

令和元年6月7日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15771

研究課題名(和文) 高比重リポタンパクの多様化に関わる分子機構およびその性質・機能への影響

研究課題名(英文) Molecular mechanism of HDL diversification and its effect on the character and function

研究代表者

大川 龍之介(Ohkawa, Ryunosuke)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：50420203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高比重リポタンパク(HDL)は多彩な抗粥状動脈硬化作用を有するリポタンパクであり、そのコレステロール濃度が臨床検査で利用されている。しかし、HDLは単一のものではなく、様々な種類のHDLの総称であり、粥状動脈硬化進展の機序をより理解するにはそれぞれのHDLの性質について詳細に理解する必要がある。われわれは、HDLの多様性に他のリポタンパクや赤血球、肝細胞と酵素や脂質の受け渡しが関わり、それがHDLの機能を変化させていること、多様化の一つである血清アミロイドA含有HDLはHDLコレステロール濃度測定には影響がないこと、また、一部のマイナーHDLの抗粥状動脈硬化機能の詳細を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、単なるHDLの量的評価だけでなく、質的評価が注目されている。HDLの質を理解するためには、多様なHDLの一つ一つの形成機序や機能を明らかにする必要があるが、まだ十分に明らかになっていない。今回の研究成果により、HDLの多様化の機序や機能の一端を明らかにすることができた。これにより、これまでのHDLの定量では不十分であった粥状動脈硬化との関連を説明する手助けとなり、また、通常のHDLとは機能の異なるマイナーHDLの検出など新たなバイオマーカー開発の手がかりになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：High-density lipoprotein (HDL) has various anti-atherosclerotic functions and testing its cholesterol level is widely used for laboratory medicine. However, HDL is not single particle. There are various types of HDL and their characters should be investigated in detail to understand the mechanism of the progression of atherosclerosis. We revealed that HDL diversification is involved in interaction between HDL and other lipoproteins, red blood cells or hepatic cells where some enzymes and lipids are exchanged. We also demonstrated that serum amyloid A does not affect HDL measurement by a homogeneous assay. Moreover, we found one of anti-atherosclerotic function of minor HDL.

研究分野：臨床検査医学

キーワード：HDL 多様化 コレステロール 粥状動脈硬化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高比重リポタンパク (HDL) (比重 1.063-1.210 g/mL) は末梢から肝臓へコレステロールを運搬するコレステロール逆転送能や抗炎症能, 単球遊走抑制能, 抗血栓作用, 血管内皮細胞の生存維持・増殖など多彩な抗動脈硬化作用を有するリポタンパクである。そのため従来, 粥状動脈硬化のリスク評価として, HDL コレステロール濃度の測定が利用されている。しかしながら, 生体内に存在する HDL は単一のものではなく, ヘテロジニアスなリポタンパクであり, それぞれのタンパクや脂質の構成比率および機能は大きく異なっている。例えば, 生成初期の HDL はアポリタンパク A-I (apoA-I) と少量のリン脂質やコレステロールを有する円盤状のプレ HDL と称され, その後, 他のリポタンパクとの代謝により, 球状の HDL₃ (比重 1.125-1.210 g/mL), さらに HDL₂ (比重 1.063-1.125 g/mL) へと変化していく。また, apoA-I のかわりにアポリタンパク E (apoE) を多く含有する minor HDL である apoE 含有 HDL, アポリタンパク M 含有 HDL など, 様々な種類の HDL が生体内に存在し, これらの HDL はそれぞれ, 含有する脂質やタンパクの量が大きく異なっている。質量分析を用いたプロテオーム解析では, 広義の HDL 全体に結合するタンパクは 56 種類にも及ぶことが明らかになっており (参考文献 1), それぞれが, 脂質代謝あるいは細胞応答を發揮するメディエーターとして重要な役割を担っている。したがって, HDL の多様性はこれらのタンパクの分布や構成脂質によって決定され, それぞれが生体内で異なる役割を果たしている。そのため, 粥状動脈硬化作用に対する抑制の機序や, その破綻のメカニズムをさらに解明するには, 広義の HDL ではなく, それぞれの細分化された HDL について理解する必要がある。この HDL の多様性は, 他のリポタンパク (カイロミクロン, 超低比重リポタンパク (VLDL), 低比重リポタンパク (LDL)) や各種細胞との相互作用, また各種病態によってもたらされる。例えば, HDL は血液中を流れる間に, 自身の有するコレステロールエステル転送タンパク (CETP) によって, VLDL にコレステロールを引き渡し, VLDL から中性脂肪を受け取ることが知られている。また, 炎症や高血糖, 酸化ストレスなどの病態下において, HDL は様々な修飾を受け, さらに多様化する。このように, 生体内では様々な HDL の多様化が引き起こるが, これまでの研究の多くは HDL 全体あるいは HDL₃ や HDL₂ といった広義の HDL を対象にしたものがほとんどであり, それぞれの細分化された HDL の形成機序や構造・機能への影響については十分に解明されていない。

