

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 529775

(P2003 - 529775A)

(43)公表日 平成15年10月7日 (2003.10.7)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-コード* (参考)
G 0 1 N 33/92	ZNA	G 0 1 N 33/92	ZNA Z 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	2 G 0 5 4
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	C 4 B 0 6 3
27/62		27/62	V
30/88		30/88	E

審査請求 未請求 予備審査請求 (全117数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 573042(P2001 - 573042)

(86)(22)出願日 平成13年3月29日(2001.3.29)

(85)翻訳文提出日 平成14年9月30日(2002.9.30)

(86)国際出願番号 PCT/US01/10592

(87)国際公開番号 W001/075170

(87)国際公開日 平成13年10月11日(2001.10.11)

(31)優先権主張番号 09/539,569

(32)優先日 平成12年3月31日(2000.3.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/541,468

(32)優先日 平成12年3月31日(2000.3.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
ティ オブ カリフォルニア
アメリカ合衆国 94607 - 5200 カリフォル
ニア州 オークランド トウエルフス フ
ロア フランクリン ストリート 1111

(72)発明者 フォージェルマン、 アラン、 エム .
アメリカ合衆国 90212 - 4107 カリフォル
ニア州 ビバリー ヒルズ ヒルグリーン
ドライブ 481

(74)代理人 弁理士 中島 淳 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高密度リポタンパク質の機能アッセイ

(57)【要約】

本発明はアテローム性硬化症またはアテローム性硬化症のリスクについて予後判定および/または診断となる新規なアッセイを提供する。高密度リポタンパク質 (H D L) またはその成分は脂質 (例えば L D L に存在する脂質) の酸化を防ぐことができ、さらにまた既に酸化された脂質を修復 (還元) し、それによってアテローム性硬化症のプラーク形成に付随しさらにそれに特徴的な炎症性反応を減少させることができることが見出された。さらにそのような防御を与えることができる H D L の能力は個体によって変動することも本発明の発見であった。したがって、 H D L の防御および/または修復活性のアッセイは、アテローム性硬化症およびそれに付随する病変のリスクについて非常に有効なアッセイを提供し、そのようなアッセイが本明細書で提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の工程を含む、哺乳類でアテローム性硬化症のリスクを判定する方法：

高密度リポタンパク質（HDL）を含む、前記哺乳類の生物学的サンプルを提供する工程；

前記高密度リポタンパク質を酸化リン脂質と接触させる工程；さらに

酸化または非酸化リン脂質の量の変化を測定する工程であって、ここで酸化リン脂質の量に変化が存在しない場合は、前記哺乳類にアテローム性硬化症のおそれがあることが示される。

【請求項2】 前記酸化リン脂質が、単球の反応を惹起する酸化リン脂質である請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記リン脂質が、以下から成る群から選択される脂質の酸化形である請求項2記載の方法：1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（Ox - PAPC）、1 - パルミトイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（POVPC）、1 - パルミトイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（PGPC）、1 - パルミトイル - 2 - エポキシイソプロスタン - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（PEIPC）、1 - ステアロイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（SAPC）、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（SOVPC）、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（SGPC）、1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタン - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（SEIPC）、1 - ステアロイル - 2 - アラキドニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン（Ox - SAPE）、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン（SOVPE）、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン（SGPE）、および1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタン - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン（SEIPE）。

【請求項4】 前記酸化リン脂質が低密度リポタンパク質の成分である請求項1記載の方法。

【請求項5】 前記検出工程が、質量分析法、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、蛍光測定法、放射性同位元素検出、抗体検出、および酸化リン脂質を示す標識に由来するシグナルの検出から成る群から選択される方法を含む請求項1記載の方法。

【請求項6】 前記検出工程が蛍光標識に由来するシグナルを検出することを含む請求項5記載の方法。

【請求項7】 前記標識が、2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート、ローダミン、cis-パリナリン酸、NBD、cis-パリナリン酸コレステリルエステル、およびジフェニルヘキサトリエンプロピオン酸から成る群から選択される請求項6記載の方法。

【請求項8】 前記検出工程が、高速液体クロマトグラフィー(FPLC)から成る群から選択されるクロマトグラフィーの方法を含む請求項5記載の方法。

【請求項9】 前記生物学的サンプルが全血である請求項1記載の方法。

【請求項10】 前記生物学的サンプルが分画血液である請求項1記載の方法。

【請求項11】 前記提供工程が血液サンプルからHDLを単離することを含む請求項1記載の方法。

【請求項12】 前記測定工程が、前記酸化リン脂質の量の変化を、酸化リン脂質レベルを減少させることが分かっているHDLと酸化リン脂質を接触させることによって生じた酸化リン脂質の量の変化と比較することを含む請求項1記載の方法。

【請求項13】 前記測定工程が、前記酸化リン脂質の量の変化を、酸化リン脂質のレベルを減少させる能力が不足していることが分かっているHDLと酸化リン脂質を接触させることによって生じた酸化リン脂質の量の変化と比較することを含む請求項1記載の方法。

【請求項14】 前記測定工程が、前記酸化リン脂質の量の変化を、HDL

非存在下で同じ実験を実施することによって生じた酸化リン脂質の量の変化と比較することを含む請求項1記載の方法。

【請求項15】 前記哺乳類がヒト、ヒト以外の霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ウシ、ウマ、ブタおよびウサギから成る群から選択される請求項1記載の方法。

【請求項16】 前記哺乳類が、HDL：LDL比が低いと診断されたヒトである請求項15記載の方法。

【請求項17】 前記哺乳類がアテローム性硬化症のおそれがあると診断されたヒトである請求項15記載の方法。

【請求項18】 以下の工程を含む、哺乳類でアテローム性硬化症のリスクを判定する方法：

高密度リポタンパク質（HDL）を含む、前記哺乳類の生物学的サンプルを提供する工程；

前記高密度リポタンパク質をリン脂質と接触させる工程；

前記リン脂質を酸化条件に付す工程；さらに

酸化または非酸化リン脂質の量の変化を測定する工程であって、ここで酸化または非酸化リン脂質の量の変化によって、前記哺乳類にアテローム性硬化症のおそれがあることが示される。

【請求項19】 前記リン脂質が低密度リポタンパク質（LDL）に存在するリン脂質である請求項18記載の方法。

【請求項20】 前記リン脂質が、酸化されたときに単球の反応を惹起するリン脂質である請求項18記載の方法。

【請求項21】 前記リン脂質が、以下から成る群から選択される請求項20記載の方法：1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（Ox - P A P C）、1 - パルミトイル - 2 - オキシバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（POVPC）、1 - パルミトイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（PGPC）、1 - パルミトイル - 2 - エポキシイソプロスタン - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（PEIPC）、1 - ステアロイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリ

セロ - 3 - ホスホリルコリン (S A P C)、 1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (S O V P C)、 1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (S G P C)、 1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタン - s n - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (S E I P C)、 1 - ステアロイル - 2 - アラキドニル - s n - グリセロ - 3 - ホスホリエタノールアミン (O x - S A P E)、 1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホリエタノールアミン (S O V P E)、 1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホリエタノールアミン (S G P E)、 および 1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタン - s n - グリセロ - 3 - ホスホリエタノールアミン (S E I P E)。

【請求項 2 2】 前記リン脂質を酸化条件に付す工程が、過酸化水素、 1 3 (S) - H P O D E、 1 5 (S) - H P E T E、 H P O D E、 H P E T E、 H O D E、 および H E T E から成る群から選択される薬剤と前記リン脂質を接触させることを含む請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 3】 前記検出工程が、質量分析法、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、蛍光測定法、放射性同位元素検出、抗体検出、および酸化リン脂質を示す標識に由来するシグナルの検出から成る群から選択される方法を含む請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 4】 前記検出工程が蛍光標識に由来するシグナルを検出することを含む請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 5】 前記標識が、 2 ' , 7 ' - ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート、ローダミン、 c i s - パリナリン酸、 N B D、 c i s - パリナリン酸コレステリルエステル、およびジフェニルヘキサトリエンプロピオン酸から成る群から選択される請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 2 6】 前記検出工程が、高速液体クロマトグラフィー (F P L C) から成る群から選択されるクロマトグラフィーの方法を含む請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 7】 前記生物学的サンプルが全血である請求項 1 8 記載の方法

。

【請求項28】 前記生物学的サンプルが分画血液である請求項18記載の方法。

【請求項29】 前記提供工程が血液サンプルからHDLを単離することを含む請求項18記載の方法。

【請求項30】 前記測定工程が、前記酸化または非酸化リン脂質の量の変化を、酸化リン脂質レベルを減少させることが分かっているHDLと酸化リン脂質を接触させることによって生じた酸化または非酸化リン脂質の量の変化と比較することを含む請求項18記載の方法。

【請求項31】 前記測定工程が、前記酸化または非酸化リン脂質の量の変化を、酸化リン脂質のレベルを減少させる能力が不足していることが分かっているHDLと酸化リン脂質を接触させることによって生じた酸化または非酸化リン脂質の量の変化と比較することを含む請求項18記載の方法。

【請求項32】 前記測定工程が、前記酸化または非酸化リン脂質の量の変化を、HDL非存在下で同じアッセイを実施することによって生じた酸化または非酸化リン脂質の量の変化と比較することを含む請求項18記載の方法。

【請求項33】 前記哺乳類がヒト、ヒト以外の霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ウシ、ウマ、ブタおよびウサギから成る群から選択される請求項18記載の方法。

【請求項34】 前記哺乳類が、HDL：LDL比が低いと診断されたヒトである請求項33記載の方法。

【請求項35】 前記哺乳類がアテローム性硬化症のおそれがあると診断されたヒトである請求項33記載の方法。

【請求項36】 1つもしくは2つ以上の酸化または非酸化リン脂質を入れた容器、および請求項1または18記載のアッセイ方法を記載した指示物を含む、哺乳類でアテローム性硬化症のリスクを判定するキット。

【請求項37】 さらに、酸化リン脂質を検出する標識を含む請求項36記載のキット。

【請求項38】 さらに酸化剤を含む請求項36記載のキット。

【請求項39】 前記酸化剤が、過酸化水素、13(S)-HPODE、15(S)-HPETE、HPODE、HPETE、HODE、およびHETEから成る群から選択される請求項36記載のキット。

【請求項40】 1つまたは2つ以上の酸化リン脂質を入れた容器を含み、さらに前記指示物が請求項1記載のアッセイ方法を記載している請求項36記載のキット。

【請求項41】 1つまたは2つ以上の非酸化リン脂質を入れた容器を含み、さらに前記指示物が請求項18記載のアッセイ方法を記載している請求項36記載のキット。

【請求項42】 収容領域を有する不活性な多孔質の基質、前記多孔質の基質と並列する輸送媒体、前記輸送媒体と並列する酸化脂質検出用試薬を含むテストメンブレンを含むアテローム性硬化症のリスクを判定する検査装置。

【請求項43】 前記テストメンブレン中に、さらに非酸化脂質および酸化剤を含む請求項42記載の装置。

【請求項44】 前記テストメンブレン中に、さらに酸化脂質を含む請求項42記載の装置。

【請求項45】 以下の工程を含む、慢性炎症性疾患のリスクを判定する方法：

高密度リポタンパク質(HDL)を含む、前記哺乳類の生物学的サンプルを提供する工程；

前記高密度リポタンパク質を酸化リン脂質と接触させる工程；さらに

酸化または非酸化リン脂質の量の変化を測定する工程であって、ここで酸化リン脂質の量に変化が存在しない場合は、前記哺乳類に慢性炎症性疾患のおそれがあることが示される。

【請求項46】 前記疾患が、慢性関節リウマチ、特発性肺線維症、および狼瘡から成る群から選択される請求項45記載の方法。

【請求項47】 前記酸化リン脂質が、単球の反応を惹起する酸化リン脂質である請求項45記載の方法。

【請求項48】 前記リン脂質が、以下から成る群から選択される脂質の酸

化形である請求項47記載の方法：1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(Ox-PAPC)、1-パルミトイル-2-オキソバレロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(POVPC)、1-パルミトイル-2-グルタロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(PGPC)、1-パルミトイル-2-エポキシイソプロスタン-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(PEIPC)、1-ステアロイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(SAPC)、1-ステアロイル-2-オキソバレロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(SOVPC)、1-ステアロイル-2-グルタロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(SGPC)、1-ステアロイル-2-エポキシイソプロスタン-sn-グリセロ-3-ホスホリルコリン(SEIPC)、1-ステアロイル-2-アラキドニル-sn-グリセロ-3-ホスホリルエタノールアミン(Ox-SAPE)、1-ステアロイル-2-オキソバレロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルエタノールアミン(SOVPE)、1-ステアロイル-2-グルタロイル-sn-グリセロ-3-ホスホリルエタノールアミン(SGPE)、および1-ステアロイル-2-エポキシイソプロスタン-sn-グリセロ-3-ホスホリルエタノールアミン(SEIPE)。

【請求項49】 前記酸化リン脂質が低密度リポタンパク質の成分である請求項45記載の方法。

【請求項50】 前記検出工程が、質量分析法、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、蛍光測定法、放射性同位元素検出、抗体検出、および酸化リン脂質を示す標識に由来するシグナルの検出から成る群から選択される方法を含む請求項45記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****関連出願の相互引用**

本出願は、USSN09/541,468（2000年3月31日出願）およびUSSN09/539,569（2000年3月31日出願）（両文献は参照により本明細書に含まれる）に対して優先権を主張する。

連邦政府支援研究開発により達成された発明の権利に関する記述

本発明は、米国立衛生研究所のグラント番号HL30568の支援を受けて達成された。アメリカ合衆国政府は本発明に関して一定の権利を有する。

本発明はアテローム性硬化症の診断に関する。特に本発明は改良アッセイを提供する。

【0002】**【従来技術】**

心脈管系疾患は、特に合衆国および西欧の国々において罹病および死亡の主要原因である。原因となるいくつかの因子は、心脈管系疾患に対する遺伝的素因、性別、ライフスタイルに関する因子（例えば喫煙および食事）、年齢、高血圧および高脂血症（高コレステロール血症を含む）を含む心脈管系疾患の発生と関連がある。これらの因子のいくつか、特に、高脂血症および高コレステロール血症（高い血中コレステロール濃度を示す）は、アテローム性硬化症と密接に関連する顕著な危険因子をもたらす。

コレステロールは、リポタンパク質粒子内の遊離エステル化コレステロールとして血中に存在する。前記リポタンパク質粒子は、カイロミクロン、超低密度リポタンパク質（VLDL）、低密度リポタンパク質（LDL）、および高密度リポタンパク質（HDL）として一般的に知られている。血中の総コレステロール濃度は、（1）消化管のコレステロール吸収（2）食物成分（例えば炭水化物、タンパク質、脂肪およびエタノール）からコレステロールの合成、および（3）組織（特に肝臓）による血液からコレステロールの除去、それに続くコレステロールの胆汁酸、ステロイドホルモンおよび胆汁コレステロールへの変換によって影響を受ける。

【0003】

血中コレステロール濃度の維持は、遺伝因子および環境因子の両因子の影響を受ける。遺伝因子には、個体のコレステロール生合成における速度制限酵素の濃度、肝臓の低密度リポタンパク質に対するレセプターの濃度、コレステロール胆汁酸変換のための速度制限酵素の濃度、リポタンパク質の合成および分泌の速度、および性別が含まれる。ヒトの血中コレステロール濃度のホメオスタシスに影響を与える環境因子には、食事構成、喫煙の程度、運動および種々の薬剤の使用が含まれる。食事性変動因子には、脂肪の量およびタイプ（飽和および多不飽和脂肪酸）、コレステロールの量、線維の量およびタイプ、並びにおそらくはビタミン（例えばビタミンCおよびD）およびミネラル（例えばカルシウム）の量が含まれる。

【0004】

上記で示したように、高い血中コレステロール濃度は、ヒトの脈管系疾患および冠状動脈心疾患の主要な危険因子の1つである。低密度リポタンパク質コレステロール（“LDL-コレステロール”）および総コレステロールの上昇は、冠状動脈心疾患リスクの増加に正比例する（Anderson et al.(1987) JAMA, 257:2176-80）。高レベルの総コレステロールおよびLDL-コレステロールはアテローム性硬化症および脈管系疾患発生の危険因子であるが、高密度リポタンパク質コレステロール（以下では“HDL-コレステロール”）の不足は、前記疾患発生の危険因子であることが最近になって認識された。いくつかの臨床試験が、アテローム性硬化症に対抗するHDL-コレステロールの防御的役割を支持している。ある研究では、女性では血中HDL-コレステロールが1mg/dL増加する毎に心脈管系疾患のリスクが3%減少することが示された（Gordon et al. (1989) Circulation, 79:8-15）。

【0005】

HDLが“防御的”リポタンパク質であり（Vega and Grundy (1996) Curr. Opin. Lipidology, 7:209-216）、さらにHDLの血漿レベルの増加がアテローム性硬化症の発生に対して直接的防御を提供することができると広く信じられている。多数の実験で、ヒトの冠状動脈心疾患（CHD）リスクおよび動物の実験的

アテローム性硬化症の重篤度の両方が、血清のHDLコレステロール(HDL-C)の濃度と反比例することが示された(Russ et al. (1951) Am. J. Med., 11:480-493; Gofman et al. (1996) Circulation, 34:679-697; Miller and Miller (1975) Lancet, 1:16-19; Gordon et al. (1989) Circulation, 79:8-15; Stampfer et al. (1991) N. Engl. J. Med., 325:373-381; Badimon et al. (1989) Lab. Invest., 60:455-461)。

HDL/LDL比が集団レベルでアテローム性硬化症および心臓疾患のリスクに対して良好なマーカーを提供することは明らかであるが、一方、HDLおよび/またはLDL測定値は、個体レベルでは良好な予後インジケータではないことが判明した。高いHDL:LDL比をもつ特定の個体で、重篤なアテローム性硬化症が観察されたが、一方、逆に非常に低いHDL:LDL比をもつ個体でアテローム性硬化症の形跡は特定されなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、アテローム性硬化症についての予後判定および/または診断、またはアテローム性硬化症のリスクを診断する新規なアッセイを提供する。本アッセイは、部分的には、HDLがプラーク形成を防止するメカニズムの解明に依拠している。特に、HDLまたはその成分は、脂質(例えばLDLに存在する脂質)の酸化を防止することができ、さらにまた既に酸化された脂質を修復することも可能で、それによって、アテローム性硬化症のプラーク形成に付随し、さらにプラーク形成に特徴的な炎症性反応を減少させることができるということが本発明の発見である。さらにまた、HDLが前記の防御をもたらす能力は個体により変動するというのも本発明の発見である。したがって、HDLの防御および/または修復活性のアッセイは、アテローム性硬化症およびそれに付随する病変のリスクに対する高度に有効なアッセイを提供する。

【0007】

さらに、脂質の酸化を防止し、または既に酸化された脂質を修復しそれによって炎症性反応を減少させるHDL成分は、一般に炎症性過程(例えば慢性関節リウマチ、特発性肺線維症、狼瘡および他の慢性炎症性疾患)に付随する他の病変

に対する感受性または重篤度を減少させることができると考えられる。

したがって、ある実施態様では、本発明は、動物のHDLが酸化リン脂質を修復（還元）する能力を判定することによって哺乳類のアテローム性硬化症（または他の炎症性疾患）についてのリスクを判定する方法を提供する。本方法は、好ましくは、哺乳類の生物学的サンプル（高密度リポタンパク質（HDL）またはその成分（例えばアポA-I、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼなど）を含む）を提供し、高密度リポタンパク質を酸化リン脂質と接触させ、さらに酸化または非酸化リン脂質の量の変化を測定することを含み、酸化リン脂質の量が変化しない場合は、前記哺乳類がアテローム性硬化症のおそれがあることが示される。

【0008】

前記酸化リン脂質は、好ましくは単球反応を惹起する酸化リン脂質である。特に好ましいリン脂質には、以下から成る群から選択される脂質の酸化形が含まれる（ただしこれらに限定されない）：1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (Ox - PAPC)、1 - パルミトイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (POVPC)、1 - パルミトイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (PGPC)、1 - パルミトイル - 2 - エポキシイソプロスタノール - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (PEIPC)、1 - ステアロイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (SAPC)、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (SOVPC)、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (SGPC)、1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタノール - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (SEIPC)、1 - ステアロイル - 2 - アラキドニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (Ox - SAPE)、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (SOVPE)、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (SGPE)、および1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタノール - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエ

タノールアミン (S E I P E) 。特に好ましい実施態様では、酸化リン脂質は低密度リポタンパク質 (に存在する) 成分である。

【 0 0 0 9 】

酸化リン脂質 (または還元リン脂質) は任意の都合のよい方法によって測定できる。そのような方法には、質量分析法、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、蛍光測定法、放射性同位元素検出、抗体検出、および酸化リン脂質を表示する標識由来のシグナルの検出が含まれるが、ただしこれらに限定されない。蛍光標識 (例えば 2 ' , 7 ' - ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート、ローダミン、 c i s - パリナリン酸、NBD、c i s - パリナリン酸コレステリルエステル、ジフェニルヘキサトリエンプロピオン酸) が特に好ましい。

ある種の実施態様では、前記検出は、高速液体クロマトグラフィー (FPLC) から成る群から選択されるクロマトグラフィー方法を含む。

好ましいサンプルにはHDLを含む液体サンプルまたは組織サンプルが含まれる。特に好ましいサンプルには全血または分画血液 (例えば血清) が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【 0 0 1 0 】

サンプルは直接用いてもよいが、また別の選択肢としてHDLをサンプルから単離してもよい。酸化リン脂質の変化および / または量は、対象集団の既知レベルと比較して、および / または種々のコントロールを参照して決定できる。そのようなコントロールには、酸化リン脂質レベルを減少させることが分かっているHDLと酸化リン脂質を接触させることによって生じる酸化リン脂質の量の変化 ; 酸化リン脂質レベルを減少させる能力が不足していることが分かっているHDLと酸化リン脂質を接触させることによって生じる酸化リン脂質の量の変化 ; およびHDL非存在下または低濃度で存在するHDLとともに実施した同じ実験で生じたリン脂質の変化が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

哺乳類はヒトまたはヒト以外の哺乳類であろう。特に好ましい哺乳類には、ヒト、ヒト以外の霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ウシ、ウマ、ブタ、およびウサギが含まれるが、ただしこれらに限定されない。前記ヒトは、HDL : LDL比が低いと診断されたか、および / またはアテローム性硬化症のおそれがあると診断

されたヒトであろう。

【0011】

別の実施態様では、本発明は、脂質を酸化から防御する哺乳類のHDLの能力を測定することによって前記哺乳類のアテローム性硬化症のリスクを判定する方法を提供する。本発明は、好ましくは、哺乳類の生物学的サンプル（高密度リポタンパク質（HDL）を含む）を提供し、前記高密度リポタンパク質をリン脂質と接触させ、前記リン脂質を酸化条件に付し、さらに酸化または非酸化リン脂質の量の変化を測定することを含み、酸化または非酸化リン脂質の量の変化によって、前記哺乳類がアテローム性硬化症のおそれがあることが示される。好ましい実施態様では、リン脂質は、低密度リポタンパク質（LDL）として提供される。特に好ましいリン脂質は、酸化されたとき単球の反応を惹起させるリン脂質である。そのようなリン脂質には以下が含まれるが、ただしこれらに限定されない：1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（Ox - PAPC）、1 - パルミトイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（POVPC）、1 - パルミトイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（PGPC）、1 - パルミトイル - 2 - エポキシイソプロスタノール - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（PEIPC）、1 - ステアロイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（SAPC）、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（SOVPC）、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（SGPC）、1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタノール - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン（SEIPC）、1 - ステアロイル - 2 - アラキドニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン（Ox - SAPE）、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン（SOVPE）、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン（SGPE）、および1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタノール - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン（SEIPE）。

【0012】

ある種の実施態様では、リン脂質は、例えば過酸化水素、13(S)-HPODE、15(S)-HPETE、HPODE、HPETE、HODE、およびHETEから成る群から選択される酸化剤とリン脂質を接触させることによって酸化条件に付される。酸化または還元リン脂質の検出は都合のよい任意の方法によって実施できるが、本明細書に記載する方法(例えば上記の方法)がもっとも好ましい。特に好ましい検出標識には、2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート、ローダミン、cis-パリナリン酸、NBD、cis-パリナリン酸コレステリルエステル、およびジフェニルヘキサトリエンプロピオン酸が含まれるが、ただしこれらに限定されない。好ましいサンプルは上記および本明細書で述べるものである。血液または分画血液サンプルの場合、本方法は、前記血液もしくは分画血液サンプルを直接使用することも、または血液もしくは分画血液からHDLを単離することも含むことができる。

【0013】

酸化リン脂質の変化および/または量は、対象集団の既知レベルと比較して、および/または種々のコントロールを参照して決定できる。そのようなコントロールには、酸化リン脂質レベルを減少させることが分かっているHDLと酸化リン脂質を接触させることによって生じる酸化リン脂質の量の変化；酸化リン脂質レベルを減少させる能力が不足していることが分かっているHDLと酸化リン脂質を接触させることによって生じる酸化リン脂質の量の変化；およびHDL非存在下または低濃度で存在するHDLとともに実施した同じ実験で得られたリン脂質の変化が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

本発明の方法にしたがってアッセイされる好ましい哺乳類は、ヒトおよびヒト以外の哺乳類、例えば上記に記載したようなものであろう。特に好ましい対象は、HDL:LDL比が低いと診断されたか、および/またはアテローム性硬化症のおそれがあると診断されたヒトである。

【0014】

さらに別の実施態様では、本発明は、哺乳類でアテローム性硬化症のリスクを判定するキットを提供する。本キットは、好ましくは1つもしくは2つ以上の酸化または非酸化リン脂質を入れた容器、および本明細書に記載するアッセイのた

めのプロトコルを提供する指示物を含む。キットは場合によって、酸化リン脂質検出用標識および/または、場合によって酸化剤（例えば、13(S)-HPODE、15(S)-HPETE、HPODE、HPETE、HODEおよびHETE）を含む。ある種の実施態様では、キットは、1つまたは2つ以上の酸化リン脂質を入れた容器、および酸化リン脂質を還元する能力についてHDLをアッセイするための指示物を含む。別の実施態様では、キットは、1つまたは2つ以上の非酸化（還元）リン脂質、および脂質（例えばLDL中の脂質）を酸化から防御する能力についてHDLをアッセイするための指示物を含む。

さらに別の実施態様では、本発明は、本発明のアッセイ用検査装置を提供する。本検査装置は、好ましくは、収容領域を有する不活性の多孔質の基質を含み、前記多孔質の基質は輸送媒体と並列してあり、前記輸送媒体は、酸化脂質検出用試薬を含むテストメンブレンと並列している。

【0015】

定義

“低密度リポタンパク質”または“LDL”という用語の定義は、当業者が一般的に使用するものと一致する。一般に、LDLは、超遠心によって単離されたとき、 $d = 1.019$ から $d = 1.063$ の密度範囲で見出される脂質-タンパク質複合体を指す。

“高密度リポタンパク質”または“HDL”という用語の定義は、当業者が一般的に使用するものと一致する。一般に、HDLは、超遠心によって単離されたとき、 $d = 1.063$ から $d = 1.21$ の密度範囲で見出される脂質-タンパク質複合体を指す。

“I群HDL”という用語は、（例えば低密度リポタンパク質中の）酸化脂質を還元するか、または酸化脂質を酸化剤による酸化から保護する高密度リポタンパク質またはその成分（例えばアポA-I、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドラーゼなど）を指す。

“II群HDL”という用語は、酸化から脂質を保護する、または酸化脂質を修復する（例えば還元する）活性が低いかまたは全く活性をもたないHDLを指す。

【0016】

“HDL成分”という用語は、高密度リポタンパク質(HDL)を構成する成分(例えば分子)を指す。酸化からリン脂質を保護するか、または修復する(例えば酸化脂質を還元する)HDLのアッセイには、そのような活性を示すHDLの成分(例えばアポA-I、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼなど)のアッセイが含まれる。

本明細書で用いられるように、“単球の反応”という用語は、アテローム性硬化症のプラーク形成に付随する“炎症性反応”に特徴的な単球の活性を指す。前記単球の反応は、血管壁の細胞(例えば血管内皮細胞)への単球の付着、および/または内皮下腔への走化性、および/または単球のマクロファージへの分化という特徴を有する。

【0017】

“変化が存在しない”という用語は、酸化リン脂質の量をいう場合は、検出可能な変化が存在しないこと、より好ましくは統計的に有意な変化(例えば85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、もっとも好ましくは少なくとも98%または99%の信頼レベルの変化)が存在しないことを指す。(例えばI群のHDLについて陽性結果が得られたとき)検出可能な変化が存在しないということは、酸化コレステロールレベルは変化するが、HDLの非存在下ほど、または他の陽性もしくは陰性コントロールと比較してもそれほど大きくはないアッセイもまた指すことができる。

【0018】

本明細書では以下の略語が使用される：PAPC：L-1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン；POVPC：1-パルミトイル-2-(5-オキソバレリル)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン；PGPC：1-パルミトイル-2-グルタルイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン；PEIPC：1-パルミトイル-2-(5,6-エポキシイソプロスタタンE₂)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン；ChC18：2：コレステリルリノレート；ChC18：2-OOH：コレステリルリノレートヒドロペルオキシド；DMPC：1,2-ジテトラデカノイル-rac-グリセロ-3-ホス

ホコリン；PON：パラオキシナーゼ；HPE：標準化高出力野；PAPC：L
 - 1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコ
 リン；POVPC：1 - パルミトイル - 2 - (5 - オキソバレリル) - sn - グ
 リセロ - 3 - ホスホリルコリン；PGPC：1 - パルミトイル - 2 - グルタル
 - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン；PEIPC：1 - パルミトイル - 2 - (5, 6 - エポキシイソプロスタン_{E₂}) - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン；
 PON：パラオキシナーゼ；HPE：標準化高出力野；BL/6：C57BL/
 6J；C3H：C3H/HeJ。

【0019】

【課題を解決する手段】

本発明は、アテローム性硬化症の予後判定および/または診断、またはアテローム性硬化症のリスクの診断である新規なアッセイを提供する。これらアッセイは、部分的には、HDLがプラーク形成を防止するメカニズムの解明によるものである。

新しく単離された低密度リポタンパク質(LDL)は脂質ヒドロペルオキシドを含むことが記載された(Sevanian et al.(1997) J. Lipid Res., 38:419-428)。LDLの酸化には、LDLが酸化される前に反応種とともにLDLが“播種される”ことが必要であると発明者らは考えている。酸化脂質の存在は、“炎症性反応”、すなわち単球結合、走化性、およびマクロファージへの分化の誘発をもたらす。この過程はアテローム性硬化症に特有のプラーク形成の基礎である。

【0020】

より具体的には、特定の理論に拘束されないが、軽度に酸化されたLDL中の生物学的に活性を有する脂質(m/z 594, 610および828)は、一続きの3つの工程で形成されると考えられる。第一の工程は、リノール酸およびアラキドン酸の代謝生成物並びにコレステリルヒドロペルオキシドとともにLDLが播種されることである。第二の工程は、内皮下腔中にLDLが捕捉され、この捕捉されたLDLに付近の動脈壁細胞に由来する別の反応性酸素種がデリバーされることを含む。第三の工程は、LDLリン脂質の非酵素的酸化であり、前記酸化は、“播種分子”(例えば13-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸[13(

S) - H P O D E] および 15 - ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸 [15 (S) - H P E T E]) の臨界閾値が LDL 内で達成されたときに生じる。これによって、単球の結合、走化性およびマクロファージへの分化を誘発する固有の酸化脂質 (m / z 594 , 610 , 828) が生じる。本発明者らは、“ 播種分子 ” が臨界レベルに達したとき、それらは、主要な LDL リン脂質、1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - s n - グリセロ - 3 - ホスホコリン (P A P C) の非酵素的酸化では過酸化水素よりも約 2 オーダー強力な作用を示し、生物学的に活性を示す 3 種の酸化リン脂質 (m / z 594 , 610 および 828) が生成されることを示す証拠を提示した (Watson et al. (1997) J. Biol. Chem., 272: 13597-13607; Watson et al. (1999) J. Biol. Chem., 274:24787-24798)。

【 0 0 2 1 】

また、本明細書に開示した実験は、血管造影によれば冠動脈疾患の証拠があるが、LDL - コレステロール、HDL - コレステロールおよびトリグリセリドレベルは正常であり、糖尿病ではなく、さらに低脂肪血症の投薬を受けていない、比較的稀な患者亜群から得られた HDL は、正常な HDL の場合とは対照的に、ヒト動脈壁細胞による酸化に対して LDL を保護せず、酸化 P A P C の生物学的活性を抑制できないことを示した。

