様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ４ 月 １６ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2019～2020
課題番号：１９Ｋ２３７９９

研究課題名（和文）新規リン脂質定量分析法を用いた動脈硬化性冠動脈疾患の発症抑制因子の探索

研究課題名（英文）Exploration of suppressors of atherosclerotic coronary artery disease by using a novel method for measurement of phospholipids

研究代表者
辻　徳治（Tsuji, Tokuji）

京都大学・生命科学研究科・特定研究員

研究者番号：５０８４５１１２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,200,000円

研究成果の概要（和文）：リン脂質は血漿リポタンパクの主要構成成分である。本研究では、これまでに開発したリン脂質酵素蛍光定量法が、血漿リポタンパクのリン脂質定量分析に応用できるか検証した。結果、ホスファチジルコリン（PC）、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、スフィンゴミエリン（SM)に対する定量法の妥当性を確認した。また、ヒト血漿VLDL、LDL、HDLにおけるPC、PE、SMの定量分析を行った結果、SM/PC比やPE/PC比が、各リポタンパクで異なっていることを明らかにし、リン脂質組成の変化が血漿リポタンパク代謝の一つの指標となっている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
心筋梗塞や狭心症などの動脈硬化性冠動脈疾患は日本人の死因の約16%を占める疾患である。HDLは、血管内皮マクロファージから余剰のコレステロールを引き抜くことで動脈硬化プラークの形成を抑制する。しかし、HDLのリン脂質組成が、そのコレステロール引き抜き能にどのように影響するのかは明らかになっていない。本研究では、ヒト血漿リポタンパクを対象とした、PC、PEおよびSM定量分析法を確立した。今後、PC、PE、SM以外のリン脂質に対する定量分析法をさらに確立し、より網羅的なHDLリン脂質組成の定量分析を可能にすることで、動脈硬化性疾患の抑制因子として機能するリン脂質の同定に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Phospholipids are major components of plasma lipoproteins. In this study, we investigated whether the enzymatic fluorometric methods for measuring phospholipid classes, which we recently developed, can be applied to the quantification of phospholipids in plasma lipoproteins. As a result, we confirmed the validity of the enzymatic fluorometric assay to quantify phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), and sphingomyelin (SM) contained in human plasma lipoproteins. We also showed that the SM/PC ratio and PE/PC ratio were different between VLDL, LDL and HDL, suggesting that changes in phospholipid composition may be one of the indicators of plasma lipoprotein metabolism.

研究分野：脂質生化学、分子生物学

キーワード：リン脂質　リポタンパク　酵素蛍光定量法　動脈硬化

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

心筋梗塞や狭心症などの動脈硬化性冠動脈疾患は、日本人の死因の約 16%を占める疾患である。主なリスク因子として、低密度リポタンパク (low density lipoprotein: LDL)や高密度リポタンパク（high density lipoprotein: HDL）中に含まれるコレステロール量 (LDL-C、HDL-C)があげられる。一般に、LDL-C 値が 140 mg/dL 以上、HDL-C 値が 40 mg/dL 未満の場合、動脈硬化性冠動脈疾患の発症リスクが高くなる。近年、スタチン系薬物によって LDL-C を低下させることで、動脈硬化性冠動脈疾患の発症を抑制できるようになっている。一方で、HDL-C を大幅に増加させても、動脈硬化性冠動脈疾患の発症リスクに大きな変化は認められないのが現状である。

HDL 表面はリン脂質で覆われており、血管内皮マクロファージから余剰のコレステロールを引き抜くことで動脈硬化プラークの形成を抑制している。このことから、HDL のコレステロールを引き抜く能力は、動脈硬化性冠動脈疾患の発症を抑制するうえで重要な要素のひとつであることが予想される。また、近年、単一のリン脂質を用いて作製された人工 HDL 粒子が、培養細胞から効果的にコレステロールを引き抜くことが報告されており、特定のリン脂質組成を持つヒト血漿 HDL が、より強くコレステロールを引き抜く能力を有している可能性が予想される。しかし、ヒト血漿 HDL のリン脂質クラスの量や組成の違いが、HDL のコレステロール引き抜き能にどのような影響を与えているのかについてはほとんど明らかになっていない。その要因の一つとして、従来のリン脂質定量分析法である薄層クロマトグラフィー/リン定量法などの手法では、HDL をはじめとしたヒト血漿リポタンパク中に含まれる主要リン脂質クラスの全てを、微量の試料から網羅的に定量分析することが困難であったことが考えられる。