(参考文献) 1. Proteomics. 6: 721-730, 2006

2. 研究の目的

当研究室においても, VLDL と HDL₃ や HDL₂ を接触させると中性脂肪の代謝に非常に重要な役割を担うアポリタンパク C 群 (apoCs) が VLDL から HDL へ転送されること, また, LDL を酸化し HDL に接触させると HDL の抗酸化能の鍵となる酵素であるパラオキシナーゼ -1 が酸化 LDL へ転送されることを見出した (Int J Anal Bio-Sci, 2016)。さらに, リポタンパクだけでなく, HDL は赤血球から能動輸送によりコレステロールを多量に受け取ることを見出している。

さらに, マクロファージから産生されるミエロペルオキシダーゼ (MPO) によって HDL が酸化修飾を受けると, HDL の単球遊走を抑制する機能が減弱していること (Journal of Lipids, 2015), 炎症時に肝細胞から産生される血清アミロイド A (SAA) が HDL に取り込まれ, HDL の主要なタンパクである apoA-I を脱離させ, HDL の抗酸化能を増強させること (Bioscience Reports, 2016) を明らかにした。また, 動脈硬化のリスクファクターの一つであるホモシステインが HDL 中の apoA-I に結合して, マクロファージからのコレステロール引き抜き能 (CEC)

を減弱させること (Journal of Lipids, 2016), 上記の MPO によって酸化させた HDL に, 肥満細胞から分泌されたキマーゼが作用すると apoA-I が切断され, HDL 中に 14 kDa と 12 kDa の二つの断片化 apoA-I が生成されることを質量分析計を用いて見出した (未発表)。

本研究では, 引き続き各リポタンパクあるいは細胞による HDL 多様化の分子機構の解析およびそれに伴う性質・機能への影響について解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) HDL とリポタンパク間の各種タンパクの転送

血漿より超遠心法によって分離した HDL₂ および HDL₃ に VLDL や LDL, 酸化 LDL を反応させ, 相互のアポリポタンパクや酵素の移動を確認した。また, 酸化 LDL に関しては, 硫酸銅による酸化抵抗性も確認した。

2) 各種細胞 (肝細胞, 赤血球) による HDL の修飾およびその性質・機能への影響

ヒト肝癌由来細胞株をサイトカインによって刺激し SAA を分泌させた培養上清中の粒子を解析した。また, 各種炎症患者の血清を用いて, SAA を含有した HDL が HDL コレステロール測定法に影響を与えるかを超遠心法と直接法を比較することで確認した。赤血球との関わりにおいて, 赤血球と HDL を接触させ, HDL にどのような変化をもたらすかを調べた。さらに, 特殊な HDL である apoE 含有 HDL と apoE 非含有 HDL の泡沫細胞からの CEC の違いを比較した。

4. 研究成果

1) HDL とリポタンパク間の各種タンパクの転送

HDL₂ および HDL₃ を VLDL と反応させると, VLDL 中に含まれるアポリポプロテイン C-II, アポリポプロテイン C-III, アポリポプロテイン E が HDL へ転送され, さらにこれらの転送は, HDL₃ の中で比較的大きな粒子に, HDL₂ には均等に転送されることが明らかになった。この転送は, コレステロールエステル転送タンパクの作用によらず, VLDL-HDL 双方向性であるが, 転送の形式には偏りがあることを見出した。また逆に HDL から抗酸化能を有するパラオキシナーゼ I が LDL に転送されることを以前われわれは報告したが, 今回, 移動したパラオキシナーゼ I が酸化 LDL の抗酸化能を向上させることを見出した。

2) 各種細胞 (肝細胞, 赤血球) による HDL の修飾およびその性質・機能への影響

刺激後のヒト肝癌由来細胞株培養上清をさらに超遠心によって分離し, 免疫沈降法や脂質解析を行うと, SAA と apoA-I は脂質を伴う粒子に共存していることが明らかになった。また, この粒子は少なくとも細胞外で形成されることを見出した。

