

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08049

研究課題名(和文)酸化HDLによる冠動脈疾患の予後への影響を検討する

研究課題名(英文) Role of oxidised HDL in the pathogenesis of coronary artery atherosclerosis

研究代表者

岩田 洋(Hiroshi, Iwata)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00451807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では、凍結保存された血清中のHDLの酸化、その主要な構成成分であるApoA1の72番目のアミノ酸、トリプトシンの酸化(Ox ApoA1-Trp72)をtargeted proteomicsを用いて同定し、予後との相関を検討する計画としていた。しかしながら凍結検体におけるtargeted proteomicsは検出が難しい上に非常にばらつきが大きく、むしろApoA1濃度やHDL機能(コレステロール引き抜き能)を動脈硬化性疾患だけでなく、心房細動や悪性腫瘍による死亡などと関連させて検討し、様々な病態におけるHDLの重要な働きを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HDLは、その低値が動脈硬化リスクであることがエビデンスとして確立されているものの、LDL(low density lipoprotein)や中性脂肪に比べ、冠動脈疾患や脳血管疾患など動脈硬化性疾患の治療標的としての地位は高くない。本研究ではそのHDLの、動脈硬化性疾患・不整脈更には悪性腫瘍における役割とその可能性について様々な検討を行なった。その結果、HDLの量(血中HDL濃度)のみでは測れないHDL機能(コレステロール引き抜き能)などに多面的な役割が示され、治療標的としても、動脈硬化だけでなく不整脈や悪性腫瘍にも応用できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Despite an established prognostic significance of low high-density cholesterol (HDL) level in the context of atherosclerotic cardiovascular disease, recent failure of clinical trials of HDL raising drugs have caused less enthusiasm regarding its clinical and mechanistic exploration. However, since the functionality of HDL has been suggested to be significant, we addressed that in patients with coronary artery disease for prediction of all-cause and cancer mortalities. In addition, the significance of HDL functionality was evaluated in the pathology of atrial fibrillation (AF). As consequences, level of ApoA1, the main component of HDL particle, was a more sensitive marker to predict all-cause and cancer mortalities than HDL. Moreover, reduced HDL functionality, represented by cholesterol efflux capacity (CEC) was associated with enlarged left atrium volume index (LAVI) in AF patients, indicating any anti-remodeling role of HDL in the pathogenesis of AF.

研究分野：循環器内科学

キーワード：HDL機能 ApoA1 動脈硬化 悪性腫瘍 予後 心房細動

1. 研究開始当初の背景

狭心症、心筋梗塞を含む冠動脈疾患あるいは脳血管の動脈硬化を原因とする脳梗塞・脳血管性認知症などを含む動脈硬化性疾患は、わが国において常に死因の上位を占め、医学的にも医療経済・保険政策上もきわめて重要な疾患である。動脈硬化進行に関するリスク因子は、高血圧、糖尿病、脂質異常症、喫煙、家族歴・遺伝的要因などが知られているが、個々の症例においてそれらのリスクをどの程度コントロールすべきか、ということは明らかでない。

高 LDL コレステロール(以下 LDL)は動脈硬化の重大なリスク因子であり、「悪玉コレステロール」と呼ばれる。LDL を低下させる薬剤、スタチンは心血管イベントを抑制する。スタチンは史上最も有効な抗動脈硬化薬とされ、25-40%の心血管イベント抑制効果が証明され、最近では他の LDL 低下薬の有効性も示されている。LDL は動脈硬化の治療標的として確立されている一方、そのスタチンですらイベント抑制効果は 30%程度であり、60-75%のリスクは残存していると言える。HDL は、LDL とは逆に、「善玉コレステロール」と呼ばれている。血清中の HDL コレステロール低値は、一次予防症例で冠動脈疾患発症のリスク因子であることが、わが国でも示されており、スタチン内服中で LDL-C が低値に抑制されていても HDL-C 低値は心血管イベントのリスクを上昇させることが示されている(N Engl J Med 2007;35:1301)。HDL は肝臓・腸管で合成された ApoA1 とリン脂質で構成され、組織に集簇したマクロファージが取り込んだコレステロールエステルなどを回収して肝臓に戻す機能(コレステロール逆輸送系)を有しているために「善玉」と呼ばれている。しかし、血中の HDL、あるいは HDL-C を量的に増加させる目的でナイアシン(ビタミン B3)、HDL の VLDL、IDL、LDL への変換に関わる酵素、CETP の阻害薬を用いた大規模介入臨床試験では、血清中の HDL-C レベルを上昇させたにも関わらず、心血管イベントの発生は全く抑制されなかった(N Engl J Med 2011;365:2255, N Engl J Med 2007;357:2109 など)。これらの試験結果から得られた結論は、HDL 全体の量的な増加は予後改善に寄与しない、ということであり、その原因は HDL が単一のリポタンパクでないことと関係している。これまでに HDL の粒子径が大きいほど冠動脈疾患リスクが高いことが証明されており(J Am Col Cardiol 2008;51:634)、サイズの大きな HDL2 が多い症例ほど心血管イベント発症率が高いことが示されている(Atherosclerosis 2016;251:454)。血清中の HDL のコレステロール引き抜き能(Cholesterol efflux capacity)の予後への影響を検討した臨床研究では、コレステロール引き抜き能が高いほど、心血管イベント発症率が低いことが示されており(N Engl J Med 2014;371:2383 など)、動脈硬化性疾患の予後を改善するためには、HDL の量ではなく、その質、つまりはコレステロール引き抜き能を改善させる治療が必要である。しかしながら、HDL の機能改善に有効な治療はない。また、動脈硬化だけでなく、不整脈や弁膜症など他の疾患における HDL 機能の役割・影響についてはほとんど検討されていない。