したがって、我々は 2 組の対象者を特定した： 1) その HDL が酸化脂質の形成に対して防御することができ、および / またはこれら酸化脂質を減少させまたは排除し、したがってアテローム性硬化症の付随する炎症性過程に対して防御を示す対象者 (本明細書では I 群 HDL と称する) ; およびその HDL が酸化脂質の形成に対して防御することができず、および / またはこれら酸化脂質、特に酸化 LDL を減少または排除しない対象者 (本明細書では II 群 HDL と称する) 。また、これら 2 組の対象者間の HDL 活性における相違が、少なくとも部分的には、通常の HDL アッセイによる予想性の欠如の理由であると考えられる。これら 2 組の対象者 (すなわち I 群 HDL を有する対象者と II 群 HDL を有する対象者) 間を識別するアッセイは、重要な予防的および診断的価値を有する。

【 0 0 2 2 】

予防的アッセイとして、本発明の方法は、アテローム性硬化症に対して特に高

いリスクを有する個体の特定を可能にする。そのような特定に基づいて、前記対象者はより頻繁な検査、食事の調節、血圧のモニタリングおよび調節などを採用することができる。診断的アッセイとして、本発明の方法は、従来の検査方法（例えばHDL：LDL比など）を補って、通常の治療方式に抵抗性を示し、処方された治療を変更させる可能性がある対象者を特定する。したがって、例えば対象者がアテローム性硬化症の初期段階であると診断された場合は、本発明のアッセイを用いた陽性検査は、単なる食事／生活スタイルの変化よりは新たな別の薬剤治療を示唆することができる。

【0023】

本発明は、そのようなアッセイの2つの好ましい実施態様を提供する。一方の実施態様では、本アッセイは、“I群HDL”は実際に酸化リン脂質を減少および／または排除することができるという発見を利用する。したがって、その生物学的サンプルが高密度リポタンパク質（HDL）を含む前記哺乳類の生物学的サンプルを提供し、前記高密度リポタンパク質を酸化リン脂質と接触させ、さらに酸化または非酸化リン脂質の量の変化を測定することによってI群HDLは特定できる。ここで、酸化リン脂質の量に変化がない場合は、前記哺乳類はI群のHDLを有し、したがってアテローム性硬化症のリスクが低いことを示している。逆に、酸化リン脂質の顕著な変化が観察されない場合は、対象者はII群のHDLを有し、アテローム性硬化症のリスクが高い。

【0024】

第二の実施態様では、本発明のアッセイは、I群HDLはLDLおよび／またはLDLのリン脂質含有成分の酸化を防止することができるという発見を利用する。これらのアッセイは、好ましくは、そのサンプルが高密度リポタンパク質（HDL）を含む哺乳類の生物学的サンプルを提供し、前記高密度リポタンパク質をリン脂質（例えば単離リン脂質または低密度リポタンパク質）と接触させ、前記リン脂質を酸化条件に付し、さらに酸化または非酸化リン脂質の量の変化を測定することを含む。酸化または非酸化リン脂質の量の変化は、HDLがII群HDLであり、脂質の酸化を防止していないことを示す。したがって、対象哺乳類はアテローム性硬化症について高いリスクを有する。酸化または非酸化リン脂質

に実質的な変化が存在しない場合、前記HDLは脂質の酸化を防御することができ、対象者のアテローム性硬化症および付随する病変に対するリスクは低い。

【0025】

さらにまた、脂質の酸化を防止するか、または既に酸化された脂質を修復し、したがって炎症性反応を減少させるHDL成分は、一般に炎症性過程（例えば慢性関節リウマチ、特発性肺線維症、狼瘡および他の慢性炎症性疾患）に付随する他の病変に対する感受性またはその重篤度を減少させることができると考えられる。したがって、本発明のアッセイは、慢性炎症に特徴的な病変をもつ対象者のリスクの表示または測定を提供する。

本発明のアッセイが診断的 / 予後判定的価値をもつためには、具体的な病変の存在またはそのリスクについて決定的である必要はない。典型的には、例えば本発明によって提供されるようなアッセイの結果は、当業者には公知の他の疾患インジケータ / 危険因子を利用することができる種々の診断の1つとして用いられる。疾患の状態または予後の判定は、続いて生活スタイル、治療方式（例えばある種の予防薬を利用するか否かの決定など）に関する決定に情報を提供することができる。

本発明のアッセイは、迅速、簡単、安価であり、“家庭用テストキット”として容易に形態を整えることができる。

【0026】

I. HDL活性のアッセイ

上記で示したように、好ましい実施態様では、本発明のアッセイは1つまたは2つの好ましい様式をもつ。第一の様式では、HDLは、（例えば低密度リポタンパク質中の）酸化リン脂質のレベルを減少させる能力についてアッセイされる。第二の様式では、HDLは、酸化剤による酸化からリン脂質を保護する能力についてアッセイされる。

両アッセイ様式は、HDL（またはその成分）を含む生物学的サンプルを脂質（アッセイに応じて酸化または非酸化脂質）と接触させ、さらに酸化脂質または酸化されていない脂質の量を検出することを前提条件として必要とする。これらアッセイは、第一のアッセイでは、HDL（またはHDLの成分）を酸化脂質（

そのような脂質を含むLDL)と接触させ、一方、第二のアッセイでは、HDLを酸化されていない脂質と接触させ、さらに酸化剤と前記脂質を接触させてHDLによって得られる酸化の防御を評価する。

【0027】

A. HDLを含む生物学的サンプルの提供

好ましい実施態様では、アッセイは、問題の生物/対象者の生物学的サンプルを用いて実施される。本アッセイはヒトで極めて有用であるが、ただしそのように限定されるものではない。HDLサブタイプは本質的に全ての哺乳類に存在し、したがって本発明のアッセイは獣医学的利用についても同様に意図される。したがって、適切な対象者には、ヒト以外の霊長類、イヌ、ウマ、ネコ、ブタ、ヒツジ、ウサギなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

適切な生物学的サンプルには、高密度リポタンパク質(HDL)またはその成分を含む任意の生物学的材料(例えば体液、細胞、組織、器官など)が含まれる。特に好ましい組織は肝臓組織である。もっとも好ましい実施態様では、生物学的サンプルは血液である。本明細書で用いられるように、血液サンプルには全血サンプルまたは分画血液サンプル(例えば血清)が含まれる。前記サンプルは新鮮な血液でも保存血(例えば血液バンクの)でも、または分画血液でもよい。サンプルは、特に本発明のアッセイのために得られた血液サンプルでも、別の目的で得られ本発明のアッセイのために分取された血液サンプルでもよい。

【0028】

サンプルは、必要にしたがって適切な緩衝液で希釈によって予備処理するか、ヘパリンを添加するか、所望の場合は濃縮するか、または任意の多くの方法(超遠心、高速液体クロマトグラフィー(FPLC)、硫酸によるアポリポタンパク質B含有タンパク質の沈殿または他の方法を含むが、ただしこれらに限定されない)によって分画することができる。多様な緩衝物質、例えばリン酸塩、トリスなどを生理学的pHで利用する標準的な任意の水性緩衝溶液を用いることができる。

ある種の実施態様では、サンプルは直接アッセイされる。他の実施態様では、HDLはサンプルから単離される。HDLを単離する方法も同様に当業者には公

知である（例えば以下を参照されたい：米国特許4,883,765号；5,118,613号；5,215,886号など）。しかしながら、好ましい実施態様では、抗アポA - I抗体を固相支持体（例えばガラスまたは樹脂または磁性ビーズ）に結合させる。抗体を結合させた基質をウェルの血漿に添加し、さらに血漿を除き、アッセイ用試薬を添加してシグナルを検出する。

【0029】

B. HDLと脂質の接触

続いて、生物学的サンプルのHDLを脂質（上記のようにアッセイにしたがって酸化または非酸化脂質）または脂質の集合物（単離脂質またはLDLとして提供される）と接触させる。前記HDLは完全に単離されてあってもよいが、また完全な（例えば未分画）生物学的サンプルを前記脂質と接触させてもよい。部分的または完全にHDLを単離する方法は当業者には公知である（例えば以下の文献を参照されたい：Havel et al. (1955) J. Clin. Invest., 43:1345-1353; Navab et al. (1997) J. Clin. Invest., 99:2005-2019; Carroll & Rudel (1983) J. Lipid Res., 24:200-207; McNamara et al. (1994) Clin. Chem. 40:233-239; Grauhoft et al. (1986) Scandinavian J Clin. Lab. Invest. 46:715-721; Warnick et al. (1982) Clin. Chem. 28:1379-1388; Talameh et al. (1986) Clin. Chimica Acta 158:33-41)。

【0030】

好ましい実施態様では、接触させる脂質は、酸化させることができる1つまたは2つ以上の脂質（好ましくはリン脂質）を含む。好ましい脂質には以下が含まれる（ただしこれらに限定されない）：還元されている（酸化されていない）1 - パルミトイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (Ox - PAPC)、1 - パルミトイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (POVPC)、1 - パルミトイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (PGPC)、1 - パルミトイル - 2 - エポキシイソプロスタン - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (PEIPC)、1 - ステアロイル - 2 - アラキドノイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (SAPC)、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グ

リセロ - 3 - ホスホリルコリン (SOVPC)、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (SGPC)、1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタン - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルコリン (SEIPC)、1 - ステアロイル - 2 - アラキドニル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (Ox-SAPE)、1 - ステアロイル - 2 - オキソバレロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (SOVPE)、1 - ステアロイル - 2 - グルタロイル - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (SGPE)、および 1 - ステアロイル - 2 - エポキシイソプロスタン - sn - グリセロ - 3 - ホスホリルエタノールアミン (SEIPE)。

【0031】

これらの脂質は例示であって、これらに制限しようとするものではない。当業者は他の適切な脂質を容易に特定できよう。前記は、問題の脂質を酸化剤（例えば過酸化水素、HPODE、HPETE、HODE、HETEなど）と接触させ、生じた酸化脂質の量を測定することによって簡単に達成される。また別には、酸化脂質 / LDLは、アテローム性硬化症のプラーク形成に特徴的な反応（例えば単球付着、および / または走化性、および / または血管内皮細胞培養における分化の誘発）を誘発する能力についてアッセイすることができる。

脂質は“単離”または“部分的に単離”された脂質として提供してもよいが、また低密度リポタンパク質 (LDL) の形態で提供 / 接触させてもよい。LDLは生物から単離したLDLであってもよいが、また合成により集合 / 創出したLDLでもよい。脂質（例えばリン脂質）および / またはLDLを単離または合成する手段は当業者には周知である（例えば以下の文献を参照されたい：Havel et al. (1955) J. Clin. Invest., 43:1345-1353; Navab et al. (1997) J. Clin. Invest., 99:2005-2019; Carroll & Rudel (1983) J. Lipid Res., 24:200-207）。

【0032】

C) 酸化脂質のレベルの検出

上記に示したように、前記アッセイは、酸化脂質または逆に酸化されていない脂質の量を検出することを含む。好ましい実施態様では、アッセイの脂質含有量

は本質的に一定であるので、酸化脂質または酸化脂質の変化の測定は、酸化されていない脂質または酸化されていない脂質の量の変化の測定を提供し、逆の場合もまた然りである。

酸化脂質を測定する方法は当業者には周知である（例えば以下の文献を参照されたい：Vigo-Pelfrey et al. Membrane Lipid Oxidation, Volume I-III. CRC Press）。前記の方法には、質量分析法、吸収分光法（例えば234 nmのUV吸収を用いる）、液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、および種々の“酸化状態”感受性試薬の使用（例えば種々のレドックス反応において）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【0033】

酸化脂質（例えば過酸化脂質）を測定するこれまでに知られた方法には、ウィーラー法、チオシアン酸鉄法、チオバルビツル酸法などが含まれる。ウィーラー法（Wheeler (1932) Oil and Soap, 9:89-97）は、酸化脂質をヨウ化カリウムと反応させヨウ素を単離し、続いてこれをチオ硫酸ナトリウム標準液で定量するものである。チオシアン酸鉄法（Stine et al. (1954) J. Dairy Sci., 37:202）では、酸化された過酸化脂質をチオシアン酸アンモニウムおよび塩化第一鉄と混合し、生成したチオシアン酸鉄の青色を比色計で測定する。チオバルビツル酸法（Tappel & Zalkin (1959) Arch. Biochem. Biophys., 80:326）では、過酸化脂質を酸性条件下で加熱し、生じたマロンジアルデヒドをチオバルビツル酸と縮合させて赤色染料を生成し、続いてこれを比色計で測定する。

【0034】

別のアプローチでは、ペルオキシダーゼが過酸化脂質を分解すること、および、適切な水素供与体が反応系に存在する場合は、生成反応系は量の増した過酸化脂質により強く着色することが示された（例えば米国特許4,367,285号を参照）。したがって、ある実施態様では、本発明のアッセイは、ペルオキシダーゼおよび水素供与体を利用することができる。

多くのペルオキシダーゼが適切である。好ましい実施態様では、本発明で用いられるペルオキシダーゼは、好ましくはいずれの市販のセイヨウワサビペルオキシダーゼでもよい。

【0035】

好ましい実施態様では、本発明で用いられる水素供与体は、好ましくは酸化に際して発色するか、蛍光または発光を生じる酸化能力を有する公知の化合物のいずれでもよい。通常の着色、蛍光、発光試薬を用いることができる。使用することができる通常の着色試薬には、ガイヤコール、フェノールを含む4-アミノアンチピリン、N,N-ジメチルアニリンを含む4-アミノアンチピリン、ジメチルアニリンを含む3-メチル-2-ベンゾチアゾリノン、オルト-ジアニシジンなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。典型的に有用な蛍光試薬には、ホモバニリン酸、p-ヒドロキシフェニル酢酸などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。適切な発光試薬にはルミノールなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。これらの試薬の全ては単に本発明の水素供与体の例示として記載され、これらに限定しようとするものではない。

【0036】

使用される水素供与体の量は、好ましくはテストサンプル中に含まれる過酸化脂質1モルに対して少なくとも等モル濃度、好ましくは2モル未満である。前記の量は、サンプルのサイズおよびサンプル中の過酸化脂質含有量にしたがって変動可能である。

使用することができる適切な反応媒体には、ジメチルグルタレート-水酸化ナトリウム溶液、リン酸緩衝液、およびトリス-塩酸緩衝液（通常約pH5から約pH9）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【0037】

典型的な（高容量）アッセイ（3mL）は、50mMのジメチルグルタレート-水酸化ナトリウム緩衝液（pH6.0）を含み、前記緩衝液は、0.03%（w/w）の4-アミノアンチピリン、0.04%（v/v）のN,N-ジメチルアニリンおよび4.5ユニットのペルオキシダーゼを含む。典型的な測定では、アッセイ溶液を37℃に予備加温し、過酸化脂質を含むテストサンプル50μLを添加する。混合物を37℃で15分インキュベートし、生じた色の濃さを分光光度計により例えば565nmの波長で測定する。サンプル中の過酸化脂質の量は吸光値から計算する。

反応時のpH、反応時間、測定波長などの因子は、使用される試薬にしたがって変動可能である。適切な条件は環境にしたがって選択できる。

【0038】

酸化脂質についてのまた別の種類のアッセイは米国特許4,900,680号に開示されている。前記のアプローチでは、酸化脂質（例えばヒドロペルオキシド）を、2価の陽イオンを生じる遷移金属の塩または水酸化物、2価の遷移金属の複合体、ヘム、ヘムペプチド、ヘムタンパク質、またはヘム酵素と反応させる。生じた活性酸素および酸素ラジカルは発光物質と反応し、この反応によって放出された光を光学的に測定する。脂質ヒドロペルオキシドに作用して活性酸素種（例えば活性酸素または酸素ラジカル）を生じる触媒の例は、2価の陽イオンを生じる遷移金属塩（例えば塩化第一鉄、硫酸第一鉄、フェリシアン化カリウム、これらは各々 Fe^{2+} を生じる；塩化第一マンガン、硫酸第一マンガン、これらは各々 Mn^{2+} を生じる；または塩化コバルト、硫酸コバルト、これらの各々は Co^{2+} を生じる）；上記に述べた遷移金属の水酸化物；2価の遷移金属の複合体（例えば鉄（II）-ポルフィリン複合体）；ヘムタンパク質（例えば、チトクロームC、ヘモグロビン、またはミオグロビン）；ヘムペプチド（例えばヘムタンパク質を例えばキモトリプシンまたはトリプシンのようなプロテアーゼで分解することによって得られる化合物）；およびヘム酵素（例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼまたはプロスタグランジンペルオキシダーゼ）である。

【0039】

好ましい触媒化合物には、ヘムタンパク質、ヘムペプチドまたはヘム酵素が含まれるが、ただしこれらに限定されない。もっとも普通には、ヘムタンパク質、例えばチトクロームCが操作の容易さから使用される。触媒化合物の濃度は、好ましくは約 $0.1 \mu g/mL$ から約 $1000 \mu g/mL$ の範囲で、通常は約 $1 \mu g/mL$ から約 $200 \mu g/mL$ の範囲内に入る。例えば、もっとも良好な発光効率は、濃度がチトクロームCについては約 $10 \mu g/mL$ 、チトクロームCヘムペプチドについては約 $120 \mu g/mL$ 、さらにセイヨウワサビペルオキシダーゼについては約 $10 \mu g/mL$ であるときに得られる。

【0040】

発光物質は特定のものに限定されないが、ただし前記物質は活性酸素または酸素ラジカルと反応して光を放出することを条件とする。前記化合物の例には、ポリヒドロキシフェノール（例えばピロガロール、パープロガリンなど）、フタラジン誘導体（例えばルミノール、イソルミノールなど）、インドール誘導体（例えばインドール酢酸、スカトール、トリプトファンなど）、チアゾリジン誘導体（例えばキプリジナセア = ルシフェリン (Cypridinacea luciferin)、ロフィンなど）、アクリジン誘導体（例えばルシゲニン）、シュウ酸誘導体（例えばビストリクロロフェニルオキサレート）、および1,2-ジオキサ-4,5-アジン誘導体が含まれるが、ただしこれらに限定されない。発光物質の濃度は使用される化合物により変動する。濃度は、好ましくは0.1 µg/mLまたはそれ以上である。ルミノールを用いるときは、その濃度はもっとも好ましくは1 µg/mLである。

【0041】

測定は、好ましくは、発光試薬（例えばヘムタンパク質およびルミノール）の弱塩基溶液中で実施される。好ましいpH値は約pH9から約pH10の範囲である。多くの緩衝液が適切である。好ましい緩衝液は、ホウ酸緩衝液 (H_3BO_3 --KOH)、炭酸緩衝液 (Na_2CO_3 -- $NaHCO_3$)、グリシン緩衝液 (NH_2CH_2COOH --NaOH) などである。ホウ酸緩衝液がもっとも好ましい。

発光試薬溶液に溶解した酸素が微量の酸化脂質の分析に緩衝するのを防ぐために、発光試薬溶液は、望ましくは不活性ガスでパージして酸素を除去し、安定な測定値を得る。不活性ガスの例は窒素ガスおよびアルゴンガスである。

サンプル中の酸化脂質の濃度は検量線から算出する。検量線は標準的な方法によって、例えばメチルリノレートヒドロペルオキシド、アラキドン酸ヒドロペルオキシド、ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド、ホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド、およびトリアシルグリセロールヒドロペルオキシドから選択される物質を用いて作製できる。

【0042】

好ましい実施態様では、本発明のアッセイは、その蛍光が酸化状態により変化する蛍光物質を利用する。そのような蛍光物質は当業者には周知で、2',7'

- ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート、ローダミン、*cis*-パリナリン酸、NBD、*cis*-パリナリン酸コレステリルエステル、ジフェニルヘキサトリエンプロピオン酸などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。そのようなインジケータの使用は実施例で説明する。

酸化脂質を検出/定量する前述の方法は例示であって、前述の方法に限定しようとするものではないことは理解されよう。酸化脂質をアッセイする多数の他の方法が当業者に知られており、本出願の範囲内に含まれる。

【0043】

D) 脂質と酸化剤の接触

上記で述べた“第二の”アッセイ様式では、(単離されたまたはLDL中に存在する)脂質または脂質集合物を酸化剤と接触させ、前記脂質を酸化から保護する能力についてHDLをアッセイする。本質的にリン脂質を酸化することができるいずれの薬剤も本発明での使用に適している。そのような薬剤には種々の過酸化物が含まれるが、ただしこれらに限定されず、特に好ましい実施態様では、酸化剤は過酸化水素、13(S)-HPODE、15(S)-HPETE、HPODE(ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸)、HPETE(ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸)、HODE、HETEなどである。

他の酸化剤の適切性は容易に決定できる。これは、LDLおよび/または問題の単離リン脂質を酸化剤と接触させ、生成された酸化脂質の量を測定することによって容易に実施できる。また別には、酸化脂質/LDLは、アテローム性硬化症のプラーク形成に特徴的な反応(例えば単球の付着の誘発、および/または単球の走化性の誘発、および/または血管内皮細胞培養における分化の誘発)を誘発するその能力についてアッセイしてもよい。

【0044】

E) アッセイの判定

本アッセイは、そのアッセイにおいてHDLが酸化リン脂質の量を減少させるか、または脂質が酸化されるのを防ぐ場合には、“I群”HDLについて陽性と判定する(“II群”HDLについては陰性)。逆に、本アッセイは、そのアッセイにおいてHDLが酸化リン脂質の量を減少させないか、またはアッセイで脂

質が酸化されるのを防ぐことができない場合、“I群”HDLについて陰性と判定する(“II群”HDLについては陽性)。

最初の実験が、いくつかのHDLは防御を提供し他のものはそうではないことを示した場合、集団レベルで反応の分布が二項性であることは予測できないし必要でもない。それとは反対に、HDLによる脂質の酸化に対する防御の程度または酸化脂質の修復の程度は、対象者における遺伝、性別、生理的成熟度、人種、(女性については妊娠の段階)、健康状態、免疫能力のようなパラメータにより変動することは予想される。

【0045】

本発明のアッセイが商業的に使用されることを促進するために、HDLによって得られる防御に対するこれらの(および他の)パラメータの影響を日常的に決定することができる。したがって、例えば、HDLによる防御は、他の手段によってアテローム性硬化症のリスクが非常に低いと診断された老齢者、およびアテローム性硬化症が進行していると決定された老齢者でアッセイできる。これは、老齢者における“防御性HDL”の活性または“非防御性HDL”における活性の欠如の基準を提供し、若年者のHDL活性との比較を可能にする。これらの他のパラメータの影響も同様に決定可能で、そのような実験から、防御性および非防御性HDLについての集団のベースラインの“活性”レベルが決定できる。

【0046】

そのような測定は、非常に重要な“絶対的”基準をもたらす必要はないことが強調される。相対的なリスク評価が極めて有用である。なぜならば、アテローム性硬化症のリスクが増しているという指摘は比較的小さな投資(例えば運動の増加、食事の変更、追跡検査の増加など)を呼びかけることができるので、擬陽性(すなわち個体のアテローム性硬化症のリスクがより高いという指摘)によるダウンサイドリスクは比較的軽微ではない。同様に、アテローム性硬化症について他の診断因子/危険因子(例えばHDL:LDL比、血圧追跡検査、行動因子および一般的健康因子など)が存在する場合、擬陰性(すなわち個体のHDLは脂質酸化に対して防御を提供するという指摘)のダウンサイドリスクもまた比較的軽微である。

【0047】

アッセイは、対応する集団に対して決定したレベル（例えば、上記で述べた種々のパラメータについて修正されている）とアッセイ結果を比較することによって、および/または陽性または陰性コントロールとの直接比較によって、陽性、陰性または連続体（例えば、個々のリスクレベルが非常に低いリスクから低いリスクへ、中等度のリスク高いリスク非常に高いリスクへと変化する）上の1つの判定に割り当てられる。したがって、例えば、脂質を対象者のHDLと接触させることによって生じた酸化脂質の変化についてのアッセイの結果は、HDL非存在下で（または低濃度のHDLとともに）実施した“コントロール”アッセイと比較することができる。この例では、HDLの非存在下でのアッセイと比較してHDLの存在下での酸化脂質の減少は、HDLが酸化脂質の保護/修復を提供したことを示している（すなわち、“I群HDL”について陽性）。

【0048】

同様に、HDLが酸化剤から脂質を保護する能力についてアッセイされるアッセイでは、アッセイ結果は、HDLを欠いている（または低濃度でHDLが存在している）ということ以外は同一のコントロールアッセイと比較できる。HDL非存在下で、または低濃度HDL存在下でアッセイがより多くの酸化脂質を示す場合は、このアッセイはI群HDLについて陽性と判定される。

テストアッセイとコントロールアッセイとの間に相違が検出される場合、より好ましくは相違が統計的に有意である場合は（例えば、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、もっとも好ましくは少なくとも98%または99%の信頼レベルで）、上記で述べたようにこのアッセイは陽性と判定される。

【0049】

II. アッセイ様式

本発明のアッセイは、手近な個々のニーズに応じてほとんど無制限に多様な様式で実施できる。前記の様式には、慣習的な“湿式化学反応”（例えば実験室で実施される）、高処理アッセイ様式（例えば病理検査室または他の臨床検査室で実施される）および“検査片”様式（例えば家庭または医院で実施される）が含

まれるが、ただしこれらに限定されない。

A) 慣習的湿式化学反応

本発明のアッセイは慣習的な“湿式化学反応”のアプローチを用いて実施できる。基本的には、これは、それらが研究室で実施されるようにアッセイを実施することを含む。典型的には、アッセイは液相（例えば、必要に応じて反応混合物に添加された適切な試薬（例えば脂質、酸化脂質、酸化剤など）を含む緩衝液中）で実施される。酸化脂質の濃度は、標準的な方法および装置を用いてアッセイされる。

【0050】

B) 高処理アッセイ様式

集団の調査が実施される場合は、および/または臨床/商業的検査室で調査が実施される場合（このような場合には数十、数百、または数千のサンプルが（時には1日で）処理される）、高処理様式を用いてアッセイを実施することがしばしば好ましい。高処理アッセイ様式は高度な設備を有するアッセイで、サンプルの処理、アッセイの実施、アッセイデータの収集および（しばしば）結果の分析において人間の介入を最小限にする。好ましい実施態様では、高処理システムは、連続した“フロースルー”システムとして、および/または多数の並列システムとしてデザインされる。

【0051】

フロースルーシステムは、典型的には連続した液体の流れが提供され、この流れに沿って種々の試薬/操作が種々の場所に配置される。したがって、例えば、血液サンプルは受容領域に適用され（ここでサンプルは緩衝液と混合される）、さらに流れは、大きな球状物質（例えば細胞）を除去する細胞分類装置に導かれ、得られた液体はさらに種々の試薬を通過する（例えば、その場合試薬は“インプットステーション”で添加されるか、または単純に液体が流れる導管の壁に試薬は固定されてある）。したがって、例えばサンプルは、連続して脂質（例えばLDLとして提供される）、続いて酸化剤、酸化検出用薬剤と一緒にされ、さらに検出装置へ送られ、ここでシグナル（例えば比色シグナルまたは蛍光シグナル）が読み取られ、酸化脂質が測定される。

【0052】

多数の並列的高処理システムでは、典型的には、サンプルは、コンピューター制御ロボットがサンプル処理、試薬操作およびデータ収集を調節する、マイクロタイタープレート様式（例えば96ウェルプレート、1536ウェルプレートなど）で処理される。そのようなアッセイでは、種々の試薬は全て溶液として提供できる。また別の選択肢として、いくつかまたは全ての試薬（例えば酸化脂質、インジケーター、酸化剤など）は、マイクロタイタープレートの壁に固定された状態で提供することができる。

【0053】

本発明のアッセイに容易に適合させることができる高処理スクリーニングは、市販されている（例えば、Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MAなど）。これらのシステムは、典型的には全操作（全てのサンプルおよび試薬のピペット分注、液体の分散、時間設定インキュベーション、およびアッセイに適した検出装置での最終的なマイクロプレートの読み取りを含む）が自動化されている。これらの組み立て可能なシステムは、高処理性を有し始動が迅速であると同時に融通性が高くさらに個々のニーズへの対応性を提供する。そのようなシステムの製造業者は、種々の高処理のための詳細なプロトコルを提供している。したがって、例えばザイマーク社（Zymark Corp.）は、技術会報を提供し、これには、遺伝子転写の調節、リガンド結合などの調節を検出するスクリーニング系が記載されている。

【0054】

C) “検査片”アッセイ様式

別の好ましい実施態様では、本発明のアッセイは、“検査ウェル”または“検査片”様式で提供される。“検査ウェル”または“検査片”様式では、生物学的サンプルはウェルに入れるか、または細片上の受容ゾーンに適用され、続いて蛍光または比色用インジケーターが生じる。この場合、インジケーターは対象者のHDLまたはその成分によって達成できる保護または修復の測定値を提供する。

血液検査のための種々の物理的アレンジメントを開示した多くの特許が発行さ

れている。これらの特許には、血漿検査と同様に血液の側面移動または水平移動を含むシステムが含まれている。例えば、米国特許4,876,067号、4,861,712号、4,839,297号および4,786,603号は、グラスファイバーなどを用いる血液から血漿を単離することを含む体液成分の分析的測定用検査キャリアーおよび方法を開示している。上記の特許は全て、使用中に検査パッドまたは検査パッドの一部のある種の回転を必要とするシステムを開示している。米国特許4,816,224号は、全血から血漿または血清を分離し、さらにその後の反応のために全血から血漿を除去するために特有の容積および吸収を有するグラスファイバーを用いて血清を分析する装置を開示している。同様に、米国特許4,857,453号は、毛細管作用および封入液体試薬（目に見えるインジケータを含む）を含む検査片を用いる装置を開示している。米国特許4,906,439号は、導管または溝による側面移動で液体のデリバリーを実施する、体液サンプルの効率的で正確な分析を実施する診断用装置を開示している。

【0055】

上記の特許（これらは血液検査用システムの種々のタイプを示す従来技術の代表である）の他に、最近発行された特許は、HDLコレステロールの測定について特有の化学反応を目的としている。したがって、米国特許4,851,335号および4,892,815号（ともにKerscher et al）は、HDLコレステロールの測定について固有のタイプの処理および試薬を開示している。

米国特許5,135,716号は、全血から血漿を得て、血漿のHDLコレステロールレベルを決定することによってHDLコレステロールを決定する装置を開示している。

【0056】

本発明は、血漿分離を含むサンプル処理、（所望する場合は）HDLの計測、脂質（酸化または非酸化）との接触、場合によって酸化剤との接触および酸化脂質の検出が細片中に構築されており、その結果、ユーザーの操作が最小限で、さらに全血および/または血清から直接、HDLの防御活性が1、2分で測定できる装置を目的とする。好ましい実施態様では、本方法は反応終末点を測定し、したがって正確な時間コントロールおよび温度コントロールを必要としない。

好ましい実施態様では、本装置は、米国特許5,135,716号に記載されたものと類似している。したがって、例えば、ある実施態様では（例えば図1）、本装置は、不活性または活性な基質支持体1を含む。受容領域/受容レザバー11、および/またはろ過膜が場合によって存在する。アッセイ試薬（典型的には酸化または非酸化脂質および酸化剤）は検査装置に配置されている。脂質および/または、場合によってキャリア/検出膜。検査膜6は酸化脂質と反応する反応物を有し、定量された酸化脂質、非酸化脂質または酸化脂質：非酸化脂質比を示す。

【0057】

使用時には、血液は物理的輸送媒体3の血液適用領域11に添加される。血液は導管2および物理的輸送媒体3に沿って移動する。輸送媒体3は、例えば17ミクロンのメッシュ開口を有するモノフィラメントポリエステル織りメッシュ（Tetko, Briarcliff, N.Y.）で、約75ミクロンの厚さを有する。織りファブリック、不織ファブリック、ガーゼ、およびモノフィラメントヤーンが、物理的輸送媒体3として示した輸送膜のための多くの選択の中でとりわけ挙げられる。血漿分離は沈殿と同様、多数の微小孔を有する血漿分離膜4（この事例では5ミクロンのニトロセルロース（Schleicher and Schuell, Keene, N.H.）によって処理される。

【0058】

オプションのろ過膜5はLDLおよびVLDL沈殿物をろ過して除去し、それらが検査膜6に到達するのを防ぐ。配置されている場合は、ある実施態様では、ろ過膜5は、処置を施さずに使用される0.4ミクロンの疎水性のポリカーボネートメンブレン（Poretics Corp., Livermore, CA）、または0.2ミクロンのナイロン（Micron Separations, Inc., Westboro, M.A.）、または0.8ミクロンのポリスルホン（Gelman Sciences, Ann Arbor, M.I.）である。後者の2つは、5%または10%のポリエチレングリコール（分子量1000ダルトン）水溶液で飽和させ乾燥させる。

好ましい実施態様では、上記の検査膜6は、酸化脂質をアッセイする酵素および/または色素原および/または蛍光物質を含み、それにより、そこに到達したHDL含有サンプル（今やLDLおよびVLDLを含まない）は、検査膜6中の

試薬（例えば酸化脂質、非酸化脂質および酸化剤）と反応して着色反応を生じ、着色の強さは、酸化脂質および/または非酸化脂質（還元脂質）の濃度に比例する。

【0059】

好ましい実施態様では、検査膜6は0.45ミクロンのナイロン膜（Micron Separations, Inc. Westboro, M.A.）である。上部のシート7は開口部12および透明領域29を有し、矢印8および9で示すように他の成分の上部を覆って付着している。透明領域29は、酸素透過性であってもなくてもよい透明な膜で覆われた割れ目を含む。

開口部12から1滴の血液を、物理的輸送媒体3の血液適用領域11に適用し、比色反応を透明領域29から見ることができる。また別の選択肢として、不活性な基質支持体が存在しないとき、1枚または2枚以上の層は前記装置を支持するために十分な強度を有することができる。

そのような層状構造を有する装置をサンプルを適用する検査片として、サンプルに浸す“ディップスティック”として、またはサンプル受容容器の成分としてデザインできることは理解されよう。さらにまた、本実施態様は例示であって、これに限定しようとするものではないことは理解されよう。本明細書に提供した開示および“検査片”に付随する大量の文献にしたがえば、本発明の方法のHDL活性についてのアッセイは、当業者には容易に組み立てが可能であろう。

【0060】

V. キット

別の実施態様では、本発明は、本明細書に開示したアッセイの1つまたは2つ以上を実施するキットを提供する。アッセイキットは、好ましくは、1つまたは2つ以上の酸化脂質（単離脂質またはLDLとして提供される）を入れた1つまたは2つ以上の容器、および/または還元（酸化されていない）脂質、および酸化剤（例えば過酸化水素、13(S)-HPODE、15(S)-HPETE、HPODE、HODE、HETE、HPETEなど）を含む。キットは、好ましくは、酸化脂質を検出する1つまたは2つ以上の試薬（例えば2',7'-ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテート、ローダミン、cis-パリナリン酸

、NBD、cis-パリナリン酸コレステリルエステル、ジフェニルヘキサトリエンプロピオン酸、および他の蛍光物質)を含む。キットは、場合によって、本明細書に記載したアッセイの実施のために1つまたは2つ以上の任意の装置および/または試薬を含むことができる。そのような装置および/または試薬には、マイクロタイタープレート、緩衝物質、蛍光定量用フィルターなどが含まれるが、ただしこれらに限定されない。

【0061】

さらにキットは、場合によって、標識および/または本アッセイ方法の実施の指示(すなわちプロトコル)を提供する指示用物質を含む。好ましい指示用物質には、脂質を酸化から保護する能力または酸化脂質を還元する能力についてHDL(またはその成分)をスクリーニングすることについて記載されている。指示物質には、場合によってアテローム性硬化症のリスクを検定するために前記のアッセイを使用することについての記載が含まれる。

指示物質は典型的には手書きまたは印刷物を含むが、そのようなものに限定されない。前記の指示を記録し、それらを末端ユーザーに伝達することができるいずれの媒体も本発明に包含される。前記媒体には、電子記録媒体(例えば磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学媒体(例えばCDROM)などが含まれるが、ただしこれらに限定されない。前記媒体には、前記指示物質を提供するインターネットサイトのアドレスが含まれる。

【0062】

【実施例】

以下の実施例は例示を提供し、本発明を限定するものではない。

実施例1：正常なHDLは軽度に酸化されたLDLの生成における3つの工程を抑制する - 工程1

アポA-IおよびアポA-Iペプチド擬似体は“播種分子”をヒトLDLから除去し、ヒト動脈壁細胞による酸化に対してLDLを耐性にさせる。アポA-I関連“播種分子”には、13-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸[13-HPODE]および15-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸[15-HPETE]が含まれる。脂肪線条病巣形成に遺伝的に感受性を有するマウスのLDL

は動脈壁細胞による酸化に対して高い感受性を有し、in vitroでアポA - Iとインキュベートした後では酸化に対して耐性となった。マウスにアポA - I (アポA - I Iではない) を注射することによって、そのLDLは3時間以内に酸化に対して耐性になった。アポA - Iのヒトへの輸液によって、そのLDLは6時間以内に酸化に対して耐性になった。HDLおよびその関連する酵素パラオキシナーゼ(PON)もまた、LDLを酸化に対して耐性にした。発明者らは以下のように結論した：(1)動脈壁細胞によるLDLの酸化は、13-HPODEおよび15-HPETEを含む“播種分子”を必要とする；(2)アテローム発生に遺伝的に感受性を有するマウスのLDLは動脈壁細胞によってより容易に酸化される；(3)正常なHDLおよびその成分は、ヒトの動脈壁細胞による酸化に必要な新しく単離されたLDL中の脂質を除去または不活化することができる。

【0063】

序論

HDLおよびその主要なアポリタンパク質(アポA - I)は、細胞からコレステロールおよびリン脂質を除去することが知られている(Oran & Yokoyama (1996) J. Lipid Res., 37:2473-2491; Forte et al. (1995) J. Lipid Res., 36:148-157; Bruce et al. (1998) Ann. Rev. Nutr., 18:297-330; Phillips et al. (1998) Atheroscler., 137(補遺):S13-S17)。Stockerおよびその共同研究者ら(Christison et al. (1995) J. Lipid Res., 36:2017-2026)およびFluiterら(J. Biol. Chem., 274:8893-8899(1999))は、部分的にコレステリルエステル移転タンパク質によって仲介されて、コレステリルエステルヒドロペルオキシドがLDLからHDLに移されることを報告した。Fluiterおよび共同研究者ら(上掲書)はまた、ラット肝実質細胞によって酸化コレステリルエステルがHDLから選択的に取り込まれることを示した。Stockerおよび共同研究者ら(Garner et al. (1998) J. Biol. Chem., 273:6080-6087)は、アポA - IおよびアポA - I Iはともに、固有のメチオニン残基の酸化を伴うメカニズムを介してコレステリルエステルヒドロペルオキシドを還元することができることを報告した(Garner et al.(1998) J. Biol. Chem., 273:6088-6095)。しかしながら、酸化脂質をリポタンパク質および細胞から除去するアポA - Iの直接の役割はこれま

で報告されていない。

【0064】

Sevanianおよび共同研究者らは、彼らがLDLと記載した新しく単離したLDLの亜集団は脂質ヒドロペルオキシドを含むことを記載した (Sevanian et al. (1997) J. Lipid Res. 38:419-428)。Parthasarathyは、金属イオンによるLDLのin vitroでの酸化を調べ、LDLはそれが酸化される前に反応性酸素種とともに“播種”される必要があると仮説をたてた (Parthasarathy (1994) Modified Lipoproteins in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Austin, TX; R.G. Landes Co. pp.91-119; Parthasarathy (1994) Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology. H. Nohl, H. Esterbauer, & C. Rice Evans, Ed., Richelieu Press, London. pp.163-179; Witzum & Steinberg (1991) J. Clin. Invest., 88:1785-1792; Witzum (1994) Lancet 344:793-795; Chisolm (1991) Clin. Cardiol. 14:125-130; Thomas & Jackson (1991) J. Pharmacol. Exp. Therap. 256:1182-1188; Schwaery et al. (1999) Meth. Enz. 300:17-23; Polidori et al. (1998) Free Rad. Biol. Med., 25:561-567; Thomas et al. (1994) Arch. Biochem. Biophys. 315:244-254)。JacksonおよびParthasarathyは、LDLの“播種”におけるリポゲナーゼ (LO) の役割を提唱した (Parthasarathy (1994) Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology. H. Nohl, H. Esterbauer, & C. Rice Evans, Ed., Richelieu Press, London. pp.163-179; Thomas & Jackson (1991) J. Pharmacol. Exp. Therap. 256:1182-1188)。彼らはまた、過酸化水素またはそのリポペルオキシド同等物がLDLの“播種”に重要な役割を果たす可能性を提唱した (Parthasarathy (1994) Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology. H. Nohl, H. Esterbauer, & C. Rice Evans, Ed., Richelieu Press, London. pp.163-179; Thomas & Jackson (1991) J. Pharmacol. Exp. Therap. 256:1182-1188)。

【0065】

本発明者らは以前に脱脂アルブミンは軽度に酸化されたLDLから生物学的に活性な脂質を取り除くことができることを報告した (Watson et al. (1995) J. Clin. Invest., 95:774-782)。アポA - Iの公知の脂質結合特性を基に、我々は

、アポA - Iは、脂質との結合および脂質の除去において脱脂アルブミンよりもおそらく有効であると考えた。したがって、我々は、LDLを処理するためにアポA - IおよびアポA - I類似ペプチドを用いた。我々は、アポA - Iが酸化脂質に結合し、さらに“播種分子”が酸化脂質であるならば、アポA - IおよびLDLをインキュベートし、続いて前記2つを分離した場合、“播種分子”がLDLからアポA - Iへ移転され、アポA - Iから播種分子を抽出し、特定することが可能かもしれないと仮説をたてた。我々は、中性脂質および、LDLとのインキュベーション後にアポA - Iから抽出した脂質の脂肪酸分画の両方が“播種分子”を含んでいることを見出した。中性脂質分画は、コレステリルエステルヒドロペルオキシドが見出される分画である。リポキシゲナーゼ経路は、主に脂肪酸の酸化生成物およびアルファトコフェロールによって仲介される非酵素的プロセスの結果としてコレステリルエステルヒドロペルオキシドを生成するために機能するという証拠が存在するので (Neuzil et al. (1998) *Biochem.* 37:9203-9210 ; Upston et al. (1997) *J. Biol. Chem.* 272:30067-30074; Upston et al. (1999) *FASEB J.* 13:977-994)、我々は、新しく単離したLDLとインキュベートした後、アポA - Iから抽出した脂質の脂肪酸分画に努力を集中させた。我々は、新しく単離したLDLに存在する“播種分子”は、部分的にはリノール酸(13-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸 [13-HPODE])およびアラキドン酸(15-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸 [15-HPETE])の細胞代謝物に由来するという証拠を本実施例で提示する。これは、最初にParthasarathy (10, 11)によって予想されたとおりで、さらに、12/15-リポキシゲナーゼ遺伝子の破壊は、アポE-欠損マウスでアテローム性硬化症を減少させる (Cyrus et al. (1999) *J. Clin. Invest.*, 103:1597-1604; Steinberg (1999) *J. Clin. Invest.*, 103:1487-1488) という最近のCyrusらの発見と一致する。

【0066】

本実施例で提示するこの実験はまた、新しく単離したLDLの“播種分子”は正常なHDLおよびその成分(すなわちアポA - Iおよびパラオキシナーゼ)によって除去され、および/または不活化されることを示した。本実施例および実

施例2で詳述する実験から、我々は、軽度に酸化されているLDLの生物学的に活性な脂質は一続きの3つの工程で形成されることを提唱する(Watson et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:13597-13607; Watson et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:24787-24798)。第一の工程は、リノール酸およびアラキドン酸の代謝生成物並びにコレステリルヒドロペルオキシドとともにLDLが播種されることである。第二の工程は、内皮下腔へのLDLの捕捉および付近の動脈壁細胞に由来するさらに新たな反応性酸素種の蓄積である。我々は、第三の工程は、反応性酸素種が臨界閾値にたしたときに生じるLDLリン脂質の非酵素的酸化であり、これは、単球結合、単球走化性およびマクロファージへの単球の分化を誘発する固有の酸化脂質を形成させると提唱する。本実施例の実験は、これら3つの工程の第一の工程に焦点を当て、実施例2は第二および第三の工程についてのデータを提示する。

【0067】

方法

材料

組織培養の材料および他の試薬は先に記載した供給源から入手した(Navab et al. (1991) J. Clin. Invest. 88:2039-2046; Navab et al. (1993) J. Clin. Invest. 91:1225-1230; Navab et al. (1997) J. Clin. Invest. 99:2005-2019)。アセトニトリル、クロロホルム、メタノール、酢酸エチル、無水酢酸、トリエチルアミン、t-ブタノール、ポリプロピレングリコール、ギ酸アンモニウム、ギ酸および水(全てオプティマグレード)は、フィッシャーサイエンティフィック社(Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)から入手した。真性L-1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(PAPC)およびリノール酸は、アバンチポーラーリピド社(Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL)から入手した。Ox-PAPCを含むPAPCに由来する酸化リン脂質、および酸化リン脂質、1-パルミトイル-2-(5)オキソバレリル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POVPC, m/z 594)、1-パルミトイル-2-グルタリイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(PGPC, m/z 610)、および1-パルミトイル-2-(5,6-エポキシイソプロ

スタンE₂) - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (PEIPC, m/z 828) は、以前に記載したように調製し、単離した(25, 26)。13(S) - HPODEおよび15(S) - HPEETEはバイオモル社(Biomol, Plymouth Meeting, PA)から入手した。ヒトアポA - IおよびアポA - II並びにダイズリポキシゲナーゼは、シグマケミカル社(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)から入手し、in vitro実験およびマウスの注射に用いた。

【0068】

SDS - PAGE分析により、約90%の純度がアポA - IおよびアポA - IIについて示された。アポA - Iペプチド擬似体は先に記載したように合成した(30 - 32)。ヒトへの輸液用ヒトアポA - I / ホスファチジルコリンディスクは、先に記載したとおりZLBセントラルラボラトリー(ZLB Central Laboratory, Bern, Switzerland)によって調製された(33 - 35)。精製パラオキシゲナーゼは、Bert La Du教授(University of Michigan)から贈与された。さらに2つの遺伝子組換え変異体パラオキシゲナーゼ調製物(パラオキシソンを加水分解できない)(Sorenson et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7187-7191)を用いた。

【0069】

リポタンパク質

低密度リポタンパク質(LDL, d = 1.019から1.063 g/mL)および高密度リポタンパク質(HDL, d = 1.063から1.21 g/mL)は、Havelと共同研究者らの記載したプロトコル(Havel et al. (1995) J. Clin. Invest. 43:1345-1353)にしたがって、委員会(Human Research Subject Protection Committee, University of California, Los Angeles)の承認するプロトコルにしたがい書面による同意を得た後で絶食健常ボランティアの血液から単離した。リポタンパク質欠損血清は、HDLの単離の後ペレットを除去し、透析しさらにタンパク質濃度を7.5 g/100 mLに再調整して得られた。いくつかの実験では、エタノール中のブチル化ヒドロキシトルエン(BHT) 20 mMを新しく単離した血漿に20 μMの濃度に添加し、先に記載した方法(Navab et al. (1997) J. Clin. Invest., 99:2005-2019)を用いてリポタンパク質をFPL

Cにより分離した。LDL、HDLおよびLPDSのエンドトキシンレベルは20 pg/mL以下で、これは単球付着または走化性活性の誘発に対して必要な閾値より十分に低い。この実験で記載したリポタンパク質濃度はタンパク質含有量による。

【0070】

共働培養

ヒト大動脈内皮細胞(HAEC)および平滑筋細胞(HASMC)は先に記載したように単離した(Navab et al.(1991) J. Clin. Invest., 88:2039-2046)。マイクロタイタープレートのウェルを0.1%のゼラチンで37℃で一晩処理した。HASMCを 1×10^5 細胞/cm²のコンフルエント密度で添加した。細胞を2日間培養し、その間に細胞はウェルの表面全体を覆い、十分量の細胞外マトリックスを形成した。その後でHAECを 2×10^5 細胞/cm²で添加し、増殖させて2日で1層のコンフルエントなHAECを形成した。全ての実験で、HAECおよび自系(同じドナー由来)HASMCを4から6代の継代レベルで使用了。

【0071】

単球の単離

単球は先に記載した(Fogelman et al.(1988) J. Lipid Res., 29:1243-1247)リカルド(Recald)の方法を改変して用い、委員会(Human Research Subject Protection Committee, University of California, Los Angeles)の承認するプロトコルにしたがい書面による同意を得た後で健常ボランティアの血液から単離した。

単球走化性アッセイ

一般に、前記共働培養は、HDLの非存在下または存在下で天然のLDL(250 µg/mL)で8時間処理した。上清を採集し、脂質のヒドロペルオキシドレベルの測定に用いた。続いて共働培養を洗浄し、さらに一切の添加物を含まない新しい培養メジウム199(M199)を添加し、さらに8時間インキュベートした。これによって、酸化LDLによる刺激の結果として細胞により放出された単球走化性活性の採集が可能になった。インキュベーションの最後に、上清を

共働培養から採集して40倍に希釈し、単球の走化性活性についてアッセイした。簡単に記せば、上清を標準的ニューロプローブ (Neuroprobe) チャンバー (Neuroprobe, Cabin John, MD) に加え、上部に単球を添加した。チャンバーを37度で60分インキュベートした。インキュベーション後に、チャンバーを解体し移動していない単球を拭き取った。続いてメンブレンを風乾し、1%グルタルアルデヒドで固定し、0.1%のクリスタルヴァイオレット染料で染色した。移動単球数を顕微鏡で決定し、4つのウェルで数えた12の標準化高倍率視野の平均±SDとして表した。

【0072】

単球付着アッセイ

簡単に記せば、48ウェルの組織培養プレートのH A E C単層培養を、文献に記載したように (Watson et al. (1995) J. Clin. Invest. 96:2882-2891) 所望のLDLまたはリン脂質と4時間37度でインキュベートした。洗浄後、ヒト末梢血単球浮遊液を添加し、10分間インキュベートした。緩やかに付着した単球を洗い流し、単球を固定して付着した単球の数を9つの高倍率顕微鏡視野で数えた。

LDL酸化に対する13(S)-HPODEの影響

新しく単離したLDL (250 μg) をM199中の10%LPDS中の13(S)-HPODE (1.0 μg) とともに37度で4時間穏やかに攪拌しながらインキュベートした。LDLを遠心によって再度単離し、ヒトの大動脈内皮細胞の単層培養とともにインキュベートした。0~5時間の間の時点で上清を取り出し、脂質ヒドロペルオキシド含有量についてアッセイした。前記内皮単層培養を各時点後に洗浄し、単球浮遊液を添加してインキュベートし、洗浄して付着単球の数を決定した。

【0073】

ダイズリポキシゲナーゼによるLDLの処理

セファローズビーズに結合させた純粋なダイズリポキシゲナーゼ10単位とともに新しく単離したLDL (250 μg) を37度で4時間穏やかに攪拌しながらインキュベートした。LDLを遠心によって再度単離し、H E A Cの単層培養

とインキュベートした。上清を0～4時間の範囲の時点で取り出し、脂質ヒドロペルオキシド含有量についてアッセイした。内皮の単層培養を各時点後に洗浄し、単球の付着を測定した。

ネズミ

C57BL/6JおよびC3H/HeJマウスをJackson Laboratories (Bar Harbor, ME) から購入した。全ての動物は雌であった(実験時には4～6ヶ月齢であった)。マウスを4%の脂肪を含む固形飼料、プリナチョウ(Purina Chow)(Ralston-Purina Co., St. Louis, MO)で維持した。LDLは、病変感受性C57BL/6および病変耐性C3H/HeJグループから、動物実験委員会(University of California Animal Research Committee)の規則にしたがい軽度のイソフルラン麻酔下で、抗凝固剤としてヘパリン(2.5U/mL血液)を用いながら後眼窩洞から得た血液から単離した。

【0074】

アポA-Iのヒトへの輸液

書面によるインフォームドコンセントを得、さらに機関(St Bartholomew's and the Royal London School of Medicine and Dentistry)のIRB承認を得た後、アポA-I/ホスホチジルコリンディスクを、Nanjeeら(Nanjee et al.(1999) Arterioscler. Thromb. Vascul. Biol. 19:979-989; Nanjee et al.(1996) Arterioscler. Thromb. Vascul. Biol. 16:1203-1214)の記載した材料およびプロトコルを用いて40mgアポA-I/kg体重の用量で4時間にわたって6人の健常な男性対象者に輸液した。前記6人のボランティア(それぞれ対象者1、2、3、4、5および6)の脂質レベルは以下のとおりであった:総コレステロール:149、160、164、209、153、163;トリグリセリド:176、169、95、150、121、153;LDL-コレステロール:69、73、88、117、73、82;およびHDL-コレステロール:45、54、56、62、59、47mg/dL。血漿は、文献(Havel et al.(1995) J. Clin. Invest., 43:1345-1353)のように輸液前2時間および輸液後6時間で調製して凍結保存し、LDLは、ロサンジェルス著者らの研究室で実験の前にFPLCにより単離した。本プロトコルにしたがって血漿から単離したLDLは

、新しく単離したLDLと区別できない態様でin vitroおよびin vivoで機能する (Rumsey et al.(1994) J. Lipid Res.35:1529-1598)。

【0075】

高速液体クロマトグラフィー (FPLC)

LDLの迅速で穏やかな単離のため、並びにインキュベーション後のLDLおよびアポA-Iの再単離のための図2に示した高速液体クロマトグラフィー (FPLC) を先に報告 (Navab et al. (1997) J. Clin. Invest. 99:2005-2019) したように実施した。

固相抽出クロマトグラフィー

固相抽出クロマトグラフィーは、先に記載されたように実施した (Kaluzny et al.(1985) J. Lipid Res. 26:135-140)。簡単に記せば、2.0mgを越えないLDLタンパク質から得た脂質抽出物を250μLのクロロホルムに再懸濁した。Vac-Elutマニホールド (Analytichem International, Harbor City, CA) を用いて、3.0mLのメタノールを、続いて6.0mLのヘキサンを添加することによって固相抽出アミノカラム (Fisher) を条件付けした。脂質を前記カラムに添加し、中性脂質 (コレステロール、コレステリルエステル、コレステリルエステルヒドロペルオキシド、トリグリセリド、ジグリセリドおよびモノグリセリド) を3.0mLのクロロホルム/イソプロパノール (2:1, v/v) で溶出させた。遊離脂肪酸はジエチルエーテル中の3%酢酸3.0mLで溶出させ、リン脂質は3mLのメタノールで溶出させた。溶媒を蒸発させ、脂質を0.01%のBHTを含むクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) 中に再懸濁させ、アルゴンで覆って-80℃で保存した、これらの分析では、内部標準として添加したC17:0の回収は92±3%であった。

【0076】

逆相高処理液体クロマトグラフィー

逆相高処理液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) は、Amesおよび共同研究者らの方法 (Yamamoto & Ames(19__) Free Rad. Biol. Med., 3:359-361)、Kambayashiおよび共同研究者ら (Kambayashi et al.(1997) J. Biochem. 121:425-431)、およびAlex Sevanian (私的通信) にしたがって実施した。簡単に記せ

ば、分析は、移動溶媒に再懸濁させた単離脂質をカラムに注入し、流速1.0 mL/分で溶出させることにより実施した。脂肪酸酸化生成物の検出は、二極アレ一検出装置(Beckman Instruments)を用い200から350 nmでスキャンするか、または蒸発光分散検出装置(SEDEX55, France)を用いUV吸収により実施した。ハイパーシル(Hypersil)MOS-1C8(Alltech)またはスペルコスル(Supelcosil)LC-18-DB(Supelco)カラムを脂肪酸酸化生成物の分離に使用し、オールチマ(Alltima)C18カラム(Alltech)をコレステリルエステル酸化生成物の分離に用いた。メタノール/トリエチルアミン(99.99/0.01, v/v)で構成された溶媒系を13-HPODEの溶出に用い、アセトニトリル/水/酢酸(60/40/0.1, v/v/v)からアセトニトリル/水/酢酸(98/2/0.1, v/v/v)のグラジエントから成る溶媒系を15-HPETEの溶出に用い、アセトニトリル/2-プロパノール/水(44/54/2, v/v/v)から成る溶媒系はコレステリルリノレートヒドロペルオキシドの溶出に用いた。

【0077】

電子スプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)

陽イオンまたは陰イオンモードにおける電子スプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)は、先に報告(Watson et al(1997) J. Bio. Chem., 272:13597-13607)されたプロトコルおよび条件にしたがって実施した。

他の方法

リポタンパク質のタンパク質含有量は、ロウリーのアッセイ(Lowry et al.(1951) J. Biol. Chem. 183:265-275)の改変(Lehman et al.(1955) In Vitro Cell. Develop. Biol. Animal, 31:806-810)によって決定した。単球走化性タンパク質1のレベルは先に報告(Navab et al.(1991) J. Clin. Invest., 88:2039-2046)されたようにELISAを用いて測定した。脂質ヒドロペルオキシドレベルは、Auerbachらの報告(Anal. Biochem., 201:375-380(1992))したアッセイを用いて測定した。表示したいいくつかの実験では、動脈壁細胞共働培養によって酸化されたLDLを含む培養上清中の脂質は、クロロホルム-メタノールによって抽出し、ヒドロペルオキシドは、Auerbachの方法によって決定した。パラオ

キソナーゼ (PON) 活性は、先に報告されたように (Gan et al. (1991) Drug Metab. Dispos. 19:100-106) 測定した。統計的有意差はモデル1 ANOVAによって決定した。この分析は、先ず最初にEXCELアプリケーションでANOVAを用いてグループの平均間に相違があるか否かを決定し、続いて適切な場合には対合スチューデントt検定を実施して顕著に異なる平均を特定した。有意差は $p < 0.05$ と規定される。

【0078】

結果

アポA - IおよびアポA - Iペプチド擬似体は新しく単離したヒトLDLから“播種分子”を除去し、このLDLをヒト動脈壁細胞による酸化に対して耐性にする

我々のヒト動脈壁共働培養系は広範囲に性状が決定された：Navab et al. (1991) J. Clin. Invest., 88:2039-2046; Navab et al. (1993) J. Clin. Invest., 91:1225-1230; Navab et al. (1997) J. Clin. Invest., 99:2005-2019; Shin et al. (1996) J. Clin. Invest., 97:1630-1639; Ishikawa et al. (1997) J. Clin. Invest. 100:1209-1216; Castellani et al. (19__) J. Clin. Invest., 100:464-474; Shin et al. (1998) Nature 394:284-287。

LDLをこの共働培養に添加すると、それは内皮下腔に捕捉され動脈壁細胞によって酸化される。結果として、3種の生物学的に活性な酸化リン脂質、POVPC、PGPC、PEIPC (それぞれ特徴的なM/Z比、594、610および828を有する) が産生される (Watson et al. (1997) J. Biol. Chem., 272:13597-13607; Watson et al. (1999) J. Biol. Chem., 274:24787-24798)。これら3種の酸化リン脂質は、内皮細胞を単球と結合させ、内皮細胞に強力な単球誘引物質MCP-1および分化因子M-CSFを分泌させる軽度に酸化されたLDLの能力を説明する (Navab et al. (1991) J. Clin. Invest., 88:2039-2046; Berliner et al. (1990) J. Clin. Invest., 85:1260-1266; Rajavashisth et al. (1990) Nature 344:254-257)。LDLに暴露した共働培養から得られた条件付け培養液は、MCP-1を含むことが判明した (Navab et al. (1991) J. Clin. Invest., 88:2039-2046)。ヒトの単球をLDL処理培養に添加したとき、単球は

内皮細胞と結合し、内皮下腔に移動した(上掲書)。MCP-1に対する中和抗体を前記培養に添加することによって、LDL誘発単球走化性は完全に失われた(上掲書)。したがって、培養単球の走化性は、生物学的に活性な酸化リン脂質の生成およびそれに続くMCP-1の誘発に対する非常に鋭敏なバイオアッセイである(Navab et al.(1991) J. Clin. Invest., 88:2039-2046; Navab et al.(1993) J. Clin. Invest., 91:1225-1230; Navab et al.(1997) J. Clin. Invest., 99:2005-2019; Ishikawa et al.(1997) J. Clin. Invest. 100:1209-1216; Berliner et al.(1990) J. Clin. Invest., 85:1260-1266)。

【0079】

アポA-Iは正常なHDLの主要なタンパク質成分である。コレステロールおよびリン脂質に結合するというその公知の能力のために(Oram & Yokoyama (1996) J. Lipid Res. 37:2473-2491; Forte et al.(1995) J. Lipid Res. 36:148-157; Bruce et al.(1998) Ann. Rev. Nutr. 18:297-330; Phillips et al.(1998) Atheroscler. 137(補遺):S13-S17)、我々は、アポA-IもまたLDL中の“播種分子”と結合するという仮説をたてた。この仮説を調べるために、我々は図1に示したプロトコルを利用した。ブチル化ヒドロキシルエン(BHT)を新しく採取した血漿に添加し、LDLをFPLCによって分離し、アポA-Iと37で2時間インキュベートした。続いてこのLDLとアポA-Iを速やかに分離して調べた。我々は、分離後のLDLおよびアポA-Iを、それぞれ“LDLアフターA-I”および“A-IアフターLDL”と呼ぶ。

【0080】

図4Aおよび図4Bは、“LDLアフターA-I”はヒト動脈壁細胞培養によって酸化されないことを示している。図3Aから図3Cのデータは、7人の別々の健常な個体から採取したLDLおよび別々のドナーから得た別個の共働培養および単球を用いた7つの実験で得られたものの平均±SDを示している。したがって、これらの結果は、非常に再現性が高く、動脈壁細胞は“LDLアフターA-I”を酸化することができないということを図4Aで示している。しかしながら、“A-IアフターLDL”由来の脂質抽出物が“LDLアフターA-I”に戻された場合は、それは容易に酸化された(図3A)。さらにまた、図2で示し

たように、“LDLアフターA-I”は単球の付着を刺激せず(図3B)、走化性も刺激しなかった(図3C)。しかしながら、“A-IアフターLDL”由来の脂質抽出物を“LDLアフターA-I”に戻したとき、再構成されたLDLは単球の付着(図3B)および走化性(図3C)を擬似処理LDLと同程度に誘発した。図3Cに示した結果と非常に類似する結果が、単球走化性タンパク質1のレベルをELISAで測定したときに得られた(データは示されていない)。

【0081】

アポA-Iが脂質に結合する能力は、その固有の -ラセン構造の機能であると決定された(Palgunachari et al.(1996) *Arterioscler. Thromb. Vascul. Bio.* 16:328-338)。Anantharamaiahおよび共同研究者らは、徹底的に性状が調べられたアポA-Iペプチド擬似体を合成した(Garber et al.(1992) *Arterioscler. Thromb.* 12:886-894; Anantharamaiah (1986) *Meth. Enz.* 128:627-647)。これらのペプチド擬似体の1つは37pAとして知られ、以下のアミノ酸配列を有する：DWLKAIFYDKVAEKLEAFPDWLKAIFYDKVAEKLEAF(配列識別番号：1)。37pAと同じ配列をもつが、3つの余分なアミノ酸残基[アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)およびプロリン(P)]をそのN末端に有し、脂質結合に必要なラセン形成を妨げるペプチドもまた、発表された方法(; Anantharamaiah (1986) *Meth. Enz.* 128:627-647)を用いて前記のグループによって構築された。このコントロールペプチド(40Pとして知られている)は、37pAと比べてほとんど脂質と結合しない。

【0082】

図4Aおよび図4Bに示したように、LDLをアポA-Iペプチド擬似体37pAとインキュベートし、続いてアポA-Iペプチド擬似体37pAから分離した後、LDL(“LDLアフター37pA”)は動脈壁細胞による酸化に耐性を示し(図4A)、単球走化性活性を誘発しなかった(図4B)。しかしながら、リポタンパク質とのインキュベーションの後でペプチドから脂質抽出物(“37pAアフターLDL”)を“LDLアフター37pA”に戻したとき、それは容易に酸化された(図4A)。対照的に、“LDLアフター40P”は動脈壁細胞によるLDL酸化の減少を示さず(図4A)、LDL誘発単球走化性の低下も認

められなかった(図4B)。したがって、アポA-Iおよびそのペプチド擬似体37pAも両方とも、新しく単離されたLDLから脂質を除去することができ、ヒト動脈壁細胞による酸化に対してLDLを耐性にし、さらにLDL誘発単球走化性を防止した。

【0083】

アポA-Iによって除去される新しく単離されたLDL中の“播種分子”は13-HPODE15-HPETEを含む

図2に示したように20μMのBHTの存在下でFPLCによって迅速に単離したLDLに結合している生物学的に活性な脂質を特定するために、脂質を“A-IアフターLDL”から抽出した。これらの脂質は固相抽出クロマトグラフィーによって分離した。続いて、中性脂質または脂肪酸分画を、PAPC(LDLに存在するリン脂質)または“LDLアフターA-I”のどちらかと一緒に共働培養に添加した。PAPCまたは“LDLアフターA-I”の共働培養への添加は脂質ヒドロペルオキシド生成も単球の走化性も刺激しなかった(図5A-図5C、白棒線)。しかしながら、“A-IアフターLDL”から抽出した脂肪酸分画(図5Aおよび図5B、黒棒線)または中性脂質分画(図5Cおよび図5D、黒棒線)のいずれもPAPCまたは“LDLアフターA-I”へ添加することにより、脂質ヒドロペルオキシド生成および単球走化性の用量依存的増加をもたらした。これらの実験は、アポA-Iは、動脈壁細胞がPAPCおよびLDLの両者を酸化するために必要とする脂質を新しく単離したLDLから除去することを示している。“A-IアフターLDL”から回収した脂肪酸分画または中性脂質分画の添加は、動脈壁細胞によるPAPCおよび“LDLアフターA-I”の酸化をもたらした。

