

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591066

研究課題名(和文)動脈硬化リスクの評価におけるLp(a)コレステロールの意義

研究課題名(英文)Significance of Lp(a) cholesterol in the risk determination of atherosclerosis

研究代表者

吉田 博(Yoshida, Hiroshi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：30333529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：心血管病のない男性212人を対象とするHPLCリポ蛋白定量法を用いた分析では、Lp(a)-CはLDL-Cと相関を示さず、IDL-C、VLDL-C、カイロミクロン-Cと有意に正相関したが、HDL-CはLp(a)-Cと有意に逆相関した。動脈硬化の Framingham Risk Score (FRS) は non-HDL-C と有意に正相関を示すが、Lp(a)-C とは僅かな有意相関であった。血管内皮細胞において、アンジオテンシン2はその受容体を介して動脈硬化を不安定化するMMP-2を増強した。Lp(a)のMMP-2に対する増強効果については、その再現性と機序の解明が必要である。

研究成果の概要(英文)：HPLC lipoprotein analysis showed that in 212 male subjects without cardiovascular disease Lp(a)-C did not correlate with LDL-C while Lp(a)-C correlated positively with IDL-C, VLDL-C, chylomicron-C, but inversely correlated with HDL-C. Framingham Risk Score for atherosclerosis significantly provided a positive correlation to non-HDL-C but a modest correlation to Lp(a)-C. In the basic experiments to establish the study for Lp(a) effects on secretion of MMP-2, a destabilizing factor of atherosclerosis, from vascular endothelial cells, angiotensin 2 (Ang2) enhanced MMP-2, and the Ang2 receptor blocker cancelled that, and thereby it was found that Ang2 could enhance MMP-2 through Ang2 receptors. Although Lp(a) also may have certain potential to enhance MMP-2, its reproducibility and its mechanisms should be revealed. Therefore, Lp(a)-C and MMP-2 may be expected to play a role in biomarkers of cardiovascular disease.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 循環器内科学

キーワード：Lp(a)コレステロール 動脈硬化 バイオマーカー MMP-2 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

Lp(a)は、アプスミノゲンと類似してクリングル(Kringle) 4 という構成成分を繰り返し配列させているApo(a)がLDL にS-S 結合したリポ蛋白であり、Apo(a)のクリングル繰り返し回数の違いにより多くのフェノタイプがLp(a)に存在する。Lp(a)は酸化LDL と同様に、酸化変性を受けて酸化Lp(a)となり、スカベンジャー受容体から取り込まれ、マクロファージを泡沫化し、動脈硬化の基礎病変を形成する。実際、ヒトの冠動脈病変の中に酸化Lp(a)が検出されている(臨床病理 2010; 58: 622-30、J Atheroscler Thromb 2009; 16: 410-8)。Apo(a)のプラスミノゲン相同性からプラスミンを低下させ、Lp(a)は血栓形成を促す。Lp(a)は炎症部位に沈着して血管内皮細胞からの接着分子の発現を促すとともに、一酸化窒素(NO)を低下させて血管拡張能を減弱させる。

このような病態生理を基盤に、Lp(a)は冠動脈疾患や脳血管障害など動脈硬化性疾患のリスクとなるが、高LDL コレステロール血症と比べてリスク因子として必ずしも一致した成績がみられない。この理由として一つには性差の問題があり、LDL コレステロールを低下させるHMGCoA 還元酵素阻害薬(スタチン)はLp(a)を低下させないが、女性ホルモンであるエストロゲンはLp(a)を低下させる(臨床医薬 2003; 19: 827-33)。さらに重要な理由として考えられるのはLp(a)のフェノタイプであり、血清のLp(a)蛋白濃度は優性遺伝で規定されているが、それはApo(a)のクリングルの繰り返し数がLp(a)蛋白濃度を決定しているためである。すなわち、Apo(a)の分子量とLp(a)蛋白濃度が逆相関している。頸動脈硬化の予測や冠動脈疾患の重症度の予測にLp(a)蛋白濃度と合わせて低分子量Apo(a)の評価が有用であると報告がみられる(Circulation 1999; 100: 1154-60、J Am Coll Cardiol 2006; 48: 446-52)。かかる意味から、Lp(a)の血清蛋白

