

機関番号： 32620

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590558

研究課題名 (和文) 動脈硬化症における酸化リン脂質を介した HDL 機能異常の解明

研究課題名 (英文) Analysis of HDL dysfunction induced by oxidized phospholipids in atherosclerosis.

研究代表者 三井田 孝 (MIIDA TAKASHI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80260545

研究成果の概要 (和文)：酸化 LDL はマクロファージに蓄積し、HDL は動脈硬化の進展を抑制する。本研究では、酸化リン脂質と HDL の機能異常の関係を検討した。LDL-C は低い酸化ストレスが大きく動脈硬化が多い透析患者を対象とした。患者群では血清リン脂質は高くないが酸化リン脂質が増加し、リン脂質転送蛋白活性も高かった。LCAT による Pre β 1-HDL (小粒子 HDL) の成熟は障害されていた。酸化リン脂質が LDL から HDL へ転送され HDL の成熟を障害することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Oxidized LDL accumulates in macrophages, while HDL prevents the development of atherosclerosis. This study aimed at examining the relationship between oxidized phospholipids (PL) and impaired HDL function. We collected blood samples from hemodialysis (HD) patients, who have increased oxidative stress and high susceptibility to atherosclerosis. In the HD patients, serum PL concentration was low, but oxidized PL concentration and PL transfer activity increased significantly. In these patients, LCAT-dependent maturation of prebeta1-HDL, small HDL particles, was impaired. In summary, it is suggested that oxidized PL might be transferred from LDL to HDL, and cause impairment of HDL maturation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000 円	480,000 円	2,080,000 円
2009年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
2010年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
総計	3,700,000 円	1,110,000 円	4,810,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：慢性透析患者、リン脂質、酸化ストレス、HDL、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患は、日本人の死因の約 30% を占める。また、慢性腎臓病は冠動脈疾患のハイリスク群である。高 LDL-C 血症は冠動脈疾患の重要な危険因子であり、治療により発症率が低下する。しかし、現在 LDL-C を低下させることによる冠動脈疾

患の発症率の抑制は 30% 程度にとどまる。その理由として、冠動脈疾患には HDL の機能異常があるからと推定される。動脈硬化性疾患では、酸化 LDL が増加している。酸化 LDL の生理活性の一部は、酸化リン脂質により発揮されるという実験データがある。また、血中のリン脂質転送蛋白 (PLTP)

は、LDL の酸化リン脂質を HDL へ転送する。これらの一連の現象が、HDL の機能異常を惹起している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、動脈硬化症のハイリスク群である慢性透析患者において、(1) 血中のリン脂質酸化物が増加しているのか、(2) PLTP 活性が増加しているのか、(3) 小粒子 HDL である Pre β 1-HDL の成熟障害があるのか、の3点を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 血清酸化リン脂質の定量

透析患者および健常人より早朝空腹時の静脈血を採取した。リン脂質の採血後の酸化を防ぐため、分離した血清をセラムチューブに分注し、窒素を充填してすみやかに -80°C で凍結保存した。

人の血清中に最も多く存在する2種類のPL酸化物である1-palmitoyl-2-linoleoyl-glycero-3-phosphocholine monohydroperoxide (PLPC-OOH) と、1-stearoyl-2-linoleoyl-glycero-3-phosphocholine monohydroperoxide (SLPC-OOH) を化学合成した。次に、PLPC-OOH と SLPC-OOH を蛍光標識し、これらを内部標準物質として血清に添加した。脂質分画を有機溶媒で抽出し、蒸発乾固後に少量のエタノールに溶解し、逆層系カラムで酸化リン脂質を測定した (Hui SP et al. *Lipids* 40: 515-22, 2005)。

(2) PLTP 活性の測定

バッファーに (1) 蛍光標識したリン脂質と (蛍光を自己消去する) クエンチング分子を含むドナー粒子 (2) とアクセプター粒子を添加する。血清を加え、その PLTP 活性により蛍光標識したリン脂質だけをアクセプター粒子に転送させて発光する蛍光を、蛍光光度計で測定する (励起波長 465 nm、蛍光波長: 535 nm で検出)。