【0084】

さらに脂肪酸を特定するために、新しく単離したLDLをアポA-Iの存在下または非存在下でインキュベートし、続いて遠心によって分離した。アポA-Iとのインキュベーションに続いて、脂質をLDLおよびアポA-Iから抽出した。脂質はまた、LDLの非存在下でインキュベートしたアポA-I(A-I擬似)、およびアポA-Iの非存在下でインキュベートしたLDL(LDL擬似)か

ら抽出した。続いて、抽出脂質を逆相HPLCによって分画した。LDL存在下でインキュベートされなかったアポA-Iはほとんど13-HPODE (図6A)も15-HPETE (図6E)も含んでいなかった。対照的に、アポA-I非存在下でインキュベートした新しく単離したLDL (LDL擬似)は13-HPODEおよび近傍の未確認ピークを含んでおり (図6B)、さらに15-HPETEも含んでいた (図6F)。“LDLアフターA-I”は、近傍の未確認ピークと比較して実質的に少ない13-HPODE (図6Bおよび図6Cの未確認ピークに対して13-HPODEを比較)、および極めて少ない15-HPETEを含んでいた (図6G)。図6Dおよび図6Hは、13-HPODEおよび15-HPETEはアポA-Iに移されることをそれぞれ示している。質量分析法を用いた更なる分析によって、新しく単離されたLDLに顕著な量のHPODEおよびHPETEが存在し、その両方がアポA-Iとのインキュベーションによって効果的に除去されることが確認された (データは示されていない)。“A-IアフターLDL”の脂質抽出物の陰イオンモードでのESI-MSによる分析によって、HPODEの存在を示唆する m/z 311を有するイオンの存在が示された (データは示されていない)。HPODEのそれと比較してより少ない量で存在し、さらに m/z 335を有するイオンもまた観察され、“A-IアフターLDL”の脂質中にHPETEが存在することを示唆している (データは示されていない)。“A-IアフターLDL”の脂質抽出物はまた、 m/z 317を有する比較的大量のイオンを含み、HPETEの脱水生成物 (すなわち水1分子のロス)の存在を示唆している (データは示されていない)。アポA-Iで処理されていない新しく単離したLDLの脂質抽出物のMS/MSによる分析によって、HPODEの存在が確認された (データは示されていない)。しかしながら、HPETEはこれらのサンプルでは検出されなかった (データは示されていない)。HPETEは、HPLCおよびMS/MSの両方によって“A-IアフターLDL”で容易に検出されたので、我々は以下のように推論した：1)アポA-Iの処置はHPETEを濃縮し、その検出を可能にしたのかもしれない；2)HPODEは、HPETEよりも高濃度で新しく単離されたLDLに存在するのかもしれない。

【0085】

方法の項で述べたように、真性の13(S)-HPODEの新しく単離したLDLへの添加は、LDLがHAECに添加されたときは脂質ヒドロペルオキシドの生成を増加させ、さらにまたHAECへの単球の付着も増加させた(データは示されていない)。

13(S)-HPODEはリノール酸に対するリポキシゲナーゼ活性の産物である(55, 56)。LDL中の主要な不飽和脂肪酸はリノール酸であるので、新しく単離したLDLをダイズのリポキシゲナーゼの存在下または非存在下でインキュベートした。本明細書に記載したように、ダイズリポキシゲナーゼとインキュベートし、続いて前記リポキシゲナーゼから分離した後、LDLをHAECに添加した。ダイズリポキシゲナーゼとインキュベートし、続いて前記リポキシゲナーゼから分離したLDLは、ダイズリポキシゲナーゼの非存在下でインキュベートしたLDLと比較して、培養上清中の脂質ヒドロペルオキシドの生成を顕著に増加させ、さらにHAECへの単球の付着を増加させた(データは示さず)。

前記の実験を総合すれば、これらの実験は、新しく単離したLDL中の、アポA-Iによって除去される“播種分子”は、HPODEおよびHPETEを含むことができることを示している。

【0086】

遺伝的にアテローム性硬化症に感受性を有するマウスから新しく単離したLDLはヒト動脈壁細胞による酸化に強い感受性を示し、ヒトアポA-Iによって酸化に対して耐性となる

アテローム形成性飼料を与えたとき、C57BL/6J(BL/6)マウスは、大動脈に脂肪線条病変を生じ、一方、C3H/HeJ(C3H)マウスは同等のアポB含有リポタンパク質レベルにもかかわらず前記病変を生じない(Paigen et al.(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3763-3767; Ishida et al.(1991) J. Lipid Res. 32:559-568)。我々は、以前に病変感受性BL/6マウスは酸化ストレス下にあるということを提唱する証拠を提供した(Shih et al.(1996) J. Clin. Invest. 97: 1630-1639; Shih et al.(1998) Nature 394:284-287;

Liao et al.(1994) J. Clin. Invest. 94:877-884)。この仮説の論理的帰結は、病変耐性C3HマウスのLDLと比較してBL/6マウスのLDLの酸化に対する感受性の増加であろう。低脂肪固形飼料により、この2ストレインのマウスは同じように低レベルのLDLを有し、病変感受性BL/6マウスはより高レベルのHDLを有する(Paigen et al.(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3763-3767)。我々の仮説を調べるために、この2ストレイン(両方とも低脂肪固形飼料で維持された)から新しく単離したLDLをヒトアポA-Iの存在下および非存在下でインキュベートし、続いてLDLおよびアポA-Iを分離し、さらに、それらをヒトの動脈壁細胞とインキュベートした。図7Aおよび図7Bに示したように、病変感受性BL/6マウスに由来し、アポA-Iの非存在下でインキュベートしたLDL(LDL擬似)は、病変耐性C3HマウスのLDLの場合よりもはるかに容易に動脈壁細胞によって酸化された(図7A)。対照的に、病変感受性BL/6マウスおよび病変耐性C3Hマウスの“LDLアフターA-I”は両方とも動脈壁細胞による酸化に耐性であった(図7A)。他方、脂質が“A-IアフターLDL”から抽出され、“LDLアフターA-I”に戻された場合は、再構成LDLは、擬似処理LDLの場合と同じ程度に動脈壁細胞によって酸化された(図7A)。同様な結果が、LDL誘発単球走化性について得られた(図7B)。図7AおよびBのデータは、C3HマウスのLDLと比較して病変感受性BL/6マウスのLDLを酸化する動脈壁細胞の能力の相違(これはアポA-Iによって除去されるLDL中の脂質による)を示している。これらのデータはまた、動物を低脂肪固形飼料で維持しても前記の相違は存在することを示している。

【0087】

ヒトアポA-Iのマウスへの注射はマウスのLDLをヒト動脈壁細胞による酸化に耐性にするが、ヒトアポA-IIは耐性にしない

in vivoでLDLの潜在的酸化状態を変化させるアポA-Iの能力をテストするために、マウスに100 μ gのアポA-IまたはアポA-IIまたは食塩水のみを尾静脈から注射した。血液を直ちに(0時間)または注射後3、6もしくは24時間して採取した。FPLCによりLDLを単離し、ヒト動脈壁細胞培養と

インキュベートし、脂質ヒドロペルオキシドの生成および単球の走化性活性を調べた。図8Aは、アポA-Iを3～6時間前に注射されたBL/6マウスから新しく単離したLDLはヒト動脈壁細胞による酸化に対して耐性で、さらにこの耐性は24時間まで持続することを示している(図8A)。対照的に、食塩水のみ注射後直ちに、または6時間して得たLDLも、アポA-IIの注射後6時間してから得たLDLもマウスLDLを動脈壁細胞による酸化に対して耐性にしなかった(図8A)。同様な結果が単球の走化性活性について得られた(図8B)。血漿およびHDL中のPON活性は、アポA-I注射後6時間で約20%増加したが、アポA-IIの注射では変化しなかった(データは示されていない)。したがって、上記のin vitro実験の場合のように、in vivoで注射されたアポA-IはLDLの酸化を劇的に減少させることができる(アポA-IIはできない)。

【0088】

ヒトアポA-Iのヒトへの輸液はそのLDLをヒト動脈壁細胞による酸化に対して耐性にする

上記の図8Aで示されるように、アポA-Iのマウスへの注射はそのLDLを動脈壁細胞による酸化に対して耐性にした。図9Aおよび9Bはヒトの対応する実験について示している。6人の健常者からアポA-Iの輸液の2時間前および6時間後に血液を採取した(方法の項で示したように、1人はトリグリセリドレベルが軽度に上昇している、176mg/dl)。各時点の血漿からLDLを単離し、ヒトの動脈壁細胞培養とともにインキュベートした。図9Aに示したように、6人の対象者のうち6人において、アポA-Iの輸液後6時間で単離したLDLは、輸液2時間前のLDLと比較したとき動脈壁細胞による酸化に対してはるかに強い耐性を示した。同様な結果がLDL誘発単球走化性活性について得られた(図9B)が、ただし4人の対象者については酸化の減少は、LDL誘発単球走化性活性の減少より小さかった。血漿およびHDLにおけるPONの活性は、輸液2時間前と比較して輸液後6時間で約20%増加した(データは示されていない)。これらのデータは、マウスの場合のように、アポA-Iのヒトへの注射はそのLDLをヒト動脈壁細胞による酸化に対して耐性にするを示してい

る。

【0089】

HDLまたはHDL結合酵素はヒト動脈壁細胞による酸化に対してLDLを耐性にする

完全なHDLおよびアポA-I以外のその成分(例えばPON)がLDLを動脈壁細胞による酸化に対して耐性にする能力を調べるために、本明細書に記載したようにLDLをHDLまたはPONの存在下もしくは非存在下でインキュベートし、続いてそれらから分離してヒト動脈壁細胞共働培養とインキュベートした。HDLまたはPONとのインキュベーションによって、LDLは、擬似処理LDLと比較して動脈壁細胞による酸化に対して耐性になった(図10A)。同様な結果が、LDL誘発単球走化性活性について得られた(図10B)。したがって、HDLおよびその付随酵素PONは動脈壁細胞による酸化に対してLDLを耐性にすることができる。

【0090】

考察

本実施例で提示したデータは、軽度酸化されたLDLの生成をもたらす3工程プロセスの第一の工程の調節におけるHDL並びにその成分アポA-IおよびPONの役割を示している。LDLは、それが酸化される前に反応性酸素種とともに“播種”される必要があるという仮説が提唱された(Parthasarathy (1994) Modified Lipoproteins in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Austin, TX; R.G. Landes Co. pp.91-119; Parthasarathy (1994) Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology. Ed. H. Nohl, H. Esterbauer, and C. Rice Evans. Richelieu Press, London. pp.163-179; Witztum and Steinberg (1991) J. Clin. Invest. 88:1785-1792; Witztum (1994) Lancet 344:793-795; Chisolm (1991) Clin. Cardiol. 14:125-130; Thomas & Jackson (1991) J. Pharmacol. Exp. Therap. 256:1182-1188)。Spectorと共同研究者らは、リポキシゲナーゼ経路は動脈壁細胞で活発であることを示し(Spector et al.(1988) Prog. Lipid Res. 27:271-323; Alexander-North et al.(1994) J. Lipid Res. 35:173-1785)、さらにParthasarathy は、過酸化水素またはそのリポペルオキ

シド同等物は、LDLの“播種”で重要な役割を果たす可能性があることを強調した (Parthasarathy et al.(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1046-1050 ; Parthasarathy (1994) Modified Lipoproteins in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Austin, TX; R.G. Landes Co. pp.91-119; Parthasarathy (1994) Free Radicals in the Environment, Medicine and Toxicology. Ed. H. Nohl, H. Esterbauer, and C. Rice Evans. Richelieu Press, London. pp.163-179) 。 12 / 5 - リポキシゲナーゼ遺伝子の破壊はアポE欠損マウスでアテローム性硬化症を減少させるというCyrusらによる最近の発見 (Cyrus et al.(1999) J. Clin. Invest. 103:1597-1604) は上記の仮説および本実施例のデータと一致する。

【0091】

我々は、遺伝的にアテローム性硬化症の発生に感受性を有する、固形飼料で維持したマウスから新しく単離したLDLは、アテローム性硬化症の発生に遺伝的に耐性であるマウスから採取したLDLの場合よりもはるかに容易に動脈壁細胞により酸化されることを見出した。両ストレインのマウスから得たLDLは、アポA - I処理後に動脈壁細胞による酸化に対して耐性になり (図7Aおよび図7B)、さらに、アポA - I処理後のLDLの酸化レベルは2つのストレインについて顕著には相違しなかった (図7Aおよび図7B)。アテローム性硬化症を発生する感受性における遺伝的相違は、部分的には、これら2ストレインのマウスのLDLにおける“播種分子”レベルにおける相違によることを示しているのかもしれない。

【0092】

動脈壁細胞による酸化に対してLDLを耐性にするアポA - I (図3および図7) およびアポA - Iペプチド擬似体 (図4AおよびB) のin vitroの能力が、マウス (図8AおよびB) およびヒト (図9AおよびB) の両方でin vivo適用するために示された。マウスでは、アポA - Iを注射して3時間以内に、LDLは動脈壁細胞による酸化に対して耐性になり、この防御状態は24時間持続した (図8AおよびB)。アポA - Iの場合と対照的に、アポA - I Iの注射は、動脈壁細胞による酸化に対してLDLを防御しなかった (図7A)。ヒトでは、6

人のうち6人においてアポA - Iの輸液は、輸液後6時間以内にそのLDLを動脈壁細胞による酸化に対して耐性にした(図8A)。

【0093】

アポA - Iだけでなく、HDL自体もさらにHDL付随酵素PONも、動脈壁細胞による酸化に対してLDLの感受性を有利に変更できる。Aviramおよび共同研究者らは、最近、PONはペルオキシダーゼ活性を有することを示したが(Aviram et al.(1998) J. Clin. Invest. 101:1581-1590; Aviram et al.(1998) Arterioscler. Thromb. Vascul. Biol., 18:1617-1624)、これにより、マウスモデルにおいて(Shih et al.(1996) J. Clin. Invest. 97:1630-1639; Shih et al.(1998) Nature 394:284-287)、さらに疫学的研究において(Serrato and Marian (1995) J. Clin. Invest. 96:3005-3008; Mackness et al. (1998) Curr. Opin. Lipidol. 9:319-324; Heinecke and Lusis (1998) Amer. J. Hum. Genet. 62:20-24)アテローム性硬化症の防御におけるPONの役割を部分的に説明できるかもしれない。Danskyおよび共同研究者らの最近の報告(Dansky et al.(1999) J. Clin. Invest. 104:31-39)では、アポE欠損マウスではPON活性を増加させることなくアポA - Iが過剰発現するという利点があることが提唱された。しかしながら、前記の研究で著者らが認めているように(上掲書)、彼らは実験を最初の8週間の生存期間に限定していた。Aviramと共同研究者らは、血清PON活性はアポE欠損マウスで3ヶ月齢後に減少し、これは大動脈の病変領域の増加と血清脂質の過酸化反応の増加と一致していると報告した(Aviram et al.(1998) J. Clin. Invest. 101:1581-1590)。Plumpと共同研究者らが調べたマウスは、AviramのデータがPON活性の減少を示したときに、4または6ヶ月齢で殺されていた(Plump et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9607-9611)。Danskyと共同研究者らは、動脈壁内の脂質の保持と内皮への単球の付着は8週齢では違いがないことを報告し、アポA - Iの利点は病変の発生のより遅い時期に限られると結論した(Dansky et al.(1999) J. Clin. Invest. 104:31-39)。Danskyと共同研究者ら(上掲書)は、単球の付着を測定せず、代わりにCD11a付着を測定したが、これは単球に固有ではないことは留意されるべきである。さらにまた、Danskyと共同研究者ら(上掲書)は、遺伝的に混合したバックグラ

ウンドをもつマウスを実験のほとんどで使用しており、さらに内皮下腔の単球/マクロファージを測定しなかった。我々のデータを基にすれば、アポA-Iの過剰発現は、PON活性のどのような変化とも無関係に、酸化に対するLDLの感受性を減少させるであろうと我々は予想する。しかしながら、我々は、アポA-I (アポA-IIではない) のマウスへの注射後6時間でPON活性の約20%の増加、およびアポA-Iのヒトへの輸液後6時間で同様な小さな増加を観察した。

【0094】

Sevanianと共同研究者らは、LDL中の酸化コレステロールレベルの増加を報告した (Sevanian et al.(1997) J. Lipid Res. 38:419-428)。“A-IアフターLDL”から抽出した中性脂質は“LDLアフターA-I”を酸化する動脈壁細胞の能力を復元することができないという我々の発見 (図5) は、Sevanianらの観察と一致している。“A-IアフターLDL”から抽出した脂肪酸分画における我々の結果 (図5A-Cおよび図6A-H) は、リノール酸およびアラキドン酸の代謝産物はまた、LDL“播種分子”として機能することを示している。図6A-Hは、“LDLアフターA-I”はなお検出可能なレベルの13-HPODEを含んでいることを示している。しかしながら、このレベルは、“LDLアフターA-I”がヒト動脈壁細胞によって酸化されることを許容するほど十分な量ではなかった (図3、図5、図7、図8および図9)。中性脂肪または脂肪酸分画のいずれかを“A-IアフターLDL”から“LDLアフターA-I”に工程にしたがって添加することによって動脈壁細胞によって酸化されるその能力が回復したので (図5)、我々は、酸化に必要な、“播種分子”について臨界閾値が存在するとの結論に達した。

【0095】

Stockerと共同研究者らは、アポA-IおよびアポA-IIはともに、特異的メチオニン残基の酸化を伴うメカニズムを介してコレステリルエステルヒドロペルオキシドを減少させることができることを示した (Garner et al.(1998) J. Biol. Chem. 273:6088-6095)。我々の実験では、アポA-Iだけがマウスに注射後LDLの酸化を低下させることができ、アポA-IIは低下させることができ

なかった(図8)。これらの結果は、我々の実験におけるアポA-Iの防御メカニズムはStockerとその共同研究者らによって調べられたメカニズム(Garner et al.(1998) J. Biol. Chem. 273:6088-6095)とは別個であることを示している。HDLは、アテローム性硬化症のリスクに対する反対の強力な予測物質であることを示した(Miller and Miller(1975) Lancet. 1(7897):16-19)。HDLは、輸液されたとき(Badimon et al.(1990) J. Clin. Invest. 85:1234-1241)、およびアポA-Iの過剰発現を伴うとき(Plump et al.(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9607-9611)、動物モデルでアテローム性硬化症を減少させることが示された。しかしながら、アポA-IIの過剰発現はアテローム性硬化症を増強することが示された(Castellani et al.(19__) J. Clin. Invest. 100:464-474; Warden et al.(1993) Science 261:469-472; Hedrick et al.(1993) J. Biol. Chem. 268:20676-20682)。本明細書で報告した実験は上記の公表された報告と一致し、アポA-IIではなくアポA-Iが“播種”分子を新しく単離されたLDLから除去できることを示している。

実施例2では、我々は、正常なHDLおよびその成分はまた、軽度に酸化されたLDLの生成における第二および第三の工程も抑制できることを示す証拠を提示する。

【0096】

実施例2：正常なHDLは軽度に酸化されたLDLの生成における3つの工程を抑制する - 工程2および3

本実施例では、アポA-I、アポA-I擬似体、またはHDL、パラオキシソナーゼによるヒト動脈壁細胞の処理によって、細胞はLDLを酸化できなくなった(しかしアポA-IIでは細胞はLDLを酸化できた)。13(S)-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸[13(S)-HPODE]および15(S)-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸[15(S)-HPETE]の添加は、1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(PAPC)およびコレステリルリノレートの両方の非酵素的酸化を劇的に強化した。モル基準では、13(S)-HPODEおよび15(S)-HPETEは、PAPCから生物学的に活性な酸化リン脂質(m/z 594、610および828

)を生成させるについて、過酸化水素よりも約2オーダー強力であった。精製パラオキシナーゼはこれら酸化リン脂質の生物学的活性を抑制した。冠状動脈疾患をもち血中脂質が正常な10人の患者(糖尿病ではなく、低脂肪血症の投薬を受けていない)のうち10人に由来するHDLが動脈壁細胞によるLDL酸化を抑制できず、さらに酸化PAPCの生物学的活性を抑制できなかったが、一方年齢および性別が一致する10人のコントロールでは10人のHDLが抑制することができた。

我々は以下のように結論した:(a)軽度に酸化されたLDLは3工程で形成され、各工程は正常なHDLによって抑制できる;さらに(b)正常な血中脂質レベルを有する少なくともいくらかの冠状動脈疾患患者は、動脈壁細胞によるLDL酸化を防止する能力および酸化PAPCの生物学的活性を抑制する能力の両能力において不完全である。

【0097】

序論

我々は、HDLは、ヒト動脈壁細胞共働培養にLDLと一緒に添加されたとき動脈壁細胞によるLDLの酸化を妨げ、アポA-Iは妨げないことを見出した。これらの実験では、アポA-Iは動脈壁細胞およびLDLと一緒に前記培養中で維持された(Navab et al.(1991) J. Clin. Invest. 88:2039-2046)。すぐ後で、ヒト動脈壁細胞による酸化に対してLDLを保護するHDLの能力のメカニズムの解明で、我々は、アポA-Iを細胞とともにインキュベートし、続いてLDLの添加前に除去するならば、動脈壁細胞は添加されたLDLを酸化することができないことを発見した。これによって、我々は、アポA-Iはコレステロールおよびリン脂質だけでなくおそらく酸化脂質も同様に細胞から除去することができるかもしれないと考えた。これらの予備的発見は我々に本実施例で詳述する実験のヒントを与えた。

【0098】

本実施例および実施例1で詳述する実験によって、我々は、軽度に酸化されたLDL中の生物学的に活性な脂質は一続きの3工程で形成されると提唱する。第一の工程は、コレステリルエステルヒドロペルオキシドと同様に、リノール酸お

よびアラキドン酸の代謝生成物と一緒にLDLが播種されることである。第一の工程の立証は実施例1に提示した。本実施例では、我々は、第二の工程（すなわち内皮下腔中へのLDLの捕捉および付近の動脈壁細胞に由来するさらに別の酸素種の前記捕捉LDLへの配布）に関する証拠を提示する。

【0099】

Stockerとその共同研究者らは、リポキシゲナーゼはコレステリルリノレートの過酸化反応を主に非酵素的酸化によって仲介することを示す間接的な証拠を提示した (Neuzil et al.(1998) *Biochem.*, 37:9203-9201; Upston et al.(1997) *J. Biol. Chem.*, 272:30067-30074)。我々は、コレステリルリノレートの非酵素的酸化は、13(S)-ヒドロペルオキシオクタデカジエン酸 [13(S)-HPODE] の存在によって顕著に強化されることを本実施例で示す。我々はまた、軽度に酸化されたLDL生成における第三の工程は、“播種分子”（例えば [13(S)-HPODE] および15-ヒドロペルオキシエイコサテトラエン酸 [15(S)-HPETE]）の臨界閾値がLDL中で達成されたときに生じるLDLリン脂質の非酵素的酸化であるということを本実施例で提唱する。我々は、これら“播種分子”が臨界レベルに達するとき、それらは主要なLDLリン脂質、1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (PAPC) の非酵素的酸化を引き起こすことを示す証拠を本実施例で提示する。前記非酵素的酸化は、3つの生物学的に活性な酸化リン脂質：1-パルミトイル-2-オキソバレリル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (POVPC, m/z 594)、1-パルミトイル-2-グルタリイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (PGPC, m/z 610)、および1-パルミトイル-2-(5,6-エポキシイソプロスタン E_2)-sn-グリセロ-3-ホスホコリン (PEIPC, m/z 828) の生成をもたらす (Watson (1999) *J. Biol. Chem.* 274:24787-24798; Watson (1997) *J. Biol. Chem.* 272:13597-13607)。本実施例の実験はまた、正常なHDLの場合と比較して、冠状動脈疾患患者で正常な血中脂質レベルを示し、さらに糖尿病でもなく低脂肪血症の投薬も受けていない患者から採取されたHDLはヒト動脈壁細胞による酸化からLDLを保護せず、さらに酸化PAPCの生物学的活性を抑制することができないことも示している。

【0100】

方法

材料

アラキドン酸類似体、5, 8, 11, 14-エイコサテトライノイック酸 (ETYA) はバイオモル (Biomol, Plymouth Meeting, PA) から入手した。コレステリルリノレートヒドロペルオキシド (CH₁₈:2:-COOH) 標準物質は、t-ブチルヒドロペルオキシドを用いてコレステリルリノレートの過酸化反応によって調製した。70%のt-ブチルヒドロペルオキシドを、100mgのコレステリルリノレートを含むクロロホルムおよびメタノール(2:1, v/v)に添加した。攪拌しながら室温で48時間過酸化反応を実施した後、脂質をFolchの方法 (Folch et al. (1957) J. Biol. Chem., 226:497-509) によって抽出し、逆相高処理液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) によって下記で述べるように分離した。他の全ての材料は、実施例1で述べた供給元から得られた。

【0101】

リポタンパク質、共働培養、単球の単離、単球走化性アッセイおよび単球付着アッセイ

これらは実施例1で述べたように調製および/または実施した。

患者および正常対象者

血液サンプルは、カリフォルニア大学ロサンゼルス分校保健科学センター心臓カテーテル挿入研究室 (cardiac catheterization laboratory, Center for Health Sciences, University of California, Los Angeles) に照会された患者から採取した。同大学のヒト研究対象保護委員会 (human research subject protection committee) によって承認された同意書式に署名した後、患者はヘパリン処理試験管に採取された絶食血液サンプルを提供した。LDLおよび/またはHDLは以下の条件の患者から採取した血液サンプルからFPLCによって単離した: 血管造影により冠状動脈アテローム性硬化症の証拠が認められるが、正常な総コレステロール (< 200 mg/dl)、LDL-コレステロール (< 130 mg/dl)、HDL-コレステロール (男性で > 45 mg/dl、女性で > 50 mg/dl)、およびトリグリセリド (< 150 mg/dl) を有し、低脂肪

血症の投薬を受けておらず、さらに糖尿病ではない患者。以前に我々が報告した数人の患者および数人のコントロールのデータ (Navab et al.(1997) J. Clin. Invest. 99:2005-2019) は、さらに別の新規なデータとともにここに含まれている。包含された先に報告した患者については、図の適切な説明文中に明瞭に示されている。HDLは各個体から単離し、先に報告したようにパラオキシナーゼ活性を測定した (Navab et al.(1997) J. Clin. Invest. 99:2005-2019)。ヒト動脈壁細胞培養による酸化からLDLを保護する、各対象者から得たHDLの能力は、先に報告した技術を用いて決定した (Navab et al.(1991) J. Clin. Invest. 88:2039-2046; Navab et al.(1997) J. Clin. Invest. 99:2005-2019)。ヒト動脈壁細胞による酸化からLDLを保護するHDLの能力をテストするために用いるLDLは正常なドナーから調製し、先に報告されたように (Rumsey et al.(1992) J. Lipid Res., 33:1551-1561)、小分けして凍結保存した。酸化リン脂質を不活化するHDLの受容力を決定するために、いくつかの事例では、M199中の10%LPDSを含む試験管中で100mg/mLの酸化PAPC (Navab et al.(1997) J. Clin. Invest. 99:2005-2019) を250µg/mLのHDLと37で穏やかに攪拌しながらインキュベートした。HDL-Ox-PAPC混合物を続いて内皮単層培養に添加し、単球の結合を調べた。

【0102】

アポA-Iによる13(S)-HPODEの除去に対する線維芽細胞中の15-リポオキシゲナーゼ(15-LO)の過剰発現の影響

ベクターのみをトランスフェクトした線維芽細胞、または15-LOを過剰発現している細胞は、Joe WitztumおよびPeter Reavenから提供された。本実験では、線維芽細胞は100µg/mLのアポA-Iの存在下または非存在下でインキュベートした。穏やかに攪拌しながら37で3時間インキュベートした後、培養上清を取り出し、FPLCによりアポA-Iを分離し、ヒドロペルオキシドレベルを培養上清の脂質抽出物およびアポA-Iの脂質抽出物で決定した。

【0103】

リポキシゲナーゼおよびシクロオキシゲナーゼ阻害物質の影響

10%のLPDSを含むM199中の 10^{-8} mol/Lの濃度のETYAまた

はシンナミル - 3 , 4 - ジヒドロキシ - シアノシナメート (CDC , ビオモル (Biomol) より入手) とともにヒト動脈壁共働培養を予備インキュベートした。続いて、前記共働培養を洗浄し、LDLを250 μ g / mLに加え、8時間インキュベートした。上清を取り出し、脂質ヒドロペルオキシドについてアッセイし、さらに単球走化性活性は実施例1で述べたように決定した。

【0104】

13(S) - HPODEまたは15(S) - HPETEまたは過酸化水素の添加によるPAPCから酸化リン脂質(POVPC、PGPCおよびPEIPC)の生成

13(S) - HPODEまたは15(S) - HPETEまたは担体のみを種々の濃度でPAPCに添加し、混合しさらに蒸発させて薄層を形成し、空气中で酸化させた。いくつかの実験では、PAPCを蒸発させて薄層を形成し、種々の濃度で過酸化水素を含む100 μ Lで空气中で酸化させた。サンプルをクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)で抽出し、過酸化水素の実験の場合は、クロロホルム/メタノール(2:1, v/v)5に対して水溶液1を添加して混合しさらに遠心した。クロロホルム相を採取し、陽イオンモードでESI - MSによって分析した。残存するPAPCのレベルおよび形成された酸化リン脂質を決定し、内部標準物質、1,2 - ジテトラデカノイル - rac - グリセロール - 3 - ホスホコリン (DPMC , m / z 678 . 3) との関連で表した。

【0105】

高速液体クロマトグラフィー (FPLC) および逆相高処理液体クロマトグラフィー (RP - HPLC)

高速液体クロマトグラフィー (FPLC) および逆相高処理液体クロマトグラフィー (RP - HPLC) は、実施例1で述べたように実施した。コレステリルリノレートヒドロペルオキシドの検出には、オールテックオールティマ (Alltech Alltima) 250 \times 4 . 6 mm , 5ミクロンRP - HPLCC18カラムを用いて分離し、コレステリルリノレートヒドロペルオキシドは234 nmで、コレステリルリノレートは205 nmで検出した。移動溶媒は、1 . 0 mL / 分でアセトニトリル / 2 - プロパノール / 水 (44 : 54 : 2 , v / v / v) から成る。

脂質は注入のために移動溶媒に再懸濁させた。

【0106】

エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS)

陽イオンまたは陰イオンモードでのエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) は、先に報告したプロトコルおよび条件に従って実施した (Watson (1999) J. Biol. Chem. 274:24787-24798; Watson (1997) J. Biol. Chem. 272:13597-13607)。ESI-MSは、API III triple-quadrupole生物分子質量分析装置 (Perkin-Elmer) で実施した。前記装置は、連結式の空気圧を利用する噴霧化プローブおよび大気圧イオン化ソースを備えている (Watson (1997) J. Biol. Chem. 272:13597-13607)。陽イオンフローインジェクション分析は、アセトニトリル/水/ギ酸 (50/50/0.1, v/v/v) を用いて実施し、陰イオンフローインジェクション分析は、10 mMの酢酸アンモニウムを含むメタノール/水 (50/50) を用いて実施した。定量分析には、1,2-ジテトラデカノイル-rac-グリセロール-3-ホスホコリン (DMPC) またはヘプタデカン酸を内部標準物質として用いた。イオンは、0.3 Daのステップサイズでスキャンした。データはPE Sciexが供給するソフトウェアにより処理した。

【0107】

他の方法

リポタンパク質のタンパク質含有量は、ロウリーのアッセイ (Lowry et al. (1951) J. Biol. Chem. 183:265-275) の変法 (Lorenzen and Kennedy (1993) Anal. Biochem. 214:346-348) によって決定した。脂質ヒドロペルオキシドレベルは、Auerbachらの報告 (Anal. Biochem., 201:375-380(1992)) したアッセイを用いて測定した。表示したいいくつかの実験では、動脈壁細胞共働培養によって酸化されたLDLを含む培養上清中の脂質は、クロロホルム-メタノールによって抽出し、ヒドロペルオキシドは、Auerbachの方法によって決定した。パラオキシナーゼ活性は、先に報告されたように (Gan et al. (1991) Drug Metab. Dispos. 19:100-106) 測定した。統計的有意差はモデル1 ANOVAによって決定した。この分析は、まず最初にEXCELアプリケーションでANOVAを用いて、グループの平均間に相違があるか否かを決定し、続いて適切な場合には対合スチ

