

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08073

研究課題名(和文)新規HDL機能評価指標の実用性の検証と規定因子の同定

研究課題名(英文)Clinical utility of cholesterol uptake capacity, a novel indicator for HDL functionality

研究代表者

杜 隆嗣 (Toh, Ryuji)

神戸大学・医学研究科・特命准教授

研究者番号：50379418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：HDLの量的指標であるHDL-Cよりも、コレステロール引き抜き能力が心血管病のリスク層別化に有用である。しかし、その評価にはRIや細胞を必要とし、臨床応用が困難である。そこで、1)RIの代替として蛍光色素を用い(非放射性)、2)血清と蛍光標識コレステロールをインキュベートし(無細胞)、3)アポA1抗体でHDLを捕捉後に蛍光強度を測定する(HDL特異的)、新たなHDL機能評価系を開発した(コレステロール取り込み能：CUC)。OCTによる検討で、CUCは冠動脈プラーク内の脂質コア量・マクロファージ集積程度と負の相関を示した。また、CUCの低下は冠動脈形成術後の再血行再建を予測する危険因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HDLはコレステロール引抜きに加え多彩な抗動脈硬化作用を有するも、慢性炎症や糖尿病などの病態下では「善玉」としての作用が失われ、「機能不全HDL」となる。HDLの重要性は、量のみならず、質も併せて評価すべきであると変遷しているにもかかわらず、いまだ確立されたHDL機能評価法がないこと自体がHDL研究の大きな障壁となっている。本研究は「機能不全HDL」を簡便かつ再現性をもって検出することを可能とし、動脈硬化性疾患のリスク指標としてのHDLの意義についてリアルワールド・エビデンスの構築に寄与することのみならず、HDL機能改善を標的とした創薬に強力な研究基盤技術を提供することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cholesterol efflux from atherosclerotic lesion is a key function of high-density lipoprotein (HDL). Recently, we established a simple, high-throughput, cell-free assay to evaluate the capacity of HDL to accept additional cholesterol, which is herein referred to as “cholesterol uptake capacity (CUC)”. We investigated the cross-sectional relationship between CUC and the morphological features of angiographic stenosis by OCT, and revealed that CUC was inversely related to lipid-rich plaque burden and the extent of macrophage accumulation. We also demonstrated that impaired CUC is the risk for incidence of target-lesion revascularization.

研究分野：循環器内科学

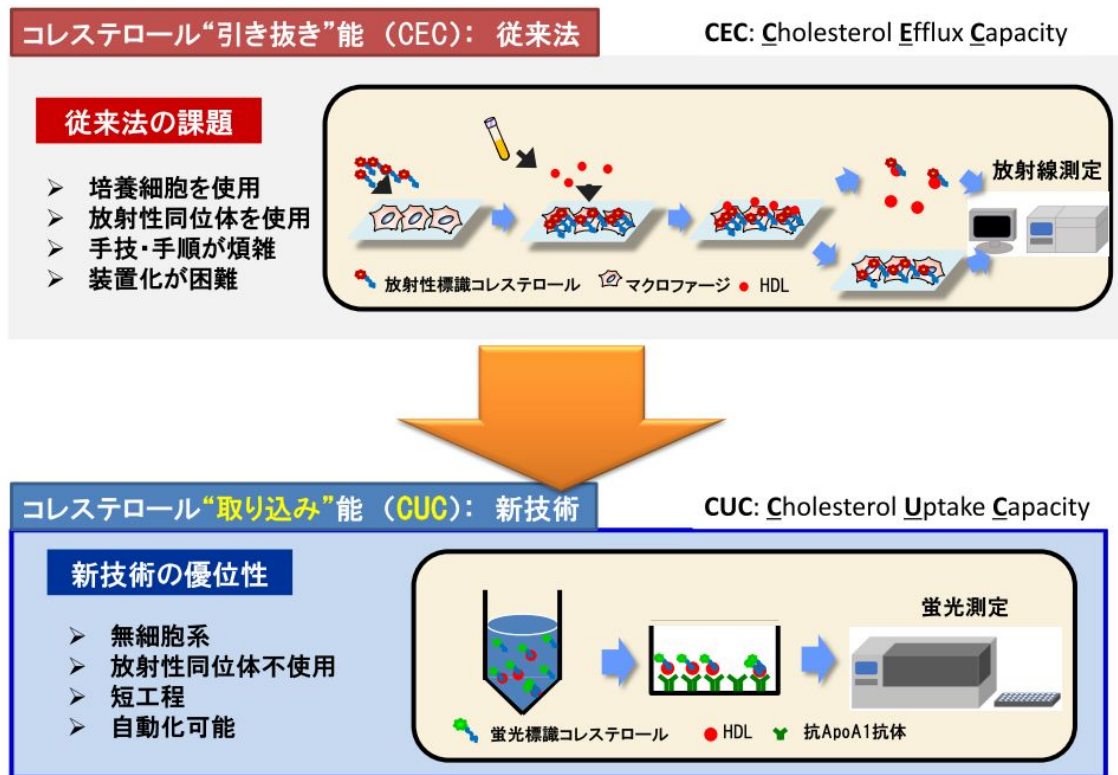
キーワード：高比重リポ蛋白(HDL) コレステロール取り込み能 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