(3) 酸化 LDL の定量

空腹時の新鮮な血清を、安定化剤と混和した後 -80°C で凍結保存した。酸化リン脂質に対するモノクローナル抗体 (DLH3) を一次抗体とした EIA により、酸化 LDL を定量した。

(4) 酸化 HDL の定量

メチオニン残基が酸化されたアポ AI (Met⁰⁹⁶ と Met⁰¹¹² を含む: アポ A-I₃₂) を、高速液体クロマトグラフィーで精製し、これをマウスに免疫した。このマウスより得たモノクローナル抗体 (MOA-I) を使ったイムノアッセイ系を確立し、酸化 HDL を定

量した。

(5) Pre β 1-HDL の定量

新鮮な早朝空腹時の血液を EDTA 入り採血管に採取し、すぐに氷冷した。 0°C で血漿を分離後、LCAT 阻害剤として DTNB を添加した血漿と、DTNB 非添加の血漿を2時間インキュベーションした。それぞれの血漿は50%スクロースで1:20に希釈し、 -80°C に保存した。

Pre β 1-HDL を特異的に認識するモノクローナル抗体 Mab55201 を一次抗体に使用した EIA により、Pre β 1-HDL を測定した。DTNB 添加血漿の2時間後の Pre β 1-HDL 濃度から、DTNB 非添加血漿の2時間後の Pre β 1-HDL 濃度を引き、それをインキュベーション前の Pre β 1-HDL 濃度で割ったものを Pre β 1-HDL 減少率 (%) とした。

4. 研究成果

(1) 酸化リン脂質濃度

透析群の PL は、健常群より有意に低値だった (175 ± 39 vs. 222 ± 28 mg/dL, $p < 0.001$)。しかし、透析患者では、酸化リン脂質である PLPC-OOH が 218.8 ± 108.3 nM、SLPC-OOH が 74.4 ± 34.4 nM であり、報告されている健常人の値のそれぞれ約2倍と著明に増加していた。

(2) PLTP 活性

PLTP 活性は、透析群で健常群より有意に高かった (11.6 ± 3.2 vs. 8.9 ± 4.0 pmol/ μ l sample/1hr, $p < 0.05$)。

(3) 酸化 LDL 濃度

透析群の LDL-C は、健常群より有意に低値だった (78 ± 19 vs. 118 ± 25 mg/dL, $p < 0.001$)。一方、酸化 LDL には両群に差がなく (12.0 ± 11.6 vs. 8.1 ± 5.5 U/mL)、酸化 LDL/LDL-C 比は、透析群で高値だった (0.15 ± 0.11 vs. 0.07 ± 0.04 $p < 0.05$)。

(4) 酸化 HDL 濃度

酸化 HDL 濃度は、透析患者で 4.7 ± 3.5 ng/mL、健常者で 8.4 ± 5.1 ng/mL と有意に透析群で低かった ($p < 0.05$)。

(5) Pre β 1-HDL 濃度

透析群の Pre β 1-HDL は、健常群より有意に高く、2時間インキュベーション後の Pre β 1-HDL 減少率は、透析群で有意に低値だった。Pre β 1-HDL 濃度や Pre β 1-HDL 減少率は、PLTP 活性、酸化 LDL 濃度、酸化 HDL 濃度などと有意な相関は認められなかった。

血中の PL は、おもに LDL と HDL に存在

する。血清中の酸化 PL が明らかに増加していたにもかかわらず、酸化リン脂質でとらえる酸化 LDL が増加していなかったことより、HDL 注の酸化 PL が増加していることが示唆された。血清 PLTP 活性が透析群で高かったことより、酸化 LDL の酸化リン脂質が、HDL へ転送されている可能性が示唆された。

