

モノクローナル抗体を用いた酸化 LDL の高感度定量と動脈硬化

板部 洋之

Atherosclerosis and Sensitive Determination of Oxidized LDL Using Monoclonal Antibody

Hiroyuki ITABE

Department of Molecular Pathology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University,
1091-1 Suarashi, Sagamiko-machi, Tsukui-gun, Kanagawa 199-1095, Japan

(Received July 1, 2002)

Oxidized low-density lipoprotein (OxLDL) is thought to be involved in atherosclerotic lesion formation. We established a monoclonal antibody, DLH3, that recognizes oxidized phosphatidylcholine (OxPC) formed in OxLDL. A sensitive method for detecting OxLDL was enabled by a sandwich ELISA procedure utilizing DLH3 together with an anti-apoB antibody. Using the method, we demonstrated the presence of OxLDL in human circulating plasma for the first time, and the plasma OxLDL level in healthy subjects was estimated to be about 0.1 ng/ μ g LDL protein. OxLDL levels in patients with acute myocardial infarction are more than 3 times higher than in controls. Thus the plasma OxLDL level could be a good marker for cardiovascular disease. There are multiple metabolic enzymes for OxPC in plasma. We demonstrated that lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) is capable of metabolizing OxPC molecules in OxLDL, and that the plasma OxLDL level in patients with familial LCAT deficiency was about 3.5 times higher than in controls. OxLDL *in vivo* is likely to be metabolized by enzymatic activities in plasma, the reticuloendothelial system including Kupffer cells, and immunological responses. The OxLDL levels determined by this analytical procedure would reflect the physiologic balance between oxidative modification of LDL and metabolic clearance of OxLDL.

Key words—atherosclerosis; oxidized LDL; oxidized PC; monoclonal antibody

1. はじめに

近年の循環器疾患の増加は、ライフスタイルの欧米化、つまり動物性脂肪摂取の増加や交通手段の発達に伴う日常の運動不足がその基礎的な要因であると考えられている。わが国の死因の第2位は心疾患、第3位が脳疾患であり、また糖尿病や慢性腎不全などいろいろな疾患に伴って血管障害が進行することから、循環器疾患の重要性は極めて高い。

いくつもの大規模疫学研究から、血漿中のコレステロール運搬を担うリポタンパク質が動脈硬化の発症進展と密接な関係があることが指摘されている。しかしながら、コレステロール代謝の異常と動脈硬化の発症進展とがどのように関連しているのか、そ

のメカニズムの解明は今まさに進行中である。動脈硬化の発症には、脂質代謝のみならず、血管内皮細胞や平滑筋など血管機能を支えている細胞に対するさまざまな刺激、マクロファージやT細胞、B細胞などによる炎症反応、免疫反応など、多くの要因が関わっている。それらに加えて、リポタンパク質の酸化変性により生じる酸化 LDL が動脈硬化を引き起こす一要因として注目されている。

2. 動脈硬化症

動脈の内面を覆っている血管内皮細胞の働きにより、心臓から送り出される血液は凝固せずに流れることができる。動脈壁の何層にも並んだ血管平滑筋が収縮・弛緩することで血圧が調節され、血液が滞りなく流れている。血液に接する血管内腔側の内膜 (intima) は、一層の血管内皮細胞とその直下のエラスチン繊維からなる網状のシート (内弾性板; elastica lamina) からなる (Fig. 1)。血管平滑筋細胞層はその外側の血管中膜 (media) にある。動脈

帝京大学薬学部病態生化学教室 (〒199-0195 神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐 1091-1)

