

平成 30 年 6 月 7 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：15K08613

研究課題名(和文)自己免疫性脂質異常症の診断法の開発

研究課題名(英文)Development of diagnostic methods for autoimmune dyslipidemia

研究代表者

山本 浩靖 (YAMAMOTO, Hiroyasu)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00631201

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)：原因不明の重症脂質異常症の1つに自己免疫的機序の関与が想定されるが、その診断は難しい。本研究では、アポリポタンパク(アポ)C-IIに対する自己抗体に伴う高中性脂肪血症症例の診断に繋がる自己抗体検出系を作製した。1次スクリーニングとしてアポC-IIの部分ペプチドに対する自己抗体価をELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法で測定した。高抗体価症例の一部では、内因性アポC-IIに結合する自己抗体が免疫沈降・イムノブロット法にて確認された。また、IgAクラスのアポC-II自己抗体価は、糖尿病性腎症の病期と関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been estimated that autoimmunity is involved in the pathogenesis for severe dyslipidemia with unknown origin, but its diagnosis is not easy. In this study, we have developed a system to detect the anti-apolipoprotein (apo) C-II autoantibodies, which lead to severe hypertriglyceridemia. As a first screening test, we measured the serum anti-apo C-II autoantibody levels against the synthetic partial peptides of apo C-II by ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Among the five selected patients of hypertriglyceridemia with high autoantibody levels, we could identify the autoantibodies associated with the endogenous apo C-II by immunoprecipitation/immunoblot method in two patients. Also, we found that the serum levels of IgA class autoantibody might be related with the stage of diabetic nephropathy.

研究分野：臨床検査

キーワード：自己免疫 脂質異常症

## 1. 研究開始当初の背景

脂質異常症は動脈硬化性疾患発症予防を目的として、高血圧症や糖尿病とともにより厳格な管理・治療が叫ばれ、スタチン薬などの強力な薬剤による有効な治療戦略が示されるようになった。しかし、重症脂質異常症の中には病因が特定できないものが数多く存在し、しばしば治療に難渋する。その理由として、自己免疫的機序の関与や未知の脂質代謝関連因子の存在が想定されている。

自己免疫性脂質異常症は、リポ蛋白代謝に関わる LPL (lipoprotein lipase)、LDL-R (low density lipoprotein receptor)、各種 apolipoprotein (apo) に対する自己抗体が産生されることにより、その分子の機能低下症や欠損症の表現型を呈する病態である。この疾患概念は、1970 年に Beaumont らによって初めて提唱され (Beaumont, *et al.* Eur J Clin Biol Res 1970)、その後、1989 年に当研究室の木原らは、バセドウ病と特発性血小板減少性紫斑病を合併した高カイトミクロン血症症例の血清中に LPL に対する自己抗体の存在を証明し、さらにその抗体が LPL、HTGL (hepatic triglyceride lipase) 活性阻害効果を示すことが高中性脂肪血症の発症機序につながることを世界で初めて報告した (Kihara, *et al.* N Engl J Med 1989)。

しかしながら、この後の多くの報告は散発的な症例報告 (15 報) にとどまる。これまでの報告を総括すると、自己免疫性疾患に合併するもの、骨髄腫に合併するもの、の基礎疾患を有する 2 群に大別されると考えられていたが、我々は基礎疾患を有さない自己免疫性高中性脂肪血症の症例を 2014 年に発見し、報告した (Yamamoto, *et al.* J Clin Endocrinol Metab 2014)。この症例では自己抗体と結合した apo C-II 分子が脂肪基質と会合できないため、LPL による水解が生じないという機序を介して高中性脂肪血症が誘導されていた。従って、原発性の「脂質異常症」と診断されて

いる患者であっても、自己免疫的機序の関与する病態が含まれている可能性があり、診断の重要性を改めて示唆することとなった。

## 2. 研究の目的

自己免疫性脂質異常症の診断法は確立されておらず、多数の症例が見逃されていた可能性がある。自己免疫性脂質異常症の診断に際しては、リポ蛋白代謝に関わる分子に対する自己抗体が存在すること、検出された自己抗体により脂質代謝が影響を受けること、の証明が必要である。しかし、自己抗体の存在を証明することは容易ではなく、確立された簡便な検査法は無い。既報の多くでは、リガンド・プロット法を用いて血清中の自己抗体を直接検出している。この方法は、抗原を精製し、その精製抗原に結合する血中の遊離自己抗体を検出する方法であるため、大量の精製抗原が必要であること、比較的感度が低いこと、一度に処理できる検体数に限界があること、等の問題点を有している。さらに、検出された抗体による酵素活性への影響の検討は生化学的手法が必要であるが、病院の臨床検査部門で行える簡便な検査法ではなく、実地臨床では行われていないのが実情である。そこで、本研究では、自己免疫性脂質異常症の診断法の開発・確立を目指し、その基礎検討を行うことを主たる目的とした。

