

様式 C-19

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 30 日現在

機関番号 : 82406

研究種目 : 基盤研究(C)

研究期間 : 2010 ~ 2012

課題番号 : 22591002

研究課題名(和文)

血液透析患者における脂質異常症に対するスタチンのアポ蛋白代謝改善効果の解明

研究課題名(英文)

Effects of statin on apolipoprotein metabolism in patients with hemodialysis

研究代表者

池脇 克則 (KATSUNORI IKEWAKI)

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

研究成果の概要(和文):

透析患者数は増加の一途であるが、心血管疾患(CVD)のリスクが極めて高いことが知られており、医療経済という観点からも逼迫した問題となっている。透析患者のCVDリスク上昇の一因は脂質異常症であり、高レムナント・低HDL血症の反面、LDLは正常であることが特徴である。申請者は平成11-12年の基盤研究C研究において高レムナント血症が異化障害、低HDL血症は異化亢進、そしてLDL濃度は正常にもかかわらず、異化、合成速度ともに50%低下していることを報告した。こうした背景から、本研究では、透析患者を対象にスタチン投与前後で安定同位体を使ったヒトアポ蛋白代謝研究を行った。その結果、スタチンがLDLアポ蛋白B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 in hemodialysis (HD) patients are responsible for the increased risk for cardiovascular disease (CVD). Previously, we demonstrated that various metabolic abnormalities in HD patients including delayed catabolism of remnant and LDL apoB. In the present study, we assessed effects of statin (atorvastatin) on the impaired LDL apoB metabolism in HD patients using in vivo metabolic study using stable isotopically-labeled amino acid and found that atorvastatin substantially improved delayed catabolism of LDL apoB.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	900,000	0	900,000
2012年度	700,000	0	700,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

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: 脂質代謝異常 透析 安定同位体

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性腎臓病(CKD)が新しい心血管疾患リスクとして注目されている。CKDの推定患者数は1330万人、中でもCKD最重症ステージである透析患者は28万といわれ

ており、世界の透析患者の5人に1人を占め、急増傾向にある。透析患者の問題点は、全医療費の5%ともいわれる維持透析に要する医療費に加えて、健常者に比較して100倍以上と推定されるCVDリスクであり心

管疾患の合併症が更なる医療費の高騰を招くことが懸念される。透析患者のリポ蛋白代謝異常に関しては、研究代表者が平成 11-12 年度 基盤研究 C 「慢性腎不全患者における高レムナント、低 HDL 血症の解明- 安定同位体を使った新しいアポ蛋白代謝研究法による検討」において、異化遅延による高レムナント血症 (ATVB, 2005) とともに見かけ上正 LDL 血症であって異化遅延が存在する (同上) ことを報告した。異化障害とともに産生低下が存在するために双方が相殺して血中濃度が正常に保たれていたことになる。

2. 研究の目的

本研究では、血液透析患者を対象として、HMG-CoA 還元酵素阻害薬であるスタチンの脂質代謝改善効果を、安定同位体を使ったアポ蛋白代謝実験によって解明することを主たる目的とした。

3. 研究の方法

6名の透析患者を対象にアトロバスタチン 10mg/日を3ヶ月間投与前後で安定同位体を使った代謝実験を行った。

(1) 代謝実験のプロトコール

① 対象

・透析患者 6名

翌朝空腹時に以下の安定同位体ラベトレーサーを静注する。

② トレーサー

・アポ蛋白代謝実験:²H₃-leucine 5mg/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
(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) 代謝モデルの確立

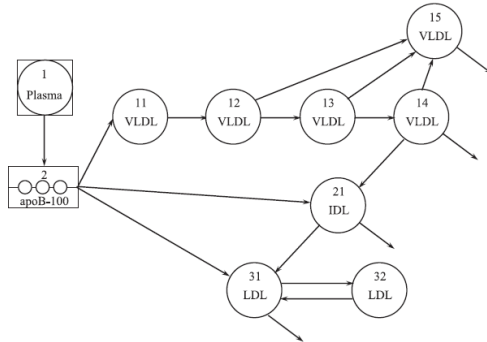
代謝モデルの開発に関しては、専用ソフト (SAAMII, ワシントン大学、現有ソフト) を使用する。アポ蛋白 B-100 のモデル (VLDL、IDL、LDL) に関しては確立している (Ikewaki K, J. Clin. Invest., 1995, ATVB 2005)。前回の透析患者で用いたコンパートメントモデルをさらに改良して用いた (成果の項参照)。

(4) 代謝パラメーター算出

代謝モデルを用いて産生、異化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) アポ蛋白 B コンパートメントモデル (図)



VLDL は lipidation cascade を反映するコンパートメント 11 から 14、そして VLDL レムナントにあたるコンパートメント 15 である。LDL は血管外のコンパートメント 32 を置いた。また肝臓から VLDL、IDL、LDL への直接的な産生分泌経路を想定した。