e-mail: h-itabe@pharm.teikyo-u.ac.jp

*本総説は、平成14年度日本薬学会学術振興賞の受賞を記念して記述したものである。

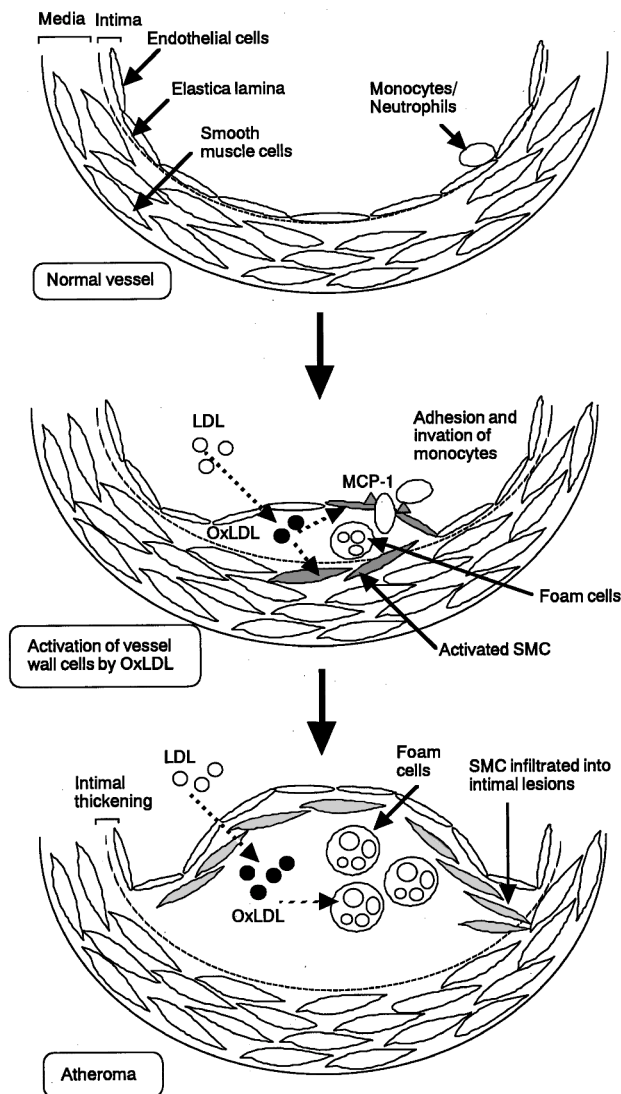


Fig. 1. Schematic Models of Atherosclerotic Lesion Formation

An arteries consists of a layer of endothelial cells on the inner surface, a sheet of elastica lamina, and layers of smooth muscle cells. In early atherosclerotic lesions, a large volume of lipids accumulates and a number of foam cells are appeared between the layer of endothelial cells and elastica lamina. Oxidatively modified LDL stimulates endothelial cells to induces monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) which recruit circulating monocytes to vessel wall tissue. Macrophages in intima bind and take up OxLDL, and subsequently change themselves into foam cells. A part of smooth muscle cells infiltrates and moves it on intimal space from media. In advanced atheroma, a cap structure is formed with smooth muscle cells and collagens near the surface area of thickened intima, and a large number of foam cells and smooth muscle cells are appeared in the deep area of intima. Such atherosclerotic lesions are mechanically valveable, and once a part of atheroma is cracked or some endothelial cells are removed, thrombi are formed quickly which lead to acute myocardial infarction.

硬化の初期に、内膜部分にコラーゲンの増加、局所的な脂質沈着、マクロファージの浸潤などの変化が現れる。病変部では、内膜への脂質の蓄積が著しく、細胞内に脂質を蓄積した泡沫細胞 (foam cells) が多数出現する。泡沫細胞の多くはマクロファージに由来するが、また一部の平滑筋細胞にも泡沫化が見られる。病変が進展して粥腫 (atheroma) を形成すると、肥厚した内膜で平滑筋細胞の増殖とコラーゲンなどの繊維成分の蓄積で血管内腔側に被膜を生じ、病巣深部には多数のマクロファージや平滑

筋細胞が浸潤し、脂質及び細胞外マトリックスを大量に蓄積する。粥腫の内部は脂質の割合が多く、比較的柔らかい。このような粥腫病変の形成に伴い血管の内腔が少しずつ狭まると同時に粥腫部分の中膜平滑筋層は厚くなり、血管全体は硬化して弾力性を失う。¹⁾

心筋に酸素を供給する冠状動脈、心臓から全身に血液を送り出す大動脈、そして脳に血液を運ぶ頸動脈の3ヵ所が動脈硬化の好発部位である。これらの血管の血流が滞ると、その周囲の組織では酸素が欠

乏し、激しい筋肉痛や組織壊死が起こる。冠状動脈の動脈硬化によって心筋への酸素供給が低下すると、一過性の胸痛発作を起こす狭心症となる。動脈硬化がしばしば致命的な心筋梗塞の基礎疾患となるのは、脆弱化した病巣組織の傷害が引き金となって血栓が生じ、血管が完全に閉塞するからである。狭心症や心筋梗塞は、壮年期以後加齢とともに増加するが、未成年の動脈にもすでに初期の動脈硬化病変が現れている。自覚症状がないため、動脈硬化は気が付かないうちに進行し、ある程度進んだ段階で狭心症や心筋梗塞など生命に関わる大変な病気の引き金になるのである。

3. 泡沫細胞と酸化 LDL

動脈硬化病変では、泡沫細胞の集積が特徴的な変化として観察される。マクロファージのスカベンジャー受容体は、LDLとは結合せず化学修飾を受けた LDL を結合する。これまでに多数のスカベンジャー受容体が発見され、その遺伝子がクローニングされている。²⁾ スカベンジャー受容体のリガンド特異性は概して低く、アセチル化修飾した LDL (アセチル LDL) や酸化 LDL の他、ポリイノシン酸やデキストラン硫酸など陰性荷電をもつ高分子などが結合する性質がある。アセチル LDL や酸化 LDL を取り込んだマクロファージは、脂質を蓄積し泡沫細胞になる。しかし、生体内でアセチル LDL が生じる可能性は考え難く、酸化 LDL が生体内リガンドであり病巣での泡沫細胞形成を起こすと考えられている。血管内皮細胞と共培養する、あるいは低濃度の硫酸銅とインキュベートするなど様々な条件で酸化させた LDL もスカベンジャー受容体に認識されるようになり、マクロファージに取り込まれて泡沫細胞を形成させる。³⁾

