

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390178

研究課題名(和文)酸化LDLコレステロールと潜在性動脈硬化症、生活機能の関連についての地域疫学研究

研究課題名(英文)The effect of soluble form LOX-1 and LOX-1 ligands containing apolipoprotein B on subclinical atherosclerosis in community dwellers..

研究代表者

岡村 智教 (Okamura, Tomonori)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00324567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：LOX-1は、内皮細胞における変性LDLの受容体である。そこでApoB含有LOX-1リガンド(LAB)と潜在的な動脈硬化所見の関連をみた。40歳代男性では、米国集団ではLDLCを調整してもLABと頸動脈IMTに有意な正の関連を認めた。しかし日本人集団では関連を認めなかった。平均年齢67歳の日本人集団ではLABと頸動脈IMTに有意な関連を認めたが、LDLCを調整すると有意差は消失した。神戸市の男女515人では、LDLCを調整してもLABはCAVIと有意な正の関連を示した。通常、IMTよりCAVIのほうがより早期の動脈硬化の指標であるため、LABは日本人の動脈硬化の早期指標として意義がある。

研究成果の概要(英文)：The serum level of LOX-1 ligand containing ApoB (LAB) may reflect atherogenicity better than LDL cholesterol (LDLC) and usual measurement of oxidized LDL. The association between LAB and subclinical atherosclerosis, such as intima-media thickness (IMT) of carotid artery and Cardio Ankle Vascular Index, CAVI, was investigated in community dwellers. In group with a mean age of 45, serum LAB was associated with an increased carotid IMT in US Caucasian men independently of various risk factors (N= 297); however, there was no significant relationship between LAB and IMT in Japanese men (N= 310). In other Japanese group with a mean age of 64 (N= 992), serum LAB was associated with an increased carotid IMT only in men with hypercholesterolemia. In 515 healthy Japanese (310 men and 205 women) living in Kobe city, the plasma LAB showed a positive association with the CAVI in men but not in women. LAB may be a useful marker for detecting early stage of atherosclerosis in "healthy" individuals.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：ApoB含有LOX-1リガンド
生活習慣

血中可溶性LOX-1 疫学調査 carotid IMT CAVI 動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

種々の動物実験、家族性高脂血症を始めとする多くの臨床研究により動脈硬化の原因としての高コレステロール血症の意義は確立されている。しかし単純なコレステロールの血中量だけでは種々の病態との関連を論じることは困難な例が疫学研究等で散見されており、コレステロールの「質」についても評価が必要である。四半世紀前に Steinberg らは、LDL そのものではなく、LDL が修飾されることが動脈硬化の原因として重要であるという仮説をたて、それ以降の基礎研究では特に酸化修飾について系統的な研究が行われてきた。酸化 LDL は、内皮障害の重要な因子であり、動脈硬化の進展にも深く関わっている。

Lectin-like oxidized LDL Receptor (LOX-1) は内皮細胞における酸化 LDL の受容体として知られており、酸化 LDL の血管内皮機能障害、動脈硬化惹起作用は LOX-1 を介していると考えられている。LOX-1 は、細胞膜を一回貫通する受容体であるが、細胞外の部分が酵素的に切断され、血中に可溶性 LOX-1 (sLOX-1) として存在する。もし sLOX-1 と酸化 LDL 濃度の両者を測定することができれば、酸化 LDL 量と内皮細胞への取り込みの両方を測定できることになる。近年開発された ApoB 含有 LOX-1 リガンド (LAB) は、酸化 LDL だけでなく、炎症やその他の要因で変性したすべての LDL を LOX-1 レセプターへの結合という視点から一括して評価できる指標と考えられた。そこで本研究では LAB を酸化・変性 LDL の指標として用いることとした。

われわれは、2010 年に都市住民 2500 人を対象とした 11 年間のコホート研究で、LDL コレステロールは脳梗塞の発症と関連しないが、血中 LOX-Index (sLOX-1 と LAB の積) は脳梗塞の危険因子であることを報告した [1]。したがって血中の sLOX-1 と LAB を測定して、動脈硬化の様々な指標との関連を検討することは、脂質関連の新しいバイオマーカーを確立し、真のハイリスク個体の識別や臨床指標に対するコレステロールの二面性の解明にも有用と考えた。