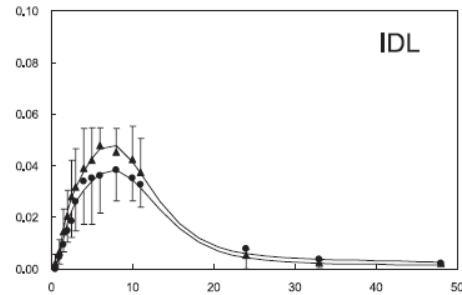
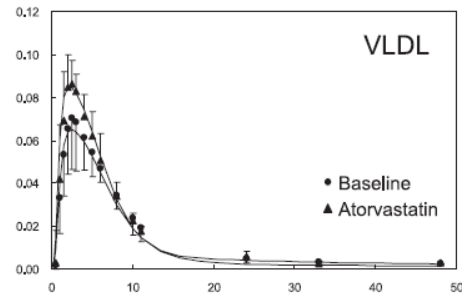
(2) アトロバスタチンによるリポ蛋白、アポ蛋白濃度の変化

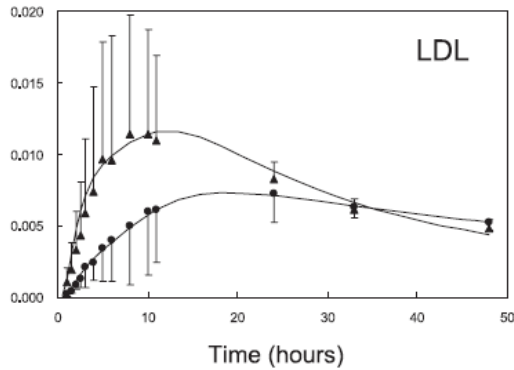
Patient	Cholesterol* (mg/dl)	LDL-Chol* (mg/dl)	HDL-Chol (mg/dl)	Triglycerides (mg/dl)	ApoA1 (mg/dl)	ApoB* (mg/dl)	Lp(a) (mg/dl)	Hematocrit
1 Before	203	132	28	203	130	131	47	0.38
1 After	184	126	45	130	155	110	38	0.42
2 Before	159	92	47	89	154	80	37	0.43
2 After	118	52	47	115	159	50	39	0.43
3 Before	186	99	22	289	121	107	8	0.43
3 After	132	73	34	111	148	73	7	0.49
4 Before	119	55	55	145	169	67	29	0.41
4 After	103	23	69	114	188	46	18	0.40
5 Before	190	139	37	95	107	107	19	0.42
5 After	115	74	32	73	96	62	14	0.40
6 Before	157	108	42	102	134	83	16	0.32
6 After	137	68	45	105	135	59	16	0.36
All Before	176±32	104±30	39±12	154±79	136±22	96±23	26±15	0.40±0.04
All After	132±29	69±34	45±13	108±19	147±30	67±23	22±13	0.42±0.04

*P<0.03 for mean values before and after treatment.

全ての HD 患者で、LDL-C は有意に減少した。Lp(a)、HDL-C 濃度は不変であった。

(3) Tracer/tracee (T/T) ratios





Peak T/T ratio は VLDL、IDL、LDL 全ての apoB で上昇しており異化の亢進を示している。加えて、LDL apoB T/T では peak までの時間も短縮しておりこの点も異化の亢進を一致する。

(4) アトロバスタチンによる代謝パラメーターの変化

上記 T/T をシュミレーション専用ソフトである SAAMII を使って、観察されたデータ (T/T) を最小二乗法でフィッティングさせて異化の指標である fractional catabolic rate (FCR, pools/day) を決定した。その後、産生速度はアポ蛋白プールサイズ * FCR、プールサイズは体重の 4.5% として算出した。

Patient Number	VLDL-ApoB		
	Concentration (mg/dl)	FCR (d ⁻¹)	PR (mg/kg per d)
Before treatment with atorvastatin			
1	18.60	3.20	23.81
2	11.30	5.54	25.04
3	18.60	2.15	16.00
4	8.80	5.72	20.13
5	5.60	10.60	23.74
6	4.70	4.00	7.52
Mean ± SD	11.27±6.15	5.20±2.98	19.37±6.68
Median	10.05	4.77	21.94
IQR	5.38, 18.60	2.94, 6.94	13.88, 24.12
After 3 mo of treatment with atorvastatin			
1	9.20	4.94	18.18
2	9.40	4.44	16.69
3	11.00	5.94	26.14
4	7.20	9.95	28.66
5	6.00	12.07	28.97
6	3.81	5.86	8.93
Mean ± SD	7.77±2.62	7.20±3.08	21.26±8.01
Median	8.20	5.90	22.16
IQR	5.45, 9.80	4.82, 10.48	14.75, 28.74
Δ median	-1.75	1.80	3.32
Δ IQR	-8.05, -0.57	0.83, 3.90	-6.31, 8.93
P value	0.05	0.05	0.5

