

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461116

研究課題名(和文) 安定同位体を用いたHDL機能評価とハプトグロビン型別による動脈硬化リスクの探索

研究課題名(英文) Exploratory research of atherosclerosis risk by HDL function evaluation and haptoglobin typing

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロール逆転送の第一ステップは細胞からのコレステロール引き抜き(C-efflux)であり、このHDLの最も重要な機能の評価法として安定同位体を用いたアッセイ系の確立に取り組んだ。近年、冠動脈疾患の発症率は、血清HDL-C値よりもHDLによるC-efflux能と強い負の相関があることが報告されている。C-efflux能については、これまでのラジオアイソトープ(RI)で標識されたコレステロールを用いた測定法ではなく、臨床現場でC-efflux能測定を普及させるために安定同位体を用いたC-efflux能測定法が必要と考え構築した。本法は、RI法の代替法として有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To establish cholesterol efflux capacity (CEC) method with stable isotope-labeled cholesterol, a fundamental method to progress this study project, was viewed as a critical issue to be addressed. The incidence of cardiovascular events is inversely correlated, to a greater extent, with cholesterol efflux capacity (CEC) than with HDL-cholesterol level. Here we established a CEC measurement technique using stable isotope-labeled cholesterol as an alternative to conventional radioisotope (RI)-labeled cholesterol. Our established stable-isotope method will facilitate CEC measurement in clinical laboratories.

研究分野：動脈硬化

キーワード：動脈硬化 HDL コレステロール引き抜き能 安定同位体

1. 研究開始当初の背景

糖尿病では動脈硬化を促進要因である酸化ストレスが亢進しているが、ヒトでは抗酸化物質を用いた治療では心血管病のリスクを軽減できない (Yoshida H, et al. *ATVB* 1997; 17: 1438-46, Witztum JL. *Diabetes* 1997; 46(supple2): S112-4, Steinberg D, Witztum JL. *Circulation* 2002; 105: 2107-11)。Hp 遺伝子には Hp1 と Hp2 の対立遺伝子があり、Hp1-1、Hp2-1 と Hp2-2 のフェノタイプに分かれる。日本人ではそれぞれ 7%、40% と 53% の分布である。Hp2-2 は抗酸化能が低く、Hp2-2 をもつ糖尿病患者では酸化ストレスの亢進が著しい。Hp2-2 型の糖尿病患者では心血管病のリスクが数倍高く、抗酸化ビタミン E の投与によりリスクが低下するが、Hp1-1 や Hp2-1 型の糖尿病患者ではビタミン E による心血管病発症の抑制はみられていない。このような Hp2-2 の心血管病の易発症性の要因の一つは HDL の酸化障害が想定されているが不明な点が多い。HDL の機能としては細胞からのコレステロール引き抜き能から始まるコレステロール逆転送 (RCT)、抗酸化作用、抗炎症作用、抗血栓作用や血管機能保全作用など多彩であるが、基本機能は RCT に関わる作用である。この RCT の第一段階である細胞からのコレステロール引き抜きについては従前、ラジオアイソトープ (^3H -cholesterol) を用いて測定されている。しかしながら、HDL 機能をみる質的評価を実地臨床の検査の現場に普及するには脱アイソトープによるアッセイ法の確立が望まれる。放射性同位体では ^3H -cholesterol や ^{14}C -cholesterol が用いられるが、安定同位体としては $^2\text{H}_4$ -cholesterol や $^{13}\text{C}_2$ -cholesterol である。放射性同位体を用いた研究として、Rader らは HDL の C-efflux 機能が HDL コレステロール値に独立して頸動脈硬化の重症度

や冠動脈疾患の発症に逆相関することを報告している (*N Engl J Med* 2011; 364: 127-35)。さらに Levy らは Hp2-2 型の糖尿病患者では C-efflux 機能が低下していることを報告している (*Circ Res* 2006; 99: 1419-25)。

2. 研究の目的

易酸化ストレス性についてハプトグロビン (Hp) のフェノタイプから評価し、安定同位体を用いた HDL 機能評価と Hp 型別による動脈硬化リスクの探索が本研究の目的であるが、先ずは基礎研究、臨床の双方において有用な安定同位体を用いた HDL の C-efflux 機能を高精度に評価する方法の確立に取り組む。