リン脂質は、細胞膜や血漿リポタンパクの主要な構成成分であり、ヒトでは主に、ホスファチジルコリン (PC)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI)、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジン酸 (PA)、ホスファチジルグリセロール (PG)、スフィンゴミエリン (SM)の 7 クラスに大きく分けられる。研究代表者の所属研究グループでは、これまでに、PC、PE、PI、PS、PA、PG および SM に対して特異的な酵素蛍光定量法を開発してきた。酵素蛍光定量法とは、特定の分子に対して特異的な酵素反応と蛍光基質とを組み合わせ、酵素反応の進行に伴って生じる蛍光物質の蛍光強度を測定することで対象分子の量を求める方法である。各リン脂質酵素蛍光定量法では、酵素反応と蛍光強度測定に関わる一連の操作を主に 96 穴マイクロプレート上での簡便な操作で実施でき、微量の測定試料中に含まれる対象のリン脂質クラスをピコモル単位で検出可能である。これまでに、研究代表者らは開発した全てのリン脂質酵素蛍光定量法を培養細胞実験に利用することで、細胞増殖に伴う細胞内リン脂質組成の微細な変化を定量的に評価してきた。以上のことから、リン脂質酵素蛍光定量法を、ヒト血漿 HDL を対象とした臨床研究に応用することで、特定のリン脂質組成を有し、高いコレステロール引き抜き能を持つような「高品質 HDL」を探索できるのではないかと考えた。

２．研究の目的

本研究の目的は、ヒト血漿 HDL のリン脂質組成を網羅的に定量分析し、高いコレステロール引き抜き能を持つ HDL に特徴的なリン脂質を探索・同定することで、特定のリン脂質組成を有する HDL が動脈硬化性冠動脈疾患の抑制因子となる可能性を示すことである。

本目的を達成するため、血漿 HDL リン脂質の網羅的な定量分析を実施可能にすることを第一の目的として本課題をスタートした。しかし、ヒト血漿 HDL を測定試料とした場合に、PC、PE、SM 以外の PI、PS、PA、PG に対する酵素蛍光定量法において定量法の妥当性が確認できず、HDL における全主要リン脂質の組成を継続して調べることが困難な状況となった。このことから、当初の研究計画を変更し、超低密度リポタンパク (very low density lipoprotein: VLDL)や LDL、HDL を対象とした PC、PE および SM の定量分析を試みることで、血漿リポタンパク中 PC、PE、SM の組成比と血漿リポタンパク代謝との関係を示す新たな知見を得ることを次なる目的とした。

３．研究の方法

(1)血漿リポタンパクの分画および測定試料の調製

滋賀医科大学研究倫理審査委員会の承認後、本研究の趣旨を説明のうえ、同意を得た健常男性 3 名を対象にして血液サンプルの採取を行った。採血後、すぐに血液サンプルを氷上に移し、遠心分離によって血漿を得た。超遠心分離によって血漿を VLDL、LDL、および HDL に分画し、各画分に含まれるリポタンパクの粒子径を動的光散乱法によって確認した。そして、クロロホルム–メタノール混合溶媒を用いた Folch 法によって、各血漿リポタンパク画分に含まれる脂質成分を抽出し、抽出脂質を 1% Triton X-100 溶液に可溶化することでリン脂質定量分析の測定試料を調製した。

(2)酵素蛍光定量法の妥当性の検証

(1)に示した方法で調製した血漿リポタンパク脂質成分を測定試料とし、以下に示す①～④の各種試験を、これまでに開発した PC、PE、PI、PS、PA、PG および SM 酵素蛍光定量法を用いて実施した。なお、測定値が各種定量法の検出可能範囲に収まるよう、測定試料を 1% Triton X-100 溶液で適宜希釈した。

①希釈直線性試験

測定試料を段階的に希釈し、希釈溶液中に含まれる各種のリン脂質クラス量を測定した。希釈率を横軸、測定値を縦軸にプロットし、サンプル希釈率に比例した直線が得られるかを検証した。

②添加回収試験

測定試料中に、1% Triton X-100 で可溶化した既知量のリン脂質標準品を添加し、この混合溶液中に含まれる各種のリン脂質クラス量を測定した。予想された測定値に対する実際の測定値の割合を算出し、その割合が 100%に近い値となるかを検証した。

③同時再現性試験

単一の測定試料から、等量ずつ 10 試料を同一のマイクロプレート上に分注し、各種リン脂質クラスの定量を行った。測定値から得られた標準偏差をもとに、変動係数 (Coefficient of variation: CV)の値を算出し、定量法の精度を検証した。

④日差再現性試験

単一の測定試料を用い、測定試料調製日を第 1 日目として、第１０日目まで 1 日ごとに各種リン脂質クラスの定量を行った。測定値から得られた標準偏差をもとに CV 値を算出し、定量法の精度を検証した。なお、測定試料は繰り返しの凍結融解を避けるため、抽出脂質成分を可溶化した後、等量ずつ 10 分割し、速やかに-20℃で凍結保存した。