ューデント t 検定を実施して顕著に異なる平均を特定した。有意差は $p < 0.01$ と規定される。

【0108】

結果

実施例 1 は、LDL は動脈壁細胞による LDL の酸化に必要な “播種分子” を含むことを示した。以前に我々は、新しく単離した LDL は内皮細胞への単球の付着を誘発せず、単球走化性も誘発しないが、一方、軽度に酸化した LDL は両方を誘発することを報告した (Navab et al. (1991) J. Clin. Invest. 88:2039-2046; Berliner et al. (1990) J. Clin. Invest. 85:1260-1266)。単球の付着および走化性を誘発する軽度に酸化された LDL の能力は、前記軽度に酸化された LDL 中に特徴的な M/Z 比 (m/z 594, 610 および 828) を有する 3 つの酸化リン脂質が存在することによる (Watson (1999) J. Biol. Chem. 274:24787-24798; Watson (1997) J. Biol. Chem. 272:13597-13607)。我々は、新しく単離した LDL にはこれら酸化リン脂質の形跡を認めなかった (データは示されていない)。したがって、我々は以下のように結論した：これら “播種分子” のレベルは臨界閾値未満であるためか、または、別の新たな異なる “播種分子” が生物学的に活性な酸化リン脂質の生成に要求されるために、新しく単離された LDL 中の “播種分子” はそれらだけでは 3 つの生物学的に活性な酸化リン脂質を生じるには不十分である。したがって、我々は、軽度に酸化された LDL の生成には、最初の “播種” 以外に少なくとも 1 つの他の工程が必要であると結論した。

【0109】

工程 2

アポ A - I はヒト動脈壁細胞が LDL を酸化できないようにするが、アポ A - II はしない

以前に我々は、ヒト動脈壁細胞とアポ A - I および LDL との同時インキュベーションは、動脈壁細胞による酸化から LDL を保護しないことを報告した (Navab et al. (1991) J. Clin. Invest. 88:2039-2046)。図 11 に示したように、これらの結果は確認された (同時インキュベーション A - I を擬似処理培養と比

較)。しかしながら、ヒト動脈壁共働培養を先ずアポA - Iとインキュベートし、続いてアポA - IをLDL添加前に前記共働培養から取り出したとき(A - I後培養)、動脈壁細胞はLDLを酸化できず(図11A)、さらに単球走化性も防止しなかった(図11B)。アポA - Iの場合とは対照的に、培養を先ずアポA - I Iとインキュベートし、続いてアポA - I Iを取り出したとき、この動脈壁共働培養はLDLを酸化するその能力を保持しており(図11A)、さらに単球の走化性も誘発した(図11B)(A - I I後培養)。

【0110】

別の実験では、アポA - Iを第一の共働培養セットとインキュベートし、続いて第一の共働培養セットからアポA - Iを取り出し、同一処理を施した第二の共働培養セットに添加した(すなわち第二の共働培養セットはアポA - Iで処理され、続いてアポA - Iは除去されている)。LDLをこの第二の共働培養セット(第一の共働培養セットに由来するアポA - Iを含んでいる)に添加したとき、これら再構成された共働培養はLDLを容易に酸化し(図11A)、さらに単球走化性を誘発した(図11B)(A - I培養+培養後A - I)。

【0111】

同様な実験をアポA - I Iを用いて実施した。アポA - I Iを第一の共働培養セットとインキュベートし、続いて第一の共働培養セットからアポA - I Iを取り出し、同一処理を施した第二の共働培養セットに添加した(すなわち第二の共働培養セットはアポA - I Iで処理され、続いてこのアポA - I Iは除去されている)。LDLをこの第二の共働培養セット(第一の共働培養セットに由来するアポA - I Iを含んでいる)に添加したとき、動脈壁細胞によるLDL酸化は顕著に増加し(図11A)、さらにLDL誘発単球走化性も顕著に増加した(図11B)(A - I I後共働培養+培養後A - I I)。

【0112】

LDL酸化およびLDL誘発単球走化性のアポA - Iによる低下は、アポA - Iが前記細胞とのインキュベーション後およびLDL添加前に取り出されることが必要であるので(A - I後培養を同時インキュベーションA - Iと比較)、我々は、アポA - Iは、LDLが共働培養によって酸化されるために必要で、さら

に単球走化性を誘発するために必要な物質を動脈壁細胞共働培養から除去したと結論した。我々はまた、アポA - I IはLDL酸化およびLDL誘発単球走化性を低下させることはできず(A - I I後培養をA - I後培養と比較)、実際のところこれらを強化すると結論した。

【0113】

同様な結果が、共働培養をアポA - Iペプチド擬似体で処理したときに得られた(図12)。共働培養を、アポA - Iペプチド擬似体37pAの存在下または非存在下でインキュベートし、続いて、前記ペプチドをLDLの添加前に取り出した。別の共働培養をコントロールペプチド40Pとインキュベートした。LDLの添加前に取り出したアポA - Iペプチド擬似体37pAとインキュベートした共働培養は、添加したLDLを酸化できず(図12A)、さらに単球の走化性も誘発しなかった(図12B)。共働培養をコントロールペプチド40Pで処理したときは上記のようではなかった。コントロールペプチド40Pで処理した後、LDLは、擬似処理共働培養と同程度に共働培養によって酸化され(図12A)、さらに単球走化性を誘発した(図12B)。我々は、アポA - Iペプチド擬似体37pAは、LDLが共働培養によって酸化されるために必要であり、さらに単球走化性を誘発するために必要な物質を動脈壁細胞から除去したと結論した。

【0114】

HD LまたはHD L結合酵素はヒト動脈壁細胞がLD Lを酸化する能力を不能にする

我々はまた、完全なHD Lおよびその結合酵素パラオキシナーゼ(PON)が、LDLを酸化する動脈壁細胞の能力を変化させることができるか否かを調べた。動脈壁細胞共働培養をHD Lまたは精製PONとインキュベートし、続いてこれらを前記共働培養にLDLを添加する前に取り出した。これら2つのどちらで動脈壁細胞を処理しても、動脈壁細胞はLDLを酸化できなくなり(図13A)、さらにLDL - 誘発単球走化性も防止した(図13B)。我々は、アポA - Iの他に、HD LおよびPONもヒト動脈壁細胞がLDLを酸化するのを妨げ、さらに単球走化性を誘発するのを防止すると結論した。

【0115】

リノール酸はヒト動脈壁細胞のLDL酸化を刺激するが、オレイン酸は刺激しない

上記に記載したように、我々は、軽度に酸化されているLDL中の“播種分子”は、単球の走化性を誘発する3つの生物学的に活性なリン脂質を生成するためにはそれだけでは不十分であると結論した。我々は、その理由を、これら“播種分子”のレベルが臨界閾値未満であるためか、またはさらに別の“播種分子”が生物学的に活性な酸化リン脂質をLDL中に生成させるために必要であるためと仮説をたてた。我々は、同じ“播種分子”が酸化リン脂質を生成し、したがって単球走化性を生じるために何らかの閾値が存在するならば、さらにこれら“播種分子”がリノール酸の代謝産物に部分的に由来するならば、ヒト動脈壁共働培養のリノール酸を豊富にすることによって、そのLDL酸化能力を強化し、単球走化性を誘発できると推論した。それゆえ、我々はヒト動脈壁共働培養をリノール酸(C18:2)またはリノール酸(C18:1)の存在下または非存在下でインキュベートし、前記細胞を洗浄し、さらに脂肪酸を補充していない新しい培養液中で37℃で3時間インキュベートすることによって前記脂肪酸をこれらの細胞に代謝させた。その後、これらヒト動脈壁細胞共働培養がLDLを酸化する能力および単球走化性を誘発する能力をテストした(図14A、図14Bおよび図14C)。動脈壁細胞をリノール酸とインキュベートすることによって、オレイン酸と比較して動脈壁細胞の酸化能力(図14A)および単球走化性の誘発能力は顕著に強化された。別の実験では、共働培養をLDLの非存在下で、リノール酸(C18:2)とともに(+)またはリノール酸(C18:2)無しに(-)インキュベートし、さらに細胞を洗浄してからアポA-Iの存在下または非存在下でインキュベートした(図14C)。上清を取り出し、FPLCでアポA-Iを分離し、脂質をアポA-Iから抽出した。アポA-I非存在下でインキュベートした培養上清の脂質抽出物もまた作製した。共働培養をリノール酸とインキュベートすることによって、アポA-Iの脂質抽出物中の13-HPODE同等物は顕著に増加した(図14C)(C18:2とインキュベートした細胞のアポA-I脂質抽出物をC18:2の非存在下でインキュベートした細胞のアポA-I

脂質抽出物と比較)。我々は、ヒト動脈壁細胞をリノール酸とインキュベートすることによって、アポA-Iによって除去できる細胞の脂質ヒドロペルオキシド(すなわち13-HPODE同等物)の生成は顕著に強化されると結論した。我々はさらに、ヒト動脈壁細胞とリノール酸とのインキュベーションは、動脈壁細胞によるLDLの酸化を刺激し、さらにLDL誘発単球走化性を刺激し、オレイン酸では刺激されないと結論した。別の実験では、図14Aから図14Cで述べた実験をアラキドン酸で実施した。その結果は、アラキドン酸は、動脈壁によるLDL酸化の刺激においてリノール酸よりもさらに強力であることを示した(データは示されていない)。

【0116】

リポキシゲナーゼ経路の役割に関する更なる証拠

Jackson & Parthasarathyは、LDLの“播種”におけるリポキシゲナーゼ(LO)の役割を提唱し(Thomas & Jackson (1991) J. Pharmacol. Exp. Therap. 256:1182-1181; Parthasarathy (1994) Modified Lipoproteins in the Pathogenesis of Atherosclerosis. Austin, TX; R.G. Landes Co. pp.91-119)、さらにSigariと共同研究者らは、15-LOを過剰発現している線維芽細胞は、ベクターのみをトランスフェクトされた線維芽細胞よりも容易にLDLを酸化することを示した(Sigari et al.(1997) Arterioscler. Thromb. Vascul. Biol. 17:3639-3645)。LO経路の脂質ヒドロペルオキシド生成物を細胞から除去するアポA-Iの能力をさらに確立させるために、我々は、LOを過剰発現している線維芽細胞およびベクターのみをトランスフェクトした細胞を、上記で述べたようにアポA-I存在下およびアポA-I非存在下でインキュベートした。上清を取り出し、アポA-IをFPLCによって分離し、脂質をアポA-Iから抽出した。アポA-Iの非存在下でインキュベートした培養上清の脂質抽出物もまた調製した。アポA-Iを添加されなかった、LOを過剰発現している細胞の上清の脂質抽出物は、コントロール細胞と比較して極くわずが多い13-HPODE同等物を含んでいた(データは示されていない)。対照的に、LOを過剰発現している細胞とインキュベートしたアポA-Iの脂質抽出物は、コントロール細胞とインキュベートしたアポA-Iの脂質抽出物よりも顕著に多い(5.1倍以上)13

- HPODE 同等物を含んでいた (データは示されていない)。

【0117】

方法の項で述べたように、LDLの添加の前に、リポキシゲナーゼ/シクロオキシゲナーゼ阻害物質ETYA ($1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$) で共働培養を予備処理したとき、脂質ヒドロペルオキシドレベルは $80 \pm 7\%$ 低下し、LDL 誘発単球走化性活性は $75 \pm 10\%$ 低下した ($p < 0.008$ 、データは示されていない)。方法の項で述べたように、LDLの添加前にリポキシゲナーゼ阻害物質CDC ($1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$) でヒト動脈壁共働培養を予備処理したとき、脂質ヒドロペルオキシドレベルは $73 \pm 6\%$ 低下し、LDL 誘発単球走化性活性は $74 \pm 11\%$ 低下した ($p < 0.01$ 、データは示されていない)。

【0118】

総合すれば、これらの実験は、動脈壁細胞は、“播種された” LDLの酸化に必須の反応性酸素種 (リノール酸およびアラキドン酸の代謝に由来するものを含む) を生成することを示唆している。これらの実験はまた、HDL、アポA-I およびPONはこれらの物質を除去または破壊することができ、さらに “播種された” LDLを動脈壁細胞が酸化できなくすることを提唱している。我々はまた以下の仮説を提唱する：動脈壁細胞によってさらに別の反応性酸素種が、“播種された” LDLに添加されてLDL中の臨界レベルが達成されるとき、主要なLDLリン脂質PAPCの非酵素的酸化は、単球結合および走化性を誘発する、3つの生物学的に活性なリン脂質 (POVPC、PGPCおよびPEIPV) の生成をもたらす。

【0119】

工程3

13(S) - HPODEおよび15(S) - HPETEはPAPCおよびコレステリルリノレートの酸化を強化する

以前に我々は、PAPCが空気に48時間曝された場合、自己酸化を受けて3つの生物学的に活性なリン脂質、POVPC、PGPCおよびPEIPCを生成することを報告した (Watson (1999) J. Biol. Chem. 274:24787-24798; Watson (1997) J. Biol. Chem. 272:13597-13607)。リポキシゲナーゼ経路の生成物が

、初期の循環LDLの“播種”および、PAPCの非酵素的酸化を惹起する臨界閾値に到達するために必要な動脈壁細胞による後期のLDL“播種”の両方に必要であるならば、リポキシゲナーゼ経路の生成物のPAPCへの添加は前記3つの生物学的に活性なリン脂質(POVPC、PGPCおよびPEIPC)の生成を増加させるはずである。この仮説を調べるために、我々は、PAPCから生成される3つの生物学的に活性な酸化リン脂質を時間の関数として測定した。図15Aから図15Cに示したように、1.0 μgの13(S)-HPODEの10 μgのPAPCへの添加は、標本抽出した各時点で3つの生物学的に活性な酸化リン脂質の生成を強化した(POVPC, m/z 594, 図15A; PGPC, m/z 610, 図15B; PEIPC, m/z 828, 図15C)。

【0120】

図16Aのデータは、わずかに0.5 μgの13(S)-PODEを10 μgのPAPCに8時間添加したとき、PAPC(m/z 782)の相対量は顕著に減少し、3つの生物学的に活性な酸化リン脂質(m/z 594, 610および828)の生成は顕著に強化されたことを示している。図16Bは、わずかに0.5 μgの15(S)-HPETEを10 μgのPAPCに8時間添加したとき、PAPC(m/z 782)の相対量は顕著に減少し、3つの生物学的に活性な酸化リン脂質(m/z 594, 610および828)の生成は顕著に強化されたことを示している。

【0121】

図16Cは、10 μgのPAPCに8時間添加された8 mMの過酸化水素は、PAPCの相対量を顕著に減少させ、生物学的に活性な酸化リン脂質の生成を顕著に強化したが、一方、2 mMおよび4 mMの過酸化水素は効果がないことを示している。PAPCの分子量は782であるので、過酸化水素によるPAPCの酸化強化に必要なモル比は、図16Cで示した実験では約62:1(H₂O₂:PAPC)であった。13(S)-HPODE 15の分子量は311で、(S)-HPETEの分子量は336.5であるので、これらのリポキシゲナーゼ経路の生成物がPAPCの酸化を促進したモル比は約1.8である。したがって、モル基準では、PAPCを酸化する13(S)-HPODE 15および(S)-HP

E T E の能力は、前記の条件下では過酸化水素のそれよりも2オーダー高い。これらのデータを総合すれば、それぞれリノール酸およびアラキドン酸代謝の生成物、13(S)-HPODE15および(S)-HPETEは、強力な酸化剤として機能しPAPCの非酵素的酸化を促進して、軽度に酸化されたLDLで見出される3つの生物学的に活性なリン脂質を生じる。

【0122】

Stockerおよび共同研究者らは、コレステリルリノレートのリポキシゲナーゼ仲介酸化は、主にリポキシゲナーゼ経路の生成物を必要とする非酵素的過程によって仲介されることを示唆する間接的証拠を提示した (Neuzil et al.(1998) Biochem. 37:9203-9210; Upston et al.(1997) J. Biol. Chem. 272:30067-30074)。図17の実験は、13(S)-HPODEの存在は、コレステリルリノレートヒドロペルオキシド($Ch_{18:2}-OOH$)の非酵素的生成を顕著に刺激することを示している。

【0123】

パラオキシナーゼは、3つの酸化リン脂質、m/z 594、610および828の生物学的活性を破壊する

以前に我々は、抗酸化剤およびHDLは生物学的に活性な軽度に酸化されたLDLの生成を防止することができるが、いったん生成されたHDLおよび抗酸化剤は軽度に酸化されたLDLの生物活性を減少させることはできないことを報告した (Navab et al.(1991) J. Clin. Invest. 88:2039-2046)。これらの実験では、上記で報告した実験(その場合HDLは、LDLが共働培養に添加される前に前記共働培養に添加された)とは対照的に、我々はHDLをLDLと一緒に共働培養に添加した。別の実験では、我々は、PAF-AHがLDLと細胞添加前にインキュベートされる場合は、前記酵素は軽度に酸化されたLDLの生物学的活性を破壊できることを報告した (Watson et al.(1995) J. Clin. Invest. 96:2882-2891)。これらの実験は、特定の酸化リン脂質ではなく(すなわち酸化PAPCまたはPOVPC、PGPC、PEIPC)軽度に酸化されたLDLを用いて実施した。パラオキシナーゼが前記3つの酸化リン脂質の各々の生物学的活性を破壊する能力を直接調べるために、我々は、方法の項で述べたように、酸化P

A P C (O x - P A P C) または P O V P C , m / z 5 9 4 ; P G P C , m / z 6 1 0 ; または P E I P C , m / z 8 2 8 を精製パラオキシナーゼの存在下または非存在下でインキュベートした。酵素を前記混合物から分離し、混成物をヒトの動脈壁共働培養に添加した。O x - P A P C または P O V P C , m / z 5 9 4 ; P G P C , m / z 6 1 0 ; または P E I P C , m / z 8 2 8 を精製パラオキシナーゼとインキュベートし、続いて動脈壁細胞共働培養に提供する前に前記混合物からパラオキシナーゼを分離した。各々の生物学的活性の破壊、すなわち単球走化性を誘発する能力の低下がもたらされた。(図 1 8)。2 つの変異体リコンビナント P O N 調製物 (Robert Sorenson および Bert N. La Du から提供された (Sorenson et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:7187-7191)) は、このアッセイ系では生物学的に活性なリン脂質を不活化することはできなかった (データは示されていない)。1 0 0 で沸騰させて不活化した P O N は、酸化リン脂質の活性に対して影響を示さなかった (データは示されていない)。

【 0 1 2 4 】

冠状動脈疾患を有し、正常な血中脂質レベルを有し、糖尿病でもなく低脂肪血症の投薬も受けていない患者の H D L は、動脈壁細胞による L D L の酸化を防止することができず、酸化 P A P C の生物学的活性を破壊することもできない

我々は、血管造影によって冠状動脈疾患と確認された 2 5 0 人以上の患者のスクリーニング後に、正常な血中脂質レベルを有し、糖尿病ではないにもかかわらず冠状動脈疾患が血管造影により確認された 1 4 人の患者を特定した (Navab et al. (1997) J. Clin. Invest. 99:2005-2019)。これら 1 4 人は、年齢および性別が適合する 1 9 人のコントロールと比較して、正常な H D L - コレステロールを有するにもかかわらず、平均してより低いレベルのパラオキシナーゼ活性を有していた (上掲書)。しかしながら、患者のパラオキシナーゼ活性と正常コントロールとの間の相違は統計的有意差には達しなかった (上掲書)。さらに我々は、正常な脂質レベルを有し (すなわち、総コレステロール < 2 0 0 m g / d l 、 L D L - コレステロール < 1 3 0 m g / d l 、 H D L - コレステロール > 4 5 m g / d l (男性) および > 5 0 m g / d l (女性)、トリグリセリド < 1 5 0 m g / d l)、血管造影により冠状動脈疾患が確認され、糖尿病ではなく低脂肪

血症の投薬も受けていない、さらに10人の患者を特定した。以前に報告したデータと新しいデータを合わせて、患者(n=24)およびコントロール(n=29)との間のパラオキシナーゼ活性において今や統計的に有意差が認められた(図19A)。

【0125】

以前には、我々の共働培養系をテストするために十分なサンプルは、最初の14人の患者のうち5人からしか得ることができなかった(Navab et al.(1997) J. Clin. Invest. 99:2005-2019)。これら5人のHDLは、ヒト動脈壁共働培養系でLDL誘発単球走化性活性を防御せず、一方コントロールの4人は防御したことを報告した。我々の現在の実験では、血管造影では冠状動脈疾患を有する血中脂肪は正常な、糖尿病でもなく低脂肪血症の投薬も受けていないさらに別の10人からHDLが得られた。これら10人の患者および年齢と性別が適合する正常対象者のコントロールLDL(すなわち、1人の正常対象者から得られたLDLで、これは全ての実験で用いられた)の酸化を変化させるHDLの能力は図19Bに示されている。図19Bに示したように、前記患者10人のうち10人から採取されたHDLは、ヒト動脈壁細胞による酸化に対してコントロールLDLを防御しなかった。実際のところ、患者のHDLは、平均してコントロールLDLの酸化を増強し、年齢と性別が適合する10人の正常対象者のうち10人のHDLは、コントロールLDLの動脈壁細胞による酸化を顕著に低下させた。

【0126】

以前に報告した5人の患者および年齢と性別が適合する4人の正常対象者の単球走化性に関するデータに10人の新しい患者および10人の正常対象者のそれを加えて、共働培養系で今やテストが完了した合計15人の患者および14人の正常対象者が得られた。図19Cに示した実験では、これら患者15人のうち15人のHDLはLDL誘発単球走化性活性を防御できなかったが、一方、14人のコントロールのうち14人が防御できるHDLを有していた。

以前には、我々は、この患者サブセットから得たHDLの酸化PAPCの生物学的活性を破壊する能力について直接テストすることはできなかった。図19Dは、患者(以前に報告されなかった者)は、酸化PAPCの生物学的活性を抑制

できないHDLを有していることを示している(10人の患者のうち10人が酸化PAPCの生物学的活性を抑制しないHDLを有していた)。実際のところ、10人の患者のHDLは、HAECへのOx-PAPC誘発単球付着を平均して増強させた。対照的に、10人の年齢と性別が適合する正常対象者のうち10人のHDLは、HAECへの単球付着を誘発するOx-PAPCの能力を顕著に低下させた。これらのデータを総合すれば、冠状動脈疾患をもつこの患者サブセットのHDLは、これら患者の正常な血漿HDL-コレステロールレベルにもかかわらず不完全のように思われる。

【0127】

考察

我々は、アポA-IおよびアポA-I擬似体はヒト動脈壁細胞に直接作用し、LDLを酸化するそれらの能力に重要な影響を与えることができることを本実施例で示した(図11および図12)。対照的に、アポA-IIは、ヒト動脈壁細胞がLDLを酸化するのを防ぐことができなかった(図11)。LDLの場合と同様に(実施例1を参照されたい)、ヒト動脈壁細胞をHDLまたはPONで処理することによって、動脈壁細胞はLDLを酸化することができなくなった(図13)。これらの実験は、HDLおよびその結合酵素はヒト動脈壁細胞がさらに新たな反応性酸素種を提供するのを抑制することができることを示している(前記反応性酸素種は、PAPCが酸化して生物学的に活性なリン脂質を生じるために必要な臨界閾値に循環LDLが到達するために必要である)。

【0128】

本実施例のデータは、軽度酸化されたLDL生成の第二の工程における、動脈壁細胞中のリポゲナーゼ経路の生成物の役割を支持し、さらに12/15-リポキシゲナーゼ遺伝子の破壊はアポE欠損マウスでアテローム性硬化症を減少させるというCyrusらの最近の発見(Cyrus et al.(1999) J. Clin. Invest., 103: 1597-1604)と一致する。彼らは、いくつかのメカニズムが彼らの発見を説明できると結論したが、以下の1つのメカニズムを支持した：“リポキシゲナーゼ由来ヒドロキシペルオキシドまたは二次的反応性脂質種は細胞膜を通過して移され、細胞外LDLを“播種”し、このLDLは脂質過酸化反応を促進させることが

できる多様なメカニズムにより感受性になるであろう”。

【0129】

3つの生物学的に活性なリン脂質(POVPC、PGPCおよびPEIPC)を生成するPAPCの非酵素的酸化は、13-HPODEおよび15-HPETEによって極めて強化された(図15および図16)。実際、PAPCを酸化してこれら3つの生物学的に活性なリン脂質を生じる13-HPODEおよび15-HPETEの能力は、過酸化水素のそれよりも2オーダー以上強力であった(図16)。これらの結果は、LDLを酸化するために必要な過酸化水素の量は、LDLを酸化する内皮細胞によって生成されるものより2オーダー大きいというMontgomery, Nathan & Cohnの発見と一致する(Montgomery et al.(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6631-6635)。コレステリルリノレートヒドロペルオキシド(C18:2-OOH)の非酵素的生成を刺激する13-HPODEの能力は、Stockerと共同研究者らの結果と一致し(Neuzil et al.(1998) Biochem. 37:9203-9210; Upston et al.(1997) J. Biol. Chem. 272:30067-30074)、さらに、Cyrusら(Cyrus et al.(1999) J. Clin. Invest. 103:1597-1604)の仮説のように、リポキシゲナーゼ経路の生成物は、多様な酸化脂質の生成にとって中核的なものであるかもしれないということを示唆する。

【0130】

Stockerと共同研究者らはまた、アポA-IおよびアポA-IIは、固有のメチオニン残基の酸化を必要とするメカニズムを介してコレステリルエステルヒドロペルオキシドを減少させることができることを示した(Garner et al.(1998) J. Biol. Chem. 273:6088-6095)。我々の実験では、アポA-IIではなくアポA-Iのみがマウスに注射した後LDLの酸化を減少させることができた(実施例1を参照されたい)。さらにまた、アポA-IのみがLDLを酸化するヒト動脈壁細胞の能力を減少させることができ、アポA-IIはできなかった(実施例11)。

Ox-PAPCおよびその成分(POVPC、PGPCおよびPEIPC)の生物学的活性はPON(図18)および正常なHDLによって破壊されるが、正常な血中HDL-コレステロールレベルにもかかわらず血管造影ではアテローム

性硬化症であることが確認された患者のHDLでは破壊されない(図19参照)ということは、HDLの異常性が、この比較的稀な患者亜群では少なくとも部分的にはアテローム性硬化症の原因であろうと提唱させる。アテローム性硬化症の発症におけるPONの役割は、先ずMacknessとDurringtonの実験によって提唱され(Mackness et al.(1998) FEBS Let., 423:57-60; Ayub et al.(1999) Arterioscler. Thromb Vascul. Biol. 19:330-335)、さらに我々を含む多数の研究室の実験によって支持された(Shih et al.(1996) J. Clin. Invest. 97:1630-1639; Shih et al.(1998) Nature 394:284-287; Castellani et al.(1997) J. Clin. Invest. 100:464-474)。本実施例で我々は、冠状動脈疾患をもち、糖尿病ではなく低脂肪血症の投薬を受けていない血中脂質が正常な患者は、年齢および性別が適合する正常対象者と比較して極めて低いPON活性レベルを有することを報告した(図19A)。しかしながら、患者と正常対象者のPON活性にはオーバーラップがあった。対照的に、10人の患者のうち10人のHDLは、ヒト動脈壁細胞による酸化に対してコントロールLDLを保護することができず(図19B)、さらに酸化PAPCの生物学的活性を抑制することもできなかったが、一方、年齢および性別が適合する10人の正常対象者のうち10人のHDLはできた。これらの発見によって、我々は、患者とコントロールHDLの相違はPON活性の相違によっては完全に説明することができないと考えた。

【0131】

本実施例および実施例1で提示したデータは、軽度に酸化されたLDLを生成させる3工程プロセスにおける各工程および全工程を調節するHDLおよびその成分、アポA-IおよびPONの役割を示した(これは図20に示されている)。軽度に酸化されたLDLの生成のメカニズム、並びに軽度に酸化されたLDL生成の防止およびその生物学的活性抑制におけるHDLおよびその成分の役割を理解することによって、アテローム性硬化症およびこの炎症性過程から生じる臨床症状の予防および治療のための新規な治療手段が提供されるであろう。

【0132】

実施例2

HDLのイムノアフィニティスクリーニング

ここで述べるアッセイでは以下の材料およびプロトコルを用いた：

材料とプロトコル

抗ヒトアポA - I - セファロース4 B ビーズの調製

材料

抗ヒトアポA - I - セファロース4 B ビーズの調製では、以下の装置および材料を用いた：臭化シアン活性化セファロース4 B、1 mM HCl、抗ヒトアポA - I (Roche/BM)、カップリング緩衝液 (500 mM NaCl、100 mM NaHCO₃ (pH 8.3))、ラブクェイク (ミキサー) および4 冷蔵庫、封鎖緩衝液0.2 Mグリシン (pH 8.0) (0.7507 g / 50 mL + TRIS 数グレイン)、酢酸 (0.1 M) 洗浄緩衝液、0.5 M NaCl, pH 4.0 (1.36 gの酢酸ナトリウム、2.9 gのNaCl、酢酸でpH 4にし、2回蒸留水で100 mLにする)、および遠心機。

【0133】

プロトコル

1.35 gのC9142シグマ臭化シアン活性化セファロース4 Bを1 mMのHCl 45 mLと一緒にし、15分膨潤させ (約4.7 mLの膨潤ビーズ)、続いて300 mLの1 mM HClで洗浄した。カップリング緩衝液を4.5 mLまで添加し、20 µLの抗ヒトアポA - Iを加えた。カップリング緩衝液中で洗浄ビーズおよび抗体を一緒にし、ひっくり返しながら4 で一晩インキュベートした。ビーズを遠心し (250 × gで5分)、上清を吸引で除いた。残存する部位を10倍容積の0.2 Mグリシンを加え、室温で2時間攪拌して封鎖した。

焼結ガラスフィルター上でビーズを洗浄することによって封鎖緩衝液を除去した。ビーズをカップリング緩衝液で、続いて酢酸緩衝液で、さらにカップリング緩衝液で洗浄した。前記洗浄サイクルをさらに4回繰り返して未結合タンパク質を除去した。続いてビーズを0.015 M食塩水、20 mM TRIS、0.02 % NaN₃ (pH 7.4) に再懸濁し、4 で保存した。

【0134】

抗アポA - Iアフィニティー免疫吸着によって濃縮したHDLのDCFアッセイ

材料

ここで述べるDCFアッセイでは以下の材料を用いる：DCF（新しく開栓した脱気メタノール（遮光して-20℃で保存）5.0 mL中の10 mgのH₂DCFDA（D-399, Molecular Probes, OR）、凍結バイアル、ミキサー、37℃インキュベーター、抗アポA-Iセファロース4B（上記でのべたとおり）、FPLC緩衝液、蛍光読取装置およびプレート、血漿サンプル、および血漿標準物（HDL、血漿）。

【0135】

プロトコル

血漿およびセファロースビーズを一緒にし（最終容積2.0 mLのアフィニティー抗アポA-Iでは1.0 mLのパックゲルにつき200 μLのヒト血漿）、0.15 Mのトリス/食塩水（pH 7.4）+ 0.02% NaN₃中で4℃で一晩ひっくり返しながらいんキュベートする。ビーズ+血漿を0.015 Mトリス, 0.5 M塩化ナトリウム（pH 7.4）で15 mLに希釈し、1500 rpmで5分室温で遠心することによって洗浄を実施する。ビーズをFPLC緩衝液に2.0 mLの最終容積（50%パックビーズ）に最懸濁する。10 μL（20 μg）のDCFストック溶液をハミルトン注射筒を用いてブランクを除く各凍結バイアルに分注しDCFをアルゴン下で蒸発させた。

DCFを含む凍結バイアルに表1に示すビーズ希釈シリーズを作製し、ボルテックスミキサーで攪拌する。

表1：アッセイ用希釈シリーズ

処置	希釈
1	1.0 mL ビーズ（50%パック容積）
2	500 μL ビーズ+ 500 μL 緩衝液
3	250 μL ビーズ+ 75 μL 緩衝液
4	125 μL ビーズ+ 875 μL 緩衝液
5	63 μL ビーズ+ 937 μL 緩衝液
6	32 μL ビーズ+ 968 μL 緩衝液
7	16 μL ビーズ+ 984 μL 緩衝液
血漿標準物	1.3 μLの血漿+ 968 μLの緩衝液をDCF処理

バイアルに添加

HDL標準物質 25 - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のコレステロールおよび
QS緩衝液を混合して1.0 mLにしDCF処理

バイアルに添加

ブランク 未処理バイアル(DCFなし)に1.0 mLの緩衝液

50 μL を広先端チップを用いてプレートに移す。プレートを穏やかに攪拌しながら37℃で4時間インキュベートする。0、1、2および4時間でプレートを読み取る。データはブランクを差し引いて読み取る。血清およびHDLコントロールで蛍光の阻害があるはずである。