2. 研究の目的

高コレステロール血症は冠動脈疾患の確立した危険因子であるが、その血中量だけで種々の病態との関連を論じることは難しい。LOX-1 は内皮細胞の酸化 LDL やその他の変性 LDL の受容体であり、酸化 LDL の血管内皮機能障害、催動脈硬化作用は LOX-1 を介していると考えられている。そこで血中の sLOX-1 と LAB を測定し、頸動脈内膜中膜複合体 (carotid Intima-Media Thickness, cIMT) や脈波 (大動脈の進展性) など様々なアウトカムとの関連を検討することで新しいバイオマーカーとしての意義を検証できる。また酸化・変性 LDL 指標 (sLOX-1 と LAB) と生活習慣の関連を明らかにすることができれば、

健康障害の予防に有用な知見を得ることが可能となる。

本研究では上記の目的を達成するため、内外の地域住民約 3 千人を対象として sLOX-1 と LAB を測定して様々なアウトカムとの関連を検討することとした。本研究の特徴は、米国人も含む複数の集団において新しいバイオマーカーである sLOX-1 と LAB を測定できる点にある。酸化 LDL を用いた疫学研究は国際的にも少なく、地域住民を対象とした国内での研究は前述のわれわれが実施した前述のコホート研究しかなかった。この研究では LOX-Index が脳梗塞や冠動脈疾患の危険因子であることは示されたが、公衆衛生的な視点での予防対策につなげるためには、無症状のうちの動脈硬化所見等との関連を明らかにする必要がある。本研究の仮説は以下の通りである。

(1) sLOX-1 と LAB は大動脈の進展性障害 (CAVI の高値) と関連を示しその影響は通常の LDL コレステロールとは独立している。

(2) 米国白人の sLOX-1 と LAB は日本人よりも高く動脈硬化性疾患の日米差の要因の一つである。

(3) 日米のそれぞれの集団において sLOX-1 と LAB は、頸動脈内膜中膜複合体、冠動脈石灰化と関連を示し、その影響は通常の LDL コレステロールとは独立している。

(4) 慢性炎症や魚介類や緑黄色野菜の摂取不足、喫煙、内臓肥満などが酸化・変性 LDL 指標の高値と関連する。

以上の検討を通じて、酸化・変性 LDL 指標の動脈硬化に対する影響を明らかにでき、一部で二面性が指摘されているコレステロールの健康影響の本質を明らかにできる。また関連する生活習慣の検証により酸化・変性 LDL 指標の改善指針を示すことも可能となる。

3. 研究の方法

本研究は、複数のフィールドで sLOX-1 と LAB を測定し、種々のアウトカムとの関連を見ることを目的としている。そのためまず重要なのは測定に使う血液サンプルを収集することである。本研究における 3 つの研究フィールドのうち 2 つでは、研究開始時に既に先行研究で血清が採取されずすべてマイナス 80 で凍結保存されていた。

(1) 滋賀県草津市とピッツバーグ市近郊の 40 歳代の男性から採取された血清は、先行研究である科学研究費補助金 基盤研究 A (平成 13~16 年度、研究代表者: 上島弘嗣) および米国 NIH 研究費 (R01HL068200) で採取され、滋賀医科大学社会医学講座公衆衛生学教室 (三浦克之教授) で保存されていた。

(2) 同様に滋賀県草津市の 79 歳までの地域住民の男女の血清は、先行研究である科学研究費補助金 基盤研究 A (平成 21~23 年度、研究代表者: 上島弘嗣) で採取され、同じく滋賀医科大学に保存されていた。

これらの先行研究の研究代表者やデータ

保管者は連携研究者として本研究に参画している。また日米共同研究の米国側代表者 (Akira Sekikawa, ピッツバーグ大学准教授) も海外共同研究者として研究協力者として参加し、酸化 LDL 指標の日米差についての助言を行う。したがって凍結血清の利用や各研究機関のデータ利用、協力関係に特に問題はなかった。また滋賀と米国の cIMT は、既に前述の先行研究で計測済みであり、全員から動脈硬化を対象とした研究について保存検体やデータ利用について同意が得られていた。

神戸では、本研究は、先端医療振興財団の新しいコホート研究として 2010 年から開始された神戸研究の追跡調査として実施された。神戸研究は、高血圧や糖尿病、加齢に伴う聴力・視力障害、症状を訴える人が多い腰や膝の痛み、心の健康と生活習慣の関連を検証するためのコホート研究である。申請者は神戸研究を推進する生活習慣疫学チームのリームリーダーを財団から委嘱されている。本研究では、神戸研究の対象者の一般検査、炎症マーカーの測定に加えて sLOX-1 と LAB を測定し、検査所見相互や生活習慣との関連を検討すると同時に、一部対象者に先行研究で測定済みの CAVI (Cardio Ankle Vascular Index) との関連を見た。CAVI は非侵襲性で大動脈を含む「心臓 (Cardio) から足首 (Ankle) まで」の動脈の硬さ (大動脈の進展性の低下) を計測する指標であり、動脈硬化が進行するほど高い値となり、脳・心血管疾患のリスクが高くなる。CAVI は VaSera VS-1000 (フクダ電子) で計測された。