2. 研究の目的

動脈硬化だけでなく様々な循環器疾患に影響する可能性のある HDL のコレステロール引き抜き能に影響を及ぼす因子はあまり知られていない。そこでわれわれは、HDL 上に存在して HDL 機能の向上あるいは低下に影響するとする報告のある micro RNA と、HDL 機能を抑制する報告のある HDL の主要構成タンパクである ApoA1 の、72 番目のアミノ酸であるトリプシン(ApoA1-Trp72)の酸化(Ox ApoA1-Trp72)(Nat Med 2014;20:193)に注目した。さらに代表的な不整脈、心房細動における HDL 機能とその病勢とどのように関与するのかを明らかにすることも目的とし、HDL 酸化(Ox ApoA1-Trp72)を検出するために、targeted proteomics という手法を用いて定量化し、HDL によるコレステロール引き抜き能への影響、さらには予後への影響について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

酸化 HDL ((Ox ApoA1-Trp72)の検出方法についての検討: ApoA1 における 72 番目のアミノ酸であるトリプシンの酸化を特異的に検出する目的に targeted proteomics を用いて条件検討を試みた。ところが、カテーテル試行時に、橈骨動脈・肘動脈・鼠径動脈から採血し、3000 回転/分・10 分間遠心後保存された検体を用いたところ、Ox ApoA1-Trp72 の検出が極めて困難であり、かつ検出されたもののばらつきが大きいことが判明した。その理由として-80℃で長期間保存された検体であること、遠心までの時間に大きなばらつきがあること、カテーテル手技に伴って投与されるヘパリンが関与している可能性が考えられた。技術的にわれわれが保存している検体を用いて Ox ApoA1-Trp72 を検出することは難しいと考えられたため、断念して 1) または 3) に注力し、研究計画を進行させることとした。

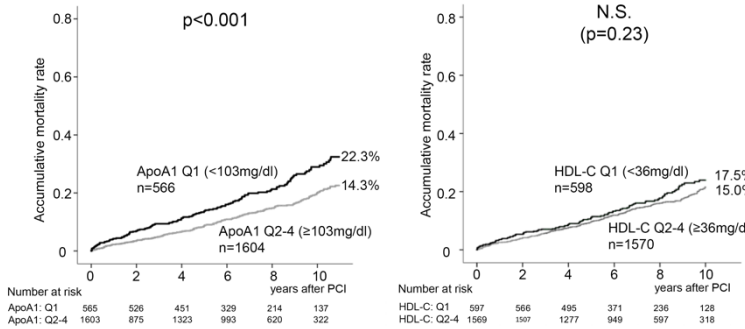
- 1) 冠動脈疾患(PCI)症例における HDL と ApoA1 の予後(総死亡・癌死亡)への影響の検討
 - ① PCI 症例(3836 症例)における血中 ApoA1 濃度の総死亡への影響を HDL と比較しながら統計学的に Kaplan-Meier 解析と Cox proportional hazard analysis を用いて検討した。
 - ② 同じく ApoA1 濃度の、悪性腫瘍による死亡への影響について検討した。
- 2) 心房細動の進行と HDL 機能の関係についての検討

心房細動に対してカテーテルアブレーションを施行した症例(202 症例)を対象とし、カテーテルアブレーション時に採取した血液を遠心し(3000 回転/分、10 分間)、200 mM glycine (pH 7.4) 中で 20% polyethylene glycol 6000 を加え、ApoB を除いた上で 8000 回転/分、30 分遠心した上清を、培養マウスマクロファージ様細胞(J774. 1)に H3 でラベルしたアセチル LDL を加え、ApoB を除いた血清を加えて 4 時間後に、培養液における放射線を測定し、HDL でマクロファージから培養液に引き抜かれたコレステロールの割合(コレステロール引き抜き能)を測定した。その値と、心臓超音波により測定された心房容積との相関を検討した。

