

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08975

研究課題名(和文) 無細胞系・非放射性・脱超遠心法によるHDLのコレステロール引き抜き能測定法の構築

研究課題名(英文) Development of a novel cholesterol efflux assay method as neither cell culture, radioisotope nor ultracentrifugation is required

研究代表者

戸塚 実 (Tozuka, Minoru)

信州大学・医学部・特任教授

研究者番号：60431954

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)：高比重リポタンパク(HDL)の主要な抗粥状動脈硬化作用は細胞からのコレステロール引き抜き能(CEC)であるといわれている。しかしながら、現状のCEC測定は臨床において実施するには課題がある。それは培養細胞を用いることである。本研究では細胞の代わりに蛍光標識コレステロールを含むリポソームを固定化したゲルビーズを開発した。この方法で得られたCECの値は放射性コレステロールを含むTHP-1マクロファージ由来泡沫細胞を用いたCECの値と良好な相関を示した。すなわち、培養細胞、放射性コレステロール、超遠心分操作を必要としない新しいCEC測定法は臨床で十分に利用可能な方法であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、HDL量の指標となるHDL-コレステロール検査が必ずしも抗粥状動脈硬化の指標にならず、むしろその機能が重要であると考えられている。HDLの代表的な抗粥状動脈硬化機能は、泡沫細胞に過剰蓄積されたコレステロールを肝臓に運ぶ、いわゆるコレステロール逆輸送である。この第1段階が細胞からのコレステロール引き抜き能(CEC)である。現在のCEC測定法は臨床検査室で日常検査として用いるには、培養細胞を用いるなどの制約から実施が困難である。本研究では培養細胞に代わる蛍光標識コレステロールを含むゲルビーズを開発した。この方法は臨床検査室でHDLの機能を測定する簡易法開発の足がかりになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cholesterol efflux capacity (CEC) is the key metric for determining the antiatherosclerotic function of high-density lipoprotein (HDL). However, the assay methods currently used to calculate CEC are not ideal for clinical use as they require the culture of cells. In the present study, we developed novel CEC assay using immobilized liposome-bound gel beads (ILG), containing fluorescently labeled cholesterol, as a substitute for cultured cells. The CEC values obtained with this ILG method were correlated with those obtained with a conventional method using THP-1 macrophages derived foam cells and radioisotope labeled-cholesterol as a tracer. Overall, this novel CEC assay method is a realistic and effective alternative to current methods in the field while also being easier to use in clinical laboratories as neither cell culture, radioisotope nor ultracentrifugation is required.

研究分野：臨床化学

キーワード：cholesterol efflux high-density lipoprotein apoB-depleted serum gel beads cardiovascular disease

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

約 40 年前から高比重リポタンパク (HDL) 中のコレステロール (HDL-C) が抗粥状動脈硬化の予防因子として広く測定されるようになった。HDL-C は「善玉コレステロール」として一般に知られるようになったが、近年、HDL 量の指標となる HDL-C 検査が必ずしも抗粥状動脈硬化の指標にならず、むしろその機能が重要であると考えられるようになった。HDL の代表的な抗粥状動脈硬化機能は、動脈内皮下に粥状硬化層を形成する泡沫細胞に過剰蓄積されたコレステロールを肝臓に運ぶ、いわゆるコレステロール逆輸送である。この逆輸送は HDL が泡沫細胞からコレステロールを引き抜くことからスタートするが、この第一段階の能力がコレステロール引き抜き能 (CEC) である。CEC は研究レベルでは広く測定されているが、当初は培養細胞、放射性コレステロール、HDL の超遠心分離を必要とし、操作が煩雑で長時間を要した。近年、放射性コレステロールに代わって蛍光標識コレステロールを使用したり、超遠心分離した HDL に代わってポリエチレングリコール沈殿によってアポリポタンパク B (apoB) を含むリポタンパク (低比重リポタンパク: LDL、超低比重リポタンパク: VLDL) を除去した apoB 除去血清 (BDS; apoB depleted serum) を用いたりする方法が報告され、汎用性は向上してきた。しかし、培養細胞に代わるものがなかったため簡略化には限界があり、臨床現場で利用できる検査になっていないのが現状である。

2. 研究の目的

CEC 測定における培養細胞の使用は煩雑で長時間を要する要因であり、これに代わりうる媒体を開発し、その媒体を用いた CEC 測定が分析法として有用であることを明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

