

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 5日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590517

研究課題名（和文） 心臓突然死ポックリ病とリポ蛋白質結合性の生理活性脂質スフィンゴシン1-リン酸

研究課題名（英文） Sudden coronary death, pokkuri disease, and lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate

研究代表者

中嶋 克行（NAKAJIMA KATSUYUKI）

群馬大学・大学院保健学研究科・客員教授

研究者番号：10444051

研究成果の概要（和文）：

我々は中性脂肪が豊富なレムナントリポタンパク（レムナント）が健康な青壮年層の男性の突然死（ポックリ病）と関連していることを提唱している。しかし、その機構は不明である。本研究ではリポタンパクに濃縮しているスフィンゴシン1-リン酸（S1P）やS1P結合活性をもつアポリポタンパクM（apoM）が関与を調べた。しかし、健常者とポックリ病患者血清のS1P濃度に有意な違いは観察されなかった。apoMの2次元電気泳動パターンの違いを解析予定である。

研究成果の概要（英文）：

We have proposed that triglyceride-rich lipoprotein remnants are associated with the risk of sudden coronary death in younger cases without coronary atherosclerosis. However, it remains unclear how remnants are involved in coronary sudden death. In the present study, we tried to relate sphingosine 1-phosphate (S1P), which is concentrated in lipoproteins, and apolipoprotein M, an S1P binding apolipoprotein, to sudden death. Our new assay method to detect S1P allowed to measure a low concentration of S1P in serum; however, there are any significant difference in S1P levels between normal and sudden death patients. We are now focusing on the difference in two dimensional electrophoresis pattern measured by anti-apoA-I and anti-apoM antibodies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：スフィンゴシン 1-リン酸、ポックリ病、レムナント

1. 研究開始当初の背景

ポックリ病は、「健康な青壮年層の男性が夜間就寝中に突然発症して短時間で死亡する原因不明の病態」として知られてきた。通院歴もなしに短時間で死亡するため、臨床的に研究される機会はほとんどなく、ほとんど法医解剖で死因の究明がなされてきたが、死因を特定することはできない。死亡状況から急性の心臓死の可能性が疑われていたが、呼吸障害や内分泌異常など種々の原因も考えられてきた。日本や東南アジア系の男性に多発する一方で、欧米人では報告が無いことが指摘されている。研究代表者の中嶋は研究分担者の藤田らとともに、血漿中のレムナントリポ蛋白質 (Remnant Lipoprotein: RLP) の分離定量法を確立し、多数の解剖例の検討から、健康な若年層男性が暴飲暴食後に高レムナント血症 (高RLP-Triglycerol 血症) 状態に陥り、ポックリ死している事実を突き止めた。さらに、RLPには強烈的冠攣縮誘発作用のあることを明らかにした。一方、研究分担者の岡島は脂質性シグナル分子であるスフィンゴシン 1-リン酸 (S1P) 研究を長年にわたって行っており、S1Pがリポ蛋白質中に存在し、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞など様々な血管機能を調節していることを明らかにしている。例えば、S1Pの投与は動脈の収縮を起こすことから、S1Pがポックリ病における冠状動脈攣縮に関わっていることが予想された。しかし、一方でHDL-S1Pは抗動脈硬化性作用も発揮することも報告されている。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、我々が既に収集したポ

ックリ死 (および同地域の冠動脈硬化による心臓死例、事故死例)の血漿を用い、レムナントリポ蛋白質、高密度リポ蛋白質中のS1P含量、レムナントリポ蛋白質、高密度リポ蛋白質(HDL)の2次元電気泳動マップを行ない、ポックリ死との関連を解析する。また、最近、S1Pが血液中で結合することが判明したアポリポタンパクM (apoM) の抗体を作成し、apoMとポックリ死との関連を明らかにすることもめざした。