C-efflux 能は、従来ラジオアイソトープ (RI) で標識したコレステロールを用いて測定されてきた (*J. Lipid. Res.* 40: 781-96, 1999; *J. Vis. Exp.* 6: e3810, 2012)。 ^3H 等の放射性同位体で標識されたコレステロールを J774 細胞、Raw264 細胞、あるいは分化させた THP-1 細胞に取り込ませた後、血清 HDL を細胞と共存させ、細胞から上清中に移動したコレステロールの放射活性を測定する方法である。この方法は多くの研究者の間でゴールドスタンダードとして広く活用されているものの、RI を使用することから実施できる施設に制限があり、臨床検査現場で活用することは容易ではない。こうした背景から、BODIPY (boron dipyrromethene difluoride) で標識されたコレステロールを用いる蛍光法が開発された (*J. Lipid. Res.* 52: 2332-40, 2011)。この方法は、RI を使用することなく高感度でハイスループットに C-efflux 能を測定する方法として注目されている。しかしながら、BODIPY 標識コレステロールは天然型のコレステロールと化学構造が異なることから、HDL あるいはアポリポタンパクとの親和性が天然型コレステロールのそれと異なることが考えられ、RI 法の代替法として適切か否かについては議論の余地がある。

RI を用いないもう一つの C-efflux 能測定法として安定同位体を用いた方法が報告されている (*J. Biol. Chem.* 277: 10021-7, 2002; *Biochim. Biophys. Acta.* 1771: 853-63, 2007)。この方法は、天然型コレステロールと安定同位体標識したコレステロールの測り分けができることやリン脂質等コレステロール以外の分子の同時測定も可能な長所がある (*Curr Med Chem.* 23: 3882-908, 2016)。

しかし、これまで報告された方法では、質量分析計で測定するためにコレステロールの誘導体化やエステル型コレステロールを遊離型コレステロールに変換する加水分解等の煩雑な前処理が必要であり、臨床検査の現場で普及させるには前処理の簡便化が必要と考えられる。

今回我々は、RI法の代替となる安定同位体を用いた C-efflux 測定法の構築を試みた。質量分析には高感度な Q-TOF による LC/MS システム (APCI 法) を採用することで培養上清中の微量のコレステロールを検出可能とし、アクセプターとの共培養時間を短縮化、及び前処理の簡便化を試みた。構築した測定法の妥当性を検証するため、患者より採取したアポリポ蛋白 B (apoB) 除去血漿を用い C-efflux 能を安定同位体法、RI 法、及び蛍光法で測定し各方法の相関性を検討した。更にそれら 3 法の比較を行うため、各方法で測定した C-efflux 能と血清 HDL-C 値及び apo-A 値との相関性を検討した。

3. 研究の方法

対象及び検体の調製 :

血清は、東京慈恵会医科大学を外来で受診した 26~83 歳の患者 41 人 (男性 22 名、女性 19 名) から採取した。本研究への使用については、「臨床検査を終了した検体の精度管理、機器・試薬の検討、教育のための使用についての包括同意」として、東京慈恵会医科大学倫理委員会にて承認されている (26-348)。これらの血清脂質の平均値は、総コレステロールが $183.5 \pm 24.3\text{mg/dl}$ (135 - 217mg/dl)、LDL コレステロールが $101.1 \pm 19.8\text{mg/dl}$ (68 - 138mg/dl)、HDL コレステロールが $61.7 \pm 18.0\text{mg/dl}$ (36 - 94mg/dl)、トリグリセライドが $81.5 \pm 33.0\text{mg/dl}$ (38 - 147mg/dl) であった。また、積水メディカルに勤務するボランティアの健常人 9 名の血液から調製した血清も一部の試験に使用した。各ボランティアからは、積水メディカルの社内倫理規定に則り、書面によるインフォームドコンセントを事前に取得した。

安定同位体 ($[d_7]$ -cholesterol) を用いた

C-efflux :

10%FBS-DMEM メディウムで 600,000cells/ml に希釈した J774 細胞を 24well プレートに 0.5ml/well で播種し、同時に $[d_7]$ -cholesterol を 10 $\mu\text{g/ml}$ 、ACAT inhibitor を 2 $\mu\text{g/ml}$ で添加して 24 時間培

養した。PBS で洗浄後、ACAT inhibitor を 2 $\mu\text{g/ml}$ 、cAMP を 0.3mM に希釈した 0.2%BSA-DMEM メディウムを 0.5ml/well ずつ添加して 18 時間培養した。PBS で洗浄後、apoB 除去血清を含む 0.2%BSA-DMEM メディウムを 0.25ml/well ずつ添加し、2 時間から 6 時間培養した。

