

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09121

研究課題名(和文)新規HDL機能評価法の実用化と冠動脈疾患リスクの層別化

研究課題名(英文)Clinical significance of cholesterol uptake capacity, a novel assay of high-density lipoprotein function, in coronary artery disease

研究代表者

石田 達郎 (Tatsuro, Ishida)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：00379413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、非放射性、無細胞、短行程、High-throughputなHDL特異的コレステロール取り込み能の測定系を開発した。本研究では、この新規HDL機能評価法(コレステロール引き抜き能：CUC)を臨床へ実用化し、冠動脈疾患のリスクの階層化に役立つかどうかを検証した。CUCは、細胞を用いた従来のコレステロール引き抜き能と強い相関を認めた。また、CUCはHDLの抗動脈硬化機能を反映し、冠動脈疾患の予後、および冠動脈プラークの脂質コア量の制御因子であることが証明された。今後、日常診療において本測定法が普及することにより、冠動脈疾患二次予防の層別化や治療戦略の選択に有用な指標となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established a new method to evaluate the efficiency of HDL-induced cholesterol efflux from macrophages “cholesterol uptake capacity (CUC)” using apoB-depleted serum, fluorescently labeled cholesterol, and immobilized anti-apolipoprotein A1 antibody. When we measured CUC in patients with coronary artery disease, CUC declined with myeloperoxidase-mediated oxidation of HDL, and correlated inversely with requirement of revascularization. Multivariable analysis adjusted for traditional coronary risk factors including HDL-C showed that only CUC remained significant. Furthermore, CUC was lower in patients with lipidic plaque than that in those without lipidic plaque, and inversely associated with the lipid index in these patients. CUC was also inversely associated with Macrophage grade. CUC is an alternative measure of HDL functionality and may be a substitute for cholesterol efflux capacity and applicable for assessing CVD risk.

研究分野：循環器内科

キーワード：高比重リポ蛋白 コレステロール逆転送 動脈硬化 冠動脈疾患 脂質異常症

### 1. 研究開始当初の背景

高比重リポ蛋白(HDL)粒子は多彩な抗動脈硬化作用を持ち、HDLに含まれるコレステロール(HDL-C)はその量的指標と考えられ、冠動脈疾患の負の危険因子として長年重要視されてきた。しかし、近年のHDL-C増加薬による大規模臨床試験では、その有効性は証明されなかった。その矛盾の理由として、HDLは粒子中のリン脂質やタンパク質などの構成成分が修飾されて善玉としての機能が減弱することから、HDLの抗動脈硬化作用の評価は量から質へと変遷してきた。とくに、HDL粒子が血管壁の泡沫細胞からコレステロールを引抜く作用(コレステロール引抜き能)と冠動脈疾患との関係が注目されている。

しかし、「コレステロール引抜き能」の定量的測定は、アイソトープや培養細胞などを用いた複雑な測定系であり数日を要する。したがって、臨床現場で使用できるHDL機能の簡便な評価法が望まれていた。我々は、シスメックス(株)との共同研究で、「HDL特異的コレステロール取込み能:CUC」という新規のHDL機能の測定系を開発した。この方法の原理は、1)放射性標識コレステロールの代替法として蛍光色素によりコレステロールを標識する、2)細胞を用いず、PEG処理血清中のHDL粒子に蛍光標識コレステロールを直接取込ませる、3)プレートに固相化したアポA-I抗体でHDLを捕捉した後のHDLの蛍光強度を「HDL特異的コレステロール取込み能:CUC」として測定するというもので、非放射性、無細胞、短行程、High-throughputな測定系である。そして、この新規HDL機能評価法を臨床へ実用化し、冠動脈疾患のリスクの階層化に応用する段階に到達した。

### 2. 研究の目的

本研究では臨床検体および再構成HDLを用いて本アッセイのHDL機能評価法としての妥当性を検証し、さらに動脈硬化性疾患のリスク評価における有用性を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

臨床研究は、神戸大学医学部附属病院において倫理審査委員会の承認と被験者からのインフォームドコンセントを得て行った。

#### 1) 臨床検体のCUCの測定

- i) 心血管疾患患者および非心疾患患者の血液検体を用い、CUCを測定し、性別・年齢を加味した測定値の分布状況を調べた。
- ii) HDL-C、LDL-C、トリグリセリド、各種アポ蛋白などの脂質プロファイルとの関連を検討する。また、HDL代謝・機能に關与する既知分子の血清濃度との関連を検討する。例えば、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)、パラオキシナーゼ1(PON1)、