3. 研究の方法

血漿中 S1P は新規の高感度 S1P バイオアッセイ法法を確立して用いた。2次元電気泳動法は血漿を一次元ゲル電気泳動 (アガロースゲル) 後、二次元ではポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。NBT/BCIP でスポットを染色検出した後、画像をスキャナーで取込み、デジタル化して解析した。レムナントの調製はアポ B-100 (VLDL、LDL)とアポ A-I (キロミクロン、HDL)に対する抗体に未反応成分として精製する我々が開発した方法 (*Nakajima K. et al. Clin. Chim. Acta 223, 53-71, 1993*) を用いた。アポ B-100 に対するモノクローナル抗体 (JI-H) が VLDL-レムナント中のアポ B-100 と反応しないことが、この簡便なレムナント精製法の有用性を決定づけている。

4. 研究成果

4.1.高感度 S1P のバイオアッセイ法の開発とそれを用いた S1P の解析

従来、S1P の測定は 3H で標識した S1P と検体中 S1P の S1P 受容体結合の競合反応を利

用してきた。今回、S1P 発現細胞におけるイノシトールリン酸産生を指標にした方法を用いた。この方法では従来よりも安定した測定値が得られるようになった。この改良法を用いほぼ30例の健常者、ポックリ病患者血漿中 S1P を測定したが、残念ながら有意な変化を見出すことが出来なかった。したがって、今回の研究から、S1P はポックリ病のマーカーになる可能性は低いと判断せざるを得ない。

4.2. レムナント画分の S1P

VLDL (キロミクロン) 画分を apoA-I や apoB100(JI-H)抗体カラムを通過させることによってレムナント画分を得た。この画分と結合画分 (nascent VLDL や nascent キロミクロン) の S1P を測定したところ、レムナント画分に S1P が検出されたが、HDL 画分に比較すると極めて低い含量であった。したがって、S1P がレムナント作用を仲介する可能性は低いと判断された。

4.3. ヒトアポリポタンパク M (apoM) 抗体 (C 末抗体) の作成と 2 次元電気泳動:

ヒト apoM タンパクの C 末に対する抗体をつくった。健常人の血漿タンパクを 2 次元電気泳動後に apoA-I と apoM 抗体で検出したところ、apoM の一部は apoA-I と同じ箇所分布した。すなわち、HDL 中に apoM が存在し、HDL-S1P の分布を説明する。しかし、大部分は apoA-I フリーの高分子のところに分布しており apoM リッチな画分が存在することが判明した。そこで、密度勾配遠心法によって HDL 画分を調整すると apoM はこの HDL 画分に大半が存在しているが、2 次元電気泳動をおこなうと、血漿の場合と同様に apoA-I と apoM の分布に解離がみられた。したがって、apoM の大半は高分子でかつ高密度画分に存在し

ていると推定された。この apoM リッチ画分の実体は今後の課題である。健常人について、絶食、摂食の効果を調べたが、apoA-I と apoM による二次元マップには大きなパターンの変動はなかった。残念ながら、今回の研究ではポックリ病患者血清を用いた apoA-I と apoM の分布の違いなどを確定するにはいたっていない。今後も継続して調べる必要がある。

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 19 件)

1. Imagawa M, Takahashi S, Zenimaru Y, Kimura T, Suzuki J, Miyamori I, Iwasaki T, Hattori H, Yamamoto TT, Nakano T, Nakajima K. Comparative reactivity of remnant-like lipoprotein particles (RLP) and low-density lipoprotein (LDL) to LDL receptor and VLDL receptor: effect of a high-dose statin on VLDL receptor expression. Clin Chim Acta. 2012; 413:441-7. 査読有

2. Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Yatsuzuka S, Shimomura Y, Tanaka A, Sumino H, Nara M, Machida T, Murakami M. The characteristics of remnant lipoproteins in the fasting and postprandial plasma. Clin Chim Acta. 2012; 413:1077-86. 査読有

3. Nakajima K and Fujita MQ. Remnant lipoproteins are a stronger risk factor for cardiovascular events than LDL-C from the studies of autopsies in sudden cardiac death cases. Recent Advances in Cardiovascular Risk Factors;