質量分析による各 cholesterol の測定 :

乾固したサンプルをイソプロパノールに再溶解し、その一部を LC/MS システムに注入した。LC/MS システムには、LaChrom (HITACHI 社)、UHRS Q-TOF MS Maxis3G (Bruker 社)、CORTECS UPLC C18 (1.6 μm , 2.1 \times 50mm) (Waters 社) を使用した。この際、流速を 0.3mL/min、カラム温度を 40 とし、アセトニトリルとメタノールを 4:1 で混合した溶液を移動相に使用してアイソクラティック溶出を行った。質量分析には、APCI 法を用いた。次いで、10、5、2、1ng/ml の濃度に希釈した $[d_0]$ -cholesterol、 $[d_4]$ -cholesterol、及び $[d_7]$ -cholesterol のピーク面積から検量線を作成し、サンプル中に含まれる各 cholesterol 量を算出して内部標準測定値で $[d_0]$ -cholesterol と $[d_7]$ -cholesterol の測定値を補正した。引抜き率 (%) は、培養上清から得られた $[d_7]$ -cholesterol の測定値からブランク値 (apoB 除去血清を添加せずに培養した細胞上清の測定値) を差し引き、それを細胞から得られた $[d_7]$ -cholesterol の測定値で割って算出した。その他、既報の方法に基づき RI ($[^3\text{H}]$ -cholesterol) を用いた C-efflux および蛍光体 (BODIPY-cholesterol) を用いた C-efflux について検討した。

4. 研究成果

質量分析による各 cholesterol の測定 :

安定同位体を用いて C-efflux 能を測定するには、天然型 cholesterol、内部標準用 cholesterol、及び細胞ラベル用 cholesterol

を質量分析計で測り分ける必要がある。LC/MS (APCI 法) で、 $[d_0]$ -cholesterol、 $[d_4]$ -cholesterol、及び $[d_7]$ -cholesterol を測定した結果、 $[d_0]$ -cholesterol から得られた ($[d_0]$ -cholesterol + H · H₂O)⁺ の m/z 比は 369.3520、 $[d_4]$ -cholesterol から得られた ($[d_4]$ -cholesterol + H · H₂O)⁺ の m/z 比は 373.3767、 $[d_7]$ -cholesterol から得られた ($[d_7]$ -cholesterol + H · H₂O)⁺ の m/z 比は 376.3955 だった。従って、各々の cholesterol を質量分析で測り分けられることが確認された。

安定同位体を用いた C-efflux 能測定法の分析性能：

内部標準に $[d_4]$ -cholesterol、細胞ラベルに $[d_7]$ -cholesterol を適用したときの C-efflux 能測定系の分析性能を調べた。アクセプター添加後の細胞培養時間と引抜き率との関係を調べた結果、apoB 除去血清では cAMP 添加系及び非添加系の両方で、apoA-1 では cAMP 添加系のみで、培養時間に依存して引抜き率 (%) が上昇した。apoB 除去血清の添加濃度と引抜き率との関係を調べた結果、cAMP 添加時と cAMP 非添加時の何れでも apoB 除去血清の添加濃度に依存して引抜き率が上昇した。また、このアクセプター濃度依存的な引抜き率の上昇について、RI 法及び BODIPY-cholesterol を用いた蛍光法でのそれと比較した。結果、引抜き率の上昇は、cAMP 添加時と cAMP 非添加時の何れでも安定同位体法と RI 法で同等であったが、蛍光法では顕著に高かった。安定同位体法における同時再現性を 3 例の患者検体を用い評価した結果、内部標準による補正なしでは CV(%) が 10.6-18.8% (n=5) であったのに対し、内部標準による補正をした場合は CV(%) が 7.3-9.5% (n=5) であった。

RI 法及び蛍光法との相関性：

41 例の検体を用い安定同位体法、RI 法、及び蛍光法で引抜き率を測定し、測定法間の相関性を検討した。まず cAMP 添加条件において、安定同位体法での引抜き率は RI 法での引抜き率と強い正の相関が認められた。安定同位体法での引抜き率は、蛍光法での引抜き率とも正の相関が認められたが、RI 法での引抜き率との相関に比べ弱い相関であった。RI 法での引抜き率は、蛍光法での引抜き率よりも安定同位体での引抜き率の方が強い正の相関を示した。また、cAMP 非添加条件における各測定法での引抜き率は、cAMP 添加条件のときと同様に、安定同位体の引抜き率は蛍光法での引抜き率よりも RI 法での引抜き率と強い正の相関を示し、RI 法での引抜き率は蛍光法での引抜き率よりも安定同位体法での引抜き率と強い正の相関を示した。