炎症の程度の異なる患者血清中の HDL を調べると, HDL に SAA が様々な形で分布していた。この血清中の HDL コレステロール濃度を超遠心法と直接法で測定し比較した。結果, それぞれの HDL コレステロール濃度は炎症の程度の大きさに関わらずおよそ一致し, SAA の HDL への結合は HDL コレステロール測定には影響しないことを明らか

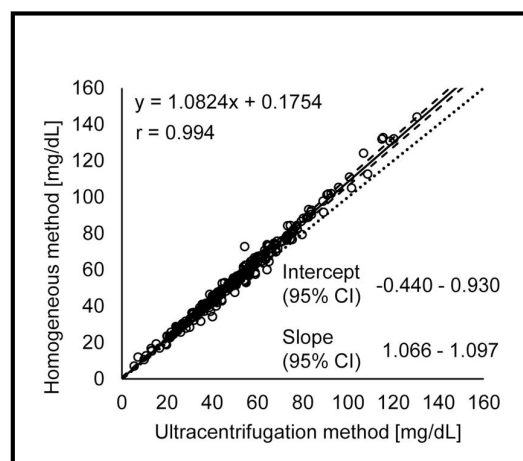


図1. 各種炎症性患者血清の HDL コレステロール濃度に関する超遠心法と直接法の比較

にした(図1)(Clin Biochem, 2019).

赤血球との研究では,赤血球と血漿を混和しインキュベーションした後,血漿中のHDLを分離,解析したところ,赤血球からHDLへ多量のコレステロールが放出されるが,この放出により,HDLの粒子サイズや表面荷電には大きな影響を与えないことが明らかになった.一方,この赤血球からのコレステロールの放出により,HDLのCECは増加することを見出した(図2).

血清から apoE 含有 HDL と apoE 非含有 HDL を分離し,両者の泡沫細胞からの CEC を比較した.CEC は,通常のアッセイでは差は認められなかったが,ABCA1 の発現を誘導すると apoE 含有 HDL の CEC が高く,Glyburide で ABCA1 を阻害すると CEC が低くなった.したがって,apoE 含有 HDL は通常の HDL の ABCG1 とは異なる経路でコレステロール引き抜きを行っている可能性が示唆された(図3)(Biol Chem, 2019).

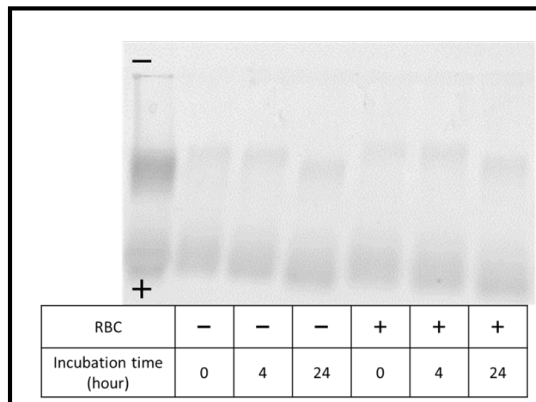


図2.赤血球と反応後のHDLの粒子荷電の変化

(アガロースゲル電気泳動)

