

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08627

研究課題名(和文) 心血管イベントの予測因子としての脂質代謝酵素動態の解明

研究課題名(英文) Elucidation of lipid metabolizing enzyme dynamics as a predictor of cardiovascular events

研究代表者

小林 淳二 (KOBAYASHI, Junji)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：60302577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脂質代謝酵素の動脈硬化症への影響は未だ明確ではない。本研究では、脂質代謝酵素あるいは制御蛋白であるリポ蛋白リパーゼ(LPL)、血管内皮リパーゼ(EL)、血管内皮細胞アンカー蛋白(GPIHBP1)、上述系で測定した血清HL蛋白量と動脈硬化度との相関性を家族性高コレステロール血症患者で明らかにした。その結果、ELとGPIHBP1は動脈硬化進展度予測因子であることが示唆された一方HTGLやLPLに関しては、頸動脈の動脈硬化重症度を必ずしも反映しないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is not clear how the lipid metabolizing enzyme affects arteriosclerosis. In this study, we investigated the relationship of serum lipoprotein lipase (LPL), serum HL protein, vascular endothelial lipase (EL), and glycosylphosphatidylinositol anchored high density lipoprotein binding protein 1 (GPI-HBP1) to the degree of arteriosclerosis in patients with familial hypercholesterolemia. As a result, it was suggested that EL and GPIHBP1 are predictors of arteriosclerotic progression, while HTGL and LPL do not necessarily reflect arteriosclerotic severity of the carotid artery.

研究分野：病態検査学

キーワード：リポ蛋白リパーゼ 肝性リパーゼ 血管内皮リパーゼ GPIHBP1 頸動脈エコー

### 1. 研究開始当初の背景

家族性高コレステロール血症(FH)は高LDLコレステロール血症と早発性冠動脈硬化を特徴とする遺伝性脂質異常症である。FHの死因の約60%は心筋梗塞である一方40歳以下の若い心筋梗塞患者の中で約40%を占める。しかし、その動脈硬化進展度や生命予後は個人差がある(Hobbs HH, NEJM)。脂質代謝酵素LPLやHLはその重要な決定因子である可能性が以前より指摘されている(Dugi ATVB)。

LPLは、脂肪細胞、骨格筋、マクロファージ(M)で合成され、カイロミクロンやVLDLの代謝を司る。HLは、肝実質細胞で合成され、中間型リポ蛋白(IDL)やHDL2の代謝を司る。従来、LPLとHLは動脈硬化性、抗動脈硬化性の相反する側面を有することが指摘されている(Fojo S, Curr Opin Lipidol)。その理由としてLPL、HLは上記のリポ蛋白代謝を司る酵素機能と別にレムナントなどを細胞に取り込ませる橋渡しの機能を有することが挙げられる(Fojo S, Curr Opin Lipidol)。その結果、これらの酵素はMへのコレステロール取り込みを促進しその泡沫化を起こし動脈硬化症を進展させる。

上述したリポ蛋白代謝酵素としての側面と、この局所的にM泡沫化を促進する側面との総和が全体的に動脈硬化症進展とどのように関係するかをヒトで明らかにしたのは少数のFHホモ症例を対象とした米国の研究者による一報のみである(Dugi ATVB)。彼らは15名のホモFHを対象としてLPL活性(蛋白量)が高いほど、HL活性が低いほど冠動脈と胸部大動脈の石灰化程度がより高度であると結論づけた。

今日、当時の酵素測定法、動脈硬化評価法に比較しその後の進歩が著しい。動脈硬化症の評価法として頸動脈超音波法や冠動脈CT法が普及している。一方酵素動態の評価も酵素活性(Imamura, JLR)だけでなく蛋白量測定系も最近申請者らにより次々と確立された。更にLPL、HLとともにlipase familyの1つとして1999年に新たに血管内皮リパーゼ(EL)が同定された。これは高比重リポ蛋白(HDL)粒子内のリン脂質(PL)に基質特異性が高くHDL代謝を促進する。しかし上記LPL、HLと同様その動脈硬化への寄与は明確ではない。

### 2. 研究の目的

(1) 代表者らは脂質代謝酵素であるLPL、HLの活性、蛋白量測定系確立を行い、過去5年間欧文医学雑誌に報告した(Imamura S, JLR)。

(2) FH症例に関し、申請者の施設は全国一の症例数を有する。これらを背景としヘテロFH症例の動脈硬化症進展度と上記脂質代謝酵素動態(活性、蛋白量)との相関性を明らかにする。当初の上記目的に加え研究推進の必要性から以下を目的として追加。

