

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461085

研究課題名(和文) 粥状硬化の進展におけるHDL機能不全の役割に関する統合的研究

研究課題名(英文) A comprehensive analysis of high density lipoprotein function

研究代表者

平田 健一 (HIRATA, KEN-ICHI)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20283880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：目的：高比重リポ蛋白コレステロール(HDL)はコレステロール引抜きに加え多彩な抗動脈硬化作用を有するも、慢性炎症や糖尿病などの病態下では「機能不全HDL」となる。本研究では簡便かつ再現性をもってHDL機能を包括的に評価できる方法を確立するとともに、臨床応用にむけ心血管リスク層別化における有用性を検討した。

結果：1) HDL機能を修飾するミエロペルオキシダーゼおよびパラオキシナーゼ1の血清中での比率は冠動脈疾患のリスク層別化に有用であった。2)放射性同位元素や細胞を用いずにHDLのコレステロール取り込み能を評価する測定系を確立し、冠動脈疾患の層別化に有用であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Aim: Recent studies suggest that the function of high-density lipoprotein (HDL) modulate and predict the progression of cardiovascular disease in addition to the quantity of HDL. In the present studies, we sought to establish conventional methods to assess functional changes in HDL for clinical use. Results: 1) Myeloperoxidase (MPO) promotes oxidation of lipoproteins, while paraoxonase 1 (PON1) has antioxidant properties for HDL. Serum MPO/PON1 ratio is inversely related with the anti-inflammatory properties and cholesterol efflux capacity of HDL. We demonstrated the clinical utility of serum MPO/PON1 ratio in predicting recurrent coronary lesions after percutaneous coronary intervention (PCI). 2) We established the methods to assess cholesterol uptake capacity of HDL in a sensitive and high-throughput manner without using radioisotope-label and cells. We demonstrated a significant inverse association between requirement of revascularization after PCI and cholesterol uptake capacity.

研究分野：循環器内科学

キーワード：高比重リポ蛋白 動脈硬化 ミエロペルオキシダーゼ パラオキシナーゼ1 コレステロール取り込み能

1. 研究開始当初の背景

高比重リポ蛋白コレステロール (HDL-C) は冠動脈疾患の負の危険因子であるが、HDL-C 増加薬による大規模臨床試験でその有効性は証明されていない。一方、HDL はコレステロール引抜きに加え多彩な抗動脈硬化作用を有するも、慢性炎症や糖尿病などの病態下では構成蛋白やリン脂質の組成が変化したり、化学的修飾を受けることで「善玉」としての作用が失われ、「機能不全 HDL」となる。HDL の量的指標として用いられている HDL-C は、HDL 重量の 2-3 割を占めるコレステロール量であり、コレステロール逆転送系における HDL の本来の機能ではなく、結果を反映するマーカーに過ぎない。すなわち HDL の重要性は、量のみならず質によって評価すべきであると変遷しているにもかかわらず、いまだ確立された HDL 機能評価法がないこと自体が HDL 研究の大きな障壁となっている。

2. 研究の目的

簡便かつ高い再現性をもって HDL 機能を包括的に評価できる方法を確立するとともに、臨床応用にむけ心血管リスク層別化における有用性を検討する。

(1) 機能不全 HDL バイオマーカーとしての血清ミエロペルオキシダーゼ (MPO) / パラオキシナーゼ 1 (PON1) 比

MPO は HDL の主要リポ蛋白である ApoA-1 を酸化修飾し、HDL のコレステロール引き抜き能を減弱させる。他方、PON1 は ApoA-I と結合し HDL 自体の酸化を抑制する。近年、HDL 上で MPO は PON1 を酸化し、その活性を低下させるとともに、PON1 が MPO によるリポ蛋白の酸化修飾を抑制し、両者のバランスが HDL 機能に重要な役割を担っていることが示唆されている。我々はこれまでに、血中における MPO/PON1 比が HDL のコレステロール引き抜き能や抗炎症作用を反映することを報告した。本研究では血清 MPO/PON1 比が経皮的冠動脈形成術 (PCI) 後の冠動脈病変の再発を予測することができるか検討を行う。