また、酸化 LDL は血管内皮細胞からの単球走化性因子 (monocyte chemoattractant protein-1; MCP-1) の発現分泌を促し、それによって単球の血管組織への浸潤を促進する。^{4,5)} 組織に浸潤したマクロファージは、酸化 LDL を取り込み泡沫細胞を形成する (Fig. 1)。これらの酸化 LDL のもつ作用から、生体内の酸化 LDL が動脈硬化促進因子として寄与する可能性が注目されている。

4. 酸化 LDL

LDL は、1 分子の apoB タンパク質と種々の脂質からなる粒子である。apoB タンパク質の分子量は

約 540 KDa なので、LDL 粒子全体の重量の約 25% にもなる。1 粒子の LDL 中に約 700 分子のリン脂質が含まれており、その半分以上はホスファチジルコリン (PC) である。

LDL が酸化変性を受けると、LDL の構成成分は脂質もアポ B タンパクも多様な修飾構造に変化していると考えられる。PC に結合している高度不飽和脂肪酸部分が、脂質過酸化反応の開始点となると考えられている。脂質過酸化反応は周囲の脂質分子に連鎖反応で拡がり、多数の脂質分子が酸化される。反応性に富むアルデヒド分子はアポ B タンパク質の側鎖、特にリジンのアミノ基を修飾する。マロンジアルデヒド、アクロレインやヒドロキシノネナールなどの低分子アルデヒドに加えて、一部の酸化 PC が apoB タンパクを修飾する。^{6,7)} また apoB タンパク上でのラジカル反応も起こりチロシン 2 量体、ニトロチロシンなどの修飾されたアミノ酸残基を生じたり、アポ B タンパクの架橋や断片化も起こり、極めて不均一な粒子に変わっている。⁸⁾

マクロファージを泡沫化することに加え、血管内皮と単球の粘着性亢進、血栓形成促進作用、マクロファージの増殖、平滑筋細胞の分化・増殖、T リンパ球の遊走促進など種々の細胞活性化作用を有する酸化 LDL は、動脈硬化の発症要因と考えられている。しかしながら、生体内の酸化 LDL の実態はなかなか明らかにされてこなかった。酸化 LDL は生体内では非常に微量な成分であり、また不均一な修飾を受けた粒子であるため、その分析法が確立していなかったのである。私たちは、酸化 LDL に対するモノクローナル抗体を樹立し、⁹⁾ これを用いて酸化 LDL の高感度定量法を開発した。¹⁰⁾ この方法により、それまで長らく存在が疑問視されていた血中での酸化 LDL の定量に成功し、ヒト血中に酸化 LDL が存在していることを明らかにすることができた。¹⁰⁻¹³⁾

5. 血漿酸化 LDL の測定法

筆者らの作成した抗酸化 LDL モノクローナル抗体「DLH3」は、硫酸銅処理した LDL と結合するが、未処理の LDL、アセチル LDL、マロンジアルデヒド LDL、あるいは糖化 LDL とは結合しない (Fig. 2)。⁹⁾ また、DLH3 抗体は鉄イオンで酸化した PC と結合するが、未酸化 PC や PC 以外の脂質と