濃度の測定のみでは動脈硬化のリスクの評価には不十分であると考えられる。

しかしながら電気泳動とイムノプロットティングによるLp(a)のフェノタイプ分析を恒常的に実施してLp(a)濃度からみた動脈硬化リスクを評価することは実地臨床的には容易ではない。先に述べたように、動脈硬化性疾患を予防するLDL 低下薬であるスタチンはLp(a)を低下できないが、これはLp(a)蛋白濃度のデータであり、Lp(a)コレステロール濃度を検討した成績はない。

我々は以前に確立した陰イオン交換クロマトグラフィを用いたHPLC リポ蛋白定量法(J Lipid Res 2003; 44: 1404-12)である基本法を改変して、高比重リポ蛋白(HDL)、LDL、中間比重リポ蛋白(IDL)、超低比重リポ蛋白(VLDL)、カイロミクロンのコレステロールに加え、Lp(a)コレステロールを分離定量できる拡張したHPLC リポ蛋白定量法(J Lipid Res 2010; 51: 1237-43)を開発した。

最近、動脈硬化性疾患のリスク評価については相対リスクよりは絶対リスクの重要性が示されているが、絶対リスクの代表ツールであるFramingham Risk Score (FRS)においても、さらにリスクの評価能力を高める追加因子について議論されている。MMP(matrix metalloproteinase)は、単球および組織球を含む血管壁細胞から分泌される細胞外マトリックスを分解する酵素の一種である。プラーク内の巨大化した泡沫細胞はMMPを分泌してプラークを不安定化させる。MMPにはサブタイプがあり、心血管病変のリモデリングには主として基底膜を選択的に分解するゼラチナーゼ群(MMP-2, MMP-9)が関係し、さらにこれらを活性化するストロメライシン群(MMP-3)も関係すると考えられている。この中で、MMP-3のみが関節リウマチの診断で保険適用が承認されているが、MMP関連バイオマーカーの臨床的有用性と保険適用についてはさらなるエビデンスの構築が必要である。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、我々が開発したHPLC リポ蛋白定量法を用いて、HDL, LDL, IDL, VLDL, カイロミクロンとともにLp(a)のコレステロール濃度を測定する。腎不全期とくに血液透析期ではLDLコレステロールが低くIDLコレステロールが高いことが本HPLC リポ蛋白定量法で確認されており(Ann Biol Chem)、LDLとHDL以外のトリグリセリド(TG)リッチリポ蛋白を測定することは必要である。動脈硬化性疾患リスクにおけるTGリッチリポ蛋白コレステロールおよびLp(a)コレステロールの影響について検討し、FRSなどの動脈硬化性疾患リスク評価のさらなる充実に寄与する研究を行った。

(2) 心血管病のサロゲートマーカーとしては、頸動脈硬化について頸動脈エコー検査により評価されることが多いが、頸動脈エコー所見によるリスク評価能力の検証として、血清バイオマーカーとの関連性が注目される。心血管病発症のバイオマーカーとして、我々は動脈硬化の不安定化要因であるマトロプロテイナーゼ(MMP)に焦点をあてて、血管内皮細胞からのMMP-2およびMMP-9の分泌について、動脈硬化惹起状態における検討を行い、血清バイオマーカーとしてMMPの有用性評価に繋ぐ研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 臨床研究

健康診断を実施している某医療施設において、心血管病をもたない1487人の男性を対象に、FRSの評価を行った。本研究のリポ蛋白分析はHPLCリポ蛋白定量の基本法で検討した。このHPLC法基本法は、2013年7月1日に保険適用の認可を受けた(リポ蛋白分画(HPLC法))。FRSの評価は、年齢・総コレステロール(TC)またはLDL-C・HDL-C・血圧・糖尿病の有無・喫煙の有無などから計算される。本研究では、

このFRSと各リポ蛋白分画のコレステロールとの関連性を評価した。

(2) 臨床研究

臨床研究と同じ施設の健康診断の対象者の中で、Lp(a)コレステロール測定用に拡張したHPLCリポ蛋白定量法を用いて検体を測定し得た212人男性を対象に、FRSと各リポ蛋白分画のコレステロールとの関連性を評価した。臨床研究でHPLCリポ蛋白定量法のデータ安定性が検証されたことを受けて、臨床研究によりLp(a)コレステロールのデータの精度を検討した。

