

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670450

研究課題名(和文) 内皮リパーゼ(EL)欠損に起因する高HDL血症の発見とELの生理機能の解明

研究課題名(英文) Discovery of patients with hyper-HDL cholesterolemia possibly due to endothelial lipase (EL) and analysis of EL physiological function

研究代表者

山下 静也 (Yamashita, Shizuya)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授

研究者番号：60243242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は著明な高HDL血症を示し、頸動脈肥厚を有する内皮リパーゼ(EL)の活性・蛋白量が極端に低値を示し、またHDL粒子径の増大とHDL粒子がTG richであることも見出した。しかし、EL遺伝子のエクソン及びエクソン・イントロン境界領域に有意な変異を見出すには至っていない。EL濃度は保存条件によるポリマー化など、様々な因子により影響されることが明らかとなった。本症例ではEL値は低い傾向を示すものの、測定系が安定せず、現在はEL遺伝子の上流の遺伝子変異ないし、EL濃度に影響する蛋白の異常による高HDL血症と考えている。

研究成果の概要(英文)：We found a subject who showed a marked hyper HDL-cholesterolemia with intima-media complex thickening of carotid artery, possibly due to extreme low plasma activity and concentration of endothelial lipase. HPLC analysis also showed that HDL particle was increased in diameter and contains rich TG. However, exon sequence analysis exhibited that significant mutations have not been found in the exon and exon-intron boundaries of EL. Therefore, we reexamined EL mass, but it is almost within normal limits. EL concentration have been shown to be influenced by various factors including stock conditions. In this case, EL concentration tends to be low, but its values often vary. Hyper HDL-cholesterolemia is considered to be due to mutations in upstream regulatory regions of EL genes or abnormalities of proteins which can modulate EL activity.

研究分野：動脈硬化、脂質代謝、循環器内科

キーワード：高HDL血症 内皮リパーゼ

1. 研究開始当初の背景

我々が見出した秋田県大曲地区に集積していた CETP 欠損症による高 HDL-C 血症は血中 HDL-C 濃度は 60 ~ 70mg/dl をボトムにそれ以上高いとむしろ虚血性心電図変化を有する割合が高く、また、いわゆる長寿症候群ではなかった。また高 HDL 血症を呈する CETP 欠損症患者の HDL は必ずしもコレステロール引き抜き能は高くなく、HDL としての抗動脈硬化作用が強くないことも示した。また、我々の検討により、HDL 濃度を低下させるプロブコールは本邦でも家族性高コレステロール血症 (FH) など一部の症例にしか使用されてこなかったが、近年 FH 患者でプロブコール内服群は非内服群と比較して心血管イベントが有意に抑制されることを報告した。このことはプロブコールが HDL 濃度を低下させるものの、HDL の持つ抗酸化作用を増強するなどして HDL の抗動脈硬化作用の機能を促進させたものと考えられている。このように単に HDL 濃度のみを上昇させても HDL 機能が損なわれると全体として HDL の抗動脈硬化作用が十分に作用しないことが考えられた。しかし、2007 年から最近にかけて、CETP 阻害剤による HDL-C 上昇が心血管イベントの抑制をエンドポイントとする大規模臨床試験の結果が発表されてきたが、いずれも抑制効果は認めなかったばかりか、むしろイベントを増やすという結果も発表された。これらのことから、CETP 阻害による HDL-C の見かけの上昇のみでは抗動脈硬化作用は機能せず、コレステロール引き抜きなど HDL 機能も同時に評価する必要がある。私共の検討では高 HDL 血症の約 6 割は CETP 欠損症であるが、成因不明の高 HDL 血症も多く動脈硬化との関連も不明である。EL はリポ蛋白リパーゼ遺伝子ファミリーに属する phospholipase の 1 つであり、マウスの EL 欠損は HDL HDL-C を増加させ、EL 増加は HDL-C を低下させる。EL は主に血管内皮細胞で合成され、内皮細胞上のプロテオグリカンと結合し、HDL リン脂質の水解に関

与する。EL と動脈硬化との関連は十分明らかになっていないが、HDL-C が増加する EL 遺伝子多型で心筋梗塞が減らないことが報告されている。

私共が見出した EL 活性・蛋白の完全欠損による高 HDL 血症のリポ蛋白プロファイルを HPLC で解析すると、健常者や CETP 欠損症とも大きく異なり、従来経験した高 HDL 血症の中でも極めて特異なパターンを示した。私共の EL 欠損症症例は他に動脈硬化危険因子を有さないが、既に頸動脈プラークを有し、動脈硬化惹起性で HDL 機能異常の可能性が示唆された。本研究では『HDL の質を修飾して見かけ上 HDL-C を上昇させるという手法が動脈硬化の治療薬の開発手法としては正しくない』という私共の仮説を証明するため、EL 欠損症の家系の分析と患者のリポ蛋白を性状と機能面から解析を行う。