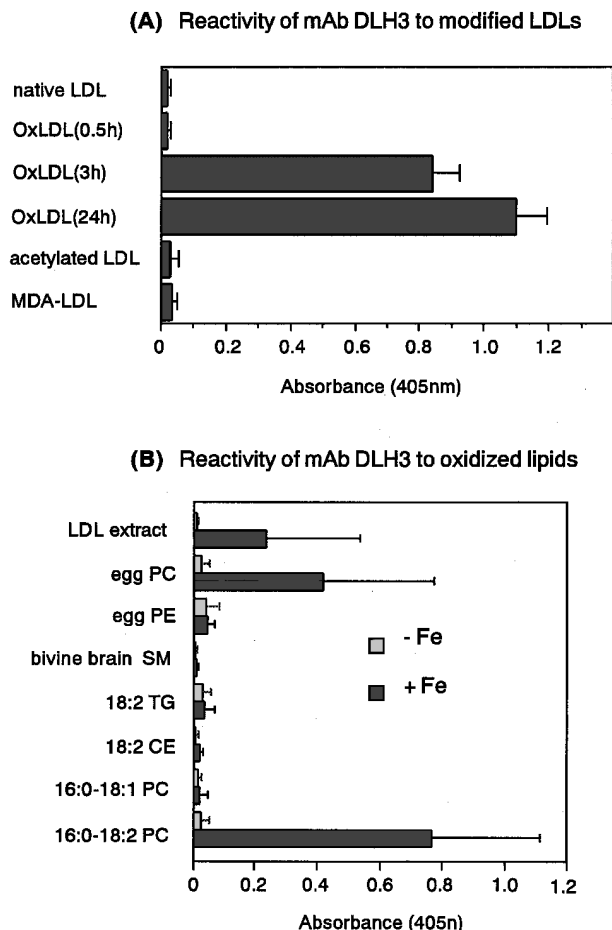


Fig. 2. Characterization of Anti-OxLDL Monoclonal Antibody DLH3

(A) Reactivity of anti-OxLDL mAb DLH3 to various modified LDLs. Microtiter wells were coated with 1 μ g each of native and modified LDL. Direct ELISA was performed with 1 : 10,000 diluted DLH3. OxLDL was prepared by incubating LDL with CuSO_4 at 37°C for 0.5, 3 and 24 h. MDA-LDL: malondialdehyde-treated LDL. (B) Reactivity of anti-OxLDL mAb DLH3 to various oxidized lipids. Lipids were oxidized by incubating with FeSO_4 and ascorbate in the presence of BSA at 37°C for 3 h. Microtiter wells were coated with 0.1 nmol each of the lipids (modified from Ref. 9).

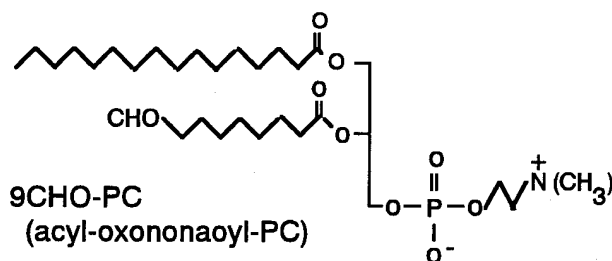


Fig. 3. The Structure of Aldehyde-Containing PC

は結合しない。PCの酸化生成物中よりDLH3抗体の抗原成分を分離し、DLH3抗体が9CHO-PCや5CHO-PCなどのアルデヒド型の酸化PCに強く結合することを明らかにした (Fig. 3).⁷⁾ アルデヒド

型酸化PCもapoBなどのタンパク質に結合し、この酸化PC-apoB複合体部分に対してもDLH3抗体はよく結合する。

ヒト動脈硬化病巣の免疫組織化学において、マクロファージ由来泡沫細胞に一致して、DLH3抗体及びapoB抗体陽性に染色され、酸化LDLが泡沫細胞に局在することが示された。^{9,11)} 免疫組織化学染色する際には、パラフィン包埋した組織を有機溶媒で脱脂するため、通常のリン脂質は除去されている。これらの結果から、泡沫細胞内に見出された抗原は酸化PC-apoB複合体であると考えられる。

酸化LDL上では酸化PC-apoB複合体構造が生じていることに注目し、酸化PCに結合するDLH3抗体とapoBタンパク質に結合する抗体を併せ用いたサンドイッチELISA法で酸化LDLの定量法を開発した¹⁰⁾ (Fig. 4)。DLH3抗体をあらかじめコートしたプレートにヒト血漿LDLを添加し、LDL中に含まれる酸化LDLをDLH3抗体に結合させる。そして結合したLDL量を抗アポB抗体と標識した二次抗体を用いて測定する方法である。硫酸銅処理した酸化LDLを標準物質とすると、10 ngまでの範囲で再現性よく定量できる。

この方法で測定した結果、健常のヒト血漿LDL画分中の酸化LDLは約0.1 ng/ μ g LDLタンパク質と求められた。このことは、硫酸銅処理した酸化LDLとの比較した反応性でLDLの約0.01%が酸化LDLであることを示唆している。ラットに放射標識酸化LDLを静脈内投与した実験により、酸化LDLは血漿中での半減期が短く非常に効率的にクリアランスされることが知られていた。¹⁴⁾ このことから、血漿中には酸化LDLは存在しないと長らく考えられてきた。われわれは、健常者血漿においても極微量ながら常に酸化LDLが存在していることを初めて示すことができた。

疾患に伴う血漿酸化LDLレベルの変動についてもいくつかの検討例がまとまってきている (Table 1)。江原らは多数の冠動脈疾患患者について血漿中の酸化LDLを測定し、急性心筋梗塞患者血漿のLDL酸化レベルが健常者の値に対して約3.4倍の高値を示すことを見出した (Fig. 5)。¹¹⁾ また、西らは内膜摘出術を受けた頸動脈硬化症患者について、患者血漿のLDL酸化レベルが健常者の値に対して約1.5倍の高値を示すことを見出している。¹³⁾ これ