(3) 基礎研究

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)からのMMP-2およびMMP-9の分泌について、アッセイ系の構築を行った。

HUVECの培養には、サブカルチャー用試薬セット(Cambrex/Lonza, Walkersville, MD, USA)と、56で30分間の非働化処理したウシ胎児血清(FCS)を用いた。内皮細胞基本培地-2(EBM®-2)(Cambrex/Lonza, Walkersville, MD, USA)を用いて、37, 5%CO₂の条件下で血管内皮細胞の培養を行った。アッセイ系の構築の目的から、刺激物質は未知のLp(a)ではなく、血管壁構成細胞の刺激物質として知られるアンジオテンシン(Ang)を用いた。EBM®-2培地で培養した細胞を12ウエルプレートに播き、24時間培養した後、細胞数を約5×10⁵個/mlに調整したのち、Angを作用させ、培養液を回収後、MMP-2を測定した。MMP-2抗原量の測定にはMMP-2 Quantikine ELISA Kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を用いた。Ang受容体拮抗薬として、テルミサルタン(Wako Chemical Company, Tokyo, Japan)を用いた。

4. 研究成果

(1) 臨床研究

日常臨床の通常法(HDL-Cは直接法、LDL-CはFriedewald式、TGとTCは酵素法)で測定さ

れた血清脂質では、HDL-Cが $r=-0.341$ ($p<0.0001$)の負の相関、LDL-Cが $r=0.379$ ($p<0.0001$)と正の相関をFRSに対して示した。HDL-CとLDL-Cは元々FRSの計算式に入っており、当然の結果である。またFRSとの間に、TGが $r=0.337$ ($p<0.0001$)の正相関、non-HDL-Cが $r=0.411$ ($p<0.0001$)の正相関が確認された。HPLCリポ蛋白定量の基本法で測定された脂質データでは、通常法と同様にHDL-Cが $r=-0.342$ ($p<0.0001$)の負の相関、LDL-Cが $r=0.339$ ($p<0.0001$)と正の相関をFRSとの間に示した。TGリッチリポ蛋白においては、IDL-Cが $r=0.32$ ($p<0.0001$)、VLDL-Cが $r=0.284$ ($p<0.0001$)と有意な正相関をFRSに対して示したが、Other分画(Lp(a)およびカイロミクロン)ではFRSと相関はみられなかった。また多変量回帰分析の結果、IDL-CがFRSに対する独立した説明因子と認められたが、その際にBody mass index (BMI)も有意な関連因子として確認された。以上の臨床研究の成績は、Int J Cardiol 2013; 168: 3853-8に論文発表した。

(2) 臨床研究

Lp(a)は本来関連するLDL-Cとは全く相関を示さなかった($r=0.093$)。一方、IDL-C($r=0.188$, $p<0.01$)およびVLDL-C($r=0.184$, $p<0.01$)に対してLp(a)-Cは有意に相関し、さらにカイロミクロン-CがLp(a)に顕著に相関($r=0.28$, $p<0.0001$)したことから、Lp(a)-CはTGリッチリポ蛋白のコレステロールと有意に関連することが判明した。これを支持するようにHDL-CはLp(a)-Cと有意な逆相関を示した($r=-0.191$, $p<0.01$)。FRSとの相関分析では、non-HDL-C(総コレステロール-HDL-C)は有意な正相関を示すが、Lp(a)-Cは僅かな有意相関であった($r=0.142$, $p=0.039$)。興味深いことにLp(a)-Cが尿酸と正相関しており($r=0.216$, $p<0.005$)、もとよりLp(a)濃度はApo(a)のサイズによっては腎機能の影響を受けるこ

とから、対象者数を増やして腎機能別に検討することも必要である。本研究の成績の一部は第4回国際カイロミクロンシンポジウム(2014年3月29~30日、東京)で学会発表した。