2. 研究の目的

内皮リパーゼ (EL) 欠損に起因する高 HDL 血症の発見と EL の生理機能の解明

3. 研究の方法

- 1) EL 完全欠損症例のリポ蛋白異常の解析
- 2) EL 完全欠損症例の遺伝子変異の同定と家計解析
- 3) EL 欠損症の HDL 機能の解析
- 4) EL 欠損症の HDL の proteomics, lipidomics による解析

4. 研究成果

- 1) EL 完全欠損症例のリポ蛋白異常の解析
我々は著明な高 HDL 血症を示し、頸動脈エコーで内膜中膜複合体肥厚やプラークを認め、内皮リパーゼ (EL) の活性・蛋白量が極端に低値を示す症例を見出した。当初、血中 EL 濃度は 32.3 pg/ml、EL 活性は 1.8 FL/min/ml と著しく低下しており、EL 欠損症が強く疑われた。EL 濃度は他大学で数十例以上症例を集積している研究者との話し合いで十分 EL 欠損症の可能性があるということであった。また、HPLC による解析では、健常人と比較して

EL欠損症疑いのHDL分画ではコレステロール、リン脂質が明らかに増加しており、また HDL 粒子径の増大と HDL 粒子が TG rich であることも見出し、本症例の高 HDL 血症が CETP 欠損症とは明らかに異なり、また EL 活性の低下のみで説明するのは困難であることが示唆された。

2) EL 完全欠損症例の遺伝子変異の同定と家計解析

EL 遺伝子変異を同定するため、本症例の全ゲノム遺伝子解析を行ったところ、EL 遺伝子のエクソン及びエクソン・イントロン境界領域に有意な変異を見出すには至らなかった。また、ATP binding cassette A1 のヘテロ変異を見出したが、ほかに高 HDL 血症の原因となりうる遺伝子変異も見出すことはできなかった。

そこで、以前は別の研究機関で測定した EL 濃度を本院で再度測定したところ、EL 濃度はほぼ正常範囲内にあった。そこで、最初に測定を依頼した機関と当方で EL 濃度の測定について細かい条件検討も含めて検討を行った。

別の研究機関において同一条件のサンプルを Human EL ELISA を用いて 4 回測定し、測定間再現性を見たところ、4 回の測定において再現性を確認した。また、血清、血漿いずれにおいても測定対象として問題ない結果が得られた。

一方、当施設で同様の ELISA kit を用いて施行し、AP-96(A450-A660)測定値を別の研究機関の基準値と比較したところ、血漿は高い再現性が得られたが、血清は施設間で差を認めた。当施設の AP-96 リーダーはフィルターの劣化が考えられ、A650 の吸光度が高値を示していたために CV が不良になっていることが示唆された。通常、吸光度は全く検出されないはずであり、この原因により、血漿より吸光度の低い血清は影響を受けたことが示唆された。

両者間での測定値差は検体の前処理方法(スピンドウの有無)によることも示唆され、前処理による変動には検体差があるため、前処理は行わない方がよいものと思われた。

また、採血後翌朝まで 4 で保存した場合、EL 濃度は低値となった ($p < 0.01$)。8 時間室温放置したのも EL 濃度は低値となった ($p < 0.05$)。EL を測定するために、当施設検査部で測定した残血清を用いることは、採血後の処理が EL 測定するには時間がかかっており、これらの検討から適当でないと思われた。最初に測定した値が低値に出た原因はさまざま考えられたが、この採血後の処理時間も十分寄与している可能性が考えられた。

検体保存の検討として、4 倍希釈検体に 5mM-EDTA の添加やインキュベートすることで保存安定性が保たれるかどうか検討した。EDTA は吸光度に変化が見られず、インキュベートは吸光度が下がることより、いずれも不要と判断した。またもしアグリゲーションを起こしている場合はそれをほどく意味で還元剤である DTT, TCEP を使用したところ、吸光度は上昇しているものも認められたが、一部低下しているものもあり、一定の傾向は示さなかった。したがって、還元剤を入れることは好ましくないと判断した。

3) EL 欠損症の HDL 機能の解析

4) EL 欠損症の HDL の proteomics, lipidomics による解析

3), 4)に関しては EL 欠損症として確認できなかったため未施行である。

EL 濃度は血清と EDTA 血漿、採血後の保存条件によるポリマー化の可能性など、様々な因子により影響されることが明らかとなり、本症例では EL 濃度は低い傾向を示すものの、最終的に測定系が安定しなかった。現在は EL 遺伝子上流の遺伝子変異ないし、EL 濃度に影響する蛋白の異常による高 HDL 血症と考えている。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山下静也 (Yamashita Shizuya)

大阪大学医学系研究科 特任教授

研究者番号 : 60243242