血管内皮リパーゼ(EL)、高感度CRPなどの血中濃度あるいは活性を測定した。

- iii) HDL機能に影響を及ぼすとされる病態(糖尿病、腎臓病、肥満など)、薬剤(スタチンなど)、生活習慣(運動、飲酒、喫煙など)との関連について検討した。
- iv) 病態や薬剤による影響が示唆された場合は再構成HDLを用いて分子機序を検討した。

#### 2) 冠動脈疾患リスクの層別化におけるCUCの有用性の検討

冠動脈疾患の一次・二次予防に用いられている現在の管理指標に本法による評価を加えることで、リスクのより迅速な見出し・層別化につながるか検討した。

- i) CUCと冠動脈疾患の有病率との関連について横断的に検討した。
- ii) 心血管イベントの発症を予測しうるか前向きに検討した(観察期間は当初3年)。
- iii) 待機的経皮的冠動脈インターベンション(PCI)施行患者のPCI施行部位以外の粥腫病変についてVirtual Histology(VH)-血管内超音波(IVUS)と光干渉断層法(OCT)により経時的に性状を評価し、新規コレステロール取込み能と冠動脈病変の進展・退縮・脆弱性との関連について検討した。
- iv) 機能不全および機能正常のレファレンスHDLとして、下記の如く機能修飾したHDLを作成し、CUCの変化との関連を検証した。過酸化水素の存在下でミエロペルオキシダーゼによりアポA-Iを酸化修飾したHDL、LCATを阻害したHDL、脂肪酸組成を変化させた再構成HDL(アポA-Iとリン脂質により人工的に合成したHDL)を用いた。

### 4. 研究成果

健常人の血清を用いた検討では、新規の「コレステロール取込み能:CUC」は、細胞を用いた従来のコレステロール引き抜き能と強い相関を認めたと(r=0.82, p<0.0001)。

血清LDL-C濃度が100 mg/dL未満に管理されている125人の冠動脈疾患患者を対象にCUCを測定したところ、冠危険因子の集積に伴ってCUCが低下していた。また、カテーテル治療後に再治療を必要とした患者では、必要としなかった患者に比べてCUCが低下していた(p=0.028)。多変量解析ではCUCは再治療の規定因子であることが判明した。以上より、CUCはHDLの機能を反映しており、内服治療により古典的な危険因子が適切に管理されている冠動脈疾患患者において、CUCが残余リスクとなることが示唆された。

CUCを制御する血清因子を検索したところ、抗酸化酵素PON-1と、アポA1の酸化変性を起こすMPOの血中濃度が、HDLの抗炎症能やCUCと逆相関し、冠動脈疾患の予後にも有意な影響を与えた。また、HDL粒子の代謝やリ

モデリングを制御する血管内皮リパーゼ (EL) の血中濃度と CUC の間には逆相関関係が認められた。

次に、冠動脈疾患患者を対象に CUC を測定したところ、多数の危険因子を有するハイリスク患者群や、繰り返してカテーテル治療を必要とした患者では取込み能が低値であった。多変量解析によって冠動脈疾患の予後の独立した規定因子であることが判明した。

さらに、光干渉断層法を用いて動脈硬化病変を形態学的に解析したところ、CUC は線維性被膜の薄さと正相関し、動脈硬化プラークにおける脂質コアの長さ (血管長軸) と角度 (血管短軸) と逆相関し、Lipid Index (=脂質コア量) との間にも逆相関関係を認めた。以上より、CUC は HDL の機能を反映しており、冠動脈プラーク内の脂質コアの体積を制御していると推察された。したがって、冠動脈疾患患者において、CUC が残余リスクとなることが示唆された。

CUC に影響を与える薬物治療の候補として、高純度エイコサペンタエン酸 (EPA) 製剤に焦点を当てて介入したところ、EPA の投与は、CUC を有意に改善するとともに、プラーク繊維性被膜は厚くなり、Lipid Index も縮小し、不安定プラークの安定化が示唆される結果であった。