(2) HDL コレステロール取り込み能

HDL のコレステロール「引き抜き」能が冠動脈疾患の独立した危険因子であることが近年、示唆されている。しかしその評価には放射性同位元素 (RI) や細胞を必要とするため、臨床応用が困難である。そこでこれらの弱点を克服すべく、1) RI の代替として蛍光色素を用い (非放射性) 2) 血清と蛍光標識コレステロールをインキュベートし (無細

胞) 3) ApoAI 抗体で HDL 粒子を捕捉した後の蛍光強度を測定する (HDL 特異的) 新たな評価系 (HDL コレステロール「取り込み」能と命名) の確立を目指す。さらに HDL コレステロール取り込み能評価系の臨床有用性について検証する。

3. 研究の方法

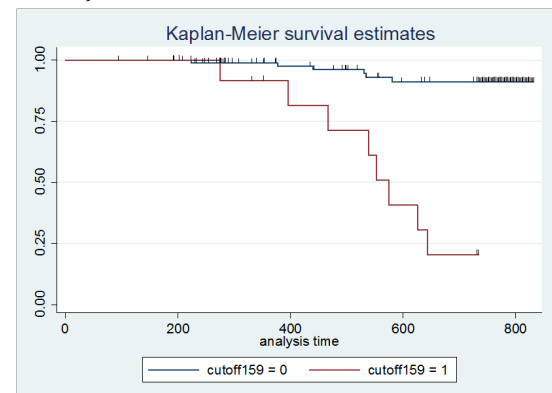
(1) 神戸大学病院で PCI 施行後のフォローアップ冠動脈造影検査 (CAG) 目的に入院された連続 116 名を対象に血清 MPO/PON1 比を測定し、観察期間 (858.9 ± 642.0 日) 中に再治療が必要な再狭窄もしくは新規病変の発生を一次エンドポイントとした。MPO/PON1 比高値群と低値群に分け、カプランマイヤー曲線を作成して検定した。さらに年齢、性別、高血圧症、糖尿病、脂質異常症、喫煙を含む多重 COX 比例ハザード解析した。

(2) シスメックス株式会社と共同で少量の血液から効率よく HDL 分画を精製し、従来の評価法では用いられていた RI と培養細胞を必要としない HDL のコレステロール取り込み能を評価する方法の開発に取り組んだ。具体的には 1) RI の代替法としてコレステロールの標識に蛍光色素を用い、2) 沈殿剤により分離した HDL 分画と蛍光標識コレステロールをインキュベートし、3) プレートに固相化した抗アポ A-I 抗体で HDL 粒子を捕捉した後の蛍光強度を「HDL コレステロール取込み能」として測定した。

さらに神戸大学病院 循環器内科に PCI 施行後のフォローアップ CAG 目的で入院した患者を対象に HDL コレステロール取込み能を測定し、再 PCI の必要性の有無との関係について検討した。

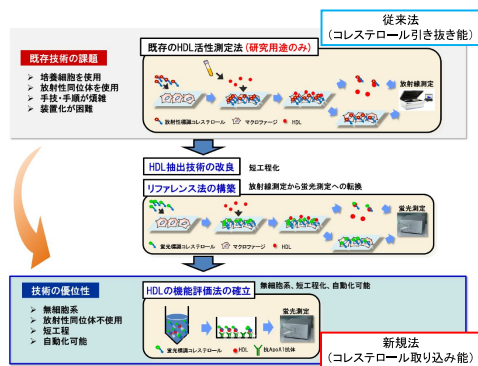
4. 研究成果

(1) 観察期間中に 116 名中 12 名にイベントを認めた。既報で我々が定めたカットオフ値である MPO/PON1 比 1.59 を用いて、MPO/PON1 比高値群と低値群に分け、カプランマイヤー曲線を作成して検定したところ、MPO/PON1 比高値群は低値群と比較して、イベントが多く発生した (75.0% vs. 19.2%、 $p < 0.001$)。



さらに年齢、性別、高血圧症、糖尿病、脂質異常症、喫煙を含む多重 COX 比例ハザード解析の結果、高 MPO/PON1 比は再 PCI の独立した予測因子であった (HR6.80, CI 2.62-17.60 p<0.001) であった。一方、臨床で用いられている脂質プロファイルはイベントの予測に有用ではなかった。以上より高 MPO/PON1 比は PCI 後の冠動脈病変再発と独立した関連を認め、冠動脈疾患の二次予防に有用なマーカーとなりうることを示唆された。

