

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01713

研究課題名(和文) カイロミクロンレムナント蓄積の臨床的意義とリポ蛋白単離による機能解析

研究課題名(英文) Clinical significance of accumulation of chylomicron remnants and its functional analysis by selective isolation

研究代表者

増田 大作 (Masuda, Daisaku)

大阪大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：20568753

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)：アポB-48濃度は測定値に異常ない健診症例でTG・RemL-C・酸化ストレスマーカーと正相関し、心原性脳塞栓症例において低値となりレムナントリスクの評価に有用だった。耐糖能異常や糖尿病群では正常群よりも高値となり、糖負荷により濃度が上昇するがDPP4阻害薬の投与で抑制された。アポB-48モノクローナル抗体により分離したカイロミクロンレムナントは様々なサイズを有し、表面に多くのアポ蛋白のみならず補体やPON-1など炎症に関連する蛋白を有しマクロファージの泡沫化も可能であった。今回の検討によりリスク評価・効果判定におけるアポB-48測定の有用性やカイロミクロンレムナントの活性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Apo B-48 concentration was positively correlated with concentrations of TG, RemL-C, oxidative stress markers in cases of annual health checkup with no abnormality and significantly low in patients with cardiogenic cerebral embolism, it was very useful for evaluating risk status with accumulating remnants. The apoB-48 level was significantly higher in patients with impaired glucose tolerance and diabetes mellitus than in cases without them, and it was increased after the glucose load and suppressed by administration of DPP4 inhibitor. Chylomicron remnants selectively separated by anti-apoB-48 monoclonal antibody have various sizes, have not only many apoproteins but also proteins related to inflammation such as complements and PON-1 and can induce macrophage foam cell formation. This study revealed the utility of the apo B-48 measurement in the risk assessment or evaluating treatment effects and the physiological activity of chylomicron remnant.

研究分野：脂質代謝異常、動脈硬化、循環器疾患

キーワード：レムナント apoB-48 脳塞栓 動脈硬化 糖尿病 リポ蛋白

1. 研究開始当初の背景

本邦での健康診断で測定されている中性脂肪(TG)濃度の高値の患者(150mg/dl以上)は動脈硬化性疾患のイベント発症が多いことから医療介入の対象とされている。しかし、TG分子ではなくレムナントリポ蛋白に動脈硬化惹起性は存在し、TG値は食事状況により容易に変動しリスク評価には不適切である。動脈硬化惹起的なカイロミクロンレムナント(CM-R)の定量的評価のため我々はCM-Rの核となるアポ蛋白(apo)B-48の濃度測定系を開発し、高apoB-48濃度は食後高脂血症・メタボリックシンドローム・CKDなど代謝異常や頸動脈肥厚や冠動脈狭窄と強く相関することを発見した。

2. 研究の目的

本研究では apoB-48 濃度と動脈硬化を進展させるインスリン抵抗性・酸化ストレス等との相関や、apoB-48 抗体により抽出した CM-R の蛋白・脂質組成をプロテオミクス・リポミクスにより解析しその特性を包括的に検討する。

3. 研究の方法

CM-R 蓄積が健常者や脂質代謝異常以外の代謝異常に対してどのような影響を及ぼすかの検討を行う。具体的には以下の およびを実施する。

検診で「異常なし」症例でのインスリン抵抗性・酸化ストレス・炎症と CM-R 蓄積との相関の検討[背景と目的] 耐糖能障害や非 MetS 肥満は健診で正常と診断されているが、CM-R の増加とインスリン抵抗性・酸化ストレス・炎症反応の増加が予想される。[対象と方法] 健診症例で、空腹時アポ B-48 濃度に加え、脂肪酸プロファイル、アディポネクチン、レプチン、レジスチン、RemL-C、TNF- α 、IL-1、IL-6、hsCRP、リポ蛋白 profile (HPLC 法)、酸化ストレス産生物(HODE, HETE 等)を測定しいずれの項目と相関が強いかを検討する。

糖代謝正常・耐糖能異常・糖尿病(治療前後)における空腹時・糖負荷後の CM-R の蓄積の評価[研究の背景]糖代謝正常・耐糖能障害・糖尿病と病態が進行すると CM-R の血中での蓄積が増加するのか、また糖尿病治療に伴い改善されているのか不明である。[対象と方法] 75gOGTT 検査により判明した 1. 糖代謝正常、2. 耐糖能障害、3. 糖尿病型患者それぞれの OGTT 血清、4. 糖尿病食事あるいは投薬治療(DPP4 阻害薬等)の前後における空腹時/OGTT 血清)のアポ B-48 濃度、脂質・糖質プロファイル(LDL-C、TG、HDL-C、アポ蛋白、アディポネクチン、脂肪酸分画、リポ蛋白プロファイル(HPLC)を測定し、これら biomarker の各病態での比較、糖代謝異常(特に耐糖能異常)の悪化に強く影響を与える biomarker の検討、さらに 4. を用いて治療前後でのこれら biomarker の変動と治療効果