(3) 基礎研究

FCS濃度2~10%に分けた培養においてAng(20pg/ml)を24時間添加したHUVECのMMP-2の分泌は10%FCSで有意に増加したため、ウエル内のFCS濃度を10%に設定した。また、MMP-9についてはMMP-2に比べて低値を示しており、本研究はMMP-2の測定に限定した。Angを5pg/mlで24時間インキュベーションしたHUVECでは、MMP-2分泌の非有意な増加傾向であったが、20pg/ml濃度のAngでは、MMP-2分泌は有意に増加した。Angを20pg/mlでHUVECインキュベーションしたところ、8時間後においてMMP-2分泌は約1.5倍に増加し、さらに24時間後においては約2倍の有意な増加が認められた。AngによるHUVECのMMP-2分泌には作用時間依存性が示された。臨床至適濃度に合せてテルミサルタンの添加濃度を $0.5\mu\text{M}$ としたところ、Angの24時間刺激によるHUVECのMMP-2分泌濃度の上昇はテルミサルタンの添加により有意に抑制された。以上より、血管内皮細胞からのMMP-2分泌はAng2刺激によって増大し、Ang2受容体を介して作用が発現することが確認された。さらなる機序の解明が必要であるが、心臓血管病のバイオマーカーとしてMMP-2を評価する意義が示唆され、臨床研究による検証が期待される。本成績は臨床化学2014(印刷中)に論文発表された。

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16件)

Yoshida H, Hirowatari Y, Kurosawa H, et al. Estimation of lipoprotein profile in patients with type II diabetes and its relevance to remnant lipoprotein

cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2012; 222: 541-4.

Miida T, Nishimura K, Okamura T, Hirayama S, Ohmura H, Yoshida H, et al. A multicenter study on the precision and accuracy of homogeneous assays for LDL-cholesterol: Comparison with a beta-quantification method using fresh serum obtained from non-diseased and diseased subjects. *Atherosclerosis* 2012; 225: 208-15.

Orimo H, Ueno T, Yoshida H, et al. Nutrition education in Japanese medical schools: a follow-up survey. *Asia Pac J Clin Nutr* 2013; 22: 144-9

Yoshida H, Shoda T, Yanai H, et al. Effects of pitavastatin and atorvastatin on lipoprotein oxidation biomarkers in patients with dyslipidemia. *Atherosclerosis* 2013; 226: 161-4

Takase S, Osuga J, Fujita H, Hara K, Sekiya M, Igarashi M, Takanashi M, Takeuchi Y, Izumida Y, Ohta K, Kumagai M, Nishi M, Kubota M, Masuda Y, Taira Y, Okazaki S, Iizuka Y, Yahagi N, Ohashi K, Yoshida H, et al. Apolipoprotein C-II deficiency with no rare variant in the APOC2 gene. *J Atheroscler Thromb* 2013; 20: 481-93

Ito K, Yoshida H, Yanai H, et al. Relevance of intermediate-density lipoprotein cholesterol to Framingham risk score of coronary heart disease in middle-aged men with increased non-HDL cholesterol. *Int J Cardiol* 2013; 168: 3853-8

Hirowatari Y, Yoshida H, Kurosawa H, Manita D, Tada N. Automated measurement method for the determination of vitamin E in plasma lipoprotein classes. *Sci Rep*. 2014 Feb 13; 4: 4086

Miida T, Nishimura K, Okamura T, Hirayama

S, Ohmura H, Yoshida H, et al. Validation of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples from healthy and diseased subjects. *Atherosclerosis* 2014; 233: 253-9

Masuda D, Nishida M, Arai T, Hanada H, Yoshida H, et al. Reference Interval for the Apolipoprotein B-48 Concentration in Healthy Japanese Individuals *J Atheroscler Thromb* 2014 Feb 26. [Epub ahead of print]

吉田博、木杉玲子、小池優、黒澤秀夫。トリグリセリド(TG)とレムナントリポ蛋白。臨床病理 2012; 60: 343-8.

吉田博、佐藤亮、正田暢。アポリポ蛋白 C-II欠損症。日本臨床(先天性代謝異常症候群第2版下巻) 2012; 20: 20-25.

