

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20591085

研究課題名(和文) 冠動脈疾患患者における small dense LDL 代謝異常の解明と治療応用

研究課題名(英文) Pathogenesis and treatment of small dense LDL metabolism in patients with coronary heart disease

研究代表者

橋本 浩一 (HASHIMOTO KOICHI)

東京慈恵会医科大学、医学部、助教

研究者番号：30317987

研究成果の概要(和文)：

脂質異常症は動脈硬化の危険因子で、これまで LDL を中心とした治療体系が構築されてきたが心血管疾患は増加の一途を辿っており、LDL 以外の動脈硬化促進性リポ蛋白の重要性が高まってきている。small dense LDL(sdLDL)は食後高脂血症と密接に関与するリポ蛋白であるがその体内代謝動態や治療法については不明であった。本研究では、安定同位体を使ったヒト代謝研究を行い、sdLDL には異化遅延があること、スタチンがこの異化障害を正常化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：

Dyslipidemia has been considered as a major risk factor for cardiovascular disease (CVD). LDL-centric treatment has failed to reduce CVD, thus highlighting other atherogenic lipoproteins. Among those, small dense LDL (sdLDL) is associated with postprandial lipemia. However, exact metabolism and treatment strategy of sdLDL is yet to be established. In the present study, we performed in vivo metabolic study using stable isotopically-labeled amino acid and found that rate of catabolism was 34% lower in sdLDL and this delayed catabolism was normalized by statin treatment.

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	480,000	2,080,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：リポ蛋白 安定同位体

## 1. 研究開始当初の背景

LDL-コレステロールが冠動脈疾患の独立した危険因子であることは周知の事実であるが、LDL の量的異常とともに質的異常も動脈硬化進展に大きく寄与することが明らかになってきた。すなわち、大型の LDL に比較して小型の LDL (small dense LDL, sdLDL) は冠動脈疾患リスクを約 3 倍に増加させること (*Circulation*, 1997)、また我が国の

Koba らの報告では、冠動脈造影で有意狭窄を認めた患者では、狭窄のない患者に比べて LDL 粒子が有意に小型化していることが確認されている (*Ann Intern Med*, 2000)。さて、様々な臨床疫学調査から small dense LDL が独立した冠動脈危険因子であることが示されているが動脈硬化進展メカニズムは不明である。そのためには、トレーサーを使って体内代謝動態を明らかにすること

が第一歩である。この方法の利点は、ヒトを研究対象としているという点でヒトでの直接的な知見が得られることである。歴史的には放射活性物質が使われてきたが、近年放射能被爆等の理由で使用困難となってきた。それに変わる方法として、安定同位体を使った代謝研究が主流となってきた。

sdLDLの分離法が困難であることも、sdLDL研究の大きな障害である。超遠心法によって高比重のLDL分画をsdLDLとする方法が一般的であるが超遠心の繰り返しの過程で変性する懸念が、響する懸念が指摘されている。近年、Hiranoらは界面活性剤を使った新規sdLDLアッセイを確立し、上記代謝研究にも応用できる可能性を示した。

## 2. 研究の目的

本研究では、冠動脈疾患患者と健常者を対象として安定同位体を使ったアポ蛋白代謝実験を施行して **small dense LDL** の体内代謝動態を解明することを主たる目的とする。加えて、安定同位体標識グリセロールとグルコースを投与し、それぞれ **VLDL TG** 代謝とグルコース代謝(インスリン感受性とグルコース感受性)を評価する。この包括的代謝研究によって、**small dense LDL** が **total LDL** と代謝が異なるかどうかという点だけでなく、**small dense LDL** 代謝が肝臓からのリポ蛋白産生量やインスリン感受性と関連性があるかどうかについても検討することが可能となる。