VLDL apoB に関しては、apoB 濃度は低下し、その機序は異化の亢進であった。産生速度は不変であった。

IDL-ApoB		
Concentration (mg/dl)	FCR (d ⁻¹)	PR (mg/kg per d)
7.30	5.95	17.37
6.70	5.04	13.51
3.10	15.63	19.38
1.60	34.50	22.08
2.60	6.97	7.25
2.83	5.09	5.76
4.02±2.37	12.20±11.64	14.23±6.62
2.97	6.46	15.44
2.35, 6.85	5.08, 20.35	6.88, 20.06
2.50	13.47	13.47
1.90	12.16	9.24
2.90	10.38	12.04
2.10	23.36	19.62
1.90	5.89	4.48
2.49	4.55	4.54
2.30±0.40	11.64±6.72	10.57±5.79
2.30	11.27	10.64
1.90, 2.60	5.56, 15.94	4.53, 15.01
-0.52	-0.81	-3.34
-4.80, -0.03	-6.72, 7.22	-5.04, -2.15
0.12	0.75	0.03

一方、IDL apoB に関しては、濃度、異化速度ともに変化なかったが、産生速度は有意に低下した。

LDL-ApoB		
Concentration (mg/dl)	FCR (d ⁻¹)	PR (mg/kg/d)
105	0.334	14.03
62	0.469	11.63
85	0.448	15.23
59	0.873	20.60
110	0.363	15.97
83	0.189	6.24
84±21	0.446±0.232	13.95±4.79
84	0.406	14.63
61, 106	0.298, 0.570	10.28, 17.13
98	0.310	12.15
39	0.653	10.19
59	0.849	20.04
28	2.369	26.53
60	0.599	14.38
57	0.325	7.46
57±24	0.851±0.772	15.13±7.03
58	0.626	13.27
36, 70	0.321, 1.229	9.51, 21.66
-26	0.210	-0.11
-36, -19	0.096, 0.675	-1.66, 5.09
0.03	0.05	0.75

最後に、LDL apoB 代謝では、濃度は有意に低下しその機序は異化の亢進によるものであった。

(5) 成果のまとめ

今回、HD 患者に対してアトロバスタチンの代謝改善効果を安定同位体を使ったヒトトレ

一サー実験で検討する世界で初めての研究を実施した。予想された結果ではあるが、アトロバスタチンは LDL apoB に異化障害を亢進させて正常化した。LDL 異化障害は血管内皮下での酸化変性を促進することが懸念されており、異化障害の是正は、LDL コレステロール濃度の低下に加えて付加的な抗動脈硬化作用と考えられる。従来透析患者ではスタチンの有効性は占められていないが、根気あふ代謝実験の知見からはスタチンが心血管疾患予防効果を発揮できる可能性が示された。

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 13 件)

