

令和元年5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01744

研究課題名(和文) 多機能面からのリポ蛋白リパーゼ分子診断による動脈硬化の早期診断・予防システム構築

研究課題名(英文) Development of the prevention and early diagnosis system on atherosclerosis by using properties of multifunctional lipoprotein lipase

研究代表者

高木 敦子 (Takagi, Atsuko)

大阪大学・医学系研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：90179416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：リポ蛋白リパーゼ(LPL)の多機能性を利用した動脈硬化性疾患の予防、早期診断を目的とした。第1機能は、血清トリグリセリド(TG)分解能で、第2機能は、細胞へのリポ蛋白取り込み促進機能等である。前者は動脈硬化抑制性で、後者は促進性と考えられる。第1については、LPL活性、蛋白量、遺伝子、自己抗体などを調べることで、高TG血症の成因を調べ、高TG血症持続による異常リポ蛋白生成などに由来する動脈硬化予防をめざした。第2については、動脈硬化バイオマーカーの可能性のある20kDa-LPL(LPL-C末端部分)と機能未知の40kDa-LPL(LPL-N末端部分)の簡便な測定系構築の基盤整備を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心血管病変による死亡は日本における死因の30%を占め、動脈硬化性病変の予防・早期発見は必至である。この一助とすべく、本研究において、リポ蛋白リパーゼ(LPL)の多機能性を利用した。第1の機能はトリグリセリド分解活性の評価を行い、この低値者は生活習慣を正常者より厳密にすることで将来的な心疾患のリスクを低減できるようにする。第2の機能はリポ蛋白取り込み促進機能で、これは動脈硬化促進的に働くと考えられる。LPLの部分蛋白をバイオマーカーにすることで、動脈硬化を早期に発見できる可能性があり、高齢化社会における生活の質の向上、医療経済面においてもその意義は大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：We have tried to apply the multiple functions of lipoprotein lipase (LPL) for development of prevention and early diagnosis of atherosclerotic diseases. The first, LPL has hydrolase activity for triglyceride, and the second, LPL enhances incorporation of lipoproteins into a cell. The former is antiatherogenic and the latter is proatherogenic. We analyzed pathophysiology of hypertriglyceridemic patients for LPL activity, protein, gene, and autoantibody in order to prevent atherogenic diseases. We have found 20kDa-LPL (LPL-C end fragment) which is thought to be atherogenic biomarker, and have tried to development measuring system of this protein and 40kDa-LPL (LPL-N end fragment) which function is unknown and is by-product when 20 kDa-LPL is made from LPL.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：高トリグリセリド血症 リポ蛋白リパーゼ 自己免疫疾患 動脈硬化 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心血管病変による死亡は日本における死因の30%を占め、本症の原因である動脈硬化性病変の予防・早期診断は必至である。高TG血症は心血管病の危険因子であるメタボリックシンドロームの評価の一項目であり、本疾患の治療のみならず、予防の重要性はいうまでもない。この課題の解決の一助とするために、リポ蛋白リパーゼ(LPL)酵素蛋白の多機能性を利用しようと考えた。

第1のLPLの機能は、血清中のTGリッチリポ蛋白粒子のTGを分解する機能である。

血清TG値は、TGの分解系と合成系により調節されている。分解系は、主にLPLが関与する。LPLは、主に脂肪細胞で、そして動脈硬化巣のマクロファージ(M)細胞においても、合成・分泌されている60kDaの糖蛋白で、細胞表面に係留し、流血中のカイロミクロンやVLDLのTGを加水分解する。LPL遺伝子異常によるTG分解活性の低下は高TG血症の原因となる。また、LPL活性に影響を与える多数の遺伝子や非遺伝因子が存在する。

LPLは通常採血の血漿や血清中に存在せず、ヘパリンを静脈内投与後の血漿(PHP: Post-Heparin Plasma)において、検出される。このPHPを臨床検体として使用し、LPL活性とLPL蛋白の測定を行っている。我々は、高TG血症の成因解明のため、LPL蛋白定量法(サンドイッチELISA法)(文献1)と活性定量法(文献2)を開発した。これら測定系と遺伝子解析法で、原発性IV型の高TG血症(空腹血清TG値が正常上限値である150mg/dl以上~300mg/dl位)はLPL蛋白量が正常の半分になるLPL遺伝子変異ヘテロ接合体が遺伝背景にあり、そこに肝臓でのTG合成亢進因子であるアルコール多飲癖や運動不足によるインスリン抵抗性といった粗悪な生活習慣(環境要因)が負荷して発症する事を明らかにした。日本人で集積された25種類のLPL変異検出方法を用いて、吹田市(大阪府)一般住民の性と年齢の階層毎の無作為抽出による検体(吹田研究: 3650名)からLPL変異ヘテロ者を11名検出できた(0.3%)。LPL変異のヘテロ者は正常者と比して、5倍高TG血症になりやすいことが判明した(オッズ比4.99、95%CI: 1.52 - 16.41)。環境因子として、肥満、高アルコール摂取、及び高血糖状態が、血清TG値上昇に相加的に関与した。LPLヘテロ者はLPL正常者よりも、軽い環境危険因子の負荷で高TG血症を呈することが判明し、環境因子に関して厳しい節制を守る必要がある。高TG血症(オッズ比1.46、95%CI; 1.01-2.11)は、高血圧(オッズ比1.90、95%CI; 1.35-2.68)と共に心疾患の独立危険因子であった(Takagi A et al, 投稿準備中)。この結果は、LPLヘテロ者ということが高TG血症を発症する以前にわかれば、その人に見合った生活習慣病の予防が可能であり、心疾患の危険因子を減少できることを意味する。