本研究のもう一つの柱は、**small dense LDL** に対する薬物介入である。一般的に、スタチン、フィブレートともに **LDL** 粒子径を大粒子化させることがわかっており、**small dense LDL** 代謝改善作用が期待されている。本研究では、具体的にどのような機序で **small dense LDL** 代謝に影響するのかを詳細に検討する。

## 3. 研究の方法

冠動脈疾患患者と健常者を対象に安定同位体を使った代謝実験を行う。

### (1) 代謝実験のプロトコール

#### ① 対象

- ・ 脂質異常症合併冠動脈疾患患者 10名
- ・ 健常者 10名

翌朝空腹時に以下の2種類の安定同位体ラベルトレーサーを静注する。

#### ② トレーサー

- ・ アポ蛋白代謝実験:  $^2\text{H}_3$ -leucine 5mg/kg
- ・ VLDL TG 代謝実験:  $^2\text{H}_5$ -glycerol 3mg/kg

採血スケジュール: 前、10、30、60min、1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、24、36、48hour

- ・ グルコース代謝実験:  $^2\text{H}_2$ -glucose 0.3g/kg

採血スケジュール: 前、2、4、7、10、15、20、30、40、50、60、80、100、120、140、

160、180min

(2) アポ蛋白代謝実験のサンプル処理  
血清分離後、超遠心法にて VLDL、IDL、LDL に分画してイソプロピルアルコールにてアポ蛋白 B-100のみを沈殿させる。加水分解後、アミノ酸修飾を行ない、ガスクロマトグラム質量分析計(H5973, ヨコガワアナリティカルシステムズ、現有機器)に注入し、T/T ratioを測定する。また、血清 0.3ml を陰イオン交換樹脂にかけてアミノ酸を抽出し、同様に修飾後 GC-MS で T/T ratio を測定する。

(3) small dense LDL の分離(Hirano T, J Lipid Res. 2003)

フィルター遠心チューブに 0.3ml の処理液(ヘパリンマグネシウム液)に対して等量の血清を添加する。混和後、37°C で 10 分間反応させる。その後 5000g、1 分間遠心してフィルター通過部分を回収する。回収分画の比重を 1.019g/ml に上げて 39000rpm、20 時間超遠心する。上清 3ml を回収してさらに比重を 1.063g/ml にして同じ条件で超遠心し、上清 1ml (small dense LDL 分画) を回収する。その後は、上に述べたのと同じ過程で tracer/tracee ratio 測定する。

#### (4) VLDL TG 代謝実験のサンプル処理

VLDL の脂質成分を抽出して薄層クロマトグラフィにて TG を分離する。ヘプタンで脂肪酸メチルエステルを除いて、残ったグリセロールを修飾後、GC-MS で T/T ratio を測定する。血清 0.2ml をアセトン/ヘキサン/水で混和し、同様の修飾を行い、GC-MS で T/T ratio を測定する。

#### (5) グルコース代謝実験のサンプル処理

血清 0.2ml をペンタアセテートにより修飾した後、GC-MS にて T/T ratio を測定する。

#### (6) 代謝モデルの確立

代謝モデルの開発に関しては、専用ソフト(SAAMII, ワシントン大学、現有ソフト)を使用する。アポ蛋白 B-100 のモデル(VLDL、IDL、LDL)に関しては確立している(Ikewaki K, J. Clin. Invest., 1995)ので、このモデルに small dense LDL のコンパートメントを組み入れる。VLDL TG モデルについては、Eliasらによって報告されたモデル(Elias N, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000)をテンプレートとして随時改良を加える。同様に、グルコース代謝モデルは、標準的なモデルである one compartment minimal model を使用する。