レシチンおよびコレステロールに微量の蛍光標識コレステロールを加えて作成したリポソームを使用することにしたが、問題はこのリポソームを何らかの媒体に固定化しなければならないことである。既報にシリカゲルにリポソームを固定化するという論文があり、これを試してみたが CEC を測定するためにはシリカゲルを一定量ずつ分注する必要があるが、これは困難であることがわかった。そこで着目したのがゲルろ過用のゲルである。当研究室ではリポタンパクのゲルろ過で Sephacryl S-300 というゲルを使用しており、これが最適と考えた。

1) リポソーム固定化ゲルビーズの作製

はじめに市販の Sephacryl S-300 懸濁液中のゲルビーズを乾燥させた。蛍光標識コレステロールを含むリポソームのエマルジョンに乾燥させたゲルビーズを加えて 30 分間室温で静置後、激しく振とう混合した。続いて、-80 と流水中で凍結融解を 7 回繰り返し、ゲルビーズをバッファーで十分洗浄した後、バッファーに懸濁してリポソーム結合ゲルビーズ (ILG; immobilized liposome-bound gel beads) とした。

2) BDS の調整

血清と 20% 濃度のポリエチレングリコール 6000 溶液を 5:2 の比で混合し、激しく攪拌した。30 分間室温で静置後、遠心により上清の apoB 除去血清 (BDS) を得た。

3) CEC の測定

ILG を均一になるように攪拌しながらチューブに分注し、そこに 3.3% 血清濃度になるように希釈した BDS 希釈液を 1.5 倍量添加し (最終濃度は 2% 血清濃度) 攪拌後 4-16 時間冷暗所に静置する。次に、静置によって沈んでいるゲルビーズを攪拌によって懸濁液とし、遠心後に上清を一定量採取し別のチューブに分注する。その際混入する可能性のある微量のゲルビーズを除去するために再遠心し、最終的に一定量の上清を専用プレートに分注して蛍光を測定する。標準試料は存在しないので、分注して凍結保存したある特定の健常者血清 (reference 血清) を用いて同様に CEC を測定し、その CEC を 1.0 として測定試料の蛍光強度から CEC として換算した。

4. 研究成果

1) 作製した ILG の安定性を冷暗所静置中にゲルビーズから遊離する蛍光量で検索したところ、少なくとも 2 カ月は安定であった。また、それ以上保存した場合でもゲルビーズを洗浄することで blanks 値を低下させた上で使用可能であることを確認した。

2) 最終的なコレステロール引き抜き反応に及ぼす温度の影響を CEC の異なる 2 名の血清で検索したところ、室温および 37 °C では両者の CEC の比がほぼ同じであったが、4 °C では多少異なっていたことから、測定は室温で実施することとした。

3) ILG のロットによって同一血清の蛍光強度としての CEC にばらつきが見られたが、

reference 血清を用いることによって再現性の良好な換算 CEC が得られた。また、故意に蛍光標識コレステロールを増量して ILG を作製した場合も reference 血清で適正に補正できることが確認された。

4) 蛍光標識コレステロールを用いた ILG 法と放射性コレステロールを用いた THP-1 macrophage 法について BDS をコレステロール acceptor として相関を検討したところ、相関係数は 0.932 と良好な相関が得られた。

5) BDS は超遠心法で得られた HDL と異なり多くの血清タンパクを含んでいる。そこで、BDS を用いて測定した CEC が HDL の CEC を反映しているか検討した。従来の CEC 測定は一定量蛋白あるいは一定量コレステロールの HDL を用いて実施されることが多かった。すなわち、HDL の単位量当たりの CEC を測定していることになる。そこで、ILG 法を用いて一定量の HDL で得られた CEC から血清 HDL 量で換算した whole-CEC と BDS で得られた CEC を比較したところ、whole-CEC をタンパクあるいはコレステロールで換算した場合のそれぞれの相関係数は 0.591、0.633 と良好な相関を示した。すなわち、BDS を用いた CEC の測定は HDL 量を加味した測定対象者の総合的な CEC を示す指標として有用であることが確認された。

本研究により得られた「新たな CEC 法の開発と分析法としての妥当性」および「CEC 測定における apoB 除去血清の有用性」に関する成果は、それぞれ専門英文誌（下記参照）に採択されている。この研究成果をスタートとして、医療現場の検査室において実施可能な CEC 測定法として確立すること、そして CEC の臨床的な有用性を明確にしていくことが今後の課題であると考えている。

(本研究に関連して採択された論文)

- Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells. *Biosci Rep* (2018) **38**. doi.org/10.1042/BSR20180144
- Usefulness of apolipoprotein B-depleted serum in cholesterol efflux capacity assays using immobilized liposome-bound gel beads. *Biosci Rep* (2019) **39**. doi.org/10.1042/BSR20190213
- Characterization of the cholesterol efflux of apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein in THP-1 cells. *Biol Chem* (2019) **400**: 209-218. doi. 10.1515/hsz-2018-0284

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Horiuchi Y, Ohkawa R, Lai SJ, Shimano S, Hagihara M, Tohda S, Kameda T, Tozuka M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Usefulness of apolipoprotein B-depleted serum in cholesterol efflux capacity assays using immobilized liposome-bound gel beads	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1042/BSR20190213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Horiuchi Y, Ohkawa R, Lai SJ, Yamazaki A, Ikoma H, Yano K, Kameda T, Tozuka M	4. 巻 400
2. 論文標題 Characterization of the cholesterol efflux of apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein in THP-1 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 209-218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1515/hsz-2018-0284	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Horiuchi Y, Lai S-J, Yamazaki A, Nakamura A, Ohkawa R, Yano K, Kameda T, Okubo S, Shimano S, Hagihara M, Tohda S, Tozuka M	4. 巻 -
2. 論文標題 Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10:1042/BSR20180144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tozuka M., Horiuchi Y., Lai S.J., Ohkawa R.
2. 発表標題 Development of a novel method to estimate the cholesterol efflux capacity of high-density lipoprotein.
3. 学会等名 2018 TMU Medical Laboratory Forum（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀内 優奈, 頼 劭睿, 南部 真由, 大川 龍之介, 戸塚 実.
2. 発表標題 無細胞系コレステロール引き抜き能評価法の開発と高比重リポタンパクサブクラスの引き抜き能の比較.
3. 学会等名 第65回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀内 優奈, 大川 龍之介, 島野 志都子, 萩原 三千男, 東田 修二, 戸塚 実
2. 発表標題 HDLのコレステロール引き抜き能はHDLコレステロール濃度とは異なるバイオマーカーとなりうる
3. 学会等名 第29回 生物試料分析科学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Horiuchi Y, Lai S-J, Yamazaki A, Nakamura A, Ohkawa R, Yano K, Kameda T, Okubo S, Shimano S, Hagihara M, Tohda S, Tozuka M
2. 発表標題 Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells
3. 学会等名 XVIIIth International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀内 優奈, 頼 劭睿, 山崎 あずさ, 中村 文香, 大川 龍之介, 矢野 康次, 亀田 貴寛, 大久保 滋夫, 島野 志都子, 萩原 三千男, 東田 修二, 戸塚 実
2. 発表標題 固相化リポソームを用いたコレステロール引き抜き能評価法の開発と評価
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Horiuchi Y, Ohkawa R, Lai SJ, Shimano S, Hagihara M, Tohda S, Tozuka M
2. 発表標題 Availability of apoB-depleted serum in clinical assay for cholesterol efflux capacity using immobilized liposome-bound gel beads
3. 学会等名 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 陸田 優芽, 堀内 優奈, 藤井 祐葵, 頼 劭睿, 戸塚 実, 大川 龍之介
2. 発表標題 血清アミロイドAが高比重リポタンパクのコレステロール引き抜き能に及ぼす影響
3. 学会等名 第14回日本臨床検査教育学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀内 優奈, 頼 劭睿, 島野 志都子, 萩原 三千男, 東田 修二, 戸塚 実, 大川 龍之介
2. 発表標題 血清を測定対象とする固相化リポソーム結合ゲルビーズを用いたコレステロール引き抜き能測定の検討
3. 学会等名 第59回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀内 優奈, 頼 劭睿, 島野 志都子, 萩原 三千男, 東田 修二, 戸塚 実, 大川 龍之介
2. 発表標題 臨床現場で利用可能なコレステロール引き抜き能測定法の開発と評価
3. 学会等名 日本臨床検査自動化学会第51回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀内 優奈, 南部 真由, 頼 劭睿, 戸塚 実, 大川龍之介
2. 発表標題 固相化リボソーム結合ゲルビーズを用いたコレステロール引き抜き能測定法の従来法との比較
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 南部 真由, 堀内 優奈, 頼 劭睿, 戸塚 実, 大川龍之介
2. 発表標題 新たなコレステロール引き抜き能評価法へのレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼの影響
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大川 龍之介 (Ohkawa Ryunosuke) (50420203)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	