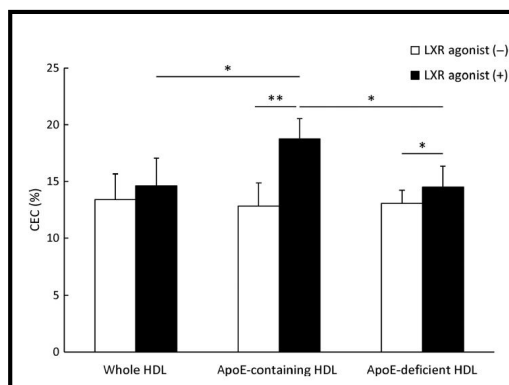


図3.apoE含有および非含有HDLのコレステロール引き抜き能の違い

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

1. Sato M., Ohkawa R. (Corresponding Author), Low H., Nishimori M., Okubo S., Yoshimoto A., Yano K., Kameda T., Yatomi Y., and Tozuka M. Serum amyloid A does not affect high-density lipoprotein cholesterol measurement by a homogeneous assay. Clin Biochem. 査読有. 63: 2019. 97-101. 10.1016/j.clinbiochem.2018.10.008
2. Horiuchi Y., Ohkawa R. (Corresponding Author), Lai S.J., Yamazaki A., Ikoma H., Yano K., Kameda T., and Tozuka M. Characterization of the cholesterol efflux of apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein in THP-1 cells. Biol Chem. 査読有. 400(2): 2019. 209-218. 10.1042/BSR20190213
3. Horiuchi Y., Ohkawa R. (Corresponding Author), Lai SJ, Shimano S, Hagihara M, Tohda S, Kameda T, and Tozuka M. Usefulness of apolipoprotein B-depleted serum in cholesterol efflux capacity assay using immobilized liposome-bound gel beads Bioscience Reports. 査読有. 39:(4). 2019. BSR20190213; DOI:10.1042/BSR20190213
4. Ohkawa R., Kurano M., Sakai N., Kishimoto T., Nojiri T., Igarashi K., Hosogaya S., Ozaki Y., Dohi T., Miyauchi K., Daida H., Aoki J., Okubo S., Ikeda H., Tozuka M., and Yatomi Y. Measurement of plasma choline in acute coronary syndrome: importance of suitable sampling conditions for this assay. Sci Rep. 査読有. 8(1):4725. 2018. doi: 10.1038/s41598-018-23009-x
5. 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. Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells. Bioscience Reports. 査読有. 38(2). pii: BSR20180144. 2018. doi: 10.1042/BSR20180144
6. Mishima Y., Kurano M., Kobayashi T., Nishikawa M., Ohkawa R., Tozuka M., and Yatomi Y. Dihydro-sphingosine 1-phosphate interacts with carrier proteins in a manner distinct from that of sphingosine 1-phosphate. Bioscience Reports. 査読有. 38(5). pii: BSR20181288. 2018. doi: 10.1042/BSR20181288,

〔学会発表〕(計 30 件)

1. 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. 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. 第 29 回 生物試料分析科学学会年次学術集会. 2019.02.09-02.10. 岡山
2. 笹岡 真衣, 大川 龍之介, 堀内 優奈, 頼 劭睿, 戸塚 実. 赤血球由来コレステロールが HDL の性質・機能に及ぼす影響. 第 29 回 生物試料分析科学学会年次学術集会. 2019.02.09-02.10. 岡山
3. 島野 志都子, 大川 龍之介, 垂門 葵, 南部 真由, 笹岡 真衣, 山崎 あずさ, 藤井 祐葵, 五十嵐 好, 堀内 優奈, 頼 劭睿, 萩原 三千男, 戸塚 実, 東田 修二. 炎症による高比重リポタンパク(HDL)の構造変化の解析. 第 65 回日本臨床検査医学会学術集会. 2018.11.15-11.18. 東京
4. 堀内 優奈, 頼 劭睿, 南部 真由, 大川 龍之介, 戸塚 実. 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. 第 65 回日本臨床検査医学会学術集会. 2018.11.15-11.18. 東京
5. 小林 玉宜, 蔵野 信, 大川 龍之介, 戸塚 実, 矢富 裕. HDL の糖化におけるリゾリン脂質解析: ApoM の物性変化と機能的修飾を中心に. 第 65 回日本臨床検査医学会学術集会. 2018.11.15-11.18. 東京
6. 五十嵐 好, 大川 龍之介, 吉本 明, 戸塚 実. 酸化低比重リポタンパクに転送された Paraoxonase 1 の役割の解明. 第 65 回日本臨床検査医学会学術集会. 2018.11.15-11.18. 東京
7. 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. 固相化リポゾ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. 第 58 回日本臨床化学学会年次学術集会. 2018.8.24-8.26. 愛知
8. 藤井 祐葵, 大川 龍之介, 佐藤 恵美, 島野 志都子, 萩原 三千男, 東田 修二, 戸塚 実. HepG2 を用いた SAA 含有 HDL の形成メカニズムの解析. 第 58 回日本臨床化学学会年次学術集会. 2018.8.24-8.26. 愛知
9. 笹岡 真衣, 大川 龍之介, 頼 劭睿, 堀内 優奈, 戸塚 実. HDL の性質・機能に及ぼす赤血球からのコレステロール放出の影響. 第 13 回日本臨床検査教育学会学術大会. 2018.08.18. 北海道
10. Horiuchi Y., Lai SJ., Yamazaki A., Nakamura A., Ohkawa R., Yano K., Kameda T., Okubo S., Hagihara M., Tohda S., and Tozuka M. Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells. The XVIIIth International Symposium on Atherosclerosis (ISA2018). 2018.7.9-7.12. Toronto.
11. Lai SJ., Ohkawa R., Horiuchi Y., Yamazaki A., Nakamura A., Tozuka M. Possible Concern of Erythrocytes with Reverse Cholesterol Transport. American Association for Clinical Chemistry (AACC) 70th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo. 2018.07.29-08.02 Chicago, IL
12. 堀内 優奈, 大川 龍之介, 増山 みさき, 渡部 芽以, 吉本 明, 頼 劭睿, 大久保 滋夫, 戸塚 実 apoB-depleted plasma のコレステロール引き抜き能は高比重リポタンパクのそれを反映するか. 第 28 回生物試料分析科学学会年次学術集会. 2018.3.3. 山形
13. Horiuchi Y., Ohkawa R., Ikoma H., Lai SJ., Yano K., Tozuka M., Cholesterol efflux capacity of apoE-containing HDL. 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPaLM) 2017. 2017 11.15-18. Kyoto, Japan 11/17
14. Nakamura A., Ohkawa R., Yano K., Kameda T., Tozuka M. Effect of oxidized LDL and HDL on monocyte chemotactic protein-1 secretion of HUVEC. 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPaLM) 2017. 2017 11.15-18. Kyoto, Japan 11/17
15. Kameda T., Ohkawa R., Nakamura A., Horiuchi Y., Yamazaki A., Lai SJ., Tozuka M. Effect of myeloperoxidase oxidation and N-homocysteinylation of HDL on its endothelial repair function. 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPaLM) 2017. 2017 11.15-18. Kyoto, Japan 11/17
16. Mishima Y., Kurano M., Kobayashi T., Nishikawa M., Ohkawa R., Tozuka M., Yatomi Y. Difference between sphingosine 1-phosphate and dihydrosphingosine 1-phosphate in their preference to HDL or albumin. 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPaLM) 2017. 2017 11.15-18. Kyoto, Japan 11/17

