

機関番号：84404

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300232

研究課題名 (和文) 動脈硬化性疾患の発症に直結する新規バイオマーカーの発見と早期診断・治療法の開発

研究課題名 (英文) Discovery of new biomarker connected directly with the onset of arteriosclerotic disease and early diagnosis, therapeutic development

研究代表者

池田 康行 (IKEDA YASUYUKI)

独立行政法人国立循環器病研究センター 分子薬理部 客員研究員

研究者番号：90176107

研究成果の概要 (和文)：動脈硬化の発症および進展を予測可能にする新規バイオマーカーを血清から発見した。これは、単球由来マクロファージから分泌される高マンノース型の 20kDa サイズの糖タンパク質であり、Mφ由来動脈硬化発症因子 (Mφ-ADF, Macrophage-derived -Atherosclerosis Developing Factor) と命名した。この Mφ-ADF 蛋白を定量可能にするサンドイッチ ELISA 法を開発し、臨床検体への応用を行った。

研究成果の概要 (英文)：We newly identified biomarker in serum which may predict the development and progress of arteriosclerosis. It was a glycoprotein of the 20kDa size of the high mannose type secreted by a monocyte-derived macrophage and named this a macrophage-derived -Atherosclerosis Developing Factor (Mφ-ADF). We developed the sandwich ELISA method for the quantification of Mφ-ADF protein and applied this method to clinical samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6300000	1890000	8190000
2009年度	4300000	1290000	5590000
2010年度	4300000	1290000	5590000
総計	14900000	4470000	19370000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：リポ蛋白リパーゼ・高トリグリセリド血症・動脈硬化症・バイオマーカー・メタボリックシンドローム・マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化が原因で心(脳)血管の狭窄で発症する虚血性心疾患や脳梗塞は、日本における死因の30%を占めており、動脈硬化性血管病の予防・診断・治療法の確立は、国民の健康推進活動において極めて重要な課題である。特に、21世紀の医療目標は、オーダーメイド予防医学である。

動脈硬化の発症には、内皮細胞の障害と酸化LDL(低比重リポ蛋白)が関与するが、LDL

降下療法の治療効率は約30%程度であり、他の動脈硬化への危険因子に対するアプローチが必要とされている。最近、生活習慣病である高血圧、糖尿病や高トリグリセリド(TG)血症等が合併した病態(メタボリックシンドローム)が、動脈硬化性心血管病への危険因子となり、治療対象となっている。高TG血症の持続により、TGとコレステロールエステル(CE)に富む動脈硬化惹起性リポ蛋白の蓄積が認められる。我々は、動脈硬化惹起性高

TG血症が遺伝素因としてリポ蛋白のTGを水解する酵素であるLPL遺伝子の欠損ヘテロ接合体に環境因子として粗悪な生活習慣が負荷することで、高頻度に発症することを報告している。

動脈硬化は無症状で進展し、**図1**に示すように、冠動脈等に単球由来のマクロファージ(Mφ)が内膜内に侵入し、Mφは動脈硬化惹起性リポ蛋白を取込み、細胞内にCEを異常蓄積して泡沫細胞になり、粥状動脈硬化巣を形成することが病理学的に確認されている。動脈硬化巣の進展による破裂と血栓形成で急激な血流障害が生じ、急性心筋梗塞等が発症し、死に至る場合がある。

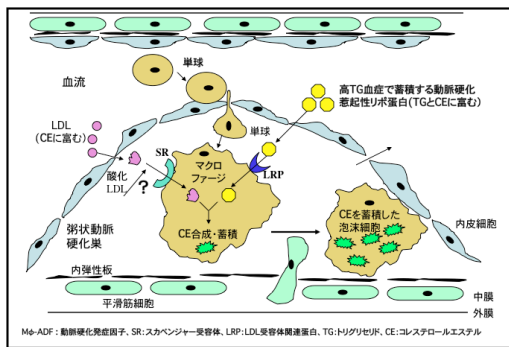


図1 動脈硬化における単球由来マクロファージからのMφ-ADF蛋白とその役割

動脈硬化性疾患の診断は、脈派伝導速度(PWV)測定、頸動脈エコーによる内膜肥厚測定、造影剤を用いる心臓カテーテル検査やMD-CT (multi-detector computed tomography) 法の画像検査にて行われ、冠動脈の狭窄度が評価されている。また、炎症マーカー (CRP: C-reactive protein) や可溶性 LOX-1 (Lectin-like oxidized LDL receptor-1) の血中濃度測定により、心血管イベントの予測に関する研究も行われている。しかし、これらの診断法は、いずれも動脈硬化性疾患の初期病変の検出には困難性を伴っている。