EPA 投与後の CUC 改善機序を検討するために、粒子中に EPA を含む再構成 HDL を用いた実験を行った。EPA 含有再構成 HDL では CUC が約 25% の改善を認めた。また、EPA 含有再構成 HDL は、血管内皮細胞における VCAM-1 の発現を抑制し、内皮細胞との相互作用によって炎症収束性の脂質メディエーターであるレゾルビン E3 の産生を増加した。

以上より、CUC は、HDL の多彩な抗動脈硬化機能を反映し、冠動脈プラークの脂質コア量の制御因子であることが証明された。今後、日常診療において本測定法が普及することにより、冠動脈疾患二次予防の層別化や治療戦略の選択に有用な指標となることが示唆された。

## 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)

1. Nagao M, Toh R, Irino Y, Mori T, Nakajima H, Hara T, Honjo T, Satomi-Kobayashi S, Shinke T, Tanaka H, Ishida T, Hirata K. -Hydroxybutyrate elevation as a compensatory response against oxidative stress in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;21:322-328.
2. Irino Y, Toh R, Nagao M, Mori T, Honjo T, Shinohara M, Tsuda S, Nakajima H, Satomi-Kobayashi S, Shinke T, Tanaka H, Ishida T, Miyata O, Hirata K. 2-Aminobutyric acid modulates glutathione homeostasis in the myocardium. *Sci Rep*. 2016;6:36749.
3. Ishida T. Dawn to a new era for the far lower the far better LDL-C story in Japan. *Circ J*. 2016;80:1903-1904.
4. Mori K, Ishida T, Tsuda S, Oshita T, Shinohara M, Hara T, Irino Y, Toh R, Hirata K. Enhanced impact of cholesterol absorption marker on new atherosclerotic lesion progression after coronary intervention during statin therapy. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24:123-132.
5. Monguchi T, Hara T, Hasokawa M, Nakajima H, Mori K, Toh R, Irino Y, Ishida T, Hirata K, Shinohara M. Excessive intake of trans fatty acid accelerates atherosclerosis through promoting inflammation and oxidative stress in a mouse model of hyperlipidemia. *J Cardiol*. 2017;70:121-127.
6. Tanaka N, Irino Y, Shinohara M, Tsuda S, Mori T, Nagao M, Oshita T, Mori K, Hara T, Toh R, Ishida T, Hirata K. Eicosapentaenoic acid-enriched high-density lipoproteins exhibit anti-atherogenic properties. *Circ J*. 2018 ;82:596-601.
7. Harada A, Toh R, Murakami K, Kiriya M, Yoshikawa K, Miwa K, Kubo T, Irino Y, Tanaka N, Nishimura K, Ishida T, Hirata K. Cholesterol Uptake Capacity: A New Measure of High-Density Lipoprotein Functionality for Coronary Risk Assessment. *J Appl Lab Med*. 2017; 2: 186-200.
8. Nagasawa Y, Shinke T, Toh R, Ishida T, Otake H, Takaya T, Toba T, Kuroda M, Takahashi H, Terashita D, Tahara N, Shinkura Y, Uzu K, Kashiwagi D, Kuroda K, Nagano Y, Yamamoto H, Yanaka K, Tsukiyama Y, Hirata K. The Impact of Serum Trans Fatty Acids Concentration on Plaque Vulnerability in Patients with Coronary Artery Disease under Medical Management for Secondary Prevention: Assessment via Optical Coherence Tomography. *Atherosclerosis*. 2017;265:312-317.
9. Hara T, Monguchi T, Iwamoto N, Akashi M, Mori K, Oshita T, Okano M, Toh R, Irino Y, Shinohara M, Yamashita Y, Shioi G, Furuse M, Ishida T, Hirata K. Targeted Disruption of JCAD/KIAA1462, a Coronary Artery Disease-associated Gene Product, Inhibits Angiogenic Processes in Vitro and in Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:1667-1673.
10. Nagao N, Toh R, Irino Y, Nakajima H, Oshita T, Tsuda S, Hara T, Shinohara M, Ishida T, Hirata K. High-density lipoproteins protect cardiomyocytes from oxidative stress via PI3K/Akt/MTOR signaling pathway. *FEBS Open Bio*. 2017;7:1402-140
11. Tsuda S, Shinohara M, Oshita T, Nagao M,