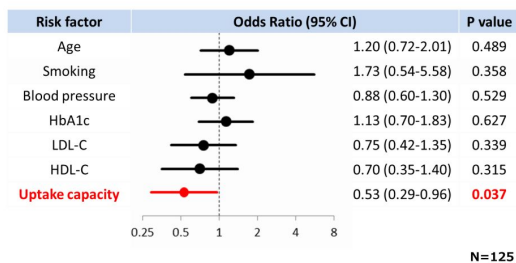
(2) まず、HDL コレステロール取り込み能測定系の分析性能について検討した結果、HDL および標識コレステロール濃度に応じてシグナルが検出されることを確認した。また、蛍光標識部分のみでは取り込みが生じないことを確認した。構築した無細胞系技術の測定値(取り込み能)と従来技術による測定値(引き抜き能)の関係性を解析したところ、高い相関性を確認した。



次に PCI 施行後のフォローアップ CAG 目的で入院した患者を対象に検討したところ、再 PCI を要した患者群では要さなかった群に比し有意に HDL コレステロール取り込み能は低下していた。さらに古典的冠危険因子とは独立した負の因子であることがわかった。

無細胞系HDL機能評価技術の臨床性能

冠動脈の再狭窄に対するオッズ比



本研究成果は HDL 機能不全を臨床現場で簡便に検出することを可能とすることのみならず、その分子機序の解明にも寄与し、さらには確立した評価法がないために停滞している HDL 機能改善を目的とした創薬に強力な研究基盤技術を提供しうる意義深いものと考えられる。

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8件)

Mori K, Ishida T, Yasuda T, Hasokawa M, Monguchi T, Sasaki M, Kondo K, Nakajima H, Shinohara M, Shinke T, Irino Y, Toh R, Nishimura K, Hirata K. Serum Trans-Fatty Acid Concentration Is Elevated in Young Patients With Coronary Artery Disease in Japan. 査読有、Circ J. 2015;79:2017-25. doi: 10.1253/circj.CJ-14-0750.

Kondo K, Ishida T, Yasuda T, Nakajima H, Mori K, Tanaka N, Mori T, Monguchi T, Shinohara M, Irino Y, Toh R, Rikitake Y, Kiyomizu K, Tomiyama Y, Yamamoto J, Hirata K. Trans-fatty acid promotes thrombus formation in mice by aggravating antithrombogenic endothelial functions via Toll-like receptors. 査読有、Mol Nutr Food Res. 2015;59:729-40. doi: 10.1002/mnfr.201400537.

入野 康宏、石田 達郎、杜 隆嗣、機能不全 HDL に対する治療戦略、Vol.16、No.1、2015、pp.53-60.

Tanaka N, Ishida T, Nagao M, Mori T, Monguchi T, Sasaki M, Mori K, Kondo K, Nakajima H, Honjo T, Irino Y, Toh R, Shinohara M, Hirata K. Administration of high dose eicosapentaenoic acid enhances anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein in Japanese patients with dyslipidemia. 査読有、Atherosclerosis. 2014;237:577-83. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.011.

Haraguchi Y, Toh R, Hasokawa M, Nakajima H, Honjo T, Otsui K, Mori K, Miyamoto-Sasaki M, Shinohara M, Nishimura K, Ishida T, Hirata K. Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ratio as potential indicator of dysfunctional high-density lipoprotein and risk stratification in coronary artery disease. 査読有、Atherosclerosis. 2014;234:288-94. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.009.

杜 隆嗣、平田 健一、HDL コレステロール、血管医学、査読無、Vol.15、No.3、2014、pp.299-307.

Shiomi M, Ishida T, Kobayashi T, Nitta N, Sonoda A, Yamada S, Koike T, Kuniyoshi N, Murata K, Hirata K, Ito T, Libby P. Vasospasm of atherosclerotic

coronary arteries precipitates acute ischemic myocardial damage in myocardial infarction-prone strain of the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. 査読有、Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33:2518-23.
doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301303.