2. 研究の目的

動脈硬化性疾患の発症に直結するバイオマーカーとして、単球由来マクロファージ(Mφ)から分泌された動脈硬化巣の形成・進展に必須のMφ-ADF (Macrophage-derived-Atherosclerosis Developing Factor: Mφ由来動脈硬化発症因子) 蛋白をヒト血中から新規に発見した。本申請において、微量の血液検体で、多検体のスクリーニングを可能にするMφ-ADF蛋白の定量法 (サンドイッチELISA法) を確立し、動脈硬化性疾患の早期診断・進展予防およびMφ-ADFを標的とした治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Mφ-ADF蛋白に対するモノクローナル抗体の作成: 精製したMφ-ADF蛋白をマウスに免疫し、蛋白部分を認識する2種類のモノクローナル抗体 (D2B2, B4D4) を作成した。これら抗体は異なる蛋白部分を認識するので、Mφ-ADF蛋白をサンドイッチする事が可能であった。

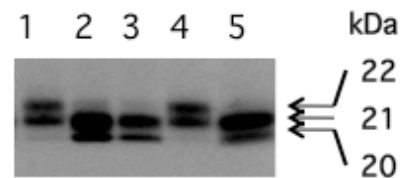
(2) モノクローナル抗体アフィニティークロマトグラフィー、SDS-PAGE、ウエスタンブロット法によるMφ-ADF蛋白の検出:

ヒト血液およびヒト単球由来Mφの培養上清からMφ-ADF蛋白に対するモノクローナル抗体 (B4D4) を結合したゲルを用いて、Mφ-ADF蛋白を分離精製した。このMφ-ADF蛋白を12%ゲルSDS-PAGEおよびウエスタンブロット法により解析した。蛋白はECL (化学発光) 法とLAS4000 (化学発光検出器) によって検出した。

(3) レクチンによるMφ-ADF蛋白の糖鎖検出: 末端のマノースを認識するConA, 末端のガラクトースを認識するRCA120, 末端のN-アセチルグルコサミンを認識するWGA, 末端のシアル酸を認識するSSA, フコースを認識するLCAとAAL, 末端のN-アセチルガラクトサミンを認識するPNAを用いて、Mφ-ADF蛋白の糖鎖を解析した。

4. 研究成果

(1) ウエスタンブロット法による健常者および動脈硬化症患者のMφ-ADF蛋白サイズの解析: 動脈硬化症患者3名と健常者25名を解析した。モノクローナル抗体アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した健常者由来のMφ-ADF蛋白をSDS-PAGE法、ウエスタンブロット法およびECL法によって解析した結果、健常者から2種類の分子サイズのMφ-ADF蛋白22、Mφ-ADF蛋白21が検出された。一方、動脈硬化症患者からは、Mφ-ADF蛋白21とMφ-ADF蛋白20が検出された。これらの結果からMφ-ADF蛋白20が動脈硬化発症に関与すると推定された (**図-2**)。



健常者: 1, 4
動脈硬化患者: 2, 3, 5

図2 SDS-PAGEとウエスタンブロット法による健常者と動脈硬化既往歴の患者からのMφ-ADFの検出

(2) 健常者と動脈硬化症患者の Mφ-ADF 蛋白の糖鎖とその識別: Mφ-ADF 蛋白を SDS-PAGE 法、ウエスタンブロット法および酵素 (AP) 標識レクチンによって解析した結果、末端のマノースを認識する ConA のみと強く反応したが、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、シアル酸、フコースおよび N-アセチルガラクトサミンなどを特異的に認識する他のレクチンとは、全く反応しなかった。これらの結果から、3 種類の分子サイズを持つ Mφ-ADF 蛋白は、N-結合型の高マノース型構造をもつ糖タンパク質と推定された。少数のマノースをもつ高マノース型糖鎖に比較的特異的認識を示すレクチンによって、Mφ-ADF 蛋白 20 の検出が可能であった。

(3) Mφ-ADF 蛋白 20 の測定を可能にするサンドイッチ ELISA 系の確立と臨床的意義: 図-3 に示す様に、Mφ-ADF 蛋白 20 に特異的なモノクローナル抗体と Mφ-ADF 蛋白の糖鎖を認識する標識レクチンを用いるサンドイッチ ELISA 法の確立を試みた。