#### (6) 代謝パラメーター算出

代謝モデルを用いて以下の代謝パラメーターを算出して研究を完結する。

4. 研究成果

(1) sdLDL 分離法の確立

当初, Hiano らの方法で分離した分画を sdLDL として分析した。その結果を図 1 に示した。

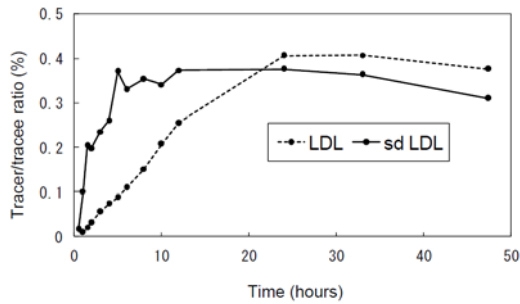


図1 LDLとsdLDLのtracer/tracee curve(1)

sdLDL の tracer/tracee (T/T ratio、実線) は、LDL 全体の T/T よりも立ち上りが早かった。小粒子 LDL の異化速度は遅いことが予想されることから、VLDL 分画の混入が疑われた。

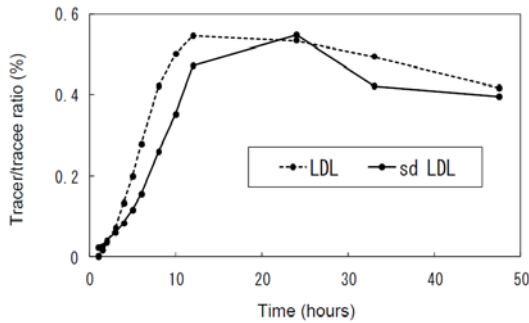


図2 LDLとsdLDLのtracer/tracee curve(2)

この結果を受けて、sdLDL アッセイ後、超遠心法にて VLDL 分画を除去するプロトコールに変更した。その結果、図 2 に示すように sdLDL T/T の立ち上りが total LDL T/T よりも遅くなった。

(2) sdLDL 代謝モデルの開発

small dense LDL代謝モデル

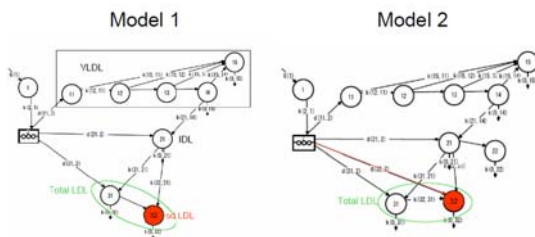


図3 sdLDL 代謝モデルの比較

sdLDL (赤で示したコンパートメント) を含むアポ蛋白 B の代謝モデルとして以下の 2 つを

作成し、実際の T/T curve のフィッティングを検討した。

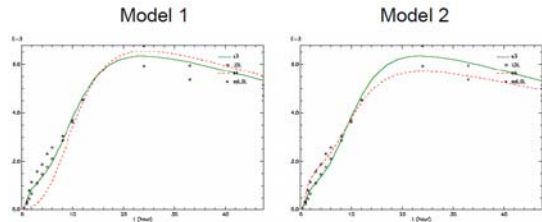


図4 sdLDL 代謝モデルによるフィッティング

その結果、図 4 に示すように、モデル 2 で良好なフィッティングを得られた。

(3) 脂質異常症合併冠動脈疾患患者の sdLDL 異化速度-LDL 全体の異化速度との比較

Study Subjects

Subjects	Age	BMI	TC	TG	HDL-C	LDL-C	ApoB	ApoA-I
	yrs	kg/m <sup>2</sup>			mg/dl			
1	32	24.5	251	125	46	180	120	116
2	33	27.3	277	176	45	196	130	122
3	36	21.5	213	58	55	147	105	148
4	40	24.7	254	192	58	158	133	155
5	58	24.3	247	59	46	189	121	123
6	37	24.5	281	96	42	220	147	115
7	45	24.3	237	170	63	140	115	144
8	42	26.9	229	217	38	148	128	123
9	34	26	204	104	39	144	101	115
10	56	29.4	231	192	58	143	133	155
Mean	41	25.3	242	139	49	167	123	132
SD	9	2.2	25	58	9	28	14	17