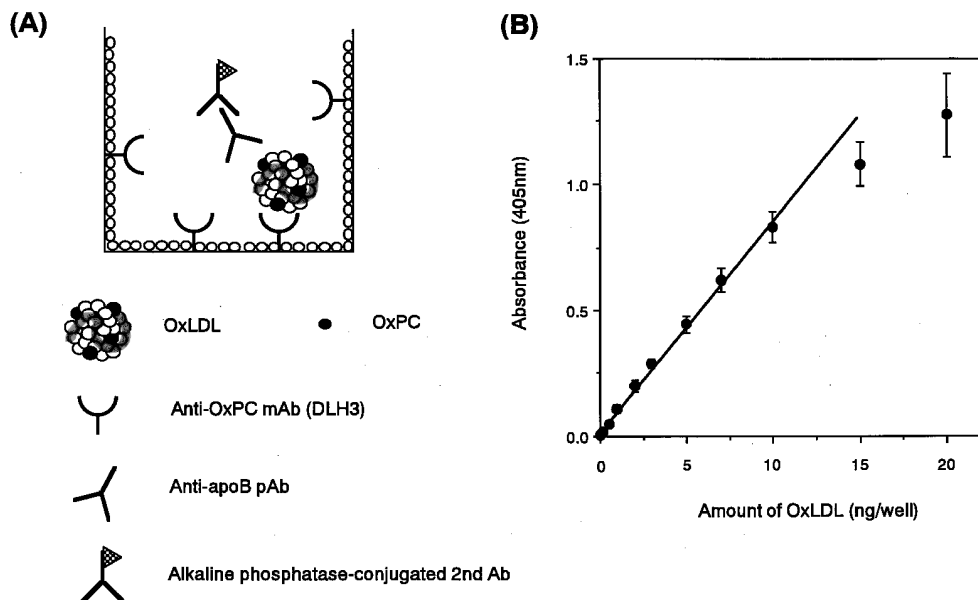


Fig. 4. Sandwich ELISA Procedure for OxLDL Determination

(A) A schematic scheme of the sandwich ELISA procedure. To microtiter wells pre-coated with anti-OxPC mAb DLH3, LDL fractions from patients were added. After washing the microtiter wells, OxLDL bound to DLH3 antibody was detected with anti-apoB pAb and alkaline phosphatase-conjugated 2nd antibody. (B) A standard curve for the OxLDL determination. Using OxLDL prepared by incubation of LDL with CuSO_4 , a linear response was observed up to 10 ng of OxLDL protein/well (modified from Ref. 10).

Table 1. Diseases Associated with Increase in Plasma OxLDL Level

Acute coronary infarction
Cardiovascular diseases (50% stenosis)
Cerebral infarction
Carotid arteriosclerosis (receiving endoarterectomy)
Familial LCAT deficiency
Hemodialysis
Dilated cardiomyopathy

らの結果から、循環器疾患の進展に伴って酸化LDLの生成蓄積が進んでいる可能性が強く示唆されるとともに、今後診断情報としての可能性も期待させるものである。

この酸化LDL定量法は優れた感度を持つ一方、各検体からLDL画分をあらかじめ分離する必要があり、臨床的な応用を広げるにはより簡便な測定条件が期待された。DLH3抗体を用いた同じサンドイッチELISAの原理を用いて、希釈血漿で測定を行うプロトコールが協和メデックス社によりキット化されている。¹⁵⁾ 都島らは、血管造影で冠状動脈に狭窄の認められた患者群について検討し、狭窄群の血漿酸化LDL値が、年齢の一致した無狭窄群より有意に高いことを見出している。¹⁶⁾ 総コレステロー

ル、トリグリセリド、HDLコレステロール、apoBなどの他の血清脂質パラメーターと比較して、酸化LDL値が患者群の選別効果に関して、最も有効性が高いことが見出された。この測定法で捕捉している酸化PC-apoB複合体構造が、酸化変性したLDLのすべてを表しているわけではないが、すでに患者循環血中に存在している酸化LDLを鋭く反映できる指標として期待している。

6. 血漿酸化LDLの代謝

血漿中に酸化LDLが存在すること、そして心筋梗塞などの疾患に伴ってその値が変動することが明らかになった。では、一旦生じた血漿中の酸化LDLはどのような代謝を受けているのだろうか。

いろいろな疾患における酸化LDL値の変動を調べている研究の中で、われわれは家族性LCAT欠損症患者において、血漿酸化LDL値が有意に高いことを見出した。¹²⁾ LCAT(レシチン:コレステロールアシル転移酵素)は、細胞膜の遊離型コレステロールを引き抜き、コレステリルエステル(CE)に転換するとともにHDL粒子に載せて肝臓に逆転送する役割を担っている。LCAT活性の欠失により、血漿HDLが著しく減少し、魚眼病といわれる眼の白濁障害を引き起こすことが知られている。

LCAT欠損によって酸化LDLが増加していたこ

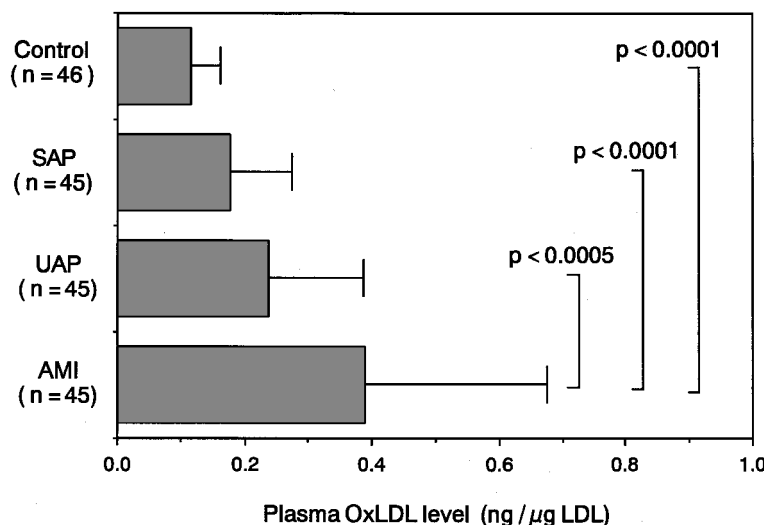


Fig. 5. Plasma LDL Oxidation Levels Increase in the Patients with Cardiovascular Diseases