一方、HDL の主要な蛋白の一つであるアポ AI でとらえた酸化 HDL は、増加が認められなかった。これは、HDL 中の酸化 PL 増加は、HDL 粒子そのものが酸化されたためではなく、LDL の酸化 PL が HDL へ転送されたためという仮説を支持する所見である。小粒子 HDL である Pre β 1-HDL の減少率は低下しており、これは酸化リン脂質が HDL に増加しているためと推定された。残念ながら、Pre β 1-HDL 濃度や Pre β 1-HDL の減少率と、酸化リン脂質、酸化 LDL、PLTP 活性などとは有意な関係を見出すことができなかった。今後さらに検討を続けていきたい。

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 32 件)

- ①. Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Ishige-Wada M, Usui H, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Miida T, Fukui M, Okano Y. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* (in press) 査読有
- ②. Fukushima Y, Hirayama S, Ueno T, Dohi T, Miyazaki T, Ohmura H, Mokuno H, Miyauchi K, Miida T, Daida H. Small dense LDL cholesterol is a robust therapeutic marker of statin treatment in patients with acute coronary syndrome and metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* (in press) 査読有
- ③. Kon M, Hirayama S, Horiuchi Y, Ueno T, Idei M, Fueki Y, Seino U, Goto S, Maruyama H, Iino H, Fukushima Y, Ohmura H, Hirowatari Y, Miida T. Profiles of inflammatory markers and lipoprotein subclasses in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Chim Acta* 411: 1723-1727, 2010. 査読有
- ④. Miida T, Hirayama S. Impacts of angiopoietin-like proteins on lipoprotein metabolism and cardiovascular events. *Curr Opin Lipidol* 21: 70-75, 2010. 査読有
- ⑤. Horiuchi Y, Hirayama S, Seino U, Kon K, Ueno T, Ohmura H, Hanyu O, Tsuda T, Miida T. Statin therapy reduces inflammatory markers in hypercholesterolemic patients who have high baseline levels. *J Atheroscler Thromb* 17: 722-729, 2010. 査読有
- ⑥. Hiki M, Shimada K, Kiyonagi T, Fukao K, Hirose K, Ohsaka H, Fukushima Y, Kume A, Matsumori R, Sumiyoshi K, Miyazaki T, Ohmura H, Kurata T, Miida T, Daida H. Single administration of α -glucosidase inhibitors on endothelial function and incretin secretion in diabetic patients with coronary artery disease. -Juntendo University Trial: effects of miglitol on endothelial vascular reactivity in type 2 diabetic patients with coronary heart disease (J-MACH)- *Circ J*, Vol. 74, No. 7, 1471-1478, 2010. 査読有
- ⑦. Hirayama S, Soda S, Ito Y, Matsui H, Ueno T, Fukushima Y, Ohmura H, Hanyu O, Aizawa Y, Miida T. Circadian change of serum concentration of small dense LDL-cholesterol in type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta*, Vol. 411, No. 3-4, 253-257, 2010. 査読有
- ⑧. Nagasaka H, Okano Y, Aizawa M, Miida T, Yorifuji T, Tajima, G Sakura N, Takatani T, Sanayama Y, Sugamoto K, Mayumi M, Kobayashi K, Hirano K, Takayanagi M, Tsukahara H. Altered metabolisms of mediators controlling vascular function and enhanced oxidative stress in asymptomatic children with congenital portosystemic venous shunt. *Metabolism*, Vol. 59, No. 1, 107-113, 2010. 査読有
- ⑨. Nagasaka H, Yorifuji T, Momoi T, Yorifuji J, Hirano K, Ota A, Takatani T, Tsukahara H, Takayanagi M, Kobayashi K, Chiba H, Sato Y, Miida T. Lipoprotein profile in children with two common cholesteryl ester transfer protein gene mutations, D442G and I14A, during the first year of life. *Clin Chim Acta* 406: 52-56, 2009. 査読有
- ⑩. Hirayama S, Ito T, Miyazaki O, Kamimura T, Hanyu O, Seino U, Ito S, Aizawa Y, Miida T. Pre β 1-HDL is elevated in the fasting state, but

markedly reduced postprandially in poorly controlled type 2 diabetic patients. Clin Chim Acta 401: 57-62, 2009. 査読有

- ⑪. 笛木百合子、石井雄士、桜井信行、飯野則昭、後藤 眞、丸山弘樹、岡田正彦、昆 美香、堀内裕紀、出居真由美、三井田孝。慢性透析患者における脂質プロフィールと炎症マーカーの検討。生物試料分析 32: 328-333, 2009. 査読有
- ⑫. Hirowatari Y, Yoshida H, Fueki Y, Ito M, Ogura Y, Sakurai N, Miida T. Measurement of cholesterol levels of major serum lipoprotein classes in hemodialysis patients by anion-exchange chromatography. Ann Clin Biochem 45: 571-574, 2008. 査読有
- ⑬. Miida T, Seino U, Miyazaki O, Hanyu O, Hirayama S, Saito T, Ishikawa Y, Akamatsu S, Nakano T, Nakajima K, Okazaki M, Okada M. Probucol markedly reduces HDL phospholipids and elevated pre β 1-HDL without delayed conversion into α migrating HDL: putative role of angiopoietin-like protein 3 in probucol-induced HDL remodeling. Atherosclerosis 200: 329-335, 2008. 査読有

[学会発表] (計 件)

- ①. Hanyu O, Fuda H, Higashi Y, Endo M, Nakae H, Kohjitani A, Miida T, Aizawa Y, Strott CA. Cholesterol sulfate regulation of profilaggrin expression: Studies involving siRNA for SULT2B1b and ROR alpha in primary cultures of normal human epidermal keratinocytes. 14th International Congress of Endocrinology, 3/26-30, 2010 (Kyoto)
- ②. Miida T. Pre β 1-HDL: A potential marker for HDL function. Annual Meeting of American Association for Clinical Chemistry, 7/29/2008, (Washington DC, U.S.A.)
- ③. Hasegawa E, Nakagawa S, Hirayama S, Miida T, Sanayama Y, Nagasaka H, Yamato S. Oxysterols levels in plasma and the correlation to the age. The 12th Asian-Pacific Congress of Clinical Biochemistry, 10/3-7, 2010, (Seoul, Korea)
- ④. Kamimura Y, Nakagawa S, Hirayama S, Miida T, Yamato S. Measurement of surrogate markers related to cholesterol metabolism in plasma of

patients with ezetimibe administration. The 12th Asian-Pacific Congress of Clinical Biochemistry, , 10/3-7, 2010, (Seoul, Korea)

- ⑤. Kuwabara N, Nakagawa S, Hirayama S, Miida T, Yamato S. Determination of isoprenoids in human plasma by LC-MS/MS. The 12th Asian-Pacific Congress of Clinical Biochemistry, , 10/3-7, 2010, (Seoul, Korea)
- ⑥. Miida T. Pre β 1-HDL: A potential marker for HDL function. Annual Meeting of American Association for Clinical Chemistry (AACC), 7/27-31, 2008 (Washington DC, U.S.A.)

[図書] (計 7 件)

- ①. Miida T, Hirayama S. Academic Press, The HDL Handbook – Biological Functions and Clinical Implications –(Chapter 12: Pre β 1-HDL: A native lipid-poor HDL, and its potential as a new marker for HDL metabolism). (Komoda T, Ed), 2010, 243-259. 査読有
- ②. 平山 哲、三井田孝。ライフサイエンス、コレステロール-基礎から臨床へ(コレステロール逆転送系の発見)(寺本民生編) 2009, 236-241.

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/med/labo/rinsyo_byori.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三井田 孝 (MIIDA TAKASHI)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80260545

(2) 研究分担者 (平成 20 年度のみ)

岡田 正彦 (OKADA MASAHIKO)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30018915

(3) 研究協力者

平山 哲 (HIRAYAMA SATOSHI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：

千葉 仁志 (CHIBA HITOSHI)

北海道大学・大学院保健科学研究院・教授

研究者番号：70197622