表1 対象患者

対象者は全員男性で平均 LDL-C 濃度は 167mg/dL と中等度の高コレステロール血症者であった。

一部の患者に対しては、6 週間のスタチン(ロスバスタチン 2.5mg/日あるいはピタバスタチン 2mg/日)の前後のトレーサー実験を実施した。

Subjects	Medication	FCR (day <sup>-1</sup> )	
		LDL	sdLDL
#1	R(-)	0.326	0.223
	R(+)	0.539	0.269
#2	R(-)	0.209	0.120
	R(+)	0.614	0.310
#3	R(+)	0.388	0.313
#4	P(-)	0.265	0.204
	P(+)	0.351	0.309
#5	P(+)	0.338	0.239
#6	R(-)	0.293	0.223
	R(+)	0.694	0.405
#7	R(+)	0.439	0.216
#8	R(+)	0.547	0.308
#9	P(+)	0.521	0.309
#10	P(-)	0.217	0.159
	P(+)	0.345	0.254
		0.406±0.147	0.257±0.071
		(-37%, p<0.0001)	

R: rosuvastatin P: pitavastatin

表2 sdLDL と LDL の異化速度

total LDL の異化速度 (FCR, fractional catabolic rate)が0.406±0.147/日に対して、sdLDL FCRは0.257±0.071と37%の有意の異化速度の低下を認めた。

(4) 高脂血症薬の sdLDL 代謝に及ぼす影響  
① スタチン

subjects	LDL medication		sdLDL medication	
	-	+	-	+
#1	0.326	0.539	0.223	0.269
#2	0.209	0.614	0.120	0.310
#4	0.265	0.351	0.204	0.309
#6	0.293	0.694	0.223	0.405
#10	0.217	0.345	0.159	0.254
average	0.262	0.509	0.186	0.309
sd	0.050	0.157	0.045	0.059
%change		+94%		+67%
p		0.02		0.01

表3 スタチン前後での異化速度

スタチンによって sdLDL FCR は 67% と著明に増加した。LDL 全体でも 94% と著明な代謝障害改善効果を認めた。LDL と sdLDL 間でのスタチンの効果の差は有意ではなかった。

② エゼチミブ

上記スタチン研究に加えて、6名の高コレステロール血症患者(冠動脈疾患非合併)に対して、プラバスタチン単独(10mg/日、6週間)と、エゼチミブ/プラバスタチン併用(ともに10mg/日、6週間)の sdLDL 代謝に対する効果を検討した。図5は、6名の平均値 T/T の推移である。

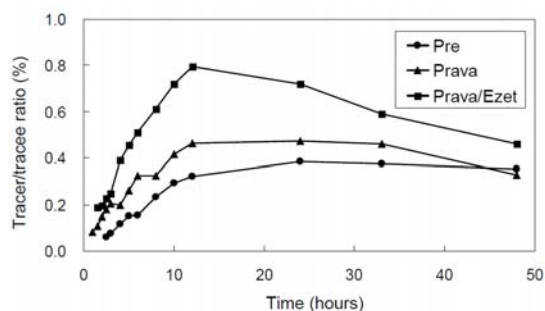


図5 エゼチマイブの sdLDL 代謝への影響

ベースライン(●)では、T/T ratio ピーク値が低く、ピーク到達時間も遅く、異化速度が著明に低下していることが示唆される。プラバスタチン(▲)により T/T の立上りが上昇しているがベースラインに比較して著明な変化は認めない。一方、エゼチミブ/プラバスタチン併用(■)には、T/T ピーク値が著明に上昇し、そのピーク到達時間も早くなっており、併用時に sdLDL の異化速度が著明に改善したことが示唆された。