酸化 LDL は不均一な粒子であり、その測定に用いられている抗酸化 LDL モノクローナル抗体は、粒子全体ではなくある一部分を認識する抗体として作成されている。この手法だとどの抗体を用いるかによって血中の酸化 LDL の値が変化するし、また実際に動脈硬化を惹起する酸化・変性 LDL を網羅しているわけではない。そこで本研究では、特定の抗原部位の認識ではなく、LOX-1 レセプターから酸化・変性 LDL を測定する手法として、サンドイッチ enzyme immunoassay (EIA) を用いて、LOX-1 に結合する ApoB 含有リポ蛋白 (LOX-1 ligand, LAB) [2] として測定した。本研究の連携研究者の沢村達也部長 (国立循環器病研究センター、現、信州大学医学部教授) は、LOX-1 レセプターを発見し、sLOX-1 と LAB の測定系を確立した業績を持っており、これらの測定について助言・指導を受けた。

4. 研究成果

(1) 日米の 40 歳代男性での検討

滋賀県草津市とピッツバーグ市近郊の 40 歳代の 40~49 歳の男性をランダムに抽出し (平均年齢 45 歳) 日本人 310 人、米国白人 297 人の LAB と sLOX-1 を測定した。LDL コレステロールは日米で同レベルだが、LAB、sLOX-1 は有意に米国のほうが高かった。米国

人の集団では、LAB が高い群ほど cIMT も段階的に大きくなったが、日本人集団では明確な関連はなかった。多変量解析で LDL コレステロールや LDL 粒子数を含む他の危険因子を統計学的に調整すると、米国白人では、年齢だけ調子したモデル、さらに HDL コレステロール、トリグリセライド (対数変換) 高血圧、糖尿病、BMI、sLOX-1 (対数変換) 喫煙、飲酒、高感度 CRP、脂質異常症治療に加えて LDL コレステロールを調整したモデル (モデル A) でも、モデル A の LDL コレステロールを LDL 粒子数に代えたモデル (モデル B) でも、LAB (対数変換値) は IMT と有意な正の関連を示した。一方、日本人集団では、すべての統計モデルで LAB だけでなく、LDL コレステロールや LDL 粒子数も cIMT と関連を示さなかった。

(2) 前期高齢者までの日本人男性での検討

滋賀県草津市の 50 歳以上を含む男性 992 人 (平均年齢 64 歳) について LAB と cIMT の関連を検討した。LAB を 4 分位で分けると、多変量調整 cIMT (総頸動脈) は、0.797、0.827、0.813、0.841mm であった (P=0.005)。しかしこの関連は総コレステロール値を調整すると消失した。対象者を LAB 中央値と高コレステロール血症の有無で 4 分割すると、両方高い群で特に cIMT が大きく、さらにスタチンを服用していない群でより顕著であった。高コレステロール血症群では、総コレステロール値を調整しても高 LAB 群の cIMT は低 LAB 群より有意に大きかった。

(3) 神戸市の男女での検討

神戸市の男女 1134 人での検討では、LAB は肥満群で高かったが、sLOX-1 は肥満と関連しなかった。sLOX-1 は喫煙者で高く、飲酒者で低い傾向を認めた。性・年齢・BMI で調整した重回帰分析において、sLOX-1、LAB のいずれも腎機能の指標であるシスタチン C と有意な正の関連を認めた。

CAVI の測定地があった 515 人 (平均年齢 62 歳) で LAB と CAVI の関連を検討すると、LAB は LDL コレステロールを含む交絡要因を調整しても、男性では CAVI と有意な正の関連を示した。その他の CAVI の決定要因としては高感度 CRP が重要であり、LDL コレステロールよりも関連が強かった。しかし LAB と CAVI の関連は CRP を調整しても認められた (ただし有意差は marginal)。

sLOX-1、LAB の疫学研究への導入は開始されたばかりであり、多くの検証課題が残されている。ここでまとめると、女性での LAB と IMT の関連、冠動脈石灰化、内皮機能など IMT、CAVI 以外の動脈硬化指標との関連、コホート研究でのハードエンドポイントとの関連のさらなる追試 (特に米国)、sLOX-1 や LAB の規定要因の検証、等になる。そしてもし LOX-1 系の指標が通常の LDL コレステロールよりも心血管疾患の強力な危険因子であることがより明確になれば、LOX-1 レセプターをブロックして予防に繋げるよ