廣渡祐史、吉田博。高速液体クロマトグラフィによるリポ蛋白定量法。臨床化学 2012; 41: 327-35

吉田博。脂質異常症の治療 食事療法。臨床栄養 2013; 122: 806-9

吉田博。原発性カイロミクロン血症 原発性 型高脂血症。日本臨床 2013; 71 (Suppl 3): 160-5

吉田博。血清総コレステロールの高値と高トリグリセリド血症を伴う脂質異常症の診断 LDLコレステロールの高値を紐解く。臨床検査 2013; 57: 1031-4

吉田博。ニコチン酸とHDL。ドクターサロン 2013; 57: 538-42

佐藤亮、齊藤正三、小池優、吉田博。培養血管内皮細胞のMMP-2の制御におけるAngiotensin の効果。臨床化学2014(印刷中)

[学会発表](計11件)

吉田博。ランチョンセミナー7。動脈硬化リスク評価におけるレムナントリポ蛋白の有用性。第61回日本医学検査学会(24年6月9日、津)

吉田博。心血管病予防における抗酸化ビタミンおよびn-3系脂肪酸の臨床的意義。

シンポジウム 7-3 第 67 回日本栄養食糧学会、名古屋（平成 25 年 5 月 26 日）

吉田博．心血管病リスク評価のためのリポ蛋白酸化バイオマーカー．シンポジウム 4 第 45 回日本動脈硬化学会（平成 25 年 7 月 19 日）

吉田博．LDL-C 測定の臨床的重要性を考える．ランチョンセミナー 4 第 53 回日本臨床化学会年次学術集会、徳島（平成 25 年 8 月 31 日）

吉田博．運動による動脈硬化予防・治療の意義と限界．シンポジウム 6 運動と脂質代謝 第 68 回日本体力医学会、東京（平成 25 年 9 月 21 日）

Hiroshi Yoshida. Trends in lipoprotein Oxidation biomarkers for cardiovascular disease risk. Symposium 6, 13th Asian Pacific Federation of Clinical Biochemistry 2013 (Bali, Indonesia, 28 Oct 2013)

吉田博．臨床検査のガイドライン JSLM2012 の活用法 8 代謝栄養．委員会特別企画 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会、神戸（平成 25 年 11 月 1 日）

吉田博．LDL-C 測定法の歩みと臨床的意義．ランチョンセミナー 10 第 60 回日本臨床検査医学会学術集会、神戸（平成 25 年 11 月 2 日）

吉田博．高 LDL-C 血症の食事療法．「脂質異常症 教育セッション～栄養のエビデンスに根差した食事療法～」第 7 回日本臨床栄養協会関東地方会、東京（平成 25 年 11 月 30 日）

吉田博．メタボリックシンドローム予防における脂質異常症と機能性食品．シンポジウム 4 「メタボリックシンドロームに取り組む機能性食品」第 11 回日本機能性食品医用学会、東京（平成 25 年 12 月 8 日）

Hirowatari Y, Manita D, Yoshida H, Ito

K, Kamachi K, Tada N. Tanaka A. Analysis of cholesterol levels in chylomicrons with anion-exchange chromatography. 第 4 回国際カイロミクロンシンポジウム、東京（平成 26 年 3 月 29 日）

〔図書〕（計 4 件）

柳内秀勝、吉田博．B 代謝疾患．3 脂質異常症．ビジュアル栄養療法、メカニズムからわかる治療戦略（丸山千寿子、中屋豊編）．東京：南江堂，2012：72-80

吉田博．脂質異常症．臨床検査のガイドライン LSLM2012（日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会編）2012 年 12 月：326-30、宇宙堂八木書店、東京

吉田博．脂質異常症を是正します-n-3 系多価不飽和脂肪酸の効果-そうだったんだ！脂肪酸 循環器疾患との深い関係（伊藤浩編）．東京：文光堂，2013：58-63.

吉田博．リポ蛋白(a)は動脈硬化性疾患の多面的危険因子．冠動脈疾患のパーフェクトマネジメント（伊藤浩編）．東京：南江堂，2013：92-7

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）
該当なし

取得状況（計 0 件）
該当なし

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

吉田 博（YOSHIDA Hiroshi）
東京慈恵会医科大学・医学科・教授
研究者番号：30333529

(2)研究分担者

正田 暢（SHODA Toru）
東京慈恵会医科大学・医学科・助教
研究者番号：80266634

(3)連携研究者

該当なし