(3) 従来脂質代謝酵素測定するための試料となるヘパリン静注後血漿(PHP)を得ることが困難となり、血清を試料としてHL蛋白量を測定するための系の確立が必須となった。血清中HLに反応する新しいモノクローナル抗体(MoAbマウス9A1、MoAbラット141A1)を開発し、血清HL蛋白量測定用ELISAシステムの確立を目的とした。更に、LPL機能発現に必須とされる血管内皮細胞アンカー蛋白(GPIHBP1)の血清濃度測定系を確立する。

(4) 脂質代謝酵素あるいは制御蛋白であるリポ蛋白リパーゼ(LPL)、血管内皮リパーゼ(EL)、血管内皮細胞アンカー蛋白(GPIHBP1)、上述系で測定した血清HL蛋白量と動脈硬化度との相関性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 年間目標症例30例のヘテロFH患者に対して、血清脂質、血糖、LPL蛋白量、高分子アディポネクチン、酸化マーカーの指標である8OHdGなどの代謝マーカーとヘパリン静注後血漿中LPL、HL活性、それらの蛋白量の測定を行う。LPL、HL活性測定は申請者らが開発した比色法(Imamura S, JLR)で、LPL、HL蛋白量測定は申請者らが開発したELISA法を用いて測定する。EL蛋白測定はELISAキット(Ishida, Clin Chem)を購入して施行する。

(2) 動脈硬化進展度は、冠動脈CT、頸動脈超音波法、PWV検査で評価する。頸動脈超音波検査では、内中膜複合体(IMC)の厚さ、プラーク数の測定を行う。当初の上記方法に加え、以下を追加。

(3) 血清HTGL蛋白測定系確立に関し、FLAG-epitope tagを3'末端に付加した後、PCR産物をpcDNA3.1(+)発現ベクターに挿入した。293細胞(HEK293)をhHTGL plasmidでtransfectionし、安定な発現系を確立するためにG418で選択した。得られたHLをBALB/cマウスまたはWisterラットに皮下注射し免疫した。MoAbの特異性を確認するために免疫沈降-免疫プロット分析を行った。臨床的意義を検討するため冠動脈疾患を有する42名の男性被験者の血清脂質、HTGL蛋白量測定を行い、それらの相関性を検討した。

(4) 血清GPIHBP1の定量系確立に関し、上記HLと同様GPIHBP1 cDNAを発現ベクターに挿入した。CHO細胞をGPIHBP1 DNAでtransfectionし、得られたGPIHBP1をanti-flag M2 columnを用いて精製し、Wisterラットに皮下注射し免疫した。MoAbの特異性を確認するために免疫沈降-免疫プロット分析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 目的で述べたように脂質代謝酵素測定するための試料となるヘパリン静注後血漿 (PHP) を得ることが困難となり、本課題研究をすすめる上で、患者 PHP ではなくその血清を試料として脂質代謝酵素測定する系の確立がまずは必須となった。血清 HL 蛋白測定系確立の結果を以下述べる。MoAb マウス 9A1 および MoAb ラット 141A1 はいずれも、組換え HL、PHP-HTGL、血清 HL を免疫沈降させた。この ELISA 法は、アッセイ内およびアッセイ間で変動係数が 6% 未満であり、リポ蛋白リパーゼまたは内皮リパーゼと交差反応しなかった。この HL 定量法の確実性を確認するため、HL 活性との相関を調べた。被験者の臨床分析では、血清 HL 濃度と PHP-HL 濃度との間に強い正の相関があった (図 1)。

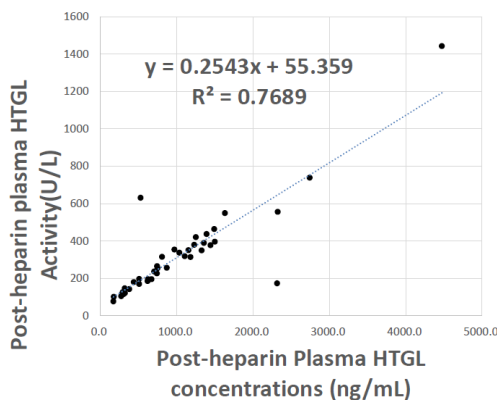


図 1

血清 HL 濃度は血清 TG ( $r = 0.314$ ,  $p < 0.05$ ) と ALT ( $r = 0.406$ ,  $p < 0.01$ ) との間に正相関を示し、LDL-C、small、dense LDL および GTP と正の相関傾向を認めた。この結果よりこの系が血清 HL 蛋白濃度測定に適していると結論する。この成績は J Lipid Res. 2017 ;58:1591-1597 に報告した。