(5) 成果のまとめ

今回、small dense LDL に対するヒトでの体内代謝動態を検討する初めての研究であったが、当初の予想通り LDL の中で著明な代謝遅延があることが明らかになった。代謝遅延によって滞在時間が延び、その間に血管壁での酸化修飾を受ける機会も増えることが予想され、動脈硬化惹起性が高いことを示唆している。LDL 受容体を活性化するスタチンや小腸でのコレステロール吸収阻害薬であるエゼチミブによって LDL 異化障害が正常化した。残存するリスクの軽減に向けて、今後の治療戦略の構築するに当たって重要な知見になるものと考えられる。

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6件)

- ① Nakaya K, Ayaori M (13,13 番目) Cilos-tazol enhances macrophage reverse cholesterol transport in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* 査読有 2010 213:135-41.
- ② Uto-Kondo H, Ayaori M (14,14 番目) Coffee consumption enhances high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux in macrophages. *Circ Res.* 査読有 2010 106:779-87.
- ③ Hisada T, Miyagawa T, (10,7 番目) Ventricular Tachyarrhythmia diagnosed during electrophysiological study for non-sustained tachycardia. *Aviat. Space Environ. Med* 査読有 2010 81:593-596.
- ④ Yoshida H, Shimizu M, (9,3 番目) Jikei Heart Study group. Sex differences in effects of valsartan administration on cardiovascular outcomes in hypertensive patients: findings from the Jikei Heart Study. *J Hypertens.* 査読有 2010 28:1150-7.
- ⑤ Ikewaki K, Terao Y, (7,1 番目) Effects of atorvastatin on nuclear magnetic resonance-defined lipoprotein subclasses and inflammatory markers in patients with hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb.* 査読有 2009 16:51-6.
- ⑥ Zheng C, Khoo C, (5,4 番目) Dietary mono-unsaturated fat activates metabolic pathways for triglyceride-rich lipoproteins that involve apolipoproteins E and C-III. *Am J Clin Nutr* 査読有 2008 88:272-281.

[学会発表] (計7件)

- ① Ozasa H: Pioglitazone enhances cholesterol efflux from macrophages by

increasing ABCA1/ABCG1 expressions via LXR $\alpha$ /PPAR $\gamma$  pathway: findings from in vitro and ex vivo studies. American Heart Association, Scientific Sessions 2010年11月16日 シカゴ

- ② Ikewaki K: Significant Regression of Left Ventricular Hypertrophy by ARB Valsartan assessed by Echocardiography: A Finding from JIKEI Heart Study The European Society of Cardiology at ESC Congress 2010年8月30日 スtockホルム
- ③ 橋本浩一: 治療高血圧症におけるメタボリックシンドローム合併の循環器系臨床像への影響 日本心臓病学会 2010年9月18日 東京
- ④ Ogura M: Increased TG Accelerates Cardio-metabolic dysfunction in low HDL cholesterol Subject 第41回日本動脈硬化学会総会 2009年7月18日 下関
- ⑤ Ikewaki K: Kinetics of ApoB-containing Lipoproteins: An Update XV International Symposium on Atherosclerosis 2009年6月19日 ボストン
- ⑥ Tada H: Impact of new insights of lipoprotein metabolism in autosomal recessive hypercholesterolemia: a stable isotope kinetic study in vivo. The 73rd Annual scientific meeting of the Japanese Circulation Society 2009年3月21日 大阪
- ⑦ Ayaori M: RAR Agonists Enhance HDL-mediated Cholesterol Efflux from Macrophages by Inducing ABCG1 Expression through RAR $\alpha$ /RXR Acting on LXR Responsive Elements. American Heart Association, Scientific Sessions 2008年11月10日 ニューオリンズ

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

橋本 浩一 (HASHIMOTO KOICHI)  
東京慈恵会医科大学、医学部、助教  
研究者番号: 30317987

### (2) 研究協力者

池脇 克則 (IKEWAKI KATSUNORI)  
防衛医科大学校、医学教育部医学科専門課程、教授  
研究者番号: 40287199