(3)血漿リポタンパク中に含まれる PC、PE および SM の定量分析

血漿リポタンパク (VLDL、LDL、HDL)の抽出脂質に含まれる PC 量および SM 量を、従来の PC 酵素蛍光定量法および SM 酵素蛍光定量法を用いて測定した。PE 量は、従来の PE 酵素蛍光定量法に改良を加えた手法で測定した。なお、検量線の作成には、1% Triton X-100 溶液で調製したリン脂質標準品 (1-パルミトイル-2-オレオイル PC、1-パルミトイル-2-オレオイル PE、およびニワトリ卵由来 SM)を用いた。

４．研究成果

(1)リン脂質酵素蛍光定量法による血漿 HDL リン脂質クラス測定法の確立

①従来の各種リン脂質クラス酵素蛍光定量法の妥当性の検証

血漿 HDL サンプルを測定試料として、PC、PE、PI、PS、PA、PG および SM 酵素蛍光定量法の妥当性を確認した。希釈直線性試験を行った結果、PC および SM 酵素蛍光定量法では、測定サンプルの希釈率に比例して非常に高い直線性が得られた。一方で、PC、SM 以外の 5 種類の定量法では希釈率に比例した直線性が認められず、各種定量法における酵素反応が十分に進行していない可能性や、測定試料中に何らかの酵素反応阻害物質が含まれている可能性が示唆された。

希釈直線性試験で良好な結果が得られた PC および SM 酵素蛍光定量法の妥当性をさらに検証するため、添加回収試験を実施した。結果、どちらの定量法においても、測定試料中に添加した既知量の各種標準リン脂質を 100%近く定量することができた。同時再現性試験においては、定量法の精度の指標となる CV 値が、PC 酵素蛍光定量法で約 2.0%、SM 酵素蛍光定量法では約 1.3%となり、測定値のばらつきは極めて小さかった。また、日差再現性試験においても、PC 酵素蛍光定量法の CV 値が約 3.1%、SM 酵素蛍光定量法の CV 値が約 2.7%と良好な結果が得られた。

②PE、PI、PS、PA、PG 酵素蛍光定量法の改良

上述の①の検証で、定量法の妥当性が確認できなかった 5 種類の酵素蛍光定量法に関して、血漿 HDL サンプルを測定試料とした場合でも対象リン脂質クラスの定量が行えるよう、酵素反応条件の再検討を行った。使用する酵素量や、酵素の種類、温度・pH・塩濃度などの酵素反応条件、加熱処理の有無など様々な条件を精査した。結果、PE 酵素蛍光定量法において、主に、由来生物種の異なるホスホリパーゼ D を酵素反応の第一段階に用いたこと、一連の酵素反応の中に加熱処理の過程を加えたことによって、希釈直線性試験では希釈率に比例した高い直線性が、添加回収試験では既知量の添加標準 PE に対する 100%近い回収率が得られるようになった。また、同時再現性試験における CV 値は約 1.8%、日差再現性試験における CV 値は約 3.5%と測定値のばらつきも小さく、定量法の妥当性を確認できた。しかし、PI、PS、PA、PG 酵素蛍光定量法に関しては、依然として定量法の妥当性を確認することができず、酵素反応系のさらなる改良が必要であった。

(2)VLDL、LDL、HDL を対象としたリン脂質定量分析

①血漿 VLDL および血漿 LDL サンプルを測定試料とした場合の PC、PE、SM 酵素蛍光定量法の妥当性の検証

ヒト血漿 HDL を測定試料とした場合に、PC、PE、SM 以外の PI、PS、PA、PG に対する酵素蛍光定量法において定量法の妥当性が確認できなかったため、当初に計画していた、HDL 中に含まれるヒト主要リン脂質クラスの全てを網羅的に定量分析することが困難になった。そこで、次のアプローチとして、VLDL、LDL、HDL の各血漿リポタンパク中に含まれる PC、PE および SM を定量分析することによって、血漿リポタンパクの代謝過程において、血漿リポタンパク中の PC、PE、SM の組成比が変化するのかを検証することを試みた。

そこでまず、血漿 VLDL ならびに LDL サンプルを測定試料として、PC、PE および SM 酵素蛍光定量法の妥当性を確認した。結果、これら全ての酵素蛍光定量法において、血漿 HDL サンプルを測定試料にした場合と同様に、希釈直線性試験では希釈率に比例した高い直線性が、添加回収試験では既知量の添加標準リン脂質に対する 100%近い回収率が得られた。また、同時再現性試験の CV 値は、血漿 VLDL サンプルを測定試料とした場合、PC、PE ならびに SM 酵素蛍光定量法でそれぞれ、約 1.9%、約 1.7%、約 1.7%、血漿 LDL サンプルを測定試料とした場合ではそれぞれ、約 2.0%、約 1.4%、約 1.9%であった。日差再現性試験における CV 値は、血漿 VLDL サンプルを測定試料とした場合、PC、PE ならびに SM 酵素蛍光定量法でそれぞれ、約 3.6%、約 3.6%、約 2.7%、血漿 LDL サンプルを測定試料とした場合ではそれぞれ、約 3.4%、約 3.3%、約 2.8%となり、両再現性試験において測定値のばらつきが小さい良好な結果が得られた。これにより、血漿リポタンパク PC、PE、SM の定量分析法を確立することができた。