Amounts of OxLDL were determined using the sandwich ELISA procedure. LDL fractions were separated from the plasma from patients with cardiovascular diseases including acute myocardial infarction (AMI), unstable angina pectris (UAP), and stable angina pectris (SAP) together with age-matched control subjects (modified from Ref. 11).

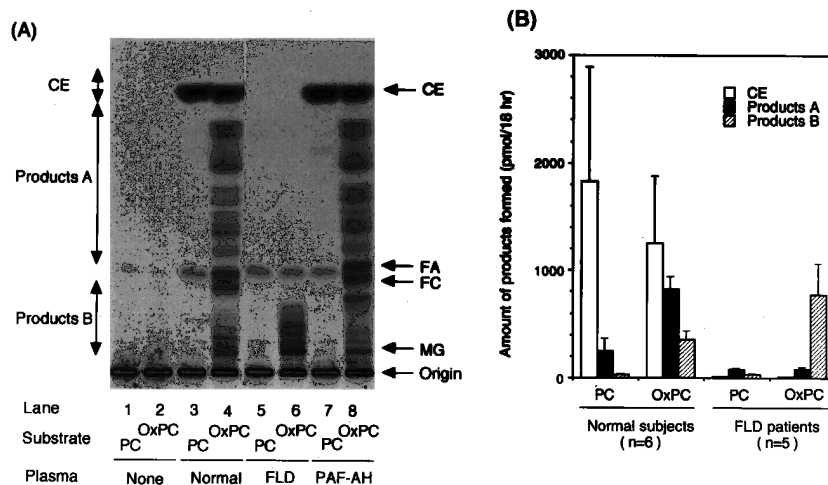


Fig. 6. LCAT is Capable of Metabolizing Oxidized PC

(A) LCAT-dependent metabolites from PC or OxPC were separated on TLC. 1-Palmitoyl-2-[¹⁴C]-linoleoyl PC was incubated with FeSO₄ and ascorbate at 37°C for 3 h to prepare OxPC. Radioactive PC or OxPC was incubated at 37°C for 18 h with human plasma from normal subject, patients with familial LCAT deficiency (FLD) or a subject deficient in platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). Total lipids extracted from the reaction mixture was separated on a TLC. The plate was developed with a solvent system chloroform : methanol : acetic acid=98 : 2 : 1 followed by another solvent system hexane : ethyl ether : acetic acid=80/20/1. Radioactive bands were visualized and quantified using BAS-1500 imaging analyzer. (B) Amounts of the metabolites (CE, products A and B) from either PC or OxPC were quantified. LCAT-deficient plasma clearly failed to generate the products A from OxPC (Ref. 17).

とから、LCATが酸化LDL上の酸化PCの代謝に寄与している可能性が推察された。そこで、放射標識したPCと酸化PCを、健常者及びLCAT欠損患者血漿とインキュベートした (Fig. 6)。健常血漿によってPCからCEが産生され、また酸化PCからも多数の代謝産物 (Fig. 6のProducts A, B)が生じた。LCAT欠損患者血漿では、PCからのCE産生はなく、それとともに酸化PCからの代謝

産物も生じなかった。¹⁷⁾ここで用いた酸化PCは、PCを鉄イオンで処理した酸化PC混合物なので、LCATによる代謝産物も多数の混合物になっている。LCAT阻害剤のDTNB (ジチオニトロ安息香酸)によっても、健常血漿中の酸化PC代謝活性が消失した。これらのことから、LCATが酸化PCの代謝活性を持ち、血漿酸化LDLの代謝に寄与していることが示された。

アルデヒド型 PC など、酸化 LDL 中に生じる酸化 PC が MCP-1 の発現誘導をはじめさまざまな細胞刺激作用の活性物質であると考えられている。^{18,19)} また、酸化 PC はマクロファージによる酸化 LDL の認識エピトープになっている可能性が指摘されている。²⁰⁾ 血漿中には LCAT 以外にも酸化 PC の代謝活性を持つ酵素として、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) あるいはパラオキシナーゼ (PON) の存在が知られている。²¹⁾ これらの酵素が血漿酸化 LDL の定常レベルの維持に寄与しているものと考えている。