- Tanaka N, Mori T, Hara T, Irino Y, Toh R, Ishida T, Hirata K. Novel mechanism of high-density lipoprotein to regulate 5-lipoxygenase/leukotriene B<sub>4</sub> pathway in macrophages. *Sci Rep*. 2017 Oct 11;7(1):12989.
12. 入野康宏, 石田達郎, 杜隆嗣. LDL/HDL コレステロールを標的とした動脈硬化症の新しい治療戦略. *血管医学*. 2015;16:53-60.
  13. 原哲也, 石田達郎. 原発性脂質異常症:疾患概念の整理と最近の進歩. 原発性低脂血症. 家族性低 HDL コレステロール血症の分子機構. *Pharma Media*. 2015;33(8):57-60.
  14. 田中伸明, 石田達郎. HDL の抗炎症能の分子機序と評価方法. *臨床病理*. 2016;64:49-56.
  15. 篠原正和, 石田達郎. 知っておくべき病態生理と診療の進め方 典型例から学ぶ 高 HDL-C 血症. *Medical Practice*. 2016;33:575-580.
  16. 石田達郎. 脂質の質的改善における脂肪酸の役割 -EPA の可能性-. *室医会報*. 2016;17:15-20

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Oshita T, Toh R, Ishida T, et al. Association of Coronary Lipidic Plaque Burden with Impairment of Cholesterol Uptake Capacity, a Novel Indicator for HDL Functionality: OCT-based Observation Study. *American Heart Association Scientific sessions 2017*. Anaheim. 2017.11.
2. Hara T, Ishida T, et al. Progression of Calcific Aortic Valve Sclerosis in WHHL Rabbits, an Animal Model of Aortic Valve Stenosis. *American Heart Association Scientific sessions 2017*. Anaheim. 2017.11.
3. Tsuda S, Ishida T, et al. Novel Mechanism of High-Density Lipoprotein to Regulate 5-Lipoxygenase/Leukotriene B<sub>4</sub> Pathway in Macrophages. *American Heart Association Scientific sessions 2017*. Anaheim. 2017.11.
4. Oshita T, Toh R, Ishida T, et al. Identification of Determinants of Cholesterol Uptake Capacity, a Novel Indicator for HDL Functionality. 第 82 回日本循環器学会学術集会. 大阪. 2018.3.
5. Oshita T, Toh R, Ishida T, et al. Relationships between Cholesterol Uptake Capacity, a Novel Indicator for HDL Functionality, and Morphologic Features of Coronary Plaque. 第 82 回日本循環器学会学術集会. 大阪. 2018.3.
6. Tsuda S, Ishida T, et al. Novel mechanism of regulation of the 5-lipoxygenase/leukotriene B<sub>4</sub> pathway by high-density lipoprotein in macrophages. 第 82 回日本循環器学会学術集会. 大阪. 2018.3.

7. Okano M, Hara T, Ishida T, et al. In Vivo Imaging Revealed Platelet- and Leukocyte-independent Initiation of Deep Venous Thrombosis (DVT) in Novel Murine DVT Model. 第 82 回日本循環器学会学術集会. 大阪. 2018.3.
8. Okano M, Irino Y, Ishida T, et al. Phospholipid Composition of Reconstitute High Density Lipoproteins Affects their Anti-inflammatory Effects. 第 82 回日本循環器学会学術集会. 大阪. 2018.3.
9. 外因性脂質を含めた包括的な血清脂質管理の重要性. 石田達郎. 第 29 回日本冠疾患学会学術集会. 2015.
10. HDL の抗炎症能・コレステロール引抜き能の評価方法の確立と動脈硬化における意義. 石田達郎. 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会. 2016.
11. HDL 粒子によるコレステロール引抜き/取込み能と冠動脈疾患との関係. 杜隆嗣, 石田達郎, 平田健一. 第 64 回日本心臓病学会学術集会. 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 達郎 (ISHIDA TATSURO)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命教授  
研究者番号: 00379413

### (2) 研究分担者

杜 隆嗣 (TOH RYUJI)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授  
研究者番号: 50379418

平田 健一 (HIRATA KEN-ICHI)  
神戸大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 20283880

### (3) 連携研究者

新家俊郎 (SHINKE TOSHIRO)  
神戸大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 60379419

### (4) 研究協力者

篠原正和 (SHINOHARA MASAKAZU)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 80437483