【0136】

イムノアフィニティーによるHDLの単離

HDLの主要タンパク質アポA-Iに対するポリクローナル抗体を臭化シアン活性化セファロース4Bビーズに結合させた。正常なヒト血漿(200 μL)を0.15 Mトリス/食塩水(pH 7.4) + 0.02% NaN_3 中の1.0 mLのパックしたアポA-I-セファロースビーズに添加し、室温で2時間混合した。続いてビーズと血漿を15 mLに希釈し1500 rpmで5分室温で遠心してペレットにすることにより、この混合物を0.015 Mトリス、0.5 M塩化ナトリウム(pH 7.4)で洗浄した。ペレットを通常の食塩水に2.0 mLの最終溶液(50%のパックビーズ)に再懸濁した。部分標本を小さなカラムに充填し、HDLをpH = 2.0の緩衝液を用いて溶出させた。このHDLをSDS-PAGEに付し、続いてクマシービリリアントブルーで染色した(図21)。分子量マーカーの他に、出発血漿およびイムノアフィニティー精製HDL、市販の精製アポA-Iを含めた。

【0137】

DCF蛍光の増加の抑制

HDLの主要タンパク質アポA-Iに対するポリクローナル抗体を臭化シアン活性化セファロース4Bビーズに結合させた。正常なヒト血漿(200 μL)を0.15 Mトリス/食塩水(pH 7.4) + 0.02% NaN_3 中の1.0 mLのパックしたアポA-I-セファロースビーズに添加し、室温で2時間混合した。

続いてビーズと血漿を15 mLに希釈し1500 rpmで5分室温で遠心してペレットにすることにより、この混合物を0.015 M トリス、0.5 M 塩化ナトリウム (pH 7.4) で洗浄した。ペレットを通常の食塩水に2.0 mLの最終溶液(50%のパックビーズ)に再懸濁した。DCFを凍結バイアルに分注し(20 µgを含む10 µL)、アルゴン下で蒸発させた。パルミトリル-アラキドノイル-ホスホリルコリン(PAPC)を20 µg/試験管で、13(S)ヒドロペルオキシジデカエン酸(13(S)HPODE)を1.0 µg/試験管で添加し、アルゴン下で蒸発させた。続いてある範囲の濃度のHDL結合セファロースビーズを添加するか、または緩衝液のみで処理したビーズを添加した。蛍光は室温で4時間インキュベートした後読み取った。データはサンプル(×3)の平均値±SDである(図22)。

本明細書に記載した実施例および実施態様は例示を目的としており、前記の例示を参考にその多様な改変または変更が当業者によりを提案されるであろうが、それらは本発明の範囲内に包含されることは理解されよう。本明細書に引用した全ての刊行物、特許および特許出願は参照により本明細書に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、脂質を酸化から保護するHDLの活性をアッセイするテストの実施態様の1つである。

【図2】

図2は、アポA-IによるLDLから播種分子の除去を示す。ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)を新しく単離した血漿に20 µMの濃度で添加し、2つの連結させたスパーローズ6カラムを有するFPLCを用いたゲルろ過クロマトグラフィーで通常の食塩水で溶出させることによって分画した。LDLを含む分画を一緒にした。精製アポA-I(100 µg/mL)を前記LDLに添加し(1 mg/mL)、通常の食塩水中で穏やかに混合しながら37 °Cで2時間インキュベートした。続いて、LDLおよびアポA-IをFPLCによりまたは遠心により再度単離した。再単離LDLは“LDLアフターA-I”と呼び、再単離したアポA-Iは“A-IアフターLDL”と呼ぶ。

【図3】

図3 A、図3 Bおよび図3 Cは、アポA - Iとインキュベートした後のLDLの酸化に対する抵抗性を示す。LDLは7人の健常者ドナーからFPLCにより迅速に単離し、1 mg / mLのLDLを100 μ g / mLのアポA - Iとインキュベートし、続いて図2で述べたようにLDLおよびアポA - Iを再度単離した。動脈壁細胞共働培養を擬似処理LDL (LDL擬似) とともに、またはアポA - Iとインキュベートし再単離したLDL (LDLアフターA - I) とともに、または擬似処理アポA - I (A - I擬似) とともにインキュベートした。別の共働培養ウェルには、“LDLアフターA - I” + “A - IアフターLDL” から抽出した脂質をインキュベートすることによって再構成したLDL (A - I脂質アフターLDL + LDLアフターA - I) を添加した。この共働培養を10%のLPDSの存在下で37、8時間インキュベートした。上清を採取し、脂質ヒドロペルオキシドレベルを分析した。

単球付着は1組の共働培養で決定し、他は洗浄して血清またはLPDSを含まない培養液で16時間インキュベートした。この条件付け培養液を採取し、単球走化性活性について分析した。図3 Aは上清の脂質ヒドロペルオキシドレベルを示している。図3 Bは単球付着を示し、図3 Cは単球走化性活性値を示している。図は、7人の別々の健常ドナーに由来するLDLおよび別のドナーの共働培養および単球を用いた7つの別個の実験の代表的なものである。値は共働培養 ($\times 4$) の平均 \pm SDである。

【図4】

図4 Aおよび図4 Bは、LDLの酸化および走化性活性に対する、アポA - Iペプチド擬似体によるLDL予備処理の影響を示している。250 μ g / mLの新しく単離したLDLを、緩衝液 (擬似LDL)、100 μ g / mLのアポA - I擬似体ペプチド37 pAまたは100 μ g / mLのコントロールペプチド40 Pで処理した。インキュベーションは、穏やかに混合しながらM199中で37で2時間実施した。LDLおよびペプチドは、図1の場合のようにその後すぐに再単離した。動脈壁細胞共働培養は、擬似処理LDL (擬似LDL)、アポA - I擬似体ペプチドとインキュベートしたLDL (LDLアフター37 pA)、

コントロールペプチドとインキュベートしたLDL (LDLアフター40P)、擬似処理37pA (37pA擬似)、または擬似処理40P (40P擬似)とともにインキュベートした。別の共働培養ウェルには、“LDLアフター37pA”および“37pAアフターLDL”から抽出した脂質をインキュベートすることによって再構成したLDL (37pA脂質アフターLDL + LDLアフター37pA)を添加した。これら添加物をヒト動脈壁共働培養とともに10%LPDSの存在下で8時間インキュベートした。上清を採集し、脂質ヒドロペルオキシドレベルを分析した(図4A)。続いてこの培養を洗浄し、血清またはLPDSを含まない培養液で8時間インキュベートした。続いて、前記条件付け培養液を採集し、単球走化性活性について分析した(図4B)。データは、別々の3つの実験の共働培養(×4)から得た値の平均±SDを示している。星印は $p < 0.0014$ を示している。

【図5】

図5A、図5B、図5Cおよび図5Dは、アポA-Iによって抽出された脂質の生物活性を示している。新しく単離したLDL (1mg/mL)をアポA-I (100mg/mL)とインキュベートし、図1に示したように再度単離した。脂質を“A-IアフターLDL”からクロロホルム-メタノールで抽出し、方法の項で述べたように固相抽出クロマトグラフィーで分離した。脂肪酸(FA)または中性脂肪(NL)分画を乾燥するまで蒸発させ、10%LPDSを含む200μLのM199と37で5分間、断続的に穏やかにボータックスミキサーで攪拌しながらインキュベートした。続いて、脂肪酸(FA-A-IアフターLDL、図5Aおよび図5B)、または中性脂質(NL-A-IアフターLDL、図5Cおよび図5D)を表示の量で、100μgPAPCまたは250μg“LDLアフターA-I”のどちらかとともに、10%のLPDSを含む最終容積1mLのM199中で37で3時間インキュベートした。10%LPDSを含むM199中の前記処理PAPCまたはLDLを、続いてHAECとともに37で4時間インキュベートした。上清を取り出し、本明細書に記載したように脂質ヒドロペルオキシド含有量(図5Aおよび図5C)を分析した。細胞を洗浄し、単球附着を本明細書に記載したように決定した(図5Bおよび図5D)。

【図6】

図6 Aから図6 Hは、アポA - IによるLDLから13 - HPODEおよび15 - HPETEの除去を示している。新しく単離したLDL (1 mg / mL) を、単独 (LDL擬似) またはM199中のアポA - I (100 mg / mL) とともに穏やかに混合しながら2時間インキュベートした。コントロールとして、アポA - I (100 μ g / mL) をM199中で単独で (A - I擬似、図6 Aおよび6 E)、または新しく単離したLDL (1 mg / mL) をM199中で単独で (LDL擬似、図6 Bおよび図6 F) 穏やかに混合しながら37 °Cで2時間インキュベートした。続いて、LDLおよびアポA - Iをミリポア分子量カットオフフィルター (100 kDa) を用いて遠心により再単離した。脂質をアポA - IおよびLDLから抽出し、逆相HPLCで分析した。図6 Cおよび図6 Gは、アポA - Iとのインキュベーション後のLDL (LDLアフターA - I) における13 - HPODEおよび15 - HPETEピークにおける減少を示し、図6 Dおよび図6 Eは、LDLとインキュベートしさらに分離した後のアポA - I (A - IアフターLDL) の脂質抽出物における13 - HPODEおよび15 - HPETEの増加をそれぞれ示している。

【図7】

図7 Aおよび図7 Bは、固形飼料で維持したC57BL / 6およびC3H / HeJマウスストレインのLDL中の播種分子を示している。LDLは、病変感受性C57BL / 6 (BL / 6) および病変耐性C3H / HeJ (C3H) マウスの群から得た血漿から単離した。LDL (100 μ g / mL) をヒトアポA - I (100 μ g / mL) とともに穏やかに混合しながら37 °Cでインキュベートし、続いて図2に示したようにFPLCで再単離した。アポA - Iによって除去された脂質とともにLDLの再構成を図3に示したように実施し、大動脈壁細胞の共働培養とともにインキュベートした。略語は図3の場合と同じである。図7 Aは、生成された脂質ヒドロペルオキシドについてのデータを示し、図7 Bは、誘発された走化性活性を示している。表示の値は、共働培養 (x4) の平均 \pm SD である。星印は $p < 0.0015$ を示している。

【図8】

図8Aおよび図8Bは、アポA-Iのマウスへの注射はマウスLDLをヒト動脈壁細胞による酸化に対して抵抗性にするが、アポA-IIではしないということを示している。C57BL/6マウス(n=5)の群に尾静脈から動物当たり100 μ gのアポA-I、アポA-IIまたは食塩水のみを注射した。血液サンプルを各時点に取り出し、LDLを単離し、共働培養とともに8時間インキュベートした。培養上清を脂質ヒドロペルオキシドについて(図8A)、さらに単球走化性活性について(図8B)方法の項で述べたようにアッセイした。図は、代表的な実験から得たそれぞれのサンプルの4つの結果の平均 \pm SDを示している。星印は0時間と比較したとき $p < 0.0001$ であることを示している。同一の結果が2つの別々の実験で得られた。

【図9】

図9Aおよび図9Bは、ヒトアポA-Iのヒトへの輸液によってそのLDLがヒト動脈壁細胞による酸化に対して抵抗性になることを示している。6人の個体(本文で説明されている)にヒトアポA-I/ホスファチジルコリンディスクを50mgアポA-I/kg体重で4時間にわたって輸液した。輸液開始前2時間および輸液開始後6時間(すなわち、輸液の完了後2時間)に血漿を調製した。LDLをFPLCで単離し、100 μ g/mLで共働培養とともに8時間インキュベートした。培養上清を採集し、脂質抽出に付し、ヒドロペルオキシド含有量についてアッセイした(図9A)。前記共働培養を洗浄し、血清またはLPDSを含まない培養液で8時間インキュベートした。前記条件付け培養液を単球走化性活性について分析した(図9B)。共働培養($\times 4$)の平均 \pm SDが示されている。星印はパネルAについては $p < 0.0173$ 、パネルBについては $p < 0.0077$ であることを示している。

【図10】

図10Aおよび図10Bは、HDLまたはHDL結合酵素は、LDLをヒト動脈壁細胞による酸化に対して抵抗性にすることを示している。新しく単離したLDLを250 μ g/mLで緩衝液とともに(擬似処理LDL)、350 μ g/mLのHDLとともに(HDL処理LDL)、または 1×10^{-2} U/mLの精製PONとともに(PON処理LDL)インキュベートした。前記インキュベーション

ンは、穏やかに混合しながらM199中で37℃で3時間実施した。続いてLDLをミリポア分子量カットオフフィルター(100kDa)を用いて遠心して再単離し、10%LPDSの存在下でヒト動脈壁細胞共働培養とともに8時間インキュベートした。上清を取り出し、脂質ヒドロペルオキシドについて分析した(図10A)。前記共働培養を洗浄し、血清またはLPDSを含まない培養液とともにインキュベートした。8時間後に培養液を集め、単球走化性活性について分析した(図10B)。データは、3つの別個の実験の培養($\times 4$)から得られた値の平均 \pm SDを示している。星印は、 $p < 0.0008$ のレベルの有意差を示している。

【図11】

図11Aおよび図11Bは、アポA-Iは、ヒト動脈壁細胞から物質を取り除き、前記細胞がLDLを酸化できなくすることを示している。共働培養を50 μ g/mLのアポA-IまたはアポA-IIとともに8時間インキュベートするか、または擬似処理した。アポA-IまたはアポA-IIのどちらかを含む条件付け培養液を取り出し、いくつかの事例では、同一の処置を施してあって標的培養として機能する別の共働培養に移した。LDLを250 μ g/mLで擬似処理されてある標的共働培養(擬似処理培養)に添加するか、またはアポA-Iで処理されており、そのアポA-Iは既に除去されてある標的培養(A-I後培養)に添加するか、またはアポA-IIで処理されており、そのアポA-IIは既に除去されてある標的培養(A-II後培養)に添加する。LDLはまた、アポA-IまたはアポA-IIで処理されており、さらに第一の共働培養セットからアポA-IまたはアポA-IIを含む条件付け培養液が添加されている標的培養にも250 μ g/mLで添加した(それぞれ(A-I後培養+培養後A-I)および(A-II後培養+培養後A-II))。標的培養は、10%LPDSおよびLDLを含むM199中で、前記第一の共働培養セット由来の添加物(条件付け培養液)とともに、または非存在下で8時間インキュベートした。いくつかの共働培養には250 μ g/mLのLDLおよび50 μ g/mLのアポA-Iを8時間のインキュベーション開始時に加え、これを合計16時間継続させた(共働インキュベーションA-I)。上清を取り出し、脂質ヒドロペルオキシドについてアッ

セイし(図11A)、さらにこの共働培養を洗浄して、血清またはLPDSを含まない新しいM199を添加し、さらに8時間インキュベートし、単球走化性活性についてアッセイした(図11B)。値は、別個のドナーに由来するLDLを用いた3つの別々の実験から得られた平均値 \pm SDを示している。星印は $p < 0.001$ のレベルの有意差を示している。

【図12】

図12Aおよび図12Bは、アポA-Iペプチド擬似体は、ヒト動脈壁細胞から物質を取り除き、前記細胞がLDLを酸化することができなくさせることを示している。ヒト大動脈壁共働培養を、培養液のみと(擬似処理)、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ のアポA-I擬似体ペプチドと(37pA処理)、または $100\mu\text{g}/\text{mL}$ のコントロールペプチドと(40P処理)8時間インキュベートした。続いてこの共働培養を洗浄し、さらに新しく単離したLDLを添加し、10%LPDSを含むM199でさらに8時間インキュベートした。培養液を取り出し、脂質ヒドロペルオキシドについてアッセイした(図12A)。前記共働培養を洗浄し、血清またはLPDSを含まない培養液でさらに8時間インキュベートし、単球走化性活性についてアッセイした(図12B)。データは、3つの別個の実験の共働培養($\times 4$)から得られた値の平均値 \pm SDを示している。星印は $p = 0.01$ のレベルの有意差を示している。

【図13】

図13Aおよび図13Bは、HDLおよびその結合酵素PONはヒト動脈壁細胞がLDLを酸化できなくすることを示している。ヒト大動脈壁共働培養を、培養液のみと(擬似処理)、 $350\mu\text{g}/\text{mL}$ のHDLと(HDL処理)、または $1 \times 10^{-2}\text{U}/\text{mL}$ の精製パラオキシナーゼと(PON処理)8時間インキュベートした。続いて、この共働培養を洗浄し、新しく単離したLDLを $250\mu\text{g}/\text{mL}$ で加え、10%LPDSを含むM199中でさらに8時間培養した。培養液を採集し、脂質ヒドロペルオキシドについて分析した(図13A)。続いて、この共働培養を洗浄し、血清またはLPDSを含まない培養液とともに8時間インキュベートし、上清を採集して単球走化性活性について分析した(図13B)。データは、3つの別個の実験の共働培養($\times 4$)から得られた値の平均値 \pm S

Dを示している。星印は $p < 0.011$ のレベルの有意差を示している。

【図14】

図14A、図14B、および図14Cは、ヒト動脈壁細胞のリノール酸による予備処理によって、脂質ヒドロペルオキシドレベル、単球走化性活性およびアポA-Iによる13-HPODEの除去が増加することを示す。2セットの共働培養を100 μ Mのオレイン酸(C18:1)またはリノール酸(C18:2)とともに10%のLPDSを含むM199中で37°Cで18時間インキュベートした。培養液を取り出し、培養を3回洗浄した。脂肪酸を含まない新しい培養液を添加し、さらに3時間37°Cでインキュベートした。続いて、250 μ g/mLでLDLを前記共働培養の1セットに加え10%LPDSを含むM199で8時間インキュベートした。続いて培養液を取り出し、脂質ヒドロペルオキシド(図14A)および単球走化性活性(図14B)を決定した。共働培養の第二のセット(図14C)には、アポA-Iを100 μ g/mLで添加しさらに3時間穏やかに混合しながら37°Cでインキュベートした。上清を取り出し、アポA-IをFPLCで分離し、アポA-Iを加えなかった上清(培養上清)の脂質抽出物およびアポA-Iの脂質抽出物(アポA-I脂質抽出物)のヒドロペルオキシド含有量を方法の項で述べたように決定し、ウェル当たりのngとして表した。値は3つの測定値の平均 \pm SDである。星印は $p < 0.001$ を示す。

【図15】

図15A、図15Bおよび図15Cは、13-HPODEはPAPCの生物学的に活性な酸化リン脂質の生成を促進することを示している。10 μ gのPAPCを1.0 μ gの13(S)-HPODE(点描棒線)または担体のみ(白棒)と混合し、蒸発させて薄層を形成し、表示した時間空気中で酸化させた。クロロホルム-メタノールで抽出した後、サンプルを陽イオンモードでESI-MSで分析した。データは、PAPCとともに添加された内部標準物質(0.1 μ gのDMPC)に対する1-パルミトイル-2-オキソバレリル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(POVPC, m/z 594、図15A)、1-パルミトイル-2-グルタリイル-sn-グリセロ-3-ホスホコリン(PGPC, m/z 610、図15B)、および1-パルミトイル-2-(5,6-エポキシイソプロ

スタンE₂) - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン (PEIPC, m/z 828、図15C) のレベルを示している。値はサンプル (×3) の平均±SDである。星印はp < 0.01を示している。13(S) - HPODE単独ではm/z 594、610または828のシグナルを生じなかった (データは示されていない)。

【図16】

図16A、図16Bおよび図16Cは、13(S) - HPODE、15(S) - HPETEまたはH₂O₂は用量依存態様でPAPCの酸化リン脂質の生成を促進することを示している。10 μgのPAPCを表示したマイクログラムの13(S) - HPODE (図16A) または15(S) - HPETE (図16B) と混合し、蒸発させて薄層を形成し、空气中で8時間酸化させた。図16Cでは、10 μgのPAPCを蒸発させて薄層を形成し、さらにH₂O₂を表示の濃度で添加し、8時間酸化させた。クロロホルム - メタノールで抽出した後、サンプルを陽イオンモードでESI - MSで分析した。データは、PAPCとともに添加された内部標準物質 (0.1 μgのDMPC) に対するPAPC, m/z 782; POVPC, m/z 594; PGPC, m/z 610; およびPEIPC, m/z 828のレベルを示す。値はサンプル (×3) の平均±SDである。13(S) - HPODE単独、15(S) - HPETE単独では、またはH₂O₂はm/z 594、610または828のシグナルを生じなかった (データは示されていない) 。星印はp < 0.001の有意差を示している。

【図17】

図17A、図17Bおよび図17Cは、13(S) - HPODEはコレステリルリノレートヒドロペルオキシド (C18:2 - OOH) の非酵素的生成を刺激することを示している。13(S) - HPODE 0.5 μg/mL (図17A) またはコレステリルリノレート 10 μg/mL (図17B) またはコレステリルリノレート 10 μg/mL とともに13(S) - HPODE 5 μg/mL (図17C) を0.01%のBHTを含むクロロホルム/メタノール (2:1, v/v) 中で簡単にかき混ぜて混合し、アルゴン下で乾燥するまで蒸発させ、層状空気流フード内で6時間空気酸化させた。脂質を50 μLのクロロホルムに溶解し、

本文で述べたようにRP-HPLCによりコレステリルリノレートヒドロペルオキシド (Ch18:2-OOH) の存在について分析した。

【図18】

図18は、精製パラオキシナーゼは酸化リン脂質の生物学的活性を破壊することを示している。酸化PAPC (Ox-PAPC)、POVPC (m/z 594)、PGPC (m/z 610) またはPEIPC (m/z 828) をM199中で、 1×10^{-2} U/mLの精製ヒトパラオキシナーゼ非存在下または存在下 (+PON) で穏やかに混合しながら試験管内で37℃で3時間インキュベートした。パラオキシナーゼを混合物から取り除き、10%LPDSを含むM199で脂質をヒト大動脈壁共働培養とともに37℃で8時間インキュベートした。続いて、前記共働培養を洗浄し、血清またはLPDSを含まない新しい培養液でさらに8時間37℃でインキュベートした。上清を取り出し、単球走化性活性について分析した。データは共働培養液 (×4) の平均±SDである。星印は $p < 0.001$ のレベルの有意差を示している。

【図19】

図19A、図19B、図19Cおよび図19Dは、パラオキシナーゼ活性が不足し、正常なHDLコレステロールレベルを有するにもかかわらず血管造影により冠状動脈のアテローム性硬化症と診断された患者のHDLは、LDLを動脈壁細胞による酸化から保護せず、酸化リン脂質の生物学的活性を破壊しないことを示している。これらの患者は、正常な総コレステロール、トリグリセリド、LDL-CコレステロールおよびHDL-Cコレステロールレベルを有するにもかかわらず血管造影により冠状動脈のアテローム性硬化症と診断された。これらの患者は糖尿病でもなく低脂肪血漿の投薬も受けていなかった。パラオキシナーゼ活性は、方法の項で述べたように24人の患者および年齢と性別が適合した29人の正常対象者について決定した (図19A)。以前に報告した14人の患者のデータおよび以前に報告した19人の正常対象者のデータは、さらに新たな10人の患者および年齢と性別が適合した正常対象者のデータとともに図19Aに含まれている。動脈壁細胞による酸化に対してコントロールLDLを保護する、新たな10人の患者のHDLおよびコントロールのHDLの能力は、本文で述べたように

脂質ヒドロペルオキシド生成によって決定されたとおり図19Bに、さらに本文で述べた単球走化性活性によって図19Cに示されている。パネルCのデータには、以前に報告した5人の患者および4人の正常対象者のデータと一緒に、新たな10人の患者および前記患者と年齢と性別が適合する正常対象者についてのデータが含まれている。図19Dのデータは、新規なアプローチ、すなわち酸化PAPC (Ox - PAPC) の生物学的活性を抑制する患者および正常なHDL (各群に対してn = 10) の能力を示している。各事例で、100 μ g / mLのOx - PAPCを250 μ g / mLのHDLと試験管で10% LPDSを含むM199中で穏やかに混合しながら37 °Cで4時間インキュベートした。続いて、HDL - Ox - PAPC混合物を内皮単層培養に添加し、単球の結合を測定した。データは、共働培養 (x 4) の平均 \pm SDである。星印は、パネルAについては $p < 0.01$; パネルBではLDL対LDL + 患者HDLについては $p < 0.001$ 、LDL + コントロールHDL対LDL + 患者HDLについては $p < 0.0001$; パネルCではコントロールLDL対LDL + コントロールHDLについては $p < 0.009$ 、LDL + コントロールHDL対LDL + 患者HDLについては $p < 0.000008$; パネルDではOx - PAPC対Ox - PAPC + 患者HDLについては $p < 0.009$ 、Ox - PAPC + コントロールHDL対Ox - PAPC + 患者HDLについては $p < 0.0001$ を示している。

【図20】

図20は、動脈壁細胞によるLDL酸化のための3つの工程のモデルを示している：工程1 - LDLが播種される；工程2 - LDLは動脈壁に捕捉され、さらに新たな播種分子を受け取る；工程3 - リン脂質に関する播種分子の臨界レベルがLDL内で達成されるとき、非酵素的酸化プロセスがPOVPC、PGPCおよびPEIPCを生じる。循環内のVLDLの加水分解によって生じるLDLは“播種分子”を含んでいるかもしれない。また別の選択肢として、LDLは内皮下腔(A)に浸入するかもしれない。前記下腔内でLDLは動脈壁細胞によって配られる反応性酸素種(ROS)とともに播種される(工程1)。模式図では、内皮下腔でこれが生じるように示されているが、工程1は実際には毛細循環で生じるかもしれない。LDLが内皮下腔で播種される場合は、LDLはそこに留ま

り、細胞外マトリックス (B) に閉じ込められるか、または播種された LDL は循環内 (C) に入って、再び内皮下腔の別の部位に侵入し、そこで細胞外マトリックス (D) に閉じ込められるであろう。工程 2 では、動脈壁細胞はさらに新たなまたは別の ROS を生成し、これを捕捉された播種 LDL に移動させる。この移動は細胞内、細胞表面または隣接する保護されたマイクロメインで発生する可能性がある。播種され捕捉されている LDL への反応性酸素種のこの移動の後、脂質酸化の非酵素的調製が惹起される (工程 3)。これは、NF - B 活性化、単球結合、MCP - 1 産生、および M - CSF 産生を誘発する固有の酸化リン脂質の生成をもたらし、さらに前記酸化リン脂質は、軽度に酸化された LDL (極めてわずかに改変された LDL (minimally modified LDL ; MM - LDL) 中に存在する。提示したように、正常な HDL は、MM - LDL 生成の各工程およびいずれの工程も封鎖することができる。

【図 2 1】

図 2 1 は、イムノアフィニティーによる HDL の単離を示す。HDL を SDS - PAGE に付し、続いてクマシービリリアントブルーで染色した。分子量マーカーの他に、出発血漿およびイムノアフィニティー精製 HDL、市販の精製アポ A - I も含めた。レーン 1 : 分子量マーカー、レーン 2 : 血漿、レーン 3 : 純粋アポ A - I、レーン 4 : 精製 HDL。

【図 2 2】

図 2 2 は HDL の保護性能を示している。HDL の主要タンパク質アポ A - I に対するポリクローナル抗体を臭化シアン活性化セファロース 4 B ビーズと結合させた。正常ヒト血漿 (200 μ L) を 1.0 mL のパックしたアポ A - I - セファロース 4 B ビーズ (0.15 M トリス / 食塩水 (pH 7.4) + 0.02 % NaN_3) に添加し、室温で 2 時間混合した。続いて、この混合物を 0.015 M トリス、0.5 M 塩化ナトリウム (pH 7.4) でビーズを希釈し、1500 rpm で 5 分室温で遠心することによって洗浄した。ペレットを通常の食塩水に最終容積 2.0 mL (50 % パックビーズ) で再懸濁させた。DCF を各凍結バイアルに分注し (20 μ g を含む 10 μ g)、アルゴン下で蒸発させた。パルミトイル - アラキドノイル - ホスホリルコリン (P A P C) (各試験管に 20 μ g

)および13(S)ヒドロペルオキシジデカエン酸(各試験管に1.0 μ g)(13(S)HPODE)を試験管に加え、アルゴン下で蒸発させた。この後、セファロスビーズに結合させたHDLまたは緩衝液のみで処理したビーズを一定範囲の濃度で添加した。室温で4時間インキュベーションした後蛍光を読み取った。データはサンプル($\times 3$)の平均 \pm SDである。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

Sequence ID No: 1

DWL KAF YDK VAE KLK EAF PDW LKA FYD KVA EKL KEA F

5

【図1】

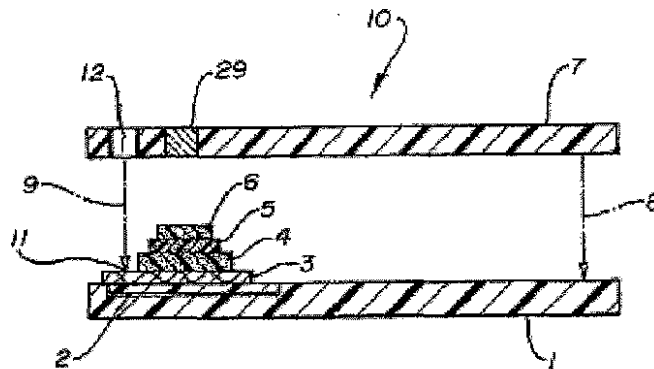
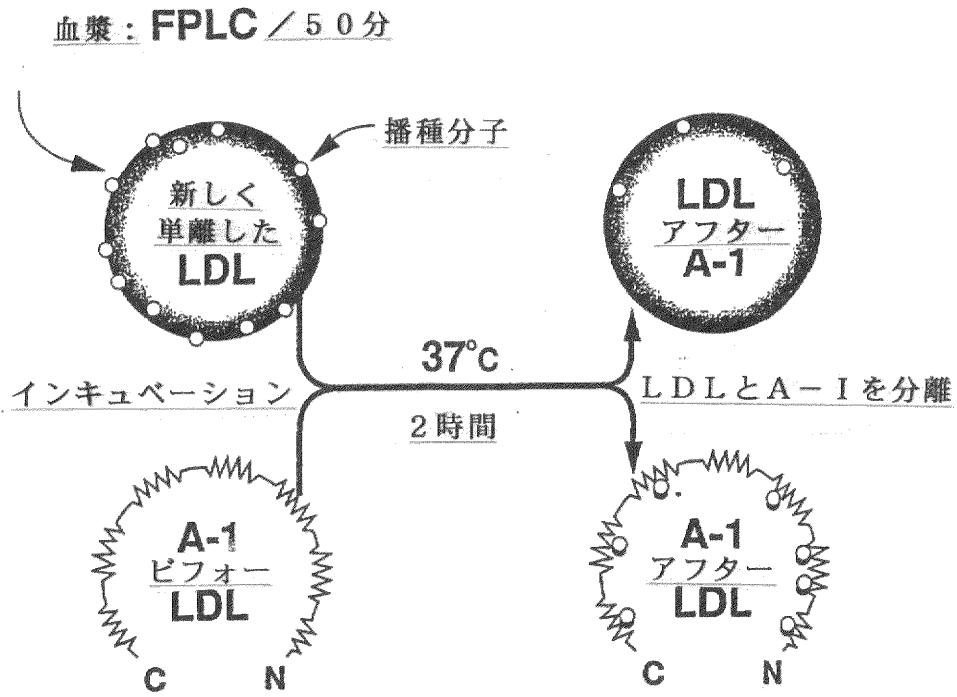
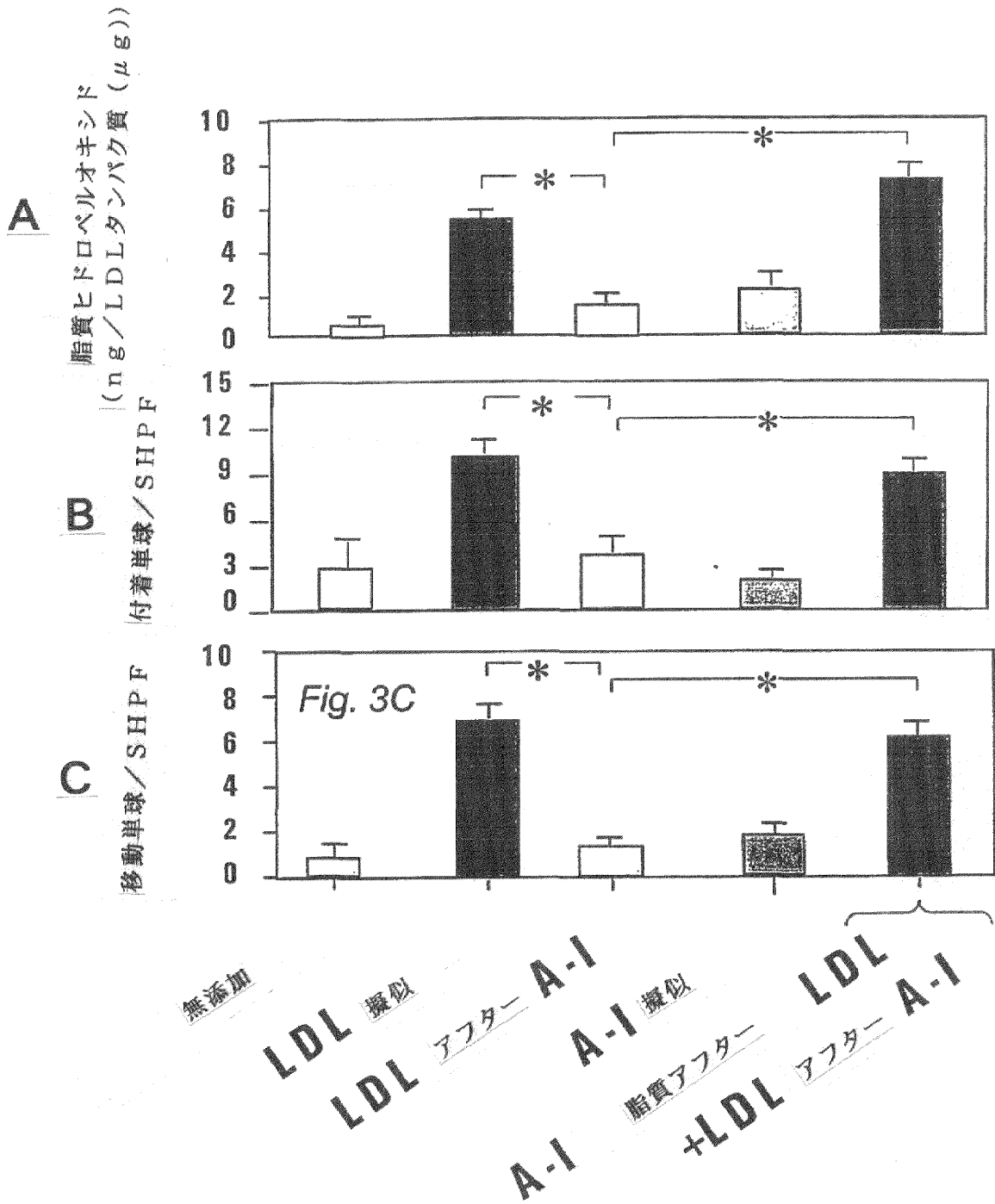