に最も影響を与える因子の解析を行う。

4. 研究成果

[検診で「異常なし」症例でのインスリン抵抗性・酸化ストレス・炎症と CM-R 蓄積との相関の検討]; 大阪大学勤務者で健康診断を受けた 99 例の検診では nonHDL-C 濃度は TC、LDL-C 濃度と極めて強い相関を示し、TG 濃度と RemL-C・アポ B-48 濃度は正相関した。HODE、HETE とアポ B-48 濃度は 4 分位の各群で正相関した。これらのことから、nonHDL-C 濃度は内因性のレムナントに、外因系レムナントであるアポ B-48 は酸化ストレスに影響を与えいずれも動脈硬化惹起性につながるものと考えられた。

[糖代謝正常・耐糖能異常・糖尿病(治療前後)における空腹時・糖負荷後の CM-R の蓄積の評価]; 大阪大学医学部附属病院における OGTT の結果分けられた正常糖代謝(NGT27 名)、耐糖能異常(IGT19 名)および糖尿病(DM39 名)の 3 群の空腹時検体、および NGT 群 28 名と DM 群 57 名糖負荷後検体を用いた検討で、空腹時 log-apoB-48 値は IGT および DM 群で NGT より有意に高値であり、apoC-3 濃度、2 時間後インスリン値および AUC-インスリン値と相関していた。IGT 群における空腹時高 log-apoB-48 値の規定因子は apoC-3 濃度および AUC-インスリン値であり、IGT においてもカイロミクロンレムナントの増加が示唆された。さらに apoB-48 濃度は糖負荷後いずれの群においても有意に上昇した。incremental AUC-アポ B-48 濃度は NGT より DM 群で高値であり、DM 群において HOMA-IR および apoC2/apoC3 比が強い相関を有し、apoC2/apoC3 比が規定因子と判明した。カイロミクロンレムナントは糖負荷後に増加し動脈硬化惹起性と関連している可能性が示唆された

[心原性脳塞栓症]脳卒中病型と比較した。結果として、心原性脳塞栓症における apo B-48 は、非心原性脳塞栓症よりも低値であり(average apoB-48; 2.1 vs 3.8 μ g/mL, $p=0.019$)、1.25 μ g/ μ L をカットオフ値とすると、心原性脳塞栓症と非心原性脳塞栓症の鑑別に有用であった(感度 81%、特異度 57%、AUC 0.70)。このことから apoB-48 は、脳梗塞における病型分類に有用である可能性が示唆された。

[モノクローナル抗体により分離したアポ B-48 含有リポタンパクの評価]分離リポタンパクは小粒子カイロミクロンから大粒子 LDL までの様々なサイズを有するレムナントの集合であり、マウス腹腔マクロファージと共培養すると泡沫化が可能であり動脈硬化惹起性を有していた。さらに多くのアポ蛋白のみならず C3、C4 が含まれており PON-1 も有していた。またこれらの補体は脂肪負荷に伴い産生が増加し小腸由来のレムナントの炎症に深く関与している可能性が示唆された。[糖尿病症例での DPP4 阻害薬 sitagliptin

の効果 138名の2型糖尿病患者(男性20名、女性18名、平均65.7 ± 9.9才、HbA1c <8.4%)に承諾を得て sitagliptin を4週間投与した。sitagliptinの投与により、TG(161 ± 90 vs. 130 ± 66 mg/dl)および non-HDL-C (129 ± 29 vs. 116 ± 20 mg/dl)の低下が glucose や HbA1c の低下とともに見られ、アポ B-48 (7.8 ± 6.7 vs. 5.6 ± 4.0 μg/ml)、レムナントコレステロール(15.3 ± 9.5 vs. 12.0 ± 7.9 mg/dl)のいずれも抑制された。HPLCによる解析ではVLDLやLDL分画に含まれるレムナントの抑制も認められ論文報告した。今回の検討を通じて、カイロミクロンレムナントの知られていない特性や近年増加している糖尿病患者における動脈硬化惹起性を担うレムナントの現状評価や治療効果の評価においてもアポ B-48 測定の有用性が示された。

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 7 件)