第2のLPLの機能は、TG分解活性非依存的に、細胞表面リセプターやプロテオグリカンとリポ蛋白粒子に同時に結合することで、細胞へのリポ蛋白とりこみを促進するブリッチ機能である。それ故、動脈硬化巣のM由来のLPLは動脈硬化促進性蛋白と考えられる。我々は、この興味あるLPL分子の機能に着目し、流血中に存在するLPL分子の解析をすすめ、血中にLPLのC末端断片を検出することに成功している。LPLのC末端断片に少なくとも20kDaと21kDaのサイズの多様性があり、これは付加している糖鎖のちがいであることをみいだしている。また、20kDaが心疾患者に多く見出されることから、これを動脈硬化のバイオマーカーに利用できる可能性を考えた。研究開始時点では、大型ゲル装置でのウエスタン法でしか、20kDaと21kDaの分別定量はできなかった。

2. 研究の目的

生活習慣病である高トリグリセリド(TG)血症は心疾患を将来的に引き起こすメタボリックシン

ドロームの評価項目であり、心疾患危険因子である。血清 TG 値は、TG の分解系と合成系により決まる。分解系は主にリポ蛋白リパーゼ(LPL)が関与する。LPL の TG 分解活性の低下は高 TG 血症の原因となるので、LPL 機能異常は動脈硬化を促進する。更に、LPL は、TG 分解活性非依存的に、細胞へのリポ蛋白とりこみを促進する働きのブリッチ機能もある。これらの LPL の二面性を利用して、動脈硬化性疾患の発症を早期発見、予防できるシステム構築を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象者： 所属施設、及び他施設からの高 TG 血症者の解析依頼があったものを対象者とする。所属施設および、依頼施設の倫理委員会の承認後、対象者から同意を文書でいただいた。

(2) LPL 活性、蛋白の解析： LPL 活性測定は選択的免疫抑制法で、LPL 蛋白測定はサンドイッチ法で行った。

LPL、*GPIHBP1*、*LMF1*、*APOC2* 他の遺伝子の解析：直接塩基配列決定法により行った。

(3) LPL に対する自己抗体の検出：ヒト精製 LPL を 12.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動、膜にトランスファーし、ブロッキング後、患者血漿を一次抗体として、室温 1 時間反応、標識抗ヒト IgA、IgE、IgG、IgM 抗体等を二次抗体として、室温 1 時間反応後、アビチン・ビオチン複合体形成により増幅後、化学発光によりバンドを LAS4000 にて検出した。

血漿による LPL 阻害効果の検出：ヒト精製 LPL の活性を、精製ヒト apoCII 存在下で、³H-トリオレイン-アラビアゴム懸濁粒子基質で測定する際に、患者血漿を添加して、LPL の活性の抑制程度をみることで調べた。

4. 研究成果

(1) LPL のトリグリセリド分解機能面からの解析

他施設からの紹介の高トリグリセリド血症患者の LPL 活性、タンパク量、遺伝子、自己抗体等の解析

新規高 TG 者 A (8 ヶ月女) は、LPL 活性、蛋白とも低値で、LPL 遺伝子の解析を行なったが、原因変異は検出されなかった。LPL の合成に係る *LMF1*、LPL の作用場への移行と保持に係る *GPIHBP1* にも原因変異は検出されなかった。新規高 TG 者 B (8 歳女) は、LPL 活性、蛋白とも低値であったが、LPL 遺伝子に原因変異は検出されなかった。新規高 TG 者 C (7 歳女) は、LPL 活性、蛋白とも正常値で、遺伝子解析は行なわなかった。LPL に対する自己抗体産生の可能性はあるが、検体未入手で、解析はできなかった。新規高 TG 者 D (TG>1000mg/dL) は、LPL 活性、蛋白ともほぼゼロで、血中に LPL 活性阻害物質をもち、*in vitro* 実験で活性が 100% 抑制された。これは自己免疫疾患のためと考えられた。新規患者 E (TG=151mg/dL) は、LPL 活性、蛋白ともほぼゼロであるが、LPL 遺伝子に変異はみいだされず、LPL 活性阻害物質をもち、*in vitro* 実験で活性が 30% 抑制された。

高トリグリセリド血症の非遺伝因子による原因のひとつである LPL の自己抗体産生を調べるために必須の TG 水解活性のある LPL 蛋白の調製法に、組換え LPL 遺伝子の無血清培養での発現を導入し、改善を行なった。