②血漿リポタンパク中に含まれる PC、PE、SM の定量分析

次に、血漿 VLDL、LDL、HDL における PC、PE、SM の組成を明らかにすることを目指し、(2)-①で確立した、血漿リポタンパク PC、PE および SM 酵素蛍光定量法を用いて、各リン脂質クラスの定量分析を行った。定量結果をもとに、PC に対する PE の比率 (PE/PC 比)、SM/PC 比、そして PE/SM 比をそれぞれ算出した。結果、PE/PC 比と PE/SM 比は、VLDL＞HDL＞LDL の順に、SM/PC 比は、LDL＞HDL＞VLDL の順に大きくなることが示された。LDL では VLDL と比較して、PE の割合 (PE/PC 比と PE/SM 比)が顕著に低下し、逆に SM の割合 (SM/PC 比)が増加することから、リン脂質組成の変化が血漿リポタンパク代謝の指標の一つとなっている可能性が予想される。

血中において、リン脂質の大部分は血漿リポタンパク上に分布しており、PC や SM はリポタンパクを構成する主要なリン脂質として知られる。現在、臨床検査においても PC や SM といったコリン含有リン脂質の合計血中濃度が、肝機能や脂質代謝異常などを評価する指標として用いられている。また、血漿 SM 濃度の上昇が狭心症や心筋梗塞などの冠動脈疾患の危険因子であること、PE や PE 代謝物の血中レベルが非アルコール性脂肪性肝疾患や心血管疾患、肺がんの指標となる可能性も徐々に明らかになってきている。したがって、VLDL や LDL、HDL といった血漿リポタンパクにおいて、各リポタンパクが特徴的なリン脂質組成を持つことを明らかにできれば、特定のリン脂質クラスの組成変化が疾患の発症や進行状況を判断するための指標となる可能性がある。

本課題では、酵素蛍光定量法を応用し、血漿リポタンパク中の PC、PE および SM 定量分析法を確立した。そして、VLDL、LDL、HDL といった血漿リポタンパクにおいて、PC、PE および SM の組成が異なっていることを見出した。今後、検体数を増やし、健常者ならびに上述の各種疾患患者における血漿リポタンパクの PC、PE、SM 組成を比較検討することによって、動脈硬化性冠動脈疾患をはじめとした様々な疾患の発症や進行を判断するための指標となる血中リン脂質組成が見出されることが期待できる。また、PC、PE、SM に加え、PI、PS、PA、PG に対する酵素蛍光定量法を、ヒト血漿リポタンパクを対象としたリン脂質定量分析に順次応用していくことで、リポタンパクリン脂質組成と疾患との関係や、血漿リポタンパクリン脂質の生理機能をより詳細に明らかにできる可能性がある。これに加え、血漿 HDL のリン脂質組成に関する情報をより一層集積することで、当初計画していた、高いコレステロール引き抜き能を持つような高品質な HDL の探索・同定に繋がることを期待している。

５．主な発表論文等

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

１．著者名 Tsuji Tokuji、Morita Shin-ya、Nakamura Yoshinobu、Ikeda Yoshito、Kambe Taiho、Terada Tomohiro	４．巻 11
２．論文標題 Alterations in cellular and organellar phospholipid compositions of HepG2 cells during cell growth	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 2731
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-81733-3	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 該当する

１．著者名 辻徳治	４．巻 37
２．論文標題 酵素蛍光定量法を用いた主要リン脂質クラスの網羅的定量法の開発と疾患バイオマーカーの探索	５．発行年 2021年
３．雑誌名 薬学研究の進歩	６．最初と最後の頁 91-97
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 無
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 Morita Shin-ya、Tsuji Tokuji、Terada Tomohiro	４．巻 21
２．論文標題 Protocols for Enzymatic Fluorometric Assays to Quantify Phospholipid Classes	５．発行年 2020年
３．雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	６．最初と最後の頁 1032-1032
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21031032	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 該当する

〔学会発表〕　計1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 辻徳治、森田真也、中村吉伸、寺田智祐
２．発表標題 酵素蛍光定量法を用いた細胞増殖に伴う細胞内リン脂質組成変化の定量分析
３．学会等名 第62回日本脂質生化学会
４．発表年 2020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