1. Masuda D, Kobayashi T, Sairyou M, Hanada H, Ohama T, Koseki M, Nishida M, Maeda N, Kihara S, Minami T, Yanagi K, Sakata Y, Yamashita S. Effects of a Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitor Sitagliptin on Glycemic Control and Lipoprotein Metabolism in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus (GLORIA Trial). *J Atheroscler Thromb.* 2018;25:512-520.
2. Masuda D and Yamashita S. Postprandial hyperlipidemia and Remnant Lipoproteins *J Atheroscler Thromb.* 2017;24(2):95-109. Review
3. Muratsu J, Koseki M, Masuda D, Yasuga Y, Tomoyama S, Ataka K, Yagi Y, Nakagawa A, Hamada H, Fujita S, Hattori H, Ohama T, Nishida M, Hiraoka H, Matsuzawa Y, Yamashita S. Accelerated Atherogenicity in Tangier Disease. *J Atheroscler Thromb.* 2018 Mar 20. [Epub ahead of print]
4. Kanai M, Koh S, Masuda D, Koseki M, Nishida K. Clinical features and visual function in a patient with Fish-eye disease: Quantitative measurements and optical coherence tomography *Am J Ophthal Case Reports* 10 (2018) 137-141.
5. Okada T, Ohama T, Okazaki M, Kanno K, Matsuda H, Sairyou M, Zhu Y, Saga A, Kobayashi T, Masuda D, Koseki M, Nishida M, Sakata Y, Yamashita S. Particle number analysis of lipoprotein subclasses by gel permeation HPLC in patients with cholesteryl ester transfer protein deficiency. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190875.
6. Kurozumi A, Okada Y, Arai T, Kobayashi T, Masuda D, Yamashita S, Tanaka Y. Comparison of effects of anagliptin and alogliptin on serum lipid profile in type 2 diabetes mellitus patients. *J Diabetes Investig.* 2018;9(2):360-365. doi: 10.1111/jdi.12739.
7. Sairyou M, Kobayashi T, Masuda D, Kanno K, Zhu Y, Okada T, Koseki M, Ohama T, Nishida M, Sakata Y, Yamashita S. A Novel Selective PPAR Modulator (SPPARM), K-877 (Pemafibrate), Attenuates Postprandial Hypertriglyceridemia in Mice. *J Atheroscler Thromb.* 2017 *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(2):142-152. doi: 10.5551/jat.39693.

[学会発表](計 13 件)

1. Daisaku Masuda. "Guidelines for Preventing Cardiovascular Diseases in Japan". KSoLA-JAS Joint symposium, the 6th International Congress on Lipid Metabolism & Atherosclerosis (ICoLA 2017) and the 54th Fall Conference of the Korean Society of Lipid & Atherosclerosis (KSoLA), September 8 to 9, 2017, Seoul, Korea
2. Daisaku Masuda, et al. "Evaluation, Analysis and Treatment of the Residual Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Diseases, the Accumulation of Chylomicron Remnants". 口頭発表(シンポジウム). 第81回日本循環器学会学術集会 2017年3月17-19日、金沢
3. 増田大作 "糖尿病患者に合併する動脈硬化惹起的なレムナント代謝異常" 第31回日本糖尿病合併症学会・第22回日本糖尿病眼学会総会 シンポジウム「糖尿病合併症と脂質異常」平成28年10月7日~8日 仙台国際センター
4. Daisaku Masuda, et al. "Increased Serum Apolipoprotein B48 Concentration In Patients With Impaired Glucose Tolerance". American Heart Association Scientific Sessions, Nov. 12-16, 2016. New Orleans, USA, Poster Presentation.
5. Daisaku Masuda, et al. "Increased Serum Apolipoprotein B48 Concentration In Patients With Impaired Glucose Tolerance". 76th American Diabetes Association Scientific Sessions, June 10-14, 2016.