前述したように、血漿中の酸化 LDL は非常に効率的にクリアランスされ、そのほとんどは主に肝臓に移行する。¹⁵⁾ 肝臓のクッパー細胞はスカベンジャー受容体を発現しており、血中からの酸化 LDL のクリアランスに大きく寄与している。ただし、スカベンジャー受容体 SR-A ノックアウトマウスにおいて、酸化 LDL の肝でのクリアランスにはほとんど影響がなかった²²⁾ ことから、クッパー細胞には他の受容体も発現していることが推測されている。

免疫系、とくに体液性免疫が酸化 LDL の排除に

寄与している可能性が考えられる。庄司らは、健康成人における血漿酸化 LDL 濃度と抗酸化 LDL 自己抗体価とが逆相関関係にあることを報告している。²³⁾ 自己抗体価が高いヒトはその抗体によって酸化 LDL のクリアランス効率が高まって血漿酸化 LDL 濃度が低くなっていると考えられた。最近、脾臓摘出したマウスでは、血中の抗酸化 LDL 自己抗体価が低下し、また動脈硬化病巣が増大するが、すでに動脈硬化を発症している apoE ノックアウトマウスの B 細胞を移植すると、摘脾マウスの病巣が著しく縮小し、体液性免疫による抗動脈硬化作用が指摘されている。²⁴⁾

血漿酸化 LDL の代謝には、酵素的な作用、受容体を介するクリアランス、そして自己抗体を介した排除機構がそれぞれに寄与している。少なくとも健康が維持されている状態では、酸化 LDL の生成・蓄積と、酸化 LDL のクリアランスとがあるバランスをとって均衡しているものと考えている (Fig. 7)。いろいろな疾患時にはこのバランスが破綻し、血漿中の酸化 LDL が著しい増加をしているにもかかわらず、効果的にクリアランスできない状態に陥る

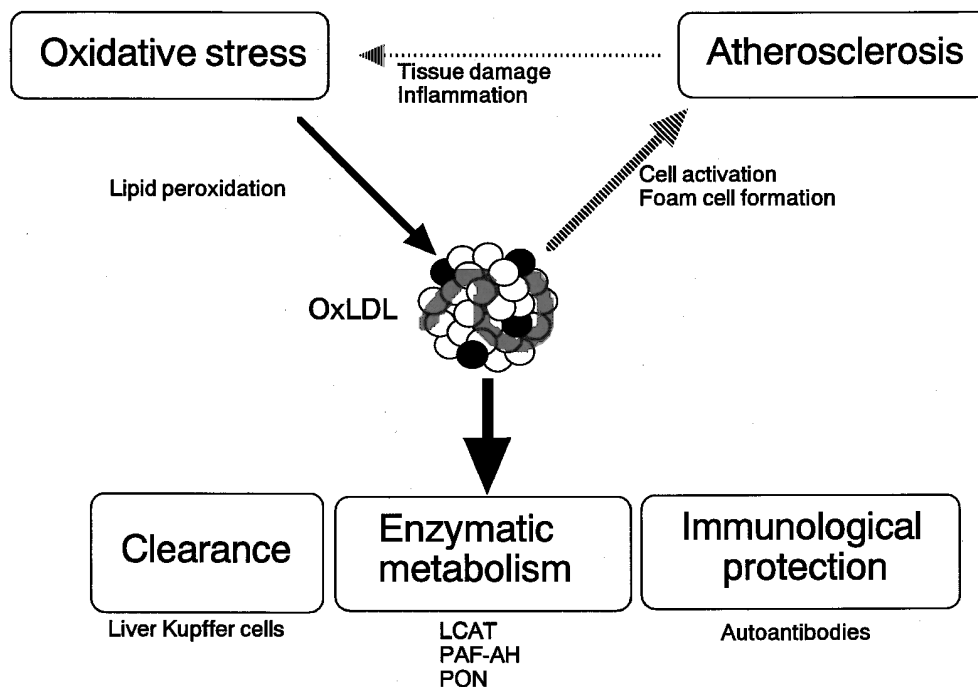


Fig. 7. Metabolic Dynamics of OxLDL *in vivo*

OxLDL is formed through lipid peroxidation on LDL particles, which is caused by a variety of oxidative stress. Once OxLDL is formed, it could act as a factor for atherogenesis by activating endothelial cells and by taken up by macrophages to form foam cells. However, a multiple function can reduce the OxLDL concentration in circulation. Liver Kupffer cells have a large capacity for clearance of circulation OxLDL. Plasma enzymes including LCAT contribute to detoxify OxLDL, and autoantibodies to OxLDL is thought to have anti-atherogenic properties. Plasma OxLDL levels would represent the balance between oxidative stress and protective conditions.