- ① Schwaiger JP, Nakada Y, Berberich R, (11,4 番目) Lipoprotein Kinetics in Male Hemodialysis Patients Treated with Atorvastatin. Clin J Am Soc Nephrol. 査読有 2013 Apr 18. [Epub ahead of print]
 - ② Ayaori M, Iwakami N, Uto-Kondo H, (15, 15 番目) Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors Attenuate Endothelial Function as Evaluated by Flow-Mediated Vasodilatation in Type 2 Diabetic Patients. J Am Heart Assoc. 査読有 2013;2:e1-10.
 - ③ Nishiwaki M, Hosoi H, Ikewaki K, ABC Study Group. : Efficacy and effects on lipid metabolism of combination treatment with losartan + hydrochlorothiazide versus losartan + amlodipine: a 48-week prospective, multicenter, randomized, open-label trial. Clin Ther. 査読 2013 35:461-73.
 - ④ Uto-Kondo H, Ayaori M, Ogura M, (8, 8 番目) The study of reverse cholesterol transport by coffee polyphenol. J Natl Def Med Coll. 2013; 38:1-15.
 - ⑤ Uto-Kondo H, Ayaori M, Kishimoto Y, (10, 10 番目) Consumption of polyphenol-rich juar tea increases endothelium-bound extracellular superoxide dismutase levels in men with metabolic syndrome: link with LDL oxidizability. Int J Food Sci Nutr. 査読有 2013 64:407-14.
 - ⑥ Sotherden GM, Uto-Kondo H, Ayaori M, (4, 4 番目) Effects of Nutraceuticals and Botanicals on Macrophage Cholesterol Efflux: Implications for Atherosclerosis. Journal of Nutritional Therapeutics 査読有 2012, 1: 96-106.
 - ⑦ Nishiwaki M, Ikewaki K, Ayaori M, Risk reductions for cardiovascular disease with pravastatin treatment by dyslipidemia phenotype: A post hoc analysis of the MEGA Study. J Cardiol. 査読有 2013 61: 196-200.
 - ⑧ Yoshida H, Shoda T, Yanai H, (10, 4 番目)、Effects of pitavastatin and atorvastatin on lipoprotein oxidation biomarkers in patients with dyslipidemia. Atherosclerosis 査読有 2013 226:161-4.
 - ⑨ Frischmann ME, Ikewaki K, Trenkwalder E, Lamina C, Dieplinger B, Soufi M, Schweer H, Schaefer JR, König P, Kronenberg F, Dieplinger H. In vivo stable-isotope kinetic study suggests intracellular assembly of lipoprotein(a). Atherosclerosis. 2012;225(2):322-7.
 - ⑩ Hayase T, Ayaori M, Sato H, (8, 7 番目) Impact of Low-and High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels on Carotid Intima-Media Thickness Differs by Smoking Status in Middle-Aged Men. J Atheroscler Thromb. 査読有 2012 19 664-672.
 - ⑪ Hisada T, Ayaori M, Ohruji N, (15, 14 番目) Statin Inhibits Hypoxia-Induced Endothelin-1 via accelerated degradation of HIF-1 α in Vascular Smooth Muscle Cells. Cardiovasc Res. 査読有 2012 95, 251-9.
 - ⑫ Ayaori M, Yakushiji E, Ogura M, (16, 16 番目): Retinoic acid receptor agonists regulate expression of ATP-binding cassette transporter G1 in macrophages. Biochim Biophys Acta. 査読有 2012 1821:561-72.
 - ⑬ Tada H, Kawashiri MA, Ikewaki K, Altered Metabolism of Low-density Lipoprotein and Very Low-density Lipoprotein Remnant in Autosomal Recessive Hypercholesterolemia: Results from Stable Isotope Kinetic Study in vivo. Circ Cardiovasc Genet. 査読有 2012 5:35-41.
- [学会発表] (計 10 件)
- ① Ayaori M: Hepatic overexpression of endothelial lipase induces a marked hypoalphalipoproteinemia but maintains macrophage reverse cholesterol transport in vivo dependent of scavenger receptor class B type I. 第 7 5 回日本循環器学会学術集会 横浜 2011年 3月 18日
 - ② Kondo H: Anthocyanin enhances

- macrophage reverse cholesterol transport in vivo. 第 43 回日本動脈硬化学会学術集会 2011 年 札幌 7 月 15 日
- ③ Ikewaki K: Alpha Hydroxybutyric Acid as A Novel Biomarker for Coronary Heart Disease. The European Society of Cardiology at ESC Congress 2011 Paris Aug 28.
 - ④ Terao Y: Hepatic overexpression of Idol reduces LDL catabolism by targeting LDL receptor to proteasomal degradation in mice and hamsters. American Heart Association, Scientific Sessions Orlando 2011 Nov 12.
 - ⑤ Kawajiri M: Impact of impaired LDL catabolism and increased VLDL and VLDL remnant production on hypercholesterolemia in homozygous PCSK9 gene mutations: evidence from kinetic study with stable isotope. American Heart Association, Scientific Sessions Orlando 2011 Nov 12.
 - ⑥ Ayaori M: Overexpression of Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 in Macrophages Enhanced Macrophage Reverse Cholesterol Transport. American Heart Association, Scientific Sessions Los Angeles 2012 Nov 3.
 - ⑦ Sasaki M: Hepatic Overexpression of Idol Accelerates LDL Receptor Degradation Partly by Increasing Circulating PCSK9 Levels via SREBP2/LDL Receptor-Dependent Pathways. American Heart Association, Scientific Sessions Los Angeles 2012 Nov 3.
 - ⑧ Kawashiri M: Statin Therapy Improves Fractional Catabolic Rate of LDL without Affecting Impaired VLDL and VLDL Remnant Catabolism in Homozygous FH Patient Due to PCSK9 Gene Mutation: Evidence from kinetic study. with stable isotope American Heart Association, Scientific Sessions Los Angeles 2012 Nov 3.
 - ⑨ Ayaori M: The Paradigm Shift of HDL-Targeted Therapy: HDL Functionality- Rather Than Quantity-Based Approach プレナリーセッション1 第 77 回日本循環器学会学術集会 横浜 2013 年 3 月 15 日
 - ⑩ Ikewaki K: The Lipoprotein Cholesterol Ratio is a Significant Marker for Predicting Acute Coronary Syndrome in the Japanese General Population with Normocholesterolemia Late Breaking Cohort Studies 3 第 77 回日本循環器学会学術集会 横浜 2013 年 3 月 15 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

綾織 誠人 (AYAORI MAKOTO)
防衛医科大学校、病院、助教
研究者番号：70532464