- New Orleans, USA, Poster Presentation.
6. Daisaku Masuda, et al. "Serum apolipoprotein B48 concentration is high in patients with impaired glucose tolerance and increases after oral glucose ingestion in patients with diabetes mellitus". European Atherosclerosis Society 2016. May29-June1, 2016. Innsbruck, Austria Poster Presentation
 7. Daisaku Masuda, et al. "Selective isolation and proteomic analysis of intestine-derived chylomicrons and their remnants in human serum" 第80回日本循環器学会学術集会(仙台・宮城) Mar 18-20th, 2016. Poster Presentation.
 8. 増田大作、小林卓哉、大久保学、花田浩之、西田誠、日高洋、坂田泰史、山下静也。「動脈硬化惹起的なカイロミクロンレムナント蓄積に着目した動脈硬化性疾患発症リスク状態の量的・質的評価」第22回日本未病システム学会学術総会(北海道大学学術交流会館 Oct. 12th, 2015. Poster Presentation.
 9. 増田大作、小林卓哉、西良雅己、岡田健志、中岡創、川瀬良太、中谷和弘、大濱透、小関正博、西田誠、坂田泰史、山下静也。「脂質異常症合併糖尿病患者におけるレムナント蓄積はシタグリプチン投与により改善する」第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会。Jul. 9th-10th, 2015. 仙台・宮城 Poster Presentation.
 10. Daisaku Masuda, Takuya Kobayashi, Masami Sairyuu, Takeshi Okada, Hajime Nakaoka, Ryota Kawase, Kazuhiro Nakatani, Tohru Ohama, Masahiro Koseki, Makoto Nishida, Yasushi Sakata, Shizuya Yamashita. "DPP4-Inhibitor, Sitagliptin, Improves the Accumulation of Remnant Lipoproteins in Patients with Type2 Diabetes Mellitus (GLORIA Study)" American Diabetes Association (ADA2015), Boston, USA Jun. 5th-9th, 2015. Poster Presentation.
 11. Daisaku Masuda, Takuya Kobayashi, Masami Sairyuu, Ryota Kawase, Kazuhiro Nakatani, Tohru Ohama, Masahiro Koseki, Makoto Nishida, Yasushi Sakata, Shizuya Yamashita. "Accumulation of Remnant Lipoproteins in Patients with Type II Diabetes Mellitus is ameliorated by the DPP4-Inhibitor, Sitagliptin" International Society of Atherosclerosis Congress (ISA2015), Amsterdam, The Netherlands, May, 22th-25th, 2015. Poster Presentation.
 12. 増田大作、小林卓哉、西良雅己、岡田健志、中岡創、川瀬良太、中谷和弘、大濱透、小関正博、西田誠、坂田泰史、山下静也。「糖尿病患者に合併するレムナント蓄積に対するシタグリプチン投与の有効性 (GLORIA 研究)」第58回日本糖尿病学会年次学術集会(下関、山口) Mar 21th, 2015. Poster Presentation.
 13. Daisaku Masuda, Takuya Kobayashi, Masami Sairyuu, Manabu Okubo, Takeshi Okada, Kazuhiro Nakatani, Hajime Nakaoka, Ryota Kawase, Masahiro Koseki, Tohru Ohama, Hiroyuki Hanada, Makoto Nishida, Yasushi Sakata, and Shizuya Yamashita "Quantitative and Qualitative Evaluations of the Residual Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Diseases That Focus on the Accumulation of Chylomicron Remnants" 第79回日本循環器学会学術集会(大阪) Apr, 26th-28th, 2015 Symposium, Oral Presentation.
- 〔図書〕(計 10 件)
1. 増田大作: "糖尿病患者に特徴的な脂質異常とその管理" 糖尿病 60(11):741-744, 2017
 2. 増田大作: "血清アポリポ蛋白 B-48 濃度測定による動脈硬化性疾患残余リスク評価の意義" 臨床病理 2018 Vol. 65 補冊
 3. 増田大作: "食後高脂血症の意義と日常診療への応用" 日本内科学会雑誌 106:702-710, 2017.
 4. 増田大作: "タンジール病と動脈硬化" The Lipid, 2017年7月号、28(3)、株式会社メディカルレビュー社
 5. 増田大作: "動脈硬化を起こしやすい原発性高脂血症" 診断と治療 2017年9月号、診断と治療社
 6. 増田大作、山下静也: "中性脂肪(TG)と動脈硬化～レムナントリポ蛋白, small dense LDL～" TarGet～中性脂肪のリスクを探る～ 2016年3月号
 7. 増田大作 "Correlation of fasting serum apolipoprotein B-48 with coronary artery disease prevalence" 臨床医学研究のすすめ 4:1-4, 2015.
 8. 増田大作 "第28回医学研究助成成果発表・血清アポリポ蛋白 B-48 濃度測定法の確立と高カイロミクロンレムナント血症の動脈硬化惹起性の解析". Osaka Heart Club, 39(4):11-12, 2015 (大阪ハートクラブ)
 9. 増田大作 "心血管リスク管理の観点からの脂質メタボリズムの評価" メディカル・ビューポイント 36(10), 2015. 株式会社医事出版社

10. 増田大作 "原発性高脂血症 家族性
型高脂血症の病因と臨床における意
義" Pharma Medica, 33:(8),29-33,2015
メディカルレビュー社

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

増田大作 (MASUDA .DAISAKU)
大阪大学 医学系研究科 特任助教
研究者番号：20568753

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()