HDL の量的指標として用いられている **HDL-C** は、**HDL** 重量の **2-3** 割を占めるコレステロール量であり、コレステロール逆転送系における **HDL** の本来の機能ではなく、結果を反映するマーカーに過ぎない。これまで **HDL-C** 増加薬による大規模臨床試験でその有効性は証明されておらず、遺伝的エビデンスでは **HDL-C** 超高値によりむしろ心血管病が増加する可能性すら示唆されており、**HDL-C** はただ高ければよいわけでは決していない。一方、**HDL** はコレステロール引抜きに加え多彩な抗動脈硬化作用を有するも、慢性炎症や糖尿病などの病態下では構成蛋白やリン脂質の組成が変化したり、化学的修飾を受けることで「善玉」としての作用が失われ、「機能不全 **HDL**」となる。すなわち **HDL** の重要性は、量のみならず質も併せて評価すべきであると変遷しているにもかかわらず、いまだ確立された **HDL** 機能評価法がないこと自体が **HDL** 研究の大きな障壁となっている。

HDL のコレステロール「引き抜き」能 (**Cholesterol efflux capacity: CEC**) が冠動脈疾患の独立した危険因子であることが近年、示唆されている。しかし、あらかじめトリチウムで標識したコレステロールをマクロファージに取り込ませ、**HDL** とインキュベーションした後に培養液中に移行したコレステロールをシンチレーションでカウントするというように、その評価には **RI** や細胞を必要とし、また手技も煩雑であるため、限られたコホート研究での報告にとどまっている。そこでこれらの弱点を克服すべく、**1) RI** の代替として蛍光色素を用い (非放射性) **2) 血清** と蛍光標識コレステロールをインキュベートし (無細胞) **3) アポ AI** 抗体で **HDL** 粒子を捕捉した後の蛍光強度を測定する (**HDL** 特異的) 新たな評価法を開発した (図 1)。

図 1



Assessment of HDL Cholesterol Removal Capacity: Toward Clinical Application.
Toh R. *J Atheroscler Thromb.* 2019;26:111-120.

従来のコレステロール“引き抜き”能に対し、コレステロール“取り込み”能 (**Cholesterol uptake capacity: CUC**) と命名した本指標は、前者の測定には数日間の工程を要するのに対し、**6** 時間以内で測定が可能であるとともに、**CV 10%**未満と非常に高い再現性を示したが、臨床現場での **HDL** 機能評価の実現化にむけて、心血管病のリスク層別化における有用性を証明することが次の課題であった。

2. 研究の目的

CUC の臨床応用を目指し、冠動脈疾患二次予防におけるリスク層別化に有用か検証する。

3. 研究の方法

1) CUC と冠動脈プラーク病変の性状との関連についての検討

神戸大学病院 循環器内科にて冠動脈 135 人の冠動脈プラーク病変について光干渉断層法 (OCT) による観察を行った 135 人を対象に CUC を測定した。OCT によりプラークにおける脂質コアの長さ (血管長軸)・角度 (血管短軸) を求め、脂質コア量として Lipid index (長さ×角度) を算出した。また、プラーク被膜内へのマクロファージの集積程度について OCT シグナル輝度から Grade 0~4 にスコア化した。

2) 二次予防における有用性の検証

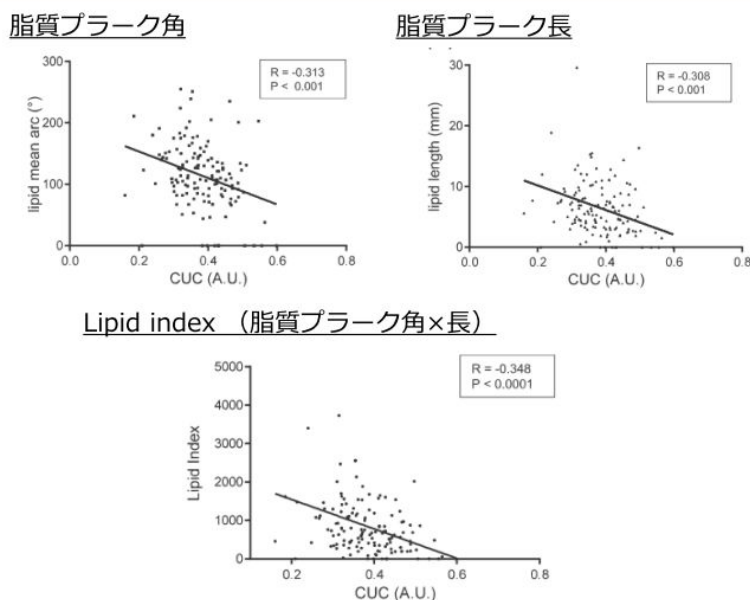
神戸大学病院 循環器内科にて経皮的冠動脈ステント留置術後フォローアップとして冠動脈造影を受けた 207 人を対象に CUC を測定し、その後の標的病変部血行再建 (Target Lesion Revascularization: TLR) の予測因子として有用か検証した。

4. 研究成果

1) CUC はプラークにおける脂質コアの長さ・角度ならびにその積値である Lipid Index のいずれとも有意な負の相関を示した (図 2)。一方、HDL コレステロールおよび HDL の主要なアポ蛋白である apoA1 量では同様の相関は認めなかった。

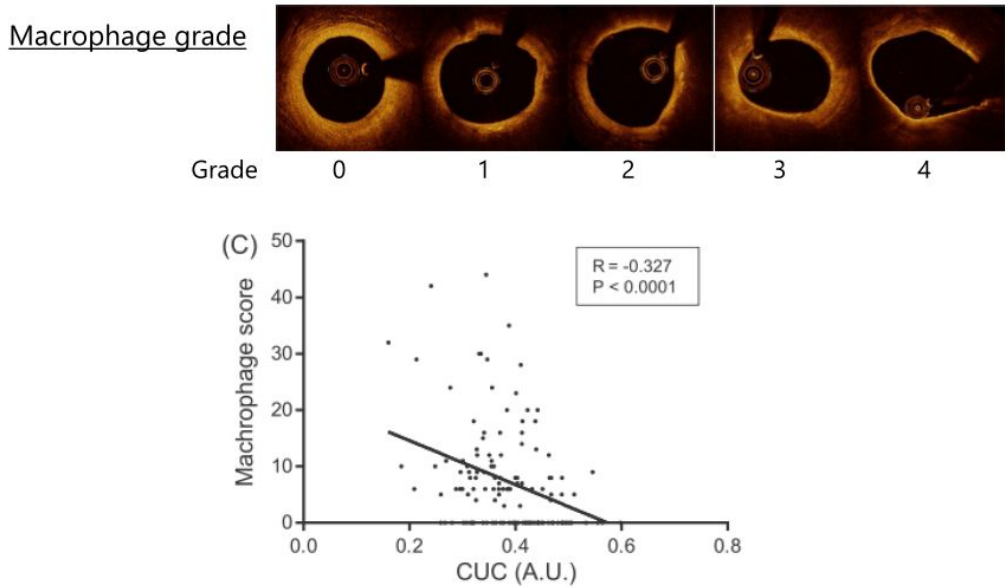
図 2

HDLコレステロール取り込み能とLipid index は逆相関する



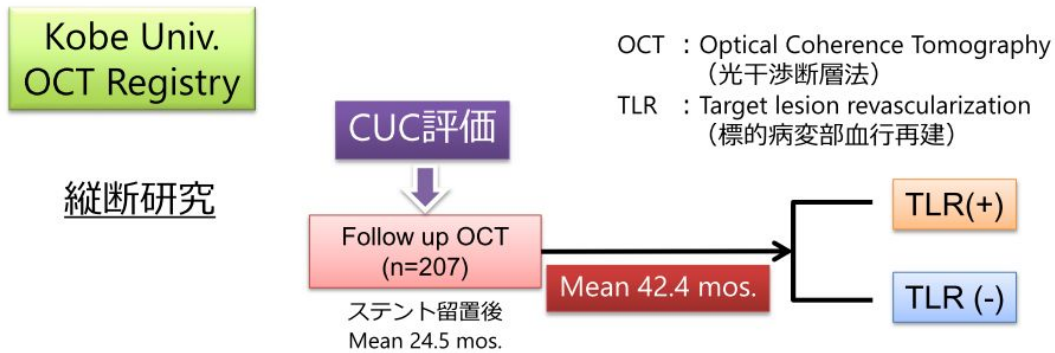
また、CUC は OCT の輝度よりスコア化したプラーク内へのマクロファージの集積程度とも有意な負の相関を示した (図 3)。CUC がマクロファージの集積と逆相関した機序については不明であるが、CUC が低下した HDL では抗炎症作用も同時に低下している可能性が考えられる。一方、マクロファージの脂質ラフトからコレステロールを引き抜くことにより、Toll 様受容体の不安定化を引き起こし、炎症を惹起するシグナル伝達を減弱化している可能性も考えられた。今後、CUC と HDL の抗炎症作用との関連について、さらなる検討が必要である。

マクロファージ量とも逆相関



Oshita T, Toh R, et al. *Clin Chim Acta.* 2020;503:136-144.

2) 経皮的冠動脈ステントを留置後の患者において CUC の低下は、ベアメタル・ステントの留置とともにその後の TLR の発生リスクであることを明らかにした。



Variables	Univariate			Multivariate		
	OR	95% CI	P value	OR	95% CI	P value
Age	0.991	0.951-1.033	0.644	0.978	0.935-1.022	0.322
Male	1.388	0.451-4.271	0.568	1.204	0.363-3.993	0.762
Duration between stent implantation and F/U OCT	1.009	1.003-1.015	0.004	1.006	0.996-1.017	0.208
CUC	0.889	0.823-0.960	0.003	0.887	0.819-0.961	0.003
Bare-metal stent	4.237	1.670-10.75	0.002	4.211	1.601-11.08	0.004

Nagano Y, et al. *J Am Heart Assoc.* 2019;8:e011975.

また、本研究期間中に CUC を自動測定できるシステムを完成させた。これまでポリエチレングリコール沈殿法による血清からのアポ蛋白 B 除去を行っていたが、血清から前処理なしで直接、測定することが可能となった。これにより 1 検体につき 30 分以内で測定が可能となり、さらなるハイスループット化の実現に伴い、臨床性能について多施設共同研究を開始している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oshita T, Toh R, Nagano Y, Kuroda K, Nagasawa Y, Harada A, Murakami K, Kiriyama M, Yoshikawa K, Miwa K, Kubo T, Iino T, Nagao M, Irino Y, Hara T, Shinohara M, Otake H, Shinke T, Nakajima K, Ishida T, Hirata K	4. 巻 503
2. 論文標題 Association of cholesterol uptake capacity, a novel indicator for HDL functionality, and coronary plaque properties: An optical coherence tomography-based observational study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 136 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2020.01.001	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 Nagao M, Miyashita K, Mori K, Irino Y, Toh R, Hara T, Hirata KI, Shinohara M, Nakajima K, Ishida T	4. 巻 13
2. 論文標題 Serum concentration of full-length- and carboxy-terminal fragments of endothelial lipase predicts future cardiovascular risks in patients with coronary artery disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Lipidology	6. 最初と最後の頁 839 ~ 846
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jacl.2019.07.007	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 Nagano Y, Otake H, Toba T, Kuroda K, Shinkura Y, Tahara N, Tsukiyama Y, Yanaka K, Yamamoto H, Nagasawa A, Onishi H, Sugizaki Y, Takeshige R, Harada A, Murakami K, Kiriyama M, Oshita T, Irino Y, Kawamori H, Ishida T, Toh R, Shinke T, Hirata KI	4. 巻 8
2. 論文標題 Impaired Cholesterol Uptake Capacity of HDL Might Promote Target Lesion Revascularization by Inducing Neoatherosclerosis After Stent Implantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e011975
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.119.011975	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 Hisamatsu E, Nagao M, Toh R, Irino Y, Iino T, Hara T, Tanaka H, Satomi-Kobayashi S, Ishida T, Hirata KI.	4. 巻 66
2. 論文標題 Fibronectin-containing High-Density Lipoprotein is Associated with Cancer Cell Adhesion and Proliferation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kobe Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 E40-E48.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Honda Takanori, Ohara Tomoyuki, Shinohara Masakazu, Hata Jun, Toh Ryuji, Yoshida Daigo, Shibata Mao, Ishida Tatsuro, Hirakawa Yoichiro, Irino Yasuhiro, Sakata Satoko, Uchida Kazuhiro, Kitazono Takanari, Kanba Shigenobu, Hirata Ken-Ichi, Ninomiya Toshiharu	4. 巻 93
2. 論文標題 Serum elaidic acid concentration and risk of dementia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurology	6. 最初と最後の頁 e2053 ~ e2064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1212/WNL.0000000000008464	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 Kuroda Koji, Otake Hiromasa, Shinohara Masakazu, Kuroda Masaru, Tsuda Shigeyasu, Toba Takayoshi, Nagano Yuichiro, Toh Ryuji, Ishida Tatsuro, Shinke Toshiro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Effect of rosuvastatin and eicosapentaenoic acid on neoatherosclerosis: the LINK-IT Trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EuroIntervention	6. 最初と最後の頁 e1099 ~ e1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4244/EIJ-D-18-01073	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 Oshita Toshihiko, Toh Ryuji, Shinohara Masakazu, Mori Kenta, Irino Yasuhiro, Nagao Manabu, Hara Tetsuya, Otake Hiromasa, Ishida Tatsuro, Hirata Ken-ichi	4. 巻 83
2. 論文標題 Elevated Serum Elaidic Acid Predicts Risk of Repeat Revascularization After Percutaneous Coronary Intervention in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circulation Journal	6. 最初と最後の頁 1032 ~ 1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-18-1175	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 Toh Ryuji	4. 巻 26
2. 論文標題 Assessment of HDL Cholesterol Removal Capacity: Toward Clinical Application	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 111 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5551/jat.RV17028	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 尾下寿彦、杜隆嗣、入野康宏、黒田浩史、永野雄一郎、長澤圭典、大竹寛雅、新家俊郎、石田達郎、平田健一
2. 発表標題 HDL機能の新規評価法“Cholesteroluptakecapacity”とOCT解析による冠動脈プラーク病変性状の比較検討
3. 学会等名 第55回 日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuji Toh, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata
2. 発表標題 Understanding of HDL Cholesterol Efflux Capacity: Towards Clinical Application
3. 学会等名 第50回 日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihiko Oshita, Ryuji Toh, Mitsumasa Okano, Shigeyasu Tsuda, Koichi Watanabe, Seimi Kobayashi, Tetsuya Hara, Masakazu Shinohara, Yasuhiro Irino, Katsuhiro Murakami, Amane Harada, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata
2. 発表標題 Searching for modulating factor of cholesterol uptake capacity, a novel indicator for HDL functionality
3. 学会等名 第50回 日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihiko Oshita, Ryuji Toh, Mitsumasa Okano, Koichi Watanabe, Yuichiro Nagano, Amane Harada, Katsuhiro Murakami, Seimi Kobayashi, Masakazu Shinohara, Tetsuya Hara, Yasuhiro Irino, Hiromasa Otake, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata.
2. 発表標題 Cholesterol Uptake Capacity, a Novel Indicator for HDL Functionality, Versus Cholesterol Efflux Capacity in Association with Coronary Plaque Lipid
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihiko Oshita, Ryuji Toh, Mitsumasa Okano, Koichi Watanabe, Yuichiro Nagano, Amane Harada, Katsuhiro Murakami, Seimi Kobayashi, Masakazu Shinohara, Tetsuya Hara, Yasuhiro Irino, Hiromasa Otake, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata.
2. 発表標題 Comparison of Cholesterol Uptake Capacity, a Novel Indicator for HDL Functionality, and Cholesterol Efflux Capacity in Association with Coronary Plaque Properties
3. 学会等名 第83回 日本循環器学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------