(2) 血清 GPIHBP 1 の定量系の確立の結果を以下に述べる。

Wister ラットを免疫して得られた抗体の中で特に mAbs IU-79 and IU-20 は GPIHBP 1 との反応性にすぐれ、これらを選択した。血清 GPIHBP 1 濃度はボランティア ( $n=28$ ) で median 849 pg/mL (range: 740-1014)、動脈硬化性疾患を有する患者 ( $n=415$ ) で median 1087 pg/mL (range: 877-1371) であった。血清脂質との相関性において、TG とごく弱い負の相関を有した ( $r=0.109$ ;  $P<.0275$ ) (図 2)。

また動脈硬化性疾患を有する群 (MACE 1) では有さない群 (MACE 0) より GPIHBP 1 濃度が高かった (図 3)。これまで血清 GPIHBP 1 濃度に

関する報告はなく、この成績は J Clin Lipid. 2018;12:203-205 に報告した。

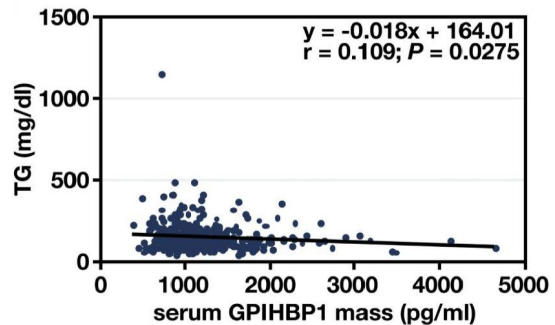


図 2

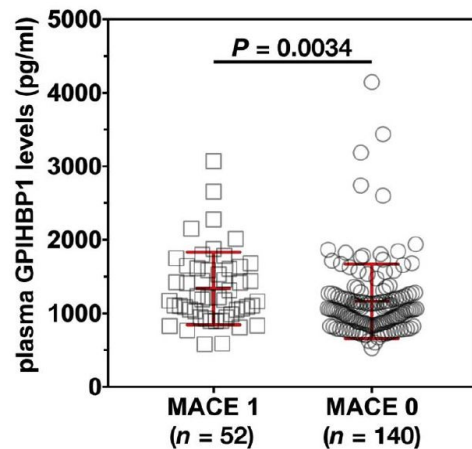


図 3

(3) 従来血清での測定系が確立している LPL、EL に加え、上記研究成果 (1) (2) で述べた HL、GPIHBP 1 測定系を用いてそれらの血清蛋白量を定量し、動脈硬化マーカーとの相関性を調べた。対象は LDL 受容体遺伝子変異が確定している家族性高コレステロール血症 (FH) 患者 (文献) ( $n=17$ , 年齢  $64 \pm 9.7$  y, M/F=12/5, TC  $379.6 \pm 42.1$  mg/dL, LDL-C  $296.6 \pm 36.8$  mg/dL, HDL-C  $46.4 \pm 9.0$  mg/dL, TG  $114.1 \pm 37.1$  mg/dL) とし、頸動脈の内膜中膜複合体厚 (IMT) またはプラークスコア (PS) を計測し血清 HL 蛋白量 (LPL, EL, GPIHBP 1 蛋白量) との相関性を検討した。その結果、頸動脈 IMT、PS と血清 HL との相関はそれぞれ  $r=0.074$   $p=0.79$ ;  $r = -0.089$   $p=0.74$ 。頸動脈 IMT、PS と血清 LPL との相関はそれぞれ  $r = 0.323$   $p=0.223$ ;  $r = -0.037$   $p=0.892$ 。頸動脈 IMT、PS と血清 EL との相関はそれぞれ  $r=0.587$   $p=0.017$ ;  $r=0.215$   $p=0.424$ 。頸動脈 IMT、PS と血清 GPIHBP 1 との相関はそれぞれ  $r=0.587$   $p=0.017$ 、 $r=0.432$   $p=0.095$ 。以上から EL と GPIHBP 1 は FH 患者の動脈硬化進展度予測因子であることが示唆された。一方 HTGL や LPL に関し

ては、頸動脈の動脈硬化重症度を必ずしも反映しないことが示唆された。

<引用文献>

1 Kawashiri MA, Kobayashi J et al. Efficacy and safety of coadministration of rosuvastatin, ezetimibe, and colestimide in heterozygous familial hypercholesterolemia. Am J Cardiol. 2012 Feb 1;109(3):364-9.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Miyashita K, Fukamachi I, Nagao M, Ishida T, Kobayashi J, Machida T, Nakajima K, Murakami M, Ploug M, Beigneux AP, Young SG, Nakajima K. An enzyme-linked immunosorbent assay for measuring GPIHBP1 levels in human plasma or serum. J Clin Lipidol. 2018 ;12:203-210.e1. doi: 10.1016/j.jacl.2017.10.022. 査読有

Muraba Y, Koga T, Shimomura Y, Ito Y, Hirao Y, Kobayashi J, Kimura T, Nakajima K, Murakami M. The role of plasma lipoprotein lipase, hepatic lipase and GPIHBP1 in the metabolism of remnant lipoproteins and small dense LDL in patients with coronary artery disease. Clin Chim Acta. 2018 ;476:146-153. doi: 10.1016/j.cca.2017.11.021. 査読有