Fig. 1

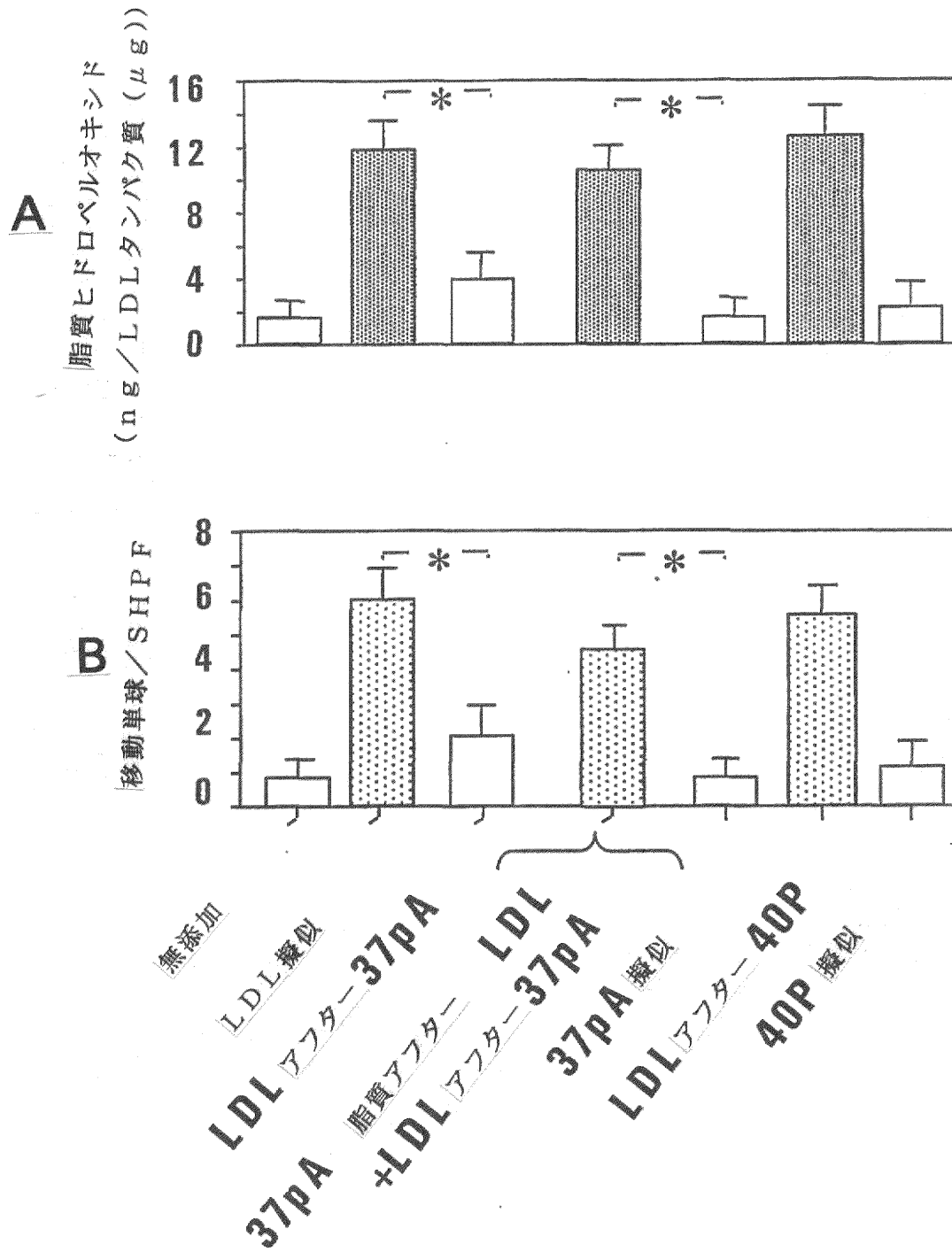
【図2】



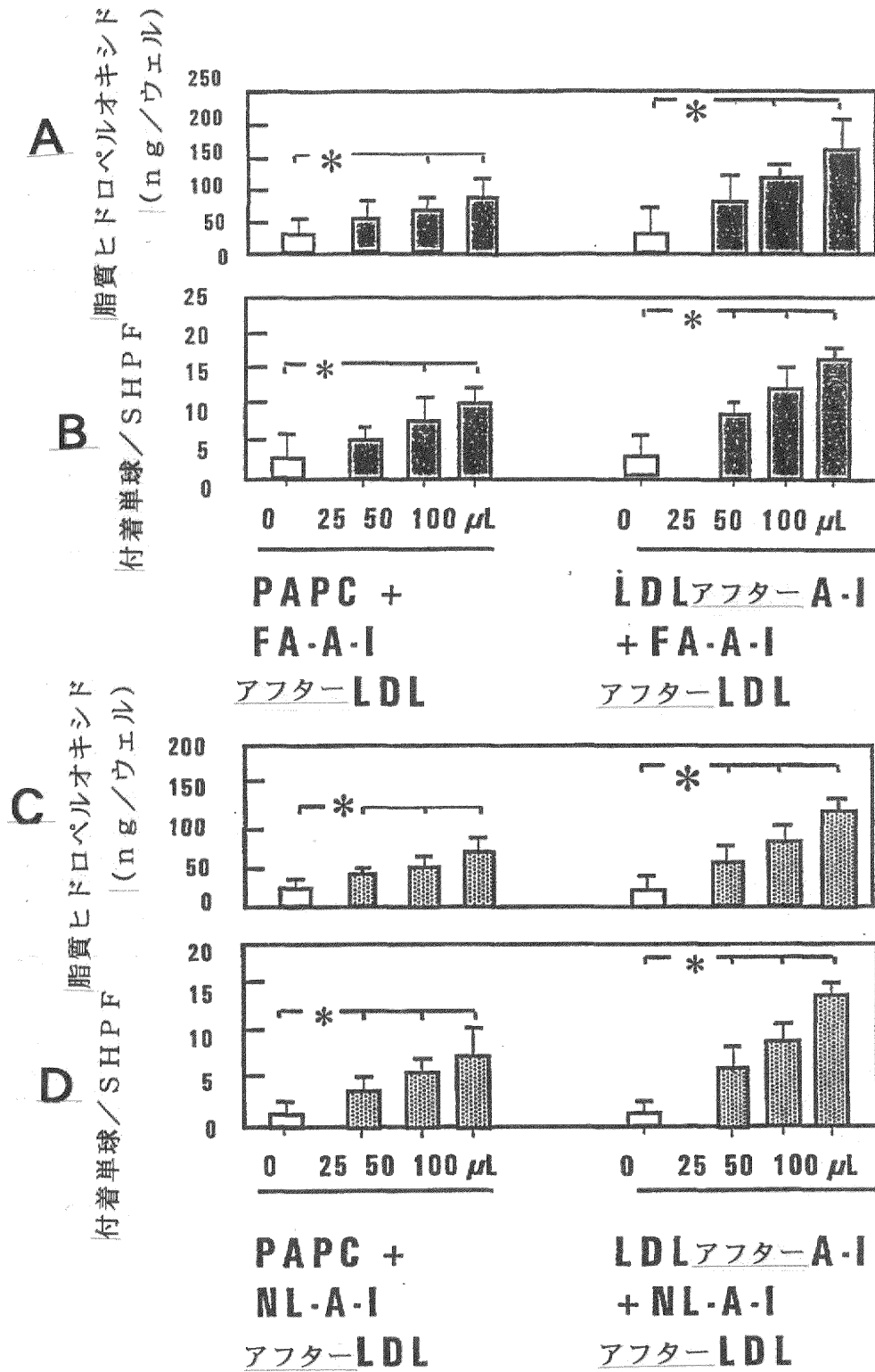
【図3】



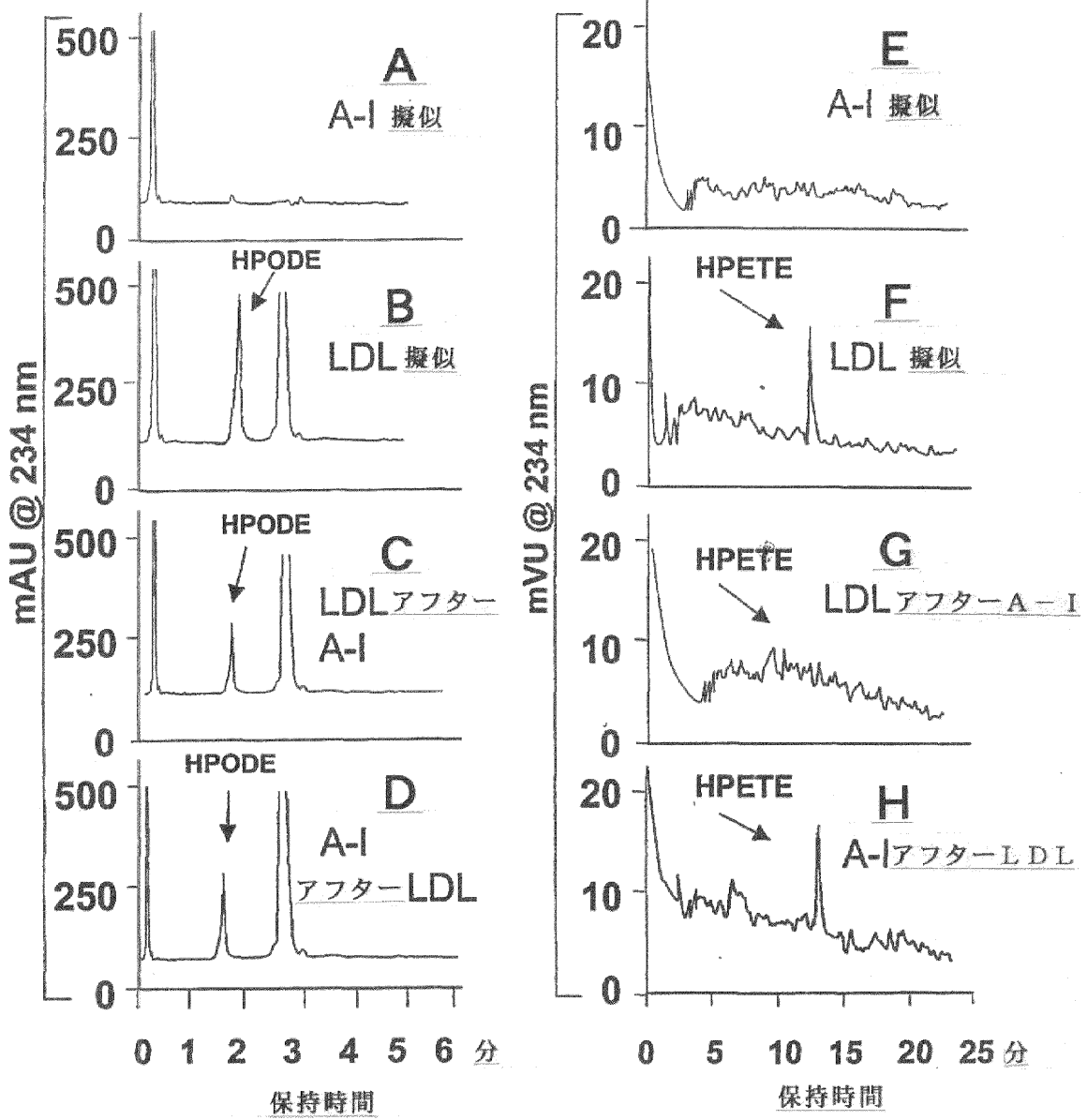
【図4】



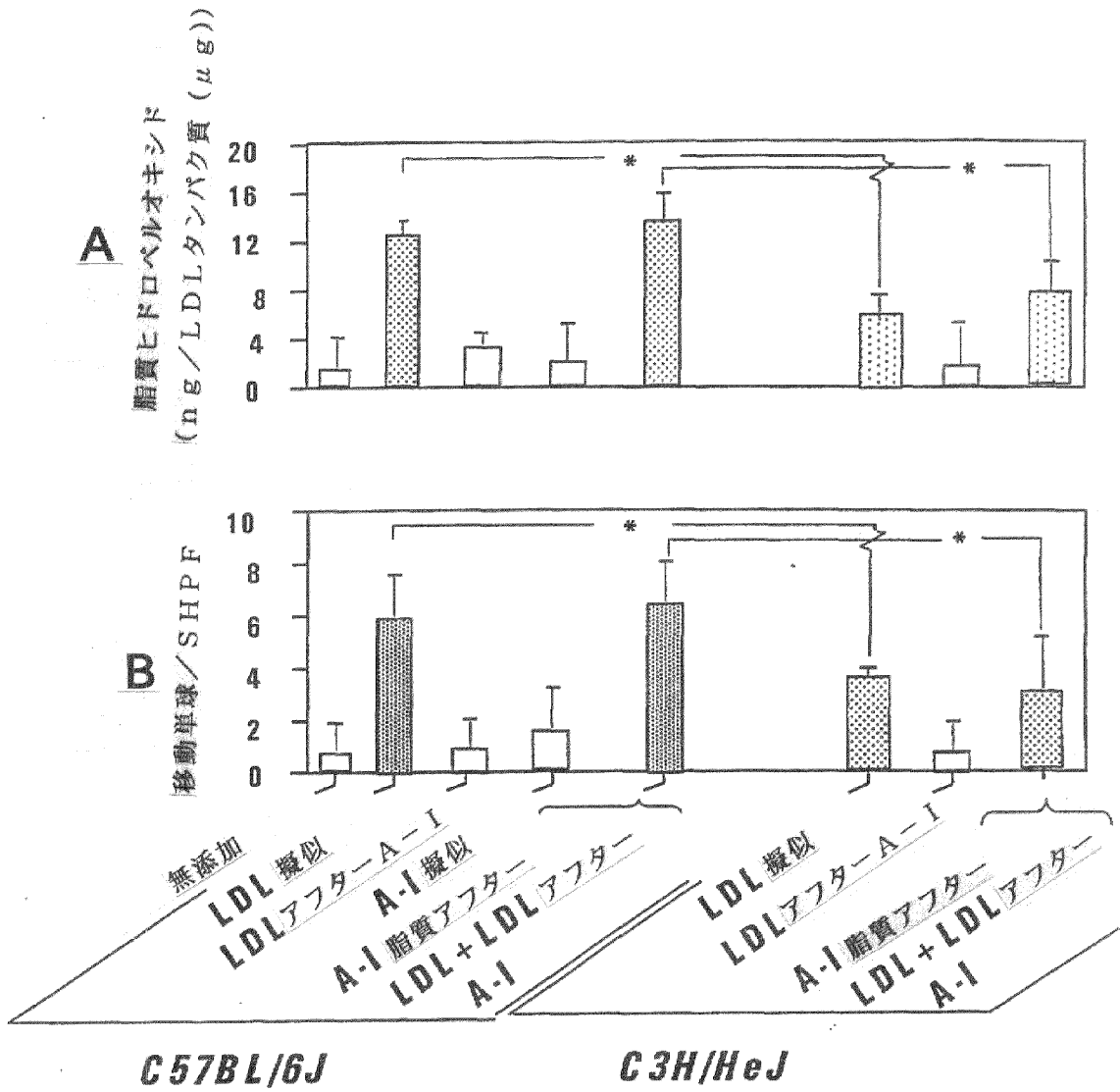
【図5】



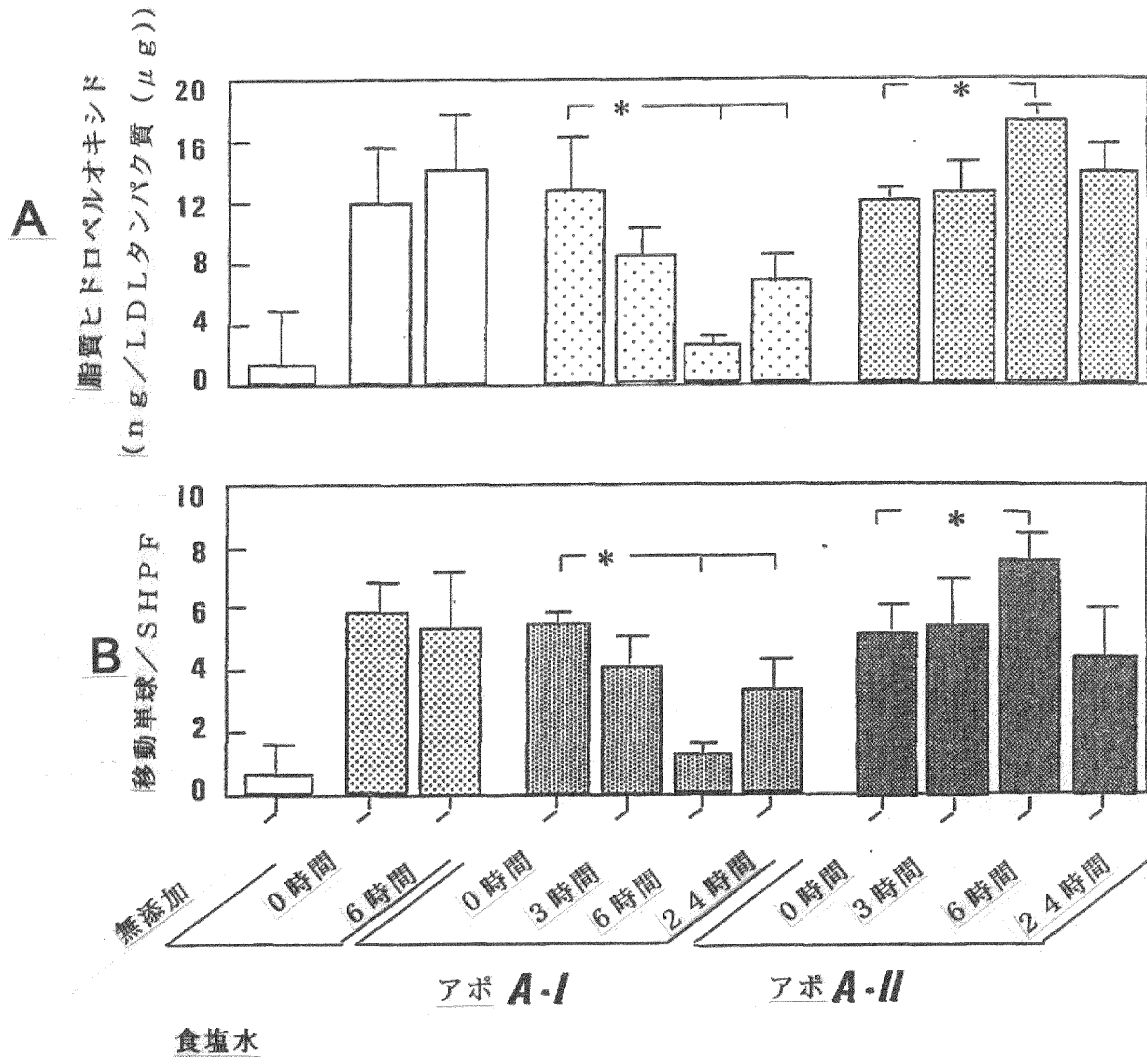
【図6】



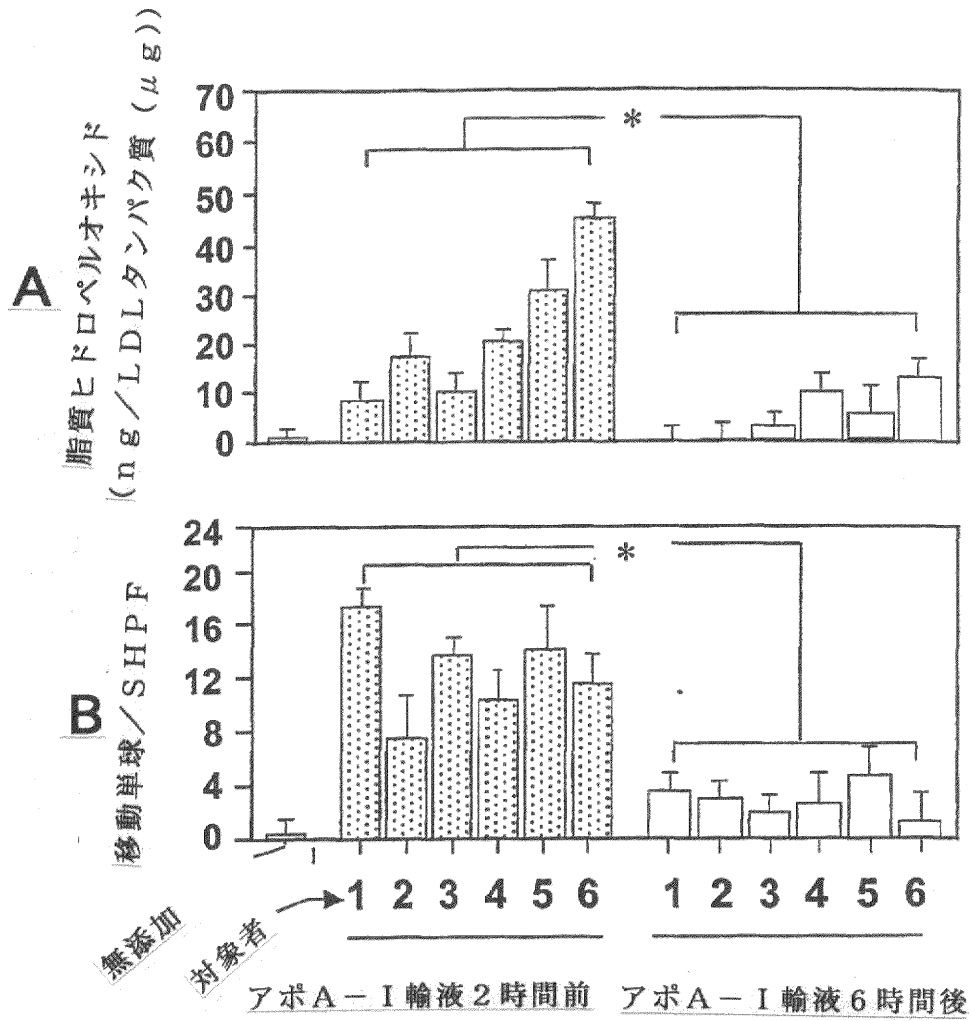
【図7】



【図8】

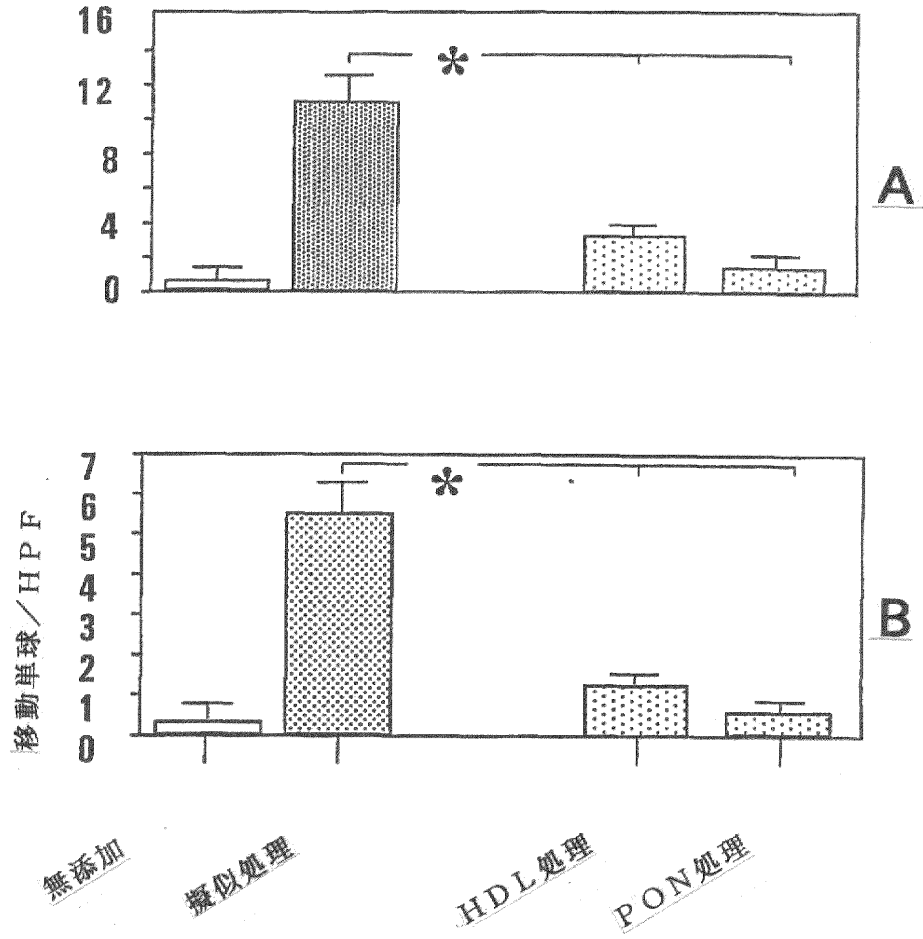


【図9】

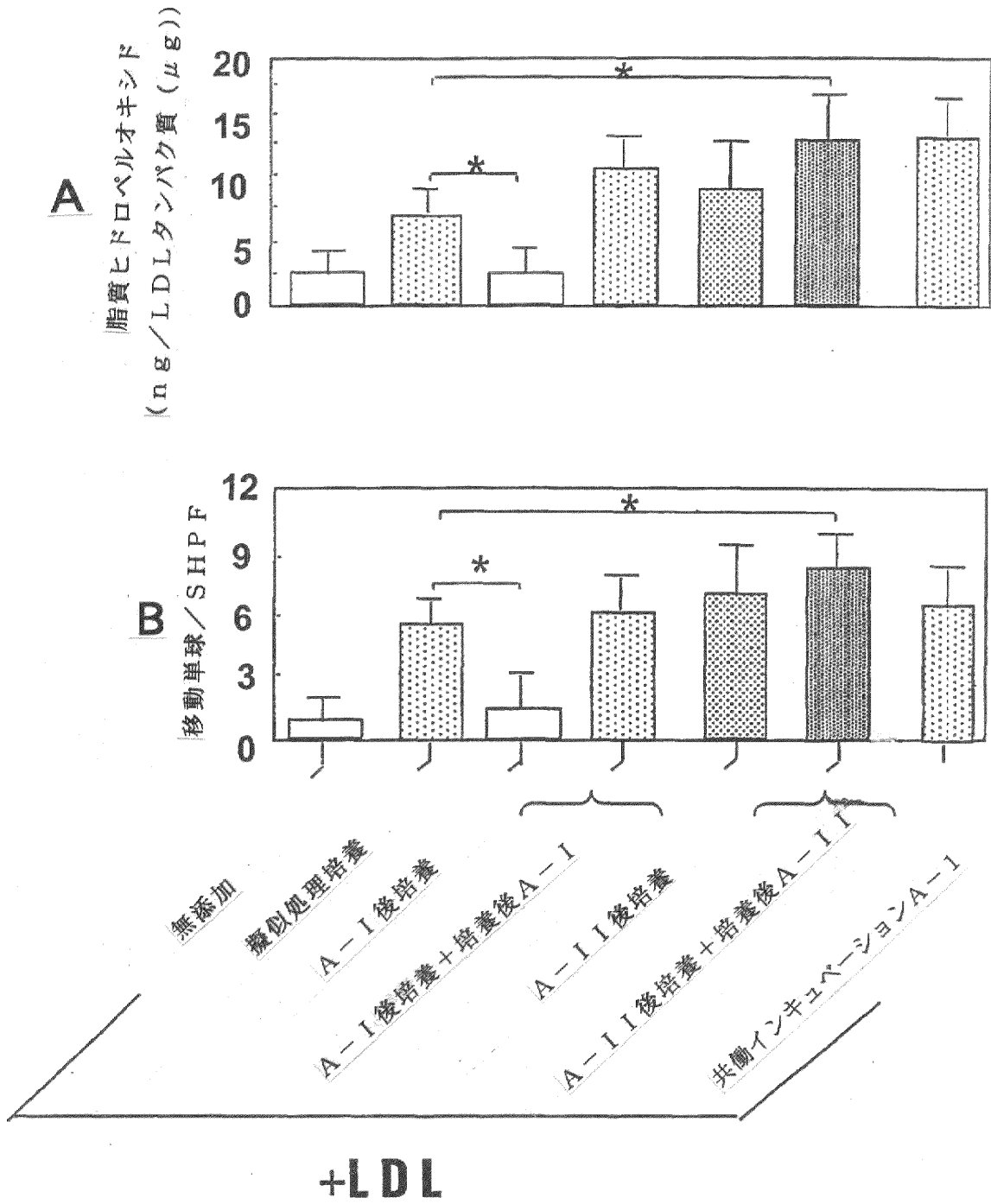


【図10】

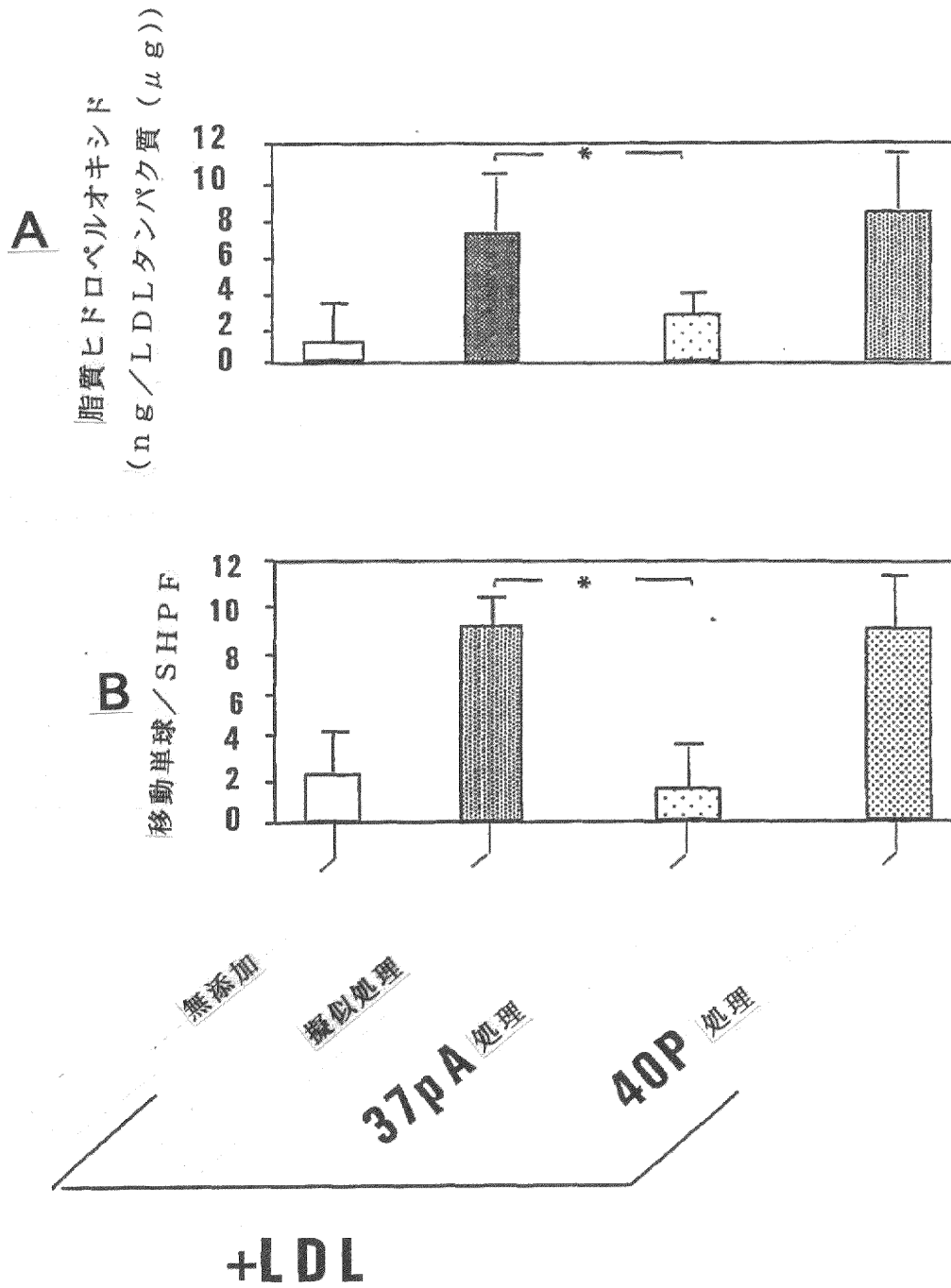
13-HPODE
同等物
(ng/LDLタンパク質(μg))