4. 研究成果

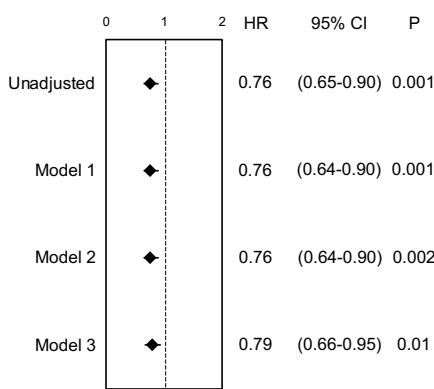
1) 動脈硬化性冠動脈疾患症例における、ApoA1 の予後への影響

a) 冠動脈疾患を有する PCI 施行後の症例では、ApoA1 が高値であれば総死亡は少ないが、



HDL の値は直接予後には影響しなかった。(左図) ApoA1 は HDL の主要な構成成分であるが、そこにコレステロールエステルやリン脂質などが結合することで、より大型に、さらに機能が低下する。われわれの研究結果は、HDL の量ではなく、質がより予後に影響することを示唆している。

Cancer mortality 1SD elevation of ApoA1



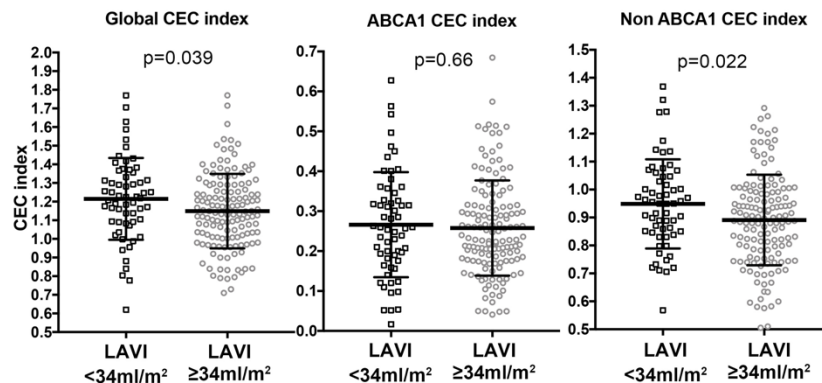
b) PCI 施行症例において、複数のモデルを用いた Cox 比例解析を行うと、ApoA1 の高値は、喫煙や性別など他の因子から独立して癌死亡リスクの低減と有意に関連することが示された。(左図) ApoA1 高値が癌死亡のリスク低下と相関することはこれまで幾つかの報告があるが、冠動脈疾患症例における癌死亡との相関はこれまでに報告がなく、今回の解析によってはじめて明らかとなった。そのメカニズムは明らかでないものの、ApoA1 は抗炎症作用や抗酸化作用を有することが知られており、その高値は何らかの抗悪性腫瘍効果を持つことが示唆された。今後の研究でそのメカニズムの解明を行う予定である。

今回の、約 3800 例の PCI 症例を対象とした検討で

は、ApoA1 が予後決定因子として重要であること、特に新たに癌死亡への影響が新たに示された。ApoA1 が単なるマーカーとして有用なのか、あるいは治療標的としての可能性があるのか、すなわち ApoA1 を上昇させる治療が癌死亡を予防することも含めた予後改善効果を発揮するかどうかについての検討が必要である。

2) 心房細動の進行における HDL 機能 (コレステロール引き抜き能) の役割

心房細動の進行は左心房のモデリングの進行と並行する。左心房容積指数(LAVI)は体表面積で補正され、比較的厳格な左心房リモデリングの指標と考えられている。本研究では心房細動症例における HDL 機能、すなわちコレステロール引き抜き能(CEC)を定量化し、LAVI との相関を検討した。さらに、CEC を全体・ABCA1 依存性と非依存性に分けて検討することで複数ある CEC pathway のどの部分と関係するかの検討を行なった。(下図)その結果、CEC 全体と ABCA1 非



依存性の CEC が LAVI 上昇群で有意に低下していることが明らかとなった。

この結果は、心房細動の進行と ABCA1 依存性の CEC 低下が相関していることを意味し、ABCA1 依存性 CEC の低下が、心房細動の病態に何らかの役割を果たしていることを示唆していると考えられる。

今後は心臓外科手術にて摘除された左心房・左心耳組織を検討し、ミクロにおける HDL の役割について検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Minami-Takano A, Iwata H, Miyosawa K, Kubota K, Kimura A, Osawa S, Shitara M, Okazaki S, Suwa S, Miyauchi K, Sumiyoshi M, Amano A, Daida H	4. 巻 24
2. 論文標題 Novel Nutritional Index Serves as A Useful Prognostic Indicator in Cardiac Critical Patients Requiring Mechanical Circulatory Support.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	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） 10.3390/nu11061420	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Funamizu T, Iwata H, Chikata Y, Doi S, Endo H, Wada H, Naito R, Konishi H, Ogita M, Kato Y, Okai I, Dohi T, Kasai T, Isoda K, Okazaki S, Miyauchi K
2. 発表標題 Statins Were Effective to Lower Long-Term Cardiovascular Mortalities in Patients Treated by Chronic Hemodialysis Underwent Percutaneous Coronary Intervention
3. 学会等名 American Heart Association（国際学会）
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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------