HDL-C 値及び apoA-1 値との相関性：

安定同位体法、RI 法、及び蛍光法の各測定系で測定したコレステロール引き抜き率と血清 HDL-C 値及び apoA-1 値との相関性を調べた。その結果、安定同位体法での引抜き率及び RI 法での引抜き率は、血清 HDL-C 値及び血清 apoA-1 値と強い正の相関を認めた。一方、蛍光法での引抜き率は血清 HDL-C 値及び血清 apoA-1 値と有意な正の相関を示したが、安定同位体法及び RI 法での引抜き率と HDL-C 値及び血清 apoA-1 値との相関ほど強い相関ではなかった。

結論

今回我々は、安定同位体を用いた C-efflux 測定法を確立した。この測定法は、コレステロールの誘導體化や加水分解のような煩雑な操作が必要なく、精度が高い。ゴールドスタンダードと言われる RI 法と同じ条件で細胞とのインキュベーションを行うことができ、RI 法との相関性も高い。以上のことから、今回確立した安定同位体を用いた C-efflux 測定法は RI を使用できない臨床検査施設や研究施設において RI 法の代替法として有用であり、HDL の代謝や機能に関する研究に役立つものと期待される。

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 16 件)

Shimizu T, Miyazaki O, Iwamoto T, Usui T, Sato R, Hiraishi C, Yoshida Y. Novel method for measuring cholesterol efflux capacity using stable isotope-labeled cholesterol. J Lipid Res, in submission, 2018.

Sato R, Hiraishi C, Yoshida H. Effect of angiotensin II on matrix metalloproteinase-2 secretion in human umbilical vein endothelial cells. J Cardiovasc Pharmacology 2018; 71: 233-239.

Uchiyama K, Aiki H, Matsumura A, Saruta K, Yuasa A, Ito Z, Takami S, Saito K, Ohtaki Y, Suzuki S, Hayashi S, Koido S, Yoshida H, Ohkusa T, Saruta M. The efficacy of the consumption of n-3 polyunsaturated fatty acids for the maintenance of remission in patients with

inflammatory bowel disease. Food Nutri Sci 2018; 9: 105-118

Tomono Y, Hiraishi C, Yoshida H. Age and sex differences in serum adiponectin and its association with lipoprotein fractions. Ann Clin Biochem. 2018; 55: 165-171

Manita D, Yoshida H, Hirowatari Y. Cholesterol Levels of Six Fractionated Serum Lipoproteins and its Relevance to Coronary Heart Disease Risk Scores. J Atheroscler Thromb. 2017; 24: 928-939

Yoshida H. Determination of Fasting and Non-Fasting Cholesterol Levels of Low- and High-Density Lipoproteins with Homogenous Assays: A Promising Reliable Way to Assessment of Dyslipidemia. J Atheroscler Thromb 2017; 24: 569-71

Yoshida H. Lomitapide, tailored to patients with homozygous familial hypercholesterolemia, is just about meeting with good news to them. J Atheroscler Thromb 2017; 24: 390-2

Yanai H, Hirowatari Y, Ito K, Kurosawa H, Tada N, Yoshida H. Understanding of Diabetic Dyslipidemia by Using the Anion-Exchange High Performance Liquid Chromatography Data. J Clin Med Res. 2016; 8: 424-6

Kishimoto Y, Yoshida H, Kondo K. Potential Anti-Atherosclerotic Properties of Astaxanthin. Mar Drugs. 2016 Feb 5;14. pii: E35

de Carvalho LS, Yoshida H. Monthly PCSK9 inhibitors: The CHOICE for prolonged duration of effect. Atherosclerosis. 2016; 254: 300-2

Manita D, Hirowatari Y, Yoshida H. A rapid anion-exchange chromatography

for measurement of cholesterol concentrations in five lipoprotein classes and estimation of lipoprotein profiles in male volunteers without overt diseases. Ann Clin Biochem. 2015; 52(Pt 6):638-646