のではないだろうか。

7. おわりに

動脈硬化症は青年期から自覚症状のないまま徐々に発症進展し、のちに心筋梗塞のような重篤な疾患を引き起こす。病巣形成には様々な要因が関わっていて、発症原因を突き止めることは容易ではない。発症要因の1つと考えられている酸化LDLが血漿で測定できるようになってきた現在、循環器疾患の効果的な診断情報として活用されることを期待している。今後は、測定される酸化LDLの実態をより明確にすることと、測定値の臨床的な位置づけとが改めて重要な課題になってきている。

この一連の研究は、帝京大学薬学部病態生化学教室(高野達哉教授)において行われ、また多くの大学、施設、企業との共同研究の成果によるものです。ともに研究に携わっていただいた方々に、厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- Ross R., *Nature*, **362**, 801–809 (1993).
- Yamada Y., Doi T., Hamakubo T., Kodama T., *Cell. Mol. Life. Sci.*, **54**, 628–640 (1998).
- Steinbrecker U. P., Parthasarathy S., Leake D. S., Witztum J. L., Steinberg D., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 3883–3887 (1984).
- Berliner J.A., Territo M.C., Sevanian A., Ramin S., Kim J. A., Bamshad B., Esterton M., Fogelman A. M., *J. Clin. Invest.*, **85**, 1260–1266 (1990).
- Gu L., Okada Y., Clinton S.K., Gerard C., Sukhova G. K., Libby P., Rollins B. J., *Mol. Cell*, **2**, 275–281 (1998).
- Itabe H., *Prog. Lipid Res.*, **37**, 181–207 (1998).
- Itabe H., Yamamoto H., Imanaka T., Suzuki M., Kawai Y., Nakagawa Y., Suzuki A., Takano T., *J. Biol. Chem.*, **271**, 33208–33217 (1996).
- Heinecke J. W., *Atherosclerosis*, **141**, 1–15 (1998).
- Itabe H., Takeshima E., Iwasaki H., Kimura J., Yoshida Y., Imanaka T., Takano T., *J. Biol. Chem.*, **269**, 15274–15279 (1994).
- Itabe H., Yamamoto H., Imanaka T., Shimamura K., Uchiyama H., Kimura J., Sanaka T., Hata Y., Takano T., *J. Lipid Res.*, **37**, 45–53 (1996).
- Ehara S., Ueda M., Naruko T., Haze K., Itoh A., Otsuka M., Komatsu R., Matsuo T., Itabe H., Takano T., Tsukamoto Y., Yoshiyama M., Takeuchi K., Yoshikawa J., Becker A. E., *Circulation*, **103**, 1955–1960 (2001).
- Jimi S., Uesugi N., Saku K., Itabe H., Zhang B., Yamashita S., Matsuzawa Y., Arakawa K., Takebayashi S., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **19**, 794–801 (1999).
- Nishi K., Itabe H., Uno M., Kitazato K. T., Horiguchi H., Shinno K., Nagahiro S., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, in press.
- Van Berkel T. J. C., De Rijke Y. B., Kruijt J. K., *J. Biol. Chem.*, **266**, 2282–2289 (1991).
- Kohno H., Sueshige N., Oguri K., Izumidate H., Masunari T., Kawamura M., Itabe H., Takano T., Hasegawa A., Nagai R., *Clin. Biochem.*, **33**, 243–253 (2000).
- Toshima S., Hasegawa A., Kurabayashi M., Itabe H., Takano T., Sugano J., Shimamura K., Kimura J., Michishita, I., Nagai R., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 2243–2247 (2000).
- Itabe H., Hosoya R., Karasawa K., Jimi S., Saku K., Takebayashi S., Imanaka T., Takano T., *J. Biochem.*, **126**, 153–161 (1999).
- Watson A. D., Leitinger N., Navab M., Faull K. F., Hörkkö S., Witztum J. L., Palinski W., Schwenke D., Salomon B. G., Sha W., Subbanagounder G., Fogelman A. M., Berliner J. A., *J. Biol. Chem.*, **272**, 13597–13607 (1997).
- Davies S. S., Pontsler A. V., Marathe G. K., Harrison K. A., Murphy R. C., Hinshaw J. C., Prestwich G. D., Hilaire A. S., Prescott S. M., Zimmerman G. A., McIntyre T. M., *J. Biol. Chem.*, **276**, 16015–16023 (2001).
- Hörkkö S., Bird D. A., Miller E., Itabe H., Leitinger N., Subbanagounder G., Berliner J. A., Friedman P., Dennis E. A., Curtiss L. K., Palinski W., Witztum J. L., *J. Clin. Invest.*, **103**, 117–128 (1999).
- Navab M., Berliner J. A., Subbanagounder G., Hama S., Lusis A. J., Castellani L. W., Reddy S., Shih D., Shi W., Watson A. D., VAn Lenten B. J., Vora D., Fogelman A. M., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 481–488 (2001).

-
- 22) Van Berkel T. J. C., Van Velzen A., Kruijt J. K., Suzuki H., Kodama T., *Biochem. J.*, **331**, 29–35 (1998).
- 23) Shoji T., Nishizawa Y., Fukumoto M., Shimamura K., Kimura J., Kanda H., Emoto M., Kawagishi T., Morii H., *Atherosclerosis*, **148**, 71–177 (2000).
- 24) Caligiuri G., Nicoletti A., Poirier B., Hannson G. K., *J. Clin. Invest.*, **109**, 745–753 (2002).