## 3. 研究の方法

自己免疫性脂質異常症の診断法の確立の方法として、自己抗体の存在を ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法で検出する一次スクリーニング、そしてその後に行う免疫沈降・イムノプロット法による自己抗体の存在の確認、という 2 段階の手法を用いることとした。後者では、内因性抗原に結合している自己抗体を検出することになるため、内因性抗原を免疫沈降できる自己抗体を検討した。まず、高中性脂肪血症の原因と

なる酵素 LPL について検討したが、作成したリコンビナント LPL を用いた免疫沈降を複数の市販の抗 LPL 抗体で検討したところ、いずれの抗体でも LPL が免疫沈降できなかった。そこで、本研究では LPL は対象から外し、これまでに使用・検討してきた apo C-II を主たる対象とすることとし、以下の研究を行った。

#### [ 方法 1 ] Apo C-II の部分ペプチドを固相化抗原とした ELISA 法の確立

Home-made ELISA での固相化抗原として、apo C-II の部分ペプチドを用いることとした。以前に我々が報告した症例では、抗 apo C-II 自己抗体が apo C-II と脂肪基質との結合を阻害し、LPL の活性化が阻害されたことから、apo C-II の脂質結合部位を含む 20 アミノ酸のペプチドを合成・精製した。このペプチドの純度は約 90.5%であった。Peptide Coating Kit (TAKARA) を用いて ELISA プレートを作製。大阪大学保健センターでの健診検体、NTT 西日本大阪病院糖尿病・内分泌内科通院中の糖尿病患者症例および人間ドック受診者の検体を用い、IgA、IgG、IgM それぞれのクラスの抗 apo C-II 抗体価を測定した。

#### [ 方法 2 ] 免疫沈降・イムノプロット法による抗 apo C-II 自己抗体の検出

方法 1 で自己抗体価が高値を呈した症例を選択し、これまでに我々の報告した方法 (Yamamoto, *et al.* J Clin Endocrinol Metab 2014) を用いて抗 apo C-II 自己抗体の存在を調べた。ヤギ抗ヒト apo C-II 抗体 (積水メディカル) をカップリングさせた磁気ビーズ (Dynabeads<sup>®</sup> M-280 (Thermo Fisher Scientific)) を用いて患者血清および健常対照血清の免疫沈降およびウエスタンブロットを行った。

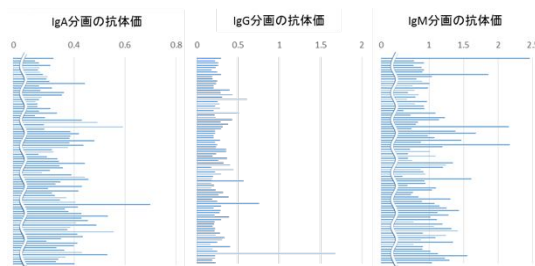
#### [ 方法 3 ] 抗 apo C-II 自己抗体の臨床的意義の検討

方法 1 の ELISA 法により、糖尿病患者症例での抗 apo C-II 自己抗体の抗体価を測定。その抗体価と各種臨床指標との関連を統計学的に検討した。統計解析には JMP<sup>®</sup> Pro version 12.2.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用し、三分位数で三群に分けた各種パラメータと抗体価との関連は Kruskal-Wallis 検定、糖尿病の合併症と抗体価との関連は Kruskal-Wallis 検定、Steel-Dwass 検定あるいは Wilcoxon 検定により評価した。

#### 4 . 研究成果

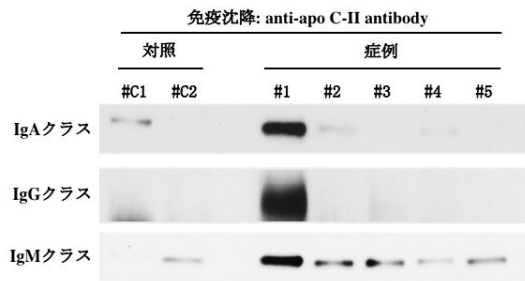
[ 結果 1 ] 91 名の糖尿病患者血清を用いた ELISA 法にて測定した IgA, G, M クラスの抗 apo C-II 抗体価は図 1 の通りであった。

図 1: ELISA 法で測定された抗 apo C-II 自己抗体の各 Ig クラスの分布



[ 結果 2 ] 結果 1 で示された抗 apo C-II 自己抗体の各 Ig クラスの抗体価の上位 5 症例で、かつ中性脂肪値が 150 mg/dL を超える症例を抽出したところ、5 症例 (#1-#5) が対象となった。ELISA 法では、#1 では IgA と IgG、#2 では IgA と IgM、#3 では IgM、#4 と #5 では IgG クラスの抗体価の増加が認められた。これらの症例と健