17. Tamaki K., Kurano M., Mishima Y., Nojiri T., Ohkawa R., Minoru T., Yatomi Y. Glycation of apolipoprotein M attenuated its capacity to bind sphingosine 1-phosphate. 29th World Congress of World Association of Societies of Pathology and Laboratory Medicine (WASPaLM) 2017. 2017 11.15-18. Kyoto, Japan 11/17
18. 堀内 優奈, 大川 龍之介, 生駒 勇人, 頼 劭睿, 矢野 康次, 戸塚 実. アポリポタンパク E 含有高比重リポタンパクのコレステロール引き抜き能の評価. 第 57 回日本臨床化学学会年次学術集会. 2017.10.06-10.08. 北海道
19. 亀田 貴寛, 大川 龍之介, 戸塚 実. 動脈硬化と脂質検査 - バイオマーカー探索を目標にした高比重リポタンパクの機能研究 - . 第 49 回日本臨床検査自動化学会. 2017.9.23. 横浜.
20. 南部 真由, 大川 龍之介, 島野 志都子, 山崎 あずさ, 萩原 三千男, 東田 修二, 戸塚 実. 炎症の程度が高比重リポタンパクの性状に及ぼす影響. 第 12 回日本臨床検査教育学会学術大会. 2017.08.24. 埼玉
21. 山崎 あずさ, 大川 龍之介, 堀内 優奈, 吉本 明, 矢野 康次, 戸塚 実. アポリポタンパク C-II (apoC-II) のリポタンパク間転送の解析. 第 12 回日本臨床検査教育学会学術大会. 2017.08.24. 埼玉
22. 五十嵐 好, 大川 龍之介, 矢野 康次, 堀内 優奈, 戸塚 実. 酵素サイクリング法を用いた高感度コレステロール測定法. 第 12 回日本臨床検査教育学会学術大会. 2017.08.24. 埼玉
23. 藤井 祐葵, 大川 龍之介, 佐藤 恵美, 島野 志都子, 戸塚 実. 血清アミロイド A の高比重リポタンパクへの結合特性の解析. 第 12 回日本臨床検査教育学会学術大会. 2017.08.24. 埼玉
24. 堀内 優奈, 大川 龍之介, 生駒 勇人, 頼 劭睿, 矢野 康次, 吉本 明, 戸塚 実. アポリポタンパク E 含有高比重リポタンパクの性状・機能の解析. 第 12 回日本臨床検査教育学会学術大会. 2017.08.24. 埼玉

〔図書〕(計 6 件)

1. 亀田 貴寛, 大川 龍之介, 戸塚 実. 日本臨床検査自動化学会. 動脈硬化と脂質検査; バイオマーカー探索を目標にした高比重リポタンパクの機能研究. 日本臨床検査自動化学会誌 43(2): 171-176, 2017
2. 大川 龍之介, 戸塚 実. 日本臨床検査医学会. バイオマーカー探索を目標にした高比重リポタンパクの機能研究. 臨床病理 65(10): 1140-1150, 2017

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/gradh/alc/index.html>

6. 研究組織

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。