LPL 遺伝子変異のカタログ化を行い、COS1 細胞での発現実験との対応の結果、細胞表面に繫留した LPL をヘパリン処理で遊離させた画分が、患者検体の LPL 活性、LPL 蛋白値とよく対応することがわかった。

(2) LPLのブリッジ機能面等からの解析

動脈硬化性疾患既往歴者3名と健常者11名の血液を利用し、ウエスタン法で、LPL分子種の存在バリエーションを調べたところ、20kDa-LPL/(20kDa-LPL+21kDa-LPL)の比率は動脈硬化性疾患既往歴者において、有意に高値を示したことから、20kDa-LPLの動脈硬化性心疾患関連バイオマーカーとしての可能性が示唆された。

従来、20kDa-LPLと21kDa-LPLのウエスタン法は、手製の大型ゲルで泳動、分離していたが、これを市販ミニゲルに変更することでも、分離度は低下するが、鑑別定量できた。

20kDa-LPLの測定系として使用する予定の固相化抗体のエピトープを調べた。LPLのC末端側の6アミノ酸残基に存在し、糖鎖部分ではないとわかった。

(3) LPLの部分蛋白の新規バイオマーカーとしての可能性

20kDa-LPLが作られる途上、N末端側のLPL蛋白(40kDa-LPL)も産生されるはずなので、この利用も可能ではないかと考えた。この存在は、特異的抗体がないため、未知である。特異的抗体作製に用いる抗原調製のため、40kDa-LPLの大腸菌と動物細胞での発現系を構築した。

あらかじめ、40kDa-LPL蛋白しか作れないように、プラスミドを改変しておくこと、この蛋白はシグナルペプチドを持つがCOS1細胞から分泌されないことがわかり、分泌にC末端側の領域も必要であるということが判明した。40kDa-LPL蛋白は無血清培地で培養し、トランスフェクション後、2日目に細胞を回収することで40kDa-LPL蛋白を含む可溶化液を得られ、抗原精製材料とすることがもっとも、効率よいことがわかった。

動脈硬化初期病変のモデル系として、ヒト白血病由来株化細胞THP-1のマクロファージ(M)化を考えた。まず、免疫染色でM化後もLPLを発現していない細胞もあったので、シングル細胞を樹立した。更に、本細胞に20kDa-LPL、新規の40kDa-LPLや、LPLの全長の発現プラスミド導入のため、導入方法を検討した。これにより多量の抗原を調製できるので、作成しているLPLハイブリドーマライブラリーから、20kDa-LPLの糖鎖部分や、40kDa-LPLを特異的に認識できる抗体のスクリーニングを可能にした。

<引用文献>

(文献1) Ikeda Y, Takagi A, Ohkaru Y, Nogi K, Iwanaga T, Kurooka S, and Yamamoto A. A sandwich-enzyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in human postheparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *Journal of Lipid Research* 31:1911-1924 (1990).

(文献2) Ikeda Y, Takagi A, and Yamamoto A. Purification and characterization of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase from human postheparin plasma: production of monospecific antibody to the individual lipase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1003:254-269 (1989).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Sawa Minohara, Sung Kwan Bae, Saori Sugiyama, Noriko Shibata, Toshifumi Gushima, Junichi Motoshita, Shinji Shimoda, Atsuko Takagi, Yasuyuki Ikeda, Kazuhiro Takahashi. A case of non-alcoholic steatohepatitis complicated with severe acute pancreatitis

induced by decreased lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase activity levels in a young Japanese woman.

Clinical Case Reports 6:1769-1773 (2018). 査読有 DOI: 10.1002/ccr3.1706.

〔学会発表〕(計4件)

高木敦子、池田康行、鈴木重雄.

血中トリグリセリド分解酵素であるリポ蛋白リパーゼ(LPL)遺伝子エキソン5上の新規変異 S193R (C834G)と既知変異 I194T (T836C)の高トリグリセリド血症者からの同定.

第2回 中性脂肪学会学術集会 (2018年)

高木敦子.

TG検査法について LPL 遺伝子変異と心血管病.

第1回 中性脂肪学会学術集会 (2017年)

Yasuyuki Ikeda, Makoto Nagano, Tsuyoshi Iwanaga, Nobuko Ito, Hiroaki Hattori, Toru Egashira, Atsuko Takagi.

Identification of compound heterozygous deficiency with a novel large deletion and Y61X of the lipoprotein lipase gene in Japanese subject.

第1回 中性脂肪学会学術集会 (2017年)

Yasuyuki Ikeda, Tsuyoshi Iwanaga, Makoto Nagano, Nobuko Ito, Hiroaki Hattori, Toru Egashira, Atsuko Takagi.

Development of a lipoprotein lipase (LPL)-specific Invader Assay for the direct detection of the LPL gene mutation from genomic DNA.

第1回 中性脂肪学会学術集会 (2017年)

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：池田 康行

ローマ字氏名：Ikeda Yasuyuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。