Miyashita K, Nakajima K, Fukamachi I, Muraba Y, Koga T, Shimomura Y, Machida T, Murakami M, Kobayashi J. A new enzyme-linked immunosorbent assay system for human serum hepatic triglyceride lipase. J Lipid Res. 2017;58:1591-1597. doi: 10.1194/jlr.M075432. 査読有

Nakajima K, Tokita Y, Sakamaki K, Shimomura Y, Kobayashi J, Kamachi K, Tanaka A, Stanhope KL, Havel PJ, Wang T, Machida T, Murakami M. Triglyceride content in remnant lipoproteins is significantly increased after food intake and is associated with plasma lipoprotein lipase. Clin Chim Acta. 2017 ;465:45-52. doi: 10.1016/j.cca.2016.12.011. 査読有

Ishiyama N, Sakamaki K, Shimomura Y, Kotani K, Tsuzaki K, Sakane N, Miyashita K, Fukamachi I, Kobayashi J, Stanhope KL, Havel PJ, Kamachi K, Tanaka A, Tokita Y, Machida T, Murakami M, Nakajima K. Lipoprotein lipase does not increase significantly in the postprandial plasma. Clin Chim Acta. 2017;464:204-210. doi: 10.1016/j.cca.2016.11.035. 査読有

Sato K, Okajima F, Miyashita K, Imamura S, Kobayashi J, Stanhope KL, Havel PJ, Machida T, Sumino H, Murakami M, Schaefer E, Nakajima K. The majority of lipoprotein lipase in plasma is bound to remnant lipoproteins: A new definition of remnant lipoproteins. Clin Chim Acta. 2016;461:114-25. doi: 10.1016/j.cca.2016.06.020. 査読有

Tada H, Kobayashi J, Kawashiri MA, Miyashita K, Nohara A, Inazu A, Nakajima K, Mabuchi H, Yamagishi M. Changes in lipoprotein lipase and endothelial lipase mass in familial hypercholesterolemia during three-drug lipid-lowering combination therapy. Lipids Health Dis. 2016;15:66. doi: 10.1186/s12944-016-0238-z. 査読有

Kobayashi J, Miyashita K, Nakajima K, Mabuchi H Hepatic lipase: A comprehensive view of it ' s role on plasma lipid and lipoprotein metabolism J Atheroscler Thromb. 2015;22(10):1001-11. doi: 10.5551/jat.31617.

[学会発表](計6件)

2017年7月6日(木)

小林 淳二、宮下かずや、深町 勇、村場祐司、古賀敬史、下村洋之助、町田哲男、村上正巳、中嶋克行 新規ヒト血清肝性リパーゼ (HTGL) 蛋白量測定法の確立 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (広島県)

2016年6月25日(土)

小林 淳二、宮下 かずや、町田 哲男、角野博之、村上 正巳、中嶋 克行 脂肪負荷の健常人循環血中リポ蛋白リパーゼ濃度に与える影響について 第2回 J-ISCP 学術集会 (徳島県)

2016年5月19(木)~21日(土) 20日

小林 淳二、宮下 かずや、町田 哲男、角野博之、村上 正巳、中嶋 克行 脂肪負荷の健常人循環血中リポ蛋白リパーゼ濃度に与える影響について 第59回 日本糖尿病学会年次学術集会(京都府)

2015年11月22日(日)

小林 淳二 新たなヒトリポ蛋白リパーゼ (LPL) 蛋白量測定法の確立 第62回 日本臨床検査医学会・学術集会:(岐阜県)

2015年7月10日

小林 淳二、宮下 かずや、今村 茂行、中嶋 克行、町田 哲男、角野 博之、奈良 誠人、村上 正巳 新たなヒトリボ蛋白リパーゼ (LPL) 蛋白量測定法の確立  
第 47 回 日本動脈硬化学会総会・学術集会 (宮城県)

2015 年 6 月 20 日 (土)~21 日 (日)

小林 淳二、宮下 かずや、今村 茂行、中嶋 克行、町田 哲男、角野 博之、奈良 誠人、村上 正巳 新たなヒトリボ蛋白リパーゼ (LPL) 蛋白量測定法の確立  
第 1 回 J-ISCIP 学術集会 国際心血管薬物療法学会日本部会 (京都府)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

小林 淳二 (KOBAYASHI, Junji)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 60302577

### (2)研究分担者

川尻 剛照 (KAWASHIRI, Masaaki)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号 : 90345637

### (3)連携研究者

多田 隼人 (TADA, Hayato)  
金沢大学・附属病院・助教  
研究者番号 : 90623653