Vallejo-Vaz AJ, Kondapally Seshasai SR, Kurogi K, Michishita I, Nozue T, Sugiyama S, Tsimikas S, Yoshida H, Ray KK. Effect of pitavastatin on glucose, HbA1c and incident diabetes: A meta-analysis of randomized controlled clinical trials in individuals without diabetes. Atherosclerosis. 2015; 241: 409-418

Yoshida H, Ito K, Sato R, Kurosawa H, Tomono Y, Hirowatari Y, Shimizu M, Tada N. Clinical relevance of decreased ratios of serum eicosapentaenoic acid/arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid/AA to impaired arterial stiffness. Int J Cardiol. 2014; 177: 517-519

吉田 博 . 脂質異常症の診断 . 医学のあゆみ 2017; 263: 1075-1080

吉田 博 . リポ蛋白分析 : リポ蛋白分画の評価と陰イオン交換クロマトグラフィ法 . 臨床病理 2016; 64: 643-50

佐藤 亮、阿部美佐子、齊藤正二、小池優、真仁田大輔、廣渡祐史、吉田 博 . イオン交換クロマトグラフィーによるリポ蛋白分析システムの基礎的評価および臨床的有用性 . 臨床病理 2015; 63:1023-1028

〔学会発表〕(計 8 件)

平石千佳、吉田 博、小峯直彦、長谷川智子 . 臨床検査値から見た高齢者腎臓病の評価 . 第 61 回日本糖尿病学会 . 東京、2018.5

吉田 博 . 会長講演 健康長寿と歩む
機能性食品 ~ 脂質異常症と動脈硬化の
視座から ~ . 第 15 回日本機能性食品医
用学会総会、東京、2017.12

宮崎 修、清水 知、佐藤 亮、吉田
博 . プロジェクト報告 . 安定同位体を用いたコレステロール引き抜き能評価
系の検討 . 第 57 回日本臨床化学会 . 札
幌、2017.10

吉田 博 . Update5 . 血清脂質検査に関
する最新の話 . 第 27 回臨床内分泌代
謝 Update . 神戸、2017.11

吉田 博 . シンポジウム 13 . 冠動脈疾
患のリスク抑制に貢献する Lp(a)低下
の期待 . 第 65 回日本心臓病学会学術集
会、大阪、2017.10

吉田 博 . 明日へのシンポジウム 2 .
脂質異常症診療の update . 再び注目さ
れるリスクファクター Lp(a) . 第 49 回
日本動脈硬化学会、広島、2017.7

廣渡祐史、真仁田大輔、吉田 博 . 健
常者におけるリポ蛋白中ビタミン E 類
の評価および動脈硬化リスクファクタ
ーとの関連性 . 第 49 回日本動脈硬化学
会 . 広島、2017.7

廣渡祐史、真仁田大輔、吉田 博 . 脂
質異常症患者のリポ蛋白中ビタミン E
の評価 . 第 48 回日本動脈硬化学会、東
京・新宿、2016、7

〔図書〕(計 5 件)

吉田 博 . 栄養・食糧学用語辞典 (第
2 版) 分担執筆 . 日本栄養・食糧学会
編 . 東京、建帛社、2015

吉田 博 . リポタンパク関連臨床指標
の進歩と課題 . Annual Review2016 糖
尿病・代謝・内分泌 (寺内康夫、伊藤
裕、石橋俊、編) . 東京 : 中外医学社、
126-135, 2016

吉田 博 . アポリポ蛋白 . 別冊プラク
ティス糖尿病を診るポケット検査事典

(島田朗、黒瀬健、三浦義孝、編) . 東
京 : 医歯薬出版、148-50、2016

吉田 博、廣渡祐史 (埼玉県立大学) .
イオン交換クロマトグラフィによるリ
ポ蛋白ビタミン E 濃度の自動測定法の
確立 . ビタミン E 研究の進歩 (ビ
タミン E 研究会、編) . 東京 : サンプラ
ネット、10-14,2016

吉田 博 . 脂質代謝異常 . 研修医・医
学生のための症例から学ぶ栄養学 (折
茂英生、勝川史憲、田中芳明、吉田 博、
編) . 東京 : 建帛社、18-22, 2017

〔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〕

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・医学部・教授
研究者番号 : 30333529

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

清水 和 (SHIMIZU, Tomo)
宮崎 修 (MIYAZAKI, Osamu)
平石千佳 (HIRAISHI, Chika)
佐藤 亮 (SATO, Ryo)