
- 5) W.A.Pryor, K.Wang and E.Bermudez (1992) Cholesterol ozonation products as biomarkers for ozone exposure in rats. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **188**, 618-623.
- 6) K.Wang, E.Bermúdez and W.A.Pryor (1993) The ozonation of cholesterol: separation and identification of 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatization products of 3β -hydroxy-5-oxo-5,6- 3β -hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al. *Steroids*, **58**, 225-229.
- 7) P.Wentworth, J.Nieva, C.Takeuchi, R.Galve, A.D.Wentworth, R.B.Dilley, G.A.DeLaria, A.Saven, B.M.Babior, K.D.Janda, A.Eschenmoser and R.A.Lerner (2003) Evidence for ozone formation in human atherosclerotic arteries. *Science*, **302**, 1053-1056.
- 8) W.A.Pryor, G.L.Squadrito and M.Friedman (1995) The cascade mechanism to explain ozone toxicity: The role of lipid ozonation products. *Free Rad.Biol.Med.*, **19**, 935-941.
- 9) M.K.Pulfer, C.Taube, E.Gelfand and R.C.Murphy (2005) Ozone exposure in vivo and formation of biologically active oxysterols in the lung. *J.Pharmacol.Exper.Ther.*, **312**, 356-364.
- 10) C.Takeuchi, R.Galve, J.Nieva, D.P.Witter, A.D.Wentworth, R.P.Troseth, R.A.Lerner and P.Wentworth (2006) Proatherogenic effects of the cholesterol ozonolysis products, atheronal-A and atheronal-B. *Biochemistry*, **45**, 7162-7170.
- 11) E.Wachtel, D.Bach, R.F.Epand, A.Tishbee and R.M.Epand (2006) A product of ozonolysis of cholesterol alters the biophysical properties of phosphatidylethanolamine membranes. *Biochemistry*, **45**, 1345-1351.
- 12) K.J.Peng, Y.S.Huang, L.N.An, X.Q.Han, J.G.Zhang, Q.L.Wang, J.Sun and S.R.Wang (2006) Effect of ozone produced from antibody-catalyzed water oxidation on pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **38**, 417-422.