Miyamoto-Sasaki M, Yasuda T, Monguchi T, Nakajima H, Mori K, Toh R, Ishida T, Hirata K. Plasma activity of endothelial lipase impacts high-density lipoprotein metabolism and coronary risk factors in humans. 査読有、J Atheroscler Thromb. 2013;20:708-16.

〔学会発表〕(計8件)

Amane Harada, Ryuji Toh, Katsuhiko Murakami, Maria Kiriyama, Keiko Yoshikawa, Takuya Kubo, Keiko Miwa, Yasuhiro Irino, Kenta Mori, Nobuaki Tanaka, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata, Cholesterol Uptake Capacity, a New Measure for High-Density Lipoprotein Functionality And Its Association with Incident Cardiovascular Events, The 80th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2016年3月18-20日、仙台国際センター(宮城県)

Shigeyasu Tsuda, Ryuji Toh, Kenta Mori, Manabu Nagao, Nobuaki Tanaka, Takeshige Mori, Tomoko Monguchi, Hideto Nakajima, Tomoyuki Honjo, Masakazu Shinohara, Kunihiro Nishimura, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata, Serum Myeloperoxidase/Paraoxonase 1 Ratio Predicts Recurrent Coronary Artery Disease, 第47回日本動脈硬化学会総会学術集会, 2015年7月9-10日、仙台国際センター(宮城県)

Shigeyasu Tsuda, Ryuji Toh, Kenta Mori, Manabu Nagao, Nobuaki Tanaka, Takeshige Mori, Tomoko Monguchi, Hideto Nakajima, Tomoyuki Honjo, Masakazu Shinohara, Kunihiro Nishimura, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata, 冠動脈疾患二次予防における予測因子としての血清ミエロペルオキシダーゼ/パラオキシナーゼ1比の有用性についての検討, 第15回日本NO学会, 2015年6月26-27日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府)

Tsuda S, Toh R, Mori K, Nagao M, Tanaka N, Mori T, Monguchi T, Nakajima H, Honjo T, Shinohara M, Nishimura K, Ishida T, Hirata K, Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ration predicts recurrent coronary artery

disease, ATVB/PVD2015, 2015年5月7-9日サンフランシスコ(アメリカ)

Shigeyasu Tsuda, Ryuji Toh, Kenta Mori, Manabu Nagao, Nobuaki Tanaka, Takeshige Mori, Tomoko Monguchi, Hideto Nakajima, Tomoyuki Honjo, Masakazu Shinohara, Kunihiro Nishimura, Tatsuro Ishida, Ken-ichi Hirata, Impact of Serum Myeloperoxidase/Paraoxonase 1 Ratio as a Predictive Marker of for Secondary Prevention of Coronary Artery Disease, The 79th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, 2015年4月24-26日、大阪国際会議場(大阪府)

Nobuaki Tanaka, Tatsuro Ishida, Manabu Nagao, Takeshige Mori, Tomoko Monguchi, Maki Sasaki, Kenta Mori, Kensuke Kondo, Hideto Nakajima, Tomoyuki Honjo, Ryuji Toh, Ken-ichi Hirata, Oral administration of eicosapentaenoic acid ameliorates anti-inflammatory functions of high-density lipoprotein in dyslipidemic patients, American Heart Association Scientific Sessions 2014, 2014年11月15-19日、シカゴ(アメリカ)

Nobuaki Tanaka, Tatsuro Ishida, Manabu Nagao, Takeshige Mori, Tomoko Monguchi, Maki Sasaki, Kenta Mori, Kensuke Kondo, Hideto Nakajima, Tomoyuki Honjo, Ryuji Toh, Ken-ichi Hirata, Eicosapentaenoic acid improves anti-inflammatory functions of high-density lipoprotein in dyslipidemic patients, 第46回日本動脈硬化学会総会, 2014年7月10-11日、京王プラザホテル(東京都)

杜 隆嗣, 石田 達郎, 西村 邦宏, 平田 健二, 機能不全HDLの簡便な臨床評価法としての血清MPO/PON1比測定の有効性, 第111回日本内科学会総会・講演会, 2014年4月11-13日、東京国際フォーラム(東京都)

〔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

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/im1/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(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