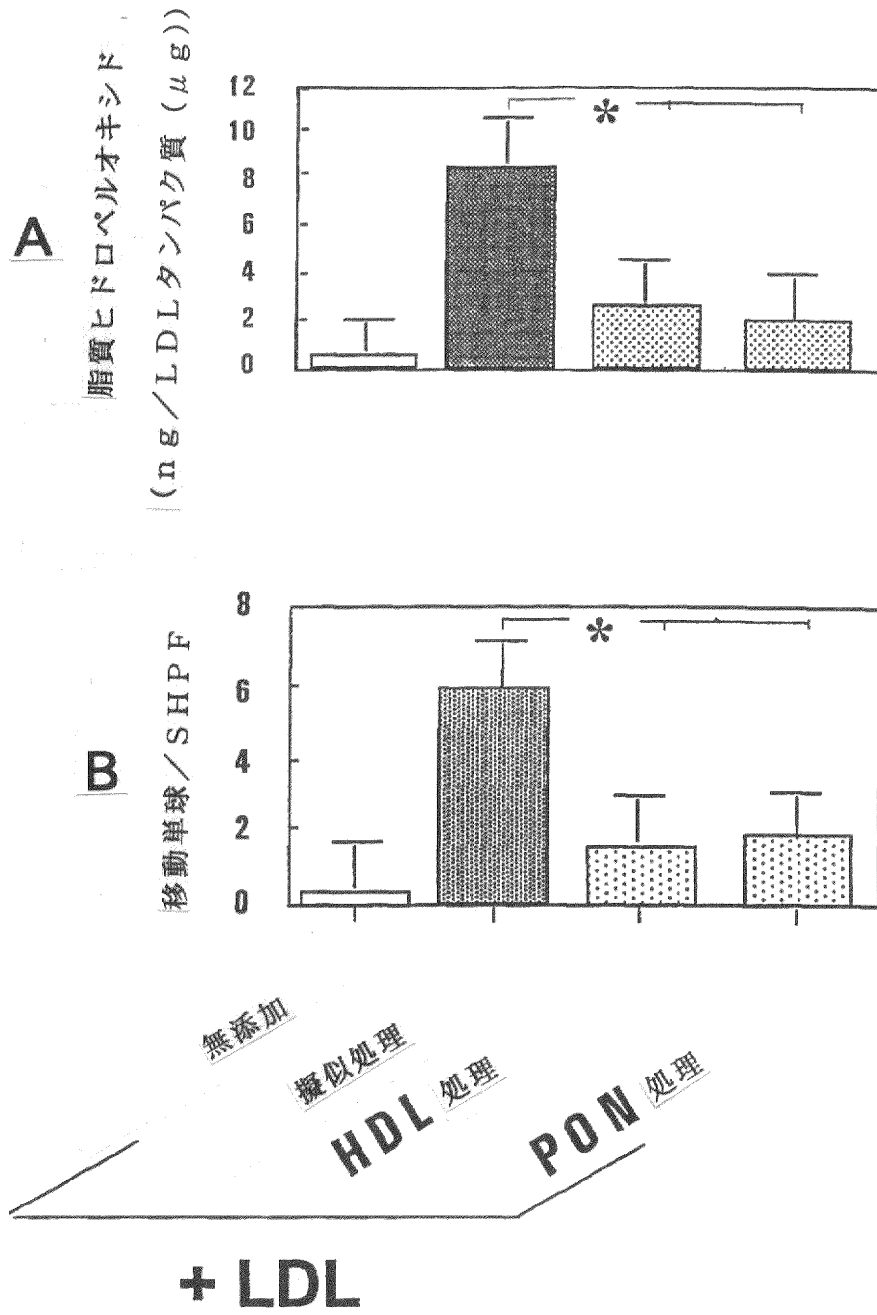
【図11】



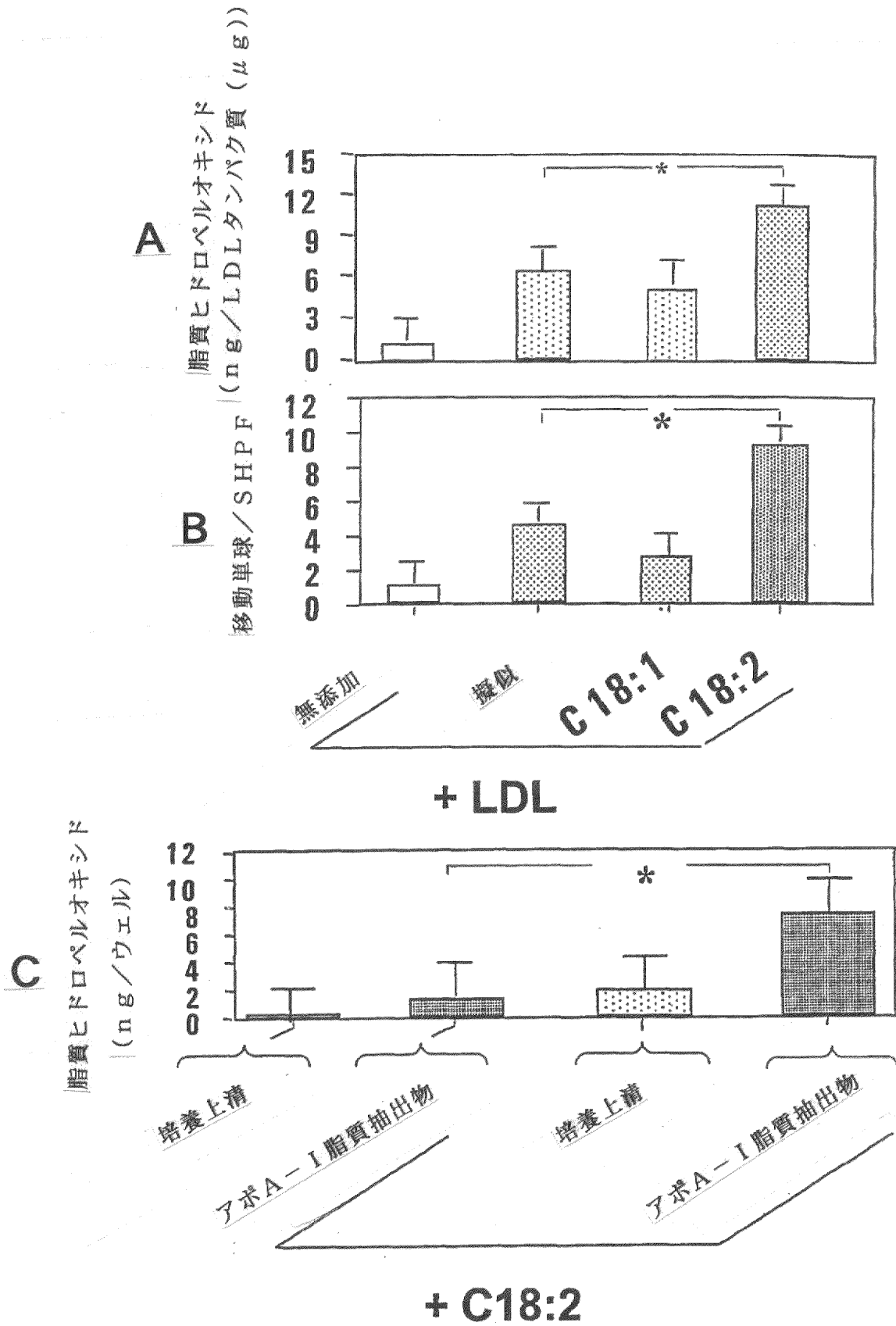
【図12】



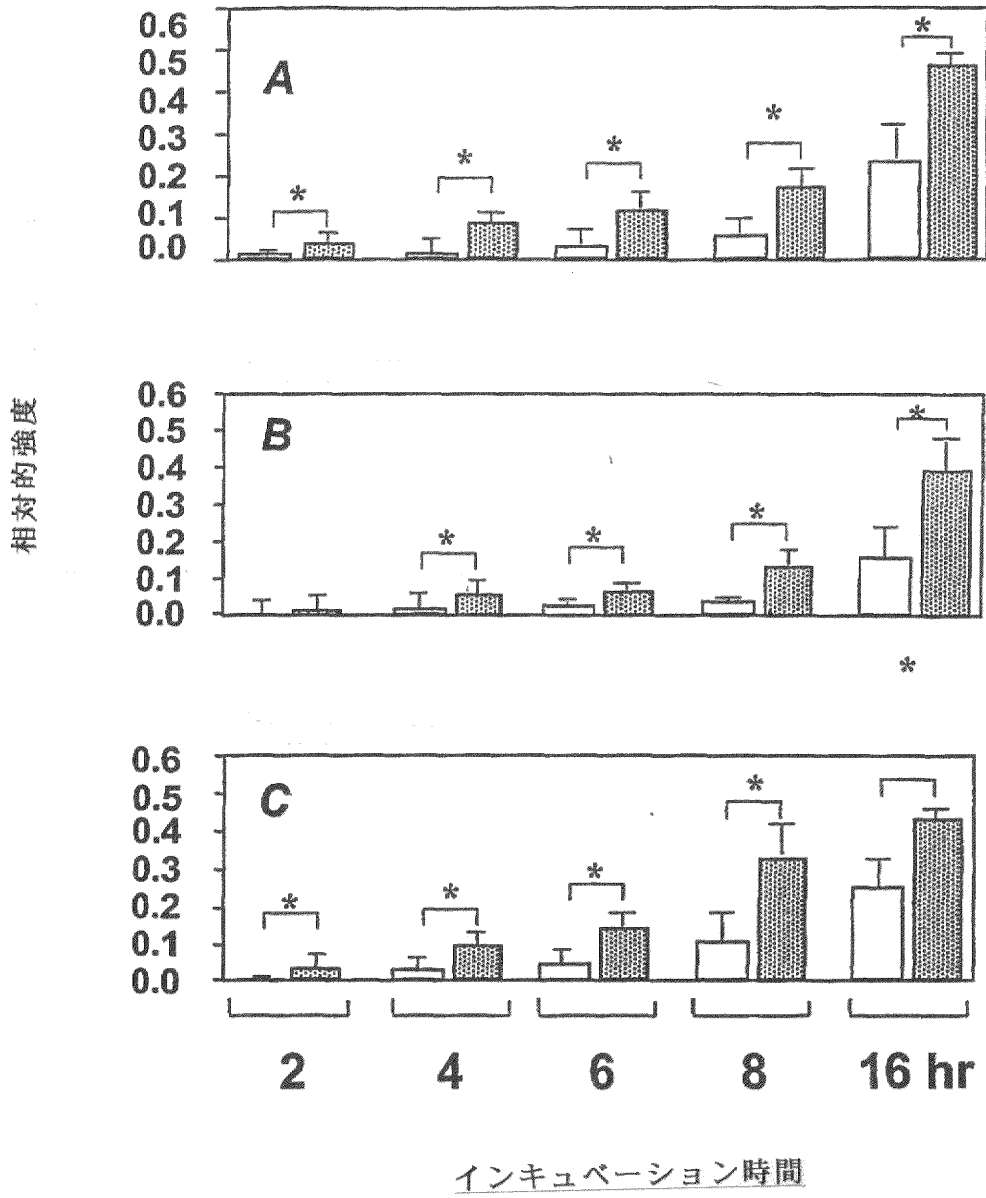
【図13】



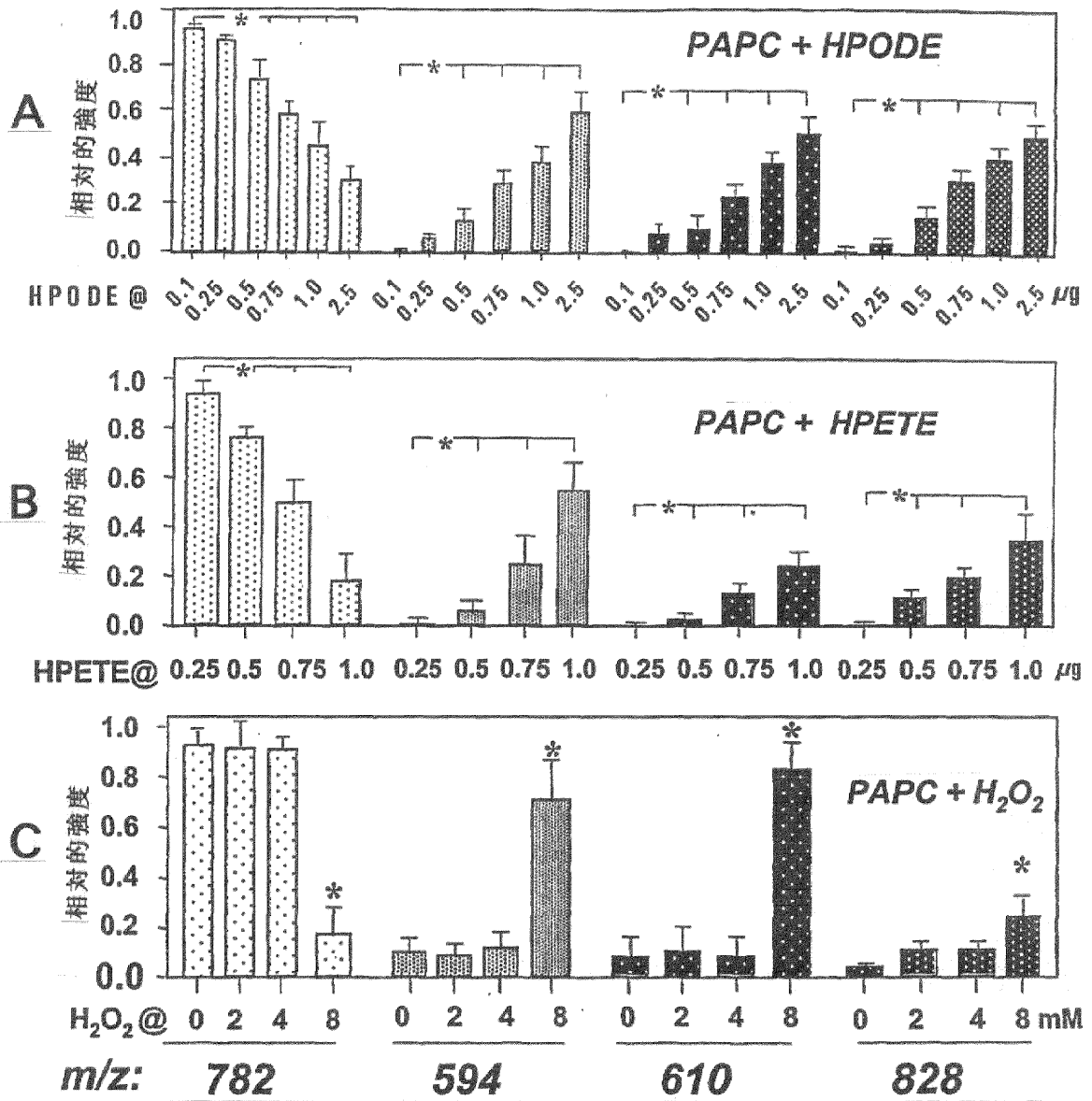
【図14】



【図15】



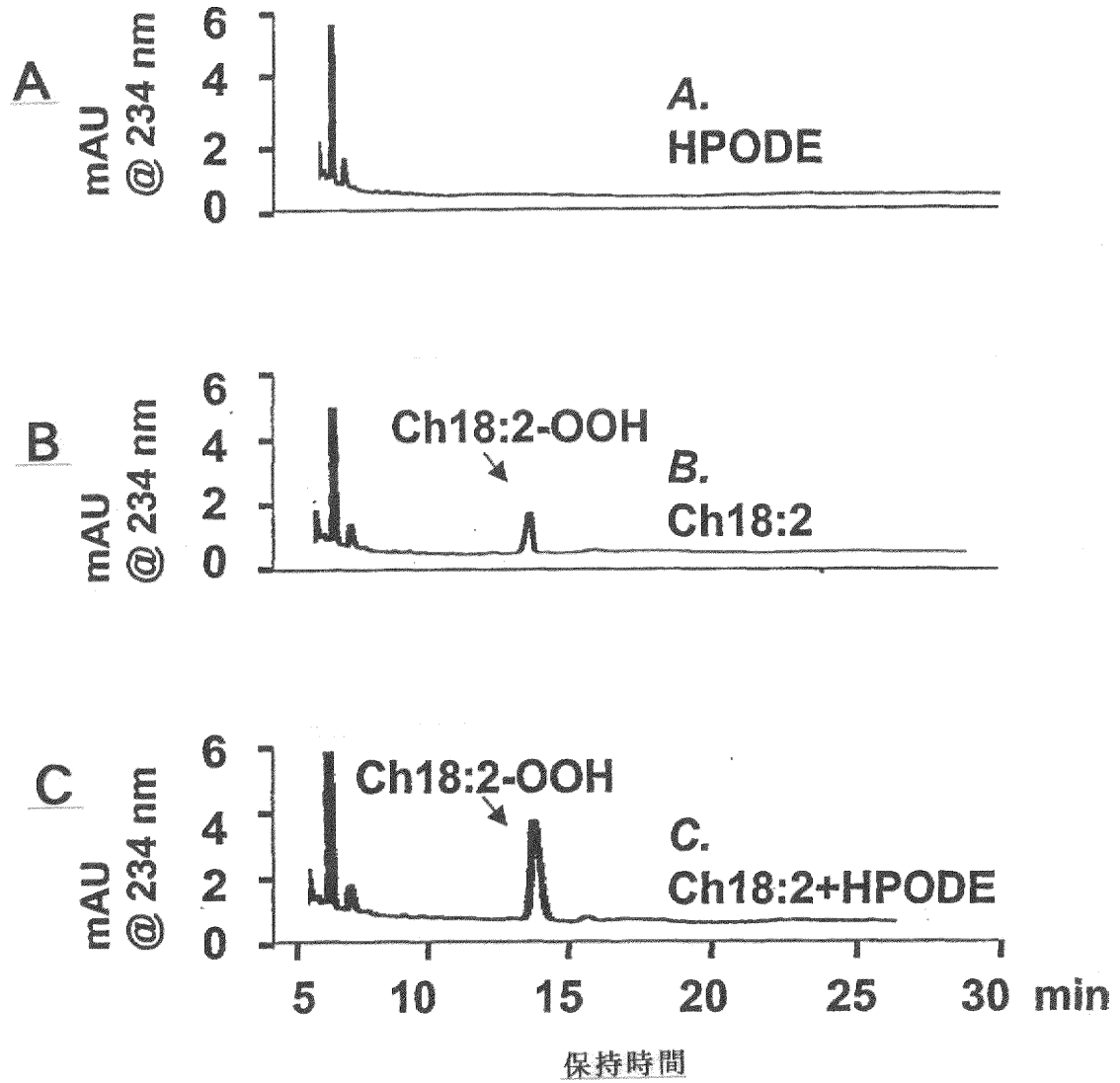
【図16】



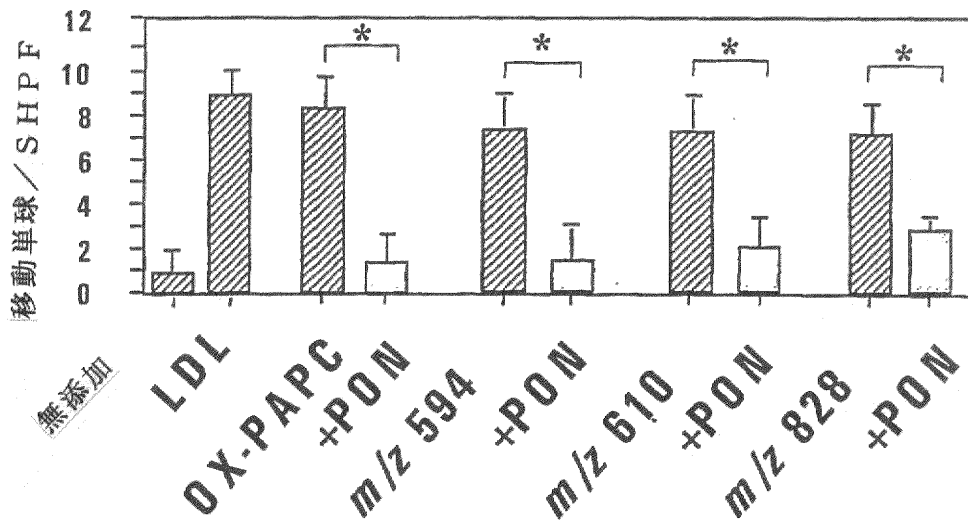
出発リン脂質

酸化生成物

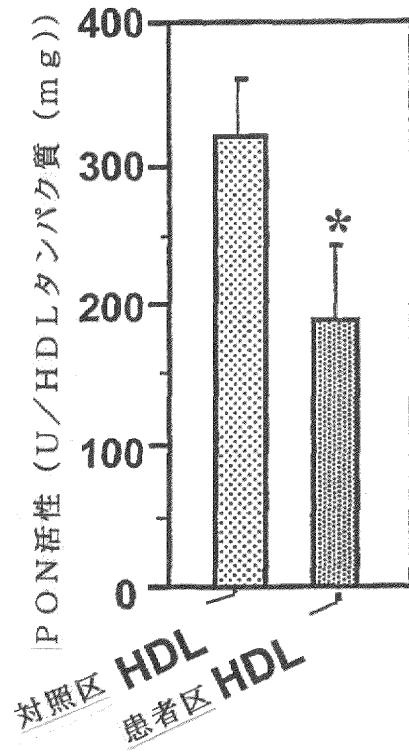
【圖17】



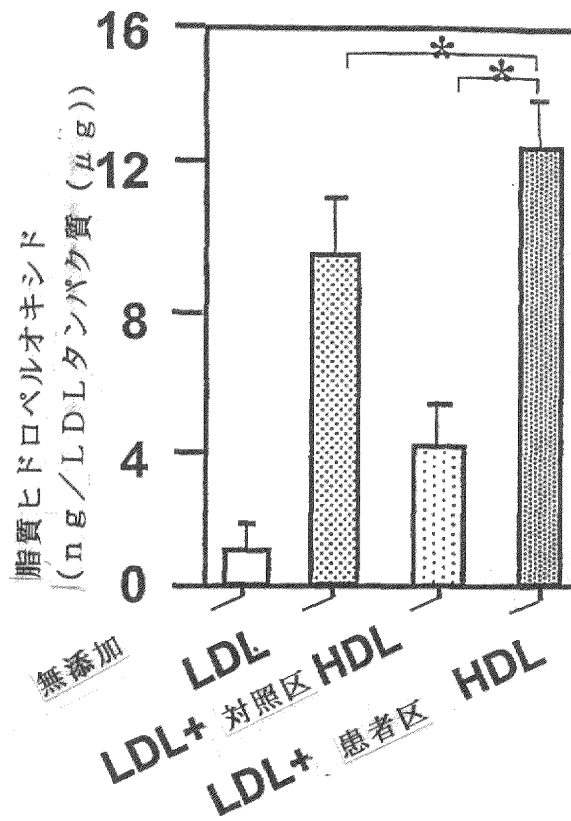
【圖18】



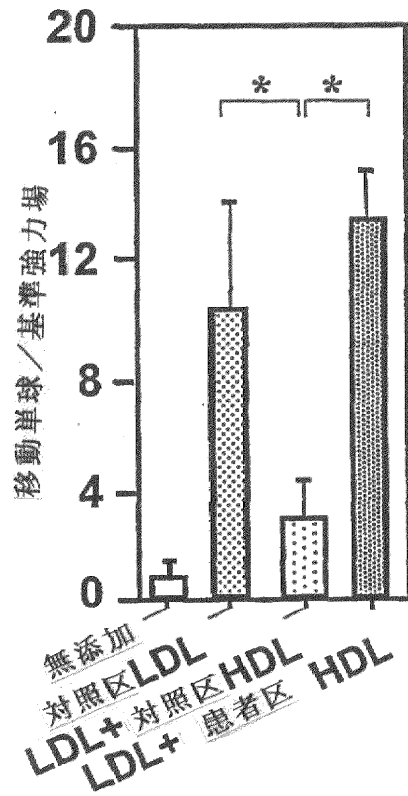
【図19A】



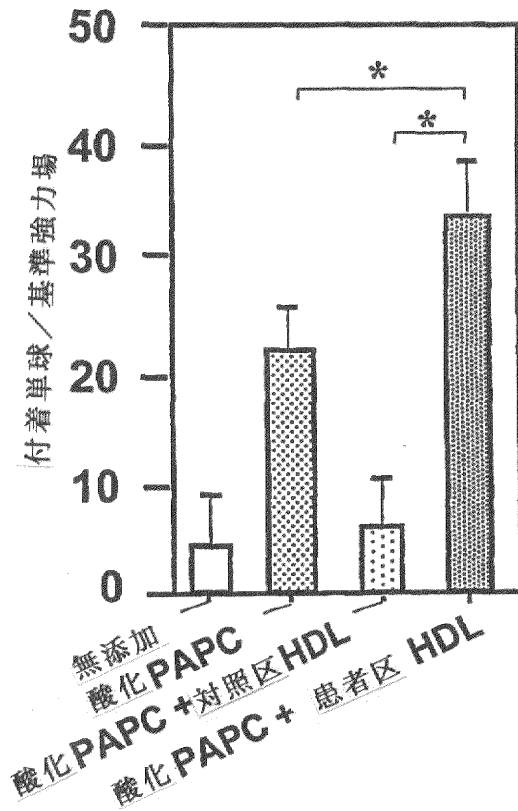
【図19B】



【図19C】



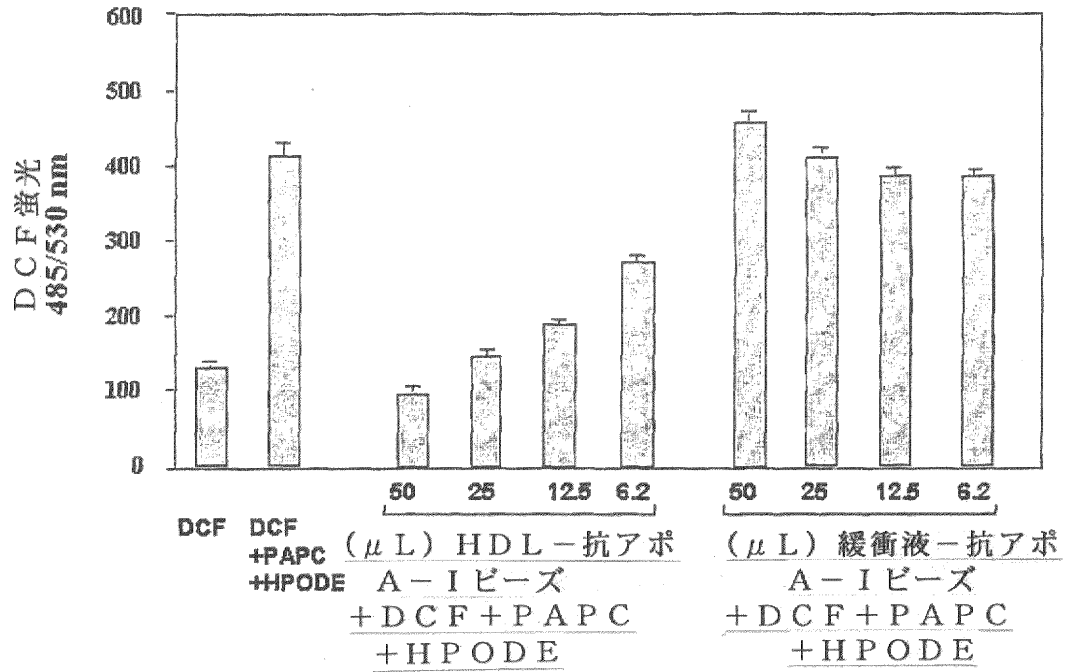
【図19D】



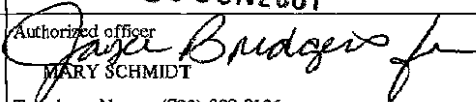
【図22】

HDLの防御性能

免疫アフィニティーで単離したHDLによるDCF酸化の増加防止



【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US01/10592
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 33/53; C07H 21/02, 21/04; A61K 48/00 US CL : 435/6, 7.1; 514/44; 536/23.1, 24.3, 24.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 7.1; 514/44; 536/23.1, 24.3, 24.5 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Database BIOSIS on STN. METZLER et al. "LDL stimulates mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression, independent of LDL receptors, in vascular smooth muscle cells". Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. August 1999, Vol. 19, No. 8, pages 1862-1871, abstract.	1-50
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 MAY 2001		Date of mailing of the international search report 18 JUN 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer  MARY SCHMIDT Telephone No. (703) 308-0196

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
G 0 1 N 33/48 33/58		G 0 1 N 33/48 33/58	B Z
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A G , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , B Z , C A , C H , C N , C O , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , D Z , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , M Z , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U Z , V N , Y U , Z A , Z W		
(72)発明者	ナヴァブ、 モハマド アメリカ合衆国 90066 - 1735 カリフォル ニア州 ロサンゼルス ローズウッド アベニュー 3247		
(72)発明者	ハマ、 スーザン アメリカ合衆国 90505 カリフォルニア 州 トーランス グランド サミット ロ ード 2639		
Fターム(参考)	2G045 AA01 AA29 BB10 BB14 BB20 BB46 BB50 BB51 CA25 DA63 DA64 FA16 FB06 FB12 GC30 2G054 AA07 BB04 BB05 BB12 EA03 GA04 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ03 QQ70 QQ79 QR48 QR50 QR66 QS03 QS11 QS12 QS17 QS33 QS36 QX02 QX07		

专利名称(译)	高密度脂蛋白功能测定		
公开(公告)号	JP2003529775A	公开(公告)日	2003-10-07
申请号	JP2001573042	申请日	2001-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	フォージェルマンアランエム ナヴァブモハマド ハマスーザン		
发明人	フォージェルマン、アラン、エム. ナヴァブ、モハマド ハマ、スーザン		
IPC分类号	G01N27/62 A61K31/7088 A61K38/43 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/06 A61P9/10 A61P19/02 A61P29/00 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/26 C12Q1/42 C12Q1/68 G01N21/78 G01N30/88 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/573 G01N33/58 G01N33/92		
CPC分类号	A61K48/00 A61P19/02 A61P29/00 C07H21/02 C07H21/04 C12Q1/42 C12Q1/6883 G01N33/573 G01N33/92 G01N2500/10 G01N2800/044		
FI分类号	G01N33/92.ZNA.Z C12Q1/02 G01N21/78.C G01N27/62.V G01N30/88.E G01N33/48.B G01N33/58.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/AA29 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/DA63 2G045/DA64 2G045/FA16 2G045/FB06 2G045/FB12 2G045/GC30 2G054/AA07 2G054/BB04 2G054/BB05 2G054/BB12 2G054/EA03 2G054/GA04 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ70 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR66 4B063/QS03 4B063/QS11 4B063/QS12 4B063/QS17 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07		
优先权	09/539569 2000-03-31 US 09/541468 2000-03-31 US		
其他公开文献	JP4675539B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于预后和/或诊断动脉粥样硬化或动脉粥样硬化风险的新颖测定法。高密度脂蛋白(HDL)或其成分可以防止脂质(例如存在于LDL中的脂质)氧化,还可以修复(减少)已经氧化的脂质,从而引起动脉粥样硬化斑块。业已发现,与形成有关的炎症反应甚至是形成的特征都可以减少。本发明的另一个发现是,HDL赋予这种保护的能力因人而异。因此,用于HDL的保护和/或修复活性的测定提供了用于动脉粥样硬化及其伴随损伤的风险的高效测定,并且本文提供了这种测定。