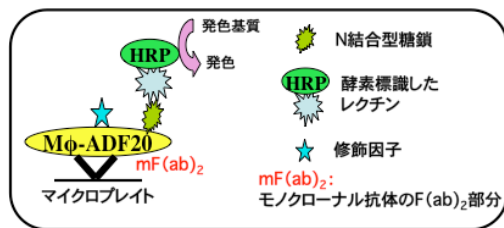


図3 Mφ-ADF20定量を可能にするレクチン使用の ELISA法の確立

免疫イムノグロブリンの H 鎖 (heavy chain) には、糖鎖が含まれていて、この測定系に用いる標識レクチンと反応するので、この糖鎖を含む Fc 部分をペプシン酵素によって切断した F (ab)₂ 部分を 96 穴プレイトに固定化した。作成した 96 穴プレイトを用いて、健常者および動脈硬化症患者からの血液検体から Mφ-ADF 蛋白 20 の検出を試みた。Mφ-ADF 蛋白 20 の検出は、動脈硬化患者において検出できた。血液検体を用いての Mφ-ADF

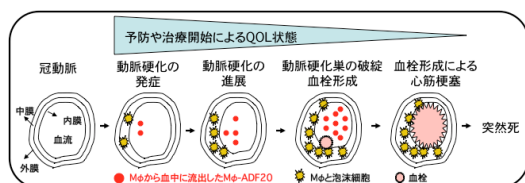


図4 動脈硬化の発症・進展・破綻の予測および治療効果の確認を可能にする血清バイオマーカーとしての Mφ-ADF20

蛋白 20 の測定は、図 4 に示す様に、動脈硬化の発症・進展・破綻の予測および治療効果

の確認を可能にすることが期待された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

高木敦子、池田康行.

リポ蛋白質リパーゼ (LPL)・肝性トリグリセリドリパーゼ (HTGL).

In: 広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査—その数値をどう読むか [第 7 版] (2) IV. 生化学的検査 [2] A. 脂質関係 日本臨床 67 巻 増刊号 8: 443-450 (2009) 日本臨床社 (査読無)

[学会発表] (計 6 件)

高木敦子、池田康行、荒木まり子、森田 拓、石原正行、松本 学、高杉尚志、前田明彦、阿部孝典、藤枝幹也、脇口 宏

高トリグリセリド血症発症の病因としてのリポ蛋白リパーゼ (LPL) に対する自己抗体産生 第 83 回 日本生化学会大会/第 33 回 日本分子生物学会大会

神戸ポートアイランド 2010 年 12 月 7-10 日

A. Takagi, M. Nagano, T. Iwanaga, N. Ito, H. Hattori, T. Egashira, Y. Ikeda.

Identification of compound heterozygous deficiency with a novel large deletion (a 54-kb deletion of 5' upper region and a part of intron 1) and dy61x of the lipoprotein lipase gene in the Japanese subject

78th EAS Hamburg, GERMANY June 20-23, 2010

Y. Ikeda, A. Takagi, N. Iwai, Y. Kokubo, and H. Tomoike.

Environmental risk factors leading to hypertriglyceridemia on heterozygous lipoprotein lipase (LPL) deficiency identified in the general population of Japanese.

78th EAS Hamburg, GERMANY June 20-23, 2010

高木敦子、池田康行、岩井直温、小久保喜弘、友池仁暢

日本人一般集団におけるリポ蛋白リパーゼ (LPL) 遺伝子変異 (第 3 報) S447X 変異の頻度と諸性質: 吹田研究

第 82 回 日本生化学会大会 (神戸国際会議場) 2009 年 10 月 21-24 日

荒木まり子、森田拓、石原正行、松本学、高杉尚志、前田明彦、阿部孝典、高木敦子、池田康行、藤枝幹也、脇口宏

高脂血症を合併した SLE の 1 例

第 44 回 日本小児腎臓病学会学術集会（一橋記念講堂・学術総合センター、東京）2009年6月27日

高木敦子、池田康行、岩井直温、小久保喜弘、友池仁暢

日本人一般集団におけるリポ蛋白リパーゼ（LPL）遺伝子変異（第2報）：吹田研究
第81回 日本生化学会大会&第31回 日本分子生物学会年会（パシフィコ横浜）2008年12月9-11日

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：動脈硬化性疾患の検出用バイオマーカーおよび動脈硬化性疾患の検査方法

発明者：池田康行、高木敦子

権利者：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特許

番号：特願 2008-178565 号

出願年月日：2008年7月9日

国内外の別：国内

PTC/JP2009/62087 2009年7月2日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 康行 (IKEDA YASUYUKI)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子薬理部・客員研究員

研究者番号：90176107

(2) 研究分担者

高木 敦子 (TAKAGI ATSUKO)

独立行政法人国立循環器病研究センター

分子薬理部・室長

研究者番号：90179416