うな創薬事業への展開が可能と期待される。

<引用文献>

- [1] Inoue N, Okamura T, Kokubo Y, Fujita Y, Sato Y, Nakanishi M, Yanagida K, Kakino A, Iwamoto S, Watanabe M, Ogura S, Otsuki K, Matsuda H, Uchida K, Yoshimoto R, Sawamura T. LOX index, a novel predictive biochemical marker for coronary heart disease and stroke. Clin Chem 56: 550-8, 2010.
- [2] Sato Y, et al. Determination of LOX-1 ligand activity in mouse plasma with a chicken monoclonal antibody for ApoB. Atherosclerosis; 200: 303-309, 2008.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6件)

1. Sugiyama D, Higashiyama A, Wakabayashi I, Kubota Y, Adachi Y, Hayashibe A, Kawamura K, Kuwabara K, Nishimura K, Kadota A, Nishida Y, Hirata T, Imano H, Miyamatsu N, Miyamoto Y, Sawamura T, Okamura T. The relationship between lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 ligands containing apolipoprotein B and cardio-ankle vascular index in healthy community inhabitants: The KOBE study. J Atheroscler Thromb (in press). 査読あり. DOI: <http://doi.org/10.5551/jat.26450>.
2. Hirata T, Higashiyama A, Kubota Y, Nishimura K, Sugiyama D, Kadota A, Nishida Y, Imano H, Nishikawa T, Miyamatsu N, Miyamoto Y, Okamura T. HOMA-IR values are associated with glycemic control in Japanese subjects without diabetes or obesity: the KOBE Study. J Epidemiol (in press). 査読あり
3. Okamura T, Sekikawa A, Sawamura T, Kadowaki T, Barinas-Mitchell E, Mackey RH, Kadota A, Evans RW, Edmundowicz D, Higashiyama A, Nakamura Y, Abbott RD, Miura K, Fujiyoshi A, Fujita Y, Murakami Y, Miyamatsu N, Kakino A, Maegawa H, Murata K, Horie M, Mitsunami K, Kashiwagi A, Kuller LH, Ueshima H; ERA JUMP Study Group. LOX-1 ligands containing apolipoprotein B and carotid intima-media thickness in middle-aged community-dwelling US Caucasian and Japanese men. Atherosclerosis; 229(1): 240-5, 2013. 査読あり doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.04.023.
4. Higashiyama A, Wakabayashi I, Kubota Y, Adachi Y, Hayashibe A, Nishimura K, Sugiyama D, Kadota A, Imano H, Miyamatsu N, Miyamoto Y, Okamura T. Does

High-Sensitivity C-Reactive Protein or Low-Density Lipoprotein Cholesterol Show a Stronger Relationship with the Cardio-Ankle Vascular Index in Healthy Community Dwellers?: the KOBE Study. J Atheroscler Thromb; 19(11): 1027-34, 2012. 査読あり
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jat/19/11/19_13599/_article

〔学会発表〕(計 8件)

1. Okamura T, Sekikawa A, Sawamura T, Kadowaki T, Sutton-Tyrrell K, Edmundowicz D, Robert EW, Miura K, Kuller LH, Ueshima H. Serum level of LOX-1 ligand containing ApoB (LAB) was associated with an increased risk of subclinical atherosclerosis in US white and Japanese men. 16th International Symposium on Atherosclerosis. 2012年3月25-29日、シドニー、オーストラリア
2. Okamura T, Sawamura T, Hisamatsu T, Fujiyoshi A, Kadota A, Miyamatsu N, Miura K, Ueshima H. Modified LDL (Serum level of LOX-1 ligand containing ApoB) was associated with increased carotid intima-media thickness in Japanese community dwelling men especially with hypercholesterolemia. 9th World Stroke Congress. 2014年10月22-25日、イスタンブール、トルコ

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0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 0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〕
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 智教 (OKAMURA TOMONORI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00324567

(2) 研究分担者

宮本 恵宏 (MIYAMOTO YOSHIHIRO)

国立循環器病研究センター・予防健診部・
部長

研究者番号：10312224

西脇 祐司 (MISHIWAKI YUJI)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：40237764

東山 綾 (HIGASHIYAMA AYA)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：20533003

(3) 連携研究者

沢村 達也 (SAWAMURA TATSUYA)

国立循環器病研究センター・血管生理部・
部長

研究者番号：30243033

三浦 克之 (MIURA KATSUYUKI)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：90257452

上島 弘嗣 (UESHIMA HIROTSUGU)

滋賀医科大学・アジア疫学研究センター・
特任教授

研究者番号：70144483

(4) 研究協力者

AKIRA SEKIKAWA

Associate Professor

University of Pittsburgh