2012: P 15-36. Ed by Mehnaz Atiq. (Intech) 査読無

4. Tada H, Kawashiri MA, Tanaka A, Nakano T, Nakajima K, Inoue T, Noguchi T, Nakanishi C, Konno T, Hayashi K, Nohara A, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Yamagishi M. Post-prandial remnant lipoprotein metabolism in autosomal recessive hypercholesterolaemia. *Eur J Clin Invest.* 2012; 42:1094-9. 査読有

5. Ishida T, Miyashita K, Shimizu M, Kinoshita N, Mori K, Sun L, Yasuda T, Imamura S, Nakajima K, Stanhope KL, Havel PJ, Hirata K. ELISA system for human endothelial lipase. *Clin Chem.* 2012 ; 58:1656-64. 査読有

6. Nakajima K, Nagamine T, Fujita MQ, Tanaka A. ApoB48. *Advances in Clinical Chemistry (Review)*. 2012 submitted. 査読有

7. Thongtang N, Ai M, Otokozawa S, Himbergen TV, Asztalos BF, Nakajima K, Stein E, Jones PH, Schaefer EJ. Effects of maximal atorvastatin and rosuvastatin treatment on markers of glucose homeostasis and inflammation. *Am J Cardiol.* 2011;107: 387-92. 査読有

8. Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, White CC, Cupples LA, Nakajima K, Lamon-Fava S, Wilson PW, Matsuzawa Y, Schaefer EJ. Adiponectin: an independent risk factor for coronary heart disease in men in the Framingham offspring Study. *Atherosclerosis.* 2011; 217: 543-8 査読有

9. Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Tanaka A, Okazaki M, Yatsuzuka S, Tarui N, Shimomura Y, Ando Y, Akamatsu S, Fujita MQ, Nakajima K.

Measurement of serum remnant-like lipoprotein particle-triglyceride (RLP-TG) and RLP-TG/ total TG ratio using highly sensitive triglyceride assay reagent. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 71-78. 査読有

10. Nakano T, Tanaka A, Okazaki M, Tokita Y, Nagamine T, Nakajima K. Particle size of apoB-48 carrying lipoproteins in remnant lipoproteins isolated from postprandial plasma. *Ann Clin Biochem.* 2011; 48: 57-64. 査読有

11. Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Inazu A, Kobayashi J, Mabuchi H, Stanhope KL, Havel PJ, Okazaki M, Ai M, Tanaka A. Postprandial lipoprotein metabolism: VLDL vs chylomicrons. *Clin Chim Acta.* 2011; 412: 1306-1318 査読有

12. Stanhope KL, Bremer AA, Medici V, Nakajima K, Ito Y, Nakano T, Chen G, Fong TH, Lee V, Menorca RI, Keim NL, Havel PJ. Consumption of fructose and high fructose corn syrup increase postprandial triglycerides, LDL-cholesterol, and apolipoprotein-B in young men and women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96 : 3783-91 査読有

13. Stanhope KL, Griffen SC, Bremer AA, Vink RG, Schaefer EJ, Nakajima K, Schwarz JM, Beysen C, Berglund L, Keim NL, Havel PJ. Metabolic responses to prolonged consumption of glucose- and fructose-sweetened beverages are not associated with postprandial or 24-h glucose and insulin excursions. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94: 112-9. 査読有

14. van Deventer HE, Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP,

Dziekonski A, Edwards S, Kimberly MM, Korzun WJ, Leary ET, Nakajima K, Nakamura M, Shamburek RD, Vetrovec GW, Warnick GR, Remaley AT.

Non-HDL cholesterol shows improved accuracy for cardiovascular risk score classification compared to direct or calculated LDL cholesterol in a dyslipidemic population. Clin Chem. 2011; 57: 490-501. 査読有

15. Nakajima K, Kobayashi J, Mabuchi H, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Imamura S, Ai M, Otokozawa S, Schaefer EF. Association of angiotensin-like protein 3 with hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase activities in human plasma. Ann Clin Biochem. 2010; 47:423-31. 査読有

16. Otokozawa S, Ai M, Asztalos BF, White CC, Demissie-Banjaw S, Cupples LA, Nakajima K, Wilson PW, Schaefer EJ. Direct assessment of plasma low density lipoprotein and high density lipoprotein cholesterol levels and coronary heart disease: Results from the Framingham Offspring Study. Atherosclerosis. 2010; 213: 251-5 査読有

17. Miller WG, Myers GL, Sakurabayashi I, Bachmann LM, Caudill SP, Dziekonski A, Edwards S, Kimberly MM, Korzun WJ, Leary ET, Nakajima K, Nakamura M, Nilsson G, Shamburek RD, Vetrovec GW, Warnick GR, Remaley AT Seven direct methods for measuring HDL and LDL cholesterol compared with ultracentrifugation reference measurement procedures. Clin Chem. 2010 Jun;56(6):977-86 査読有

18. Ai M, Otokozawa S, Asztalos BF, Ito Y,

Nakajima K, White CC, Cupples LA, Wilson PW, Schaefer EJ. Small dense LDL cholesterol and coronary heart disease: results from the Framingham Offspring Study. Clin Chem. 2010; 56: 967-76. 査読有

19. Nakajima K, Takeichi S, Nakajima Y, Fujita MQ. Pokkuri Death Syndrome; Sudden Cardiac Death Cases without Coronary Atherosclerosis in South Asian Young Males. Forensic Sci Int 2010; 207:6-13. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

1. Katsuyuki Nakajima Yasuhiro Nakajima, Panuwat Chutivongse, Nantana Sirisup, Sanae Takeichi, Masaki Q Fujita: The relationship between the severity of coronary artery atherosclerosis and heart weight in Asian sudden death cases. The XVI International Symposium on Atherosclerosis (ISA2012), Sydney Australia. March 25-29, 2012

2. Shinichi Yatsuzuka, Masako Akuzawa, Masaki Takahashi, Younosuke Shimomura, Yoshitaka Ando, Isao Kobayashi, Takamitsu Nakano, Yoshiharu Tokita, Takeaki Nagamine, Hiromi Ono, Akira Tanaka, Ernst Schaefer Katsuyuki Nakajima: Plasma diagnostic markers of fatty liver in subjects with or without metabolic syndrome. The XVI International Symposium on Atherosclerosis (ISA2012), Sydney Australia. March 25-29, 2012

3. Michiko Imagawa, Sadao Takahashi, Yasuo Zenimaru, Mai Ichikawa, Tomoko Kimura, Satsuki Sato, Jinya Suzuki, Isamu Miyamori, Takamitsu Nakano, Katsuyuki Nakajima. Effect

of very-low-density lipoprotein (VLDL) Receptor on plasma triglyceride and the increased VLDL receptor expression by high dose statin, low fat and low glucose. The XVI International Symposium on Atherosclerosis (ISA2012), Sydney Australia. March 25-29, 2012

4. Nakajima K, Nakano T, Y. Tokita, T. Nagamine, Yatsuzuka S, Shimomura Y, Tanaka A, Sumino H, Nara M, Machida T, Murakami M. The characteristics of remnant lipoproteins in the fasting and postprandial plasma. 3rd International Symposium on Chylomicrons in Disease Sydney, Australia. March 23-24, 2012.

5. Nakajima K, Nakano T, Tokita Y, Nagamine T, Yatsuzuka S, Shimomura Y, Tanaka A. The presence of postprandial remnant lipoproteins in the fasting plasma with TG levels below 150 mg/dL. American Association of Clinical Chemistry, Lipoproteins and Vascular Disease Division. July 24-27th, 2011, Atlanta, Georgia, USA

6. Katsuyuki Nakajima. Measurement of plasma remnant lipoproteins and its clinical significance. American Association of Clinical Chemistry, Lipoproteins and Vascular Disease Division. July 25th, 2011, Atlanta, Georgia, USA

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 克行 (NAKAJIMA KATSUYUKI)

群馬大学・大学院保健学研究科・客員教授

研究者番号 : 10444051

(2) 研究分担者

藤田 眞幸 (FUJITA MASAKI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号 : 00211524

岡島 史和 (OKAJIMA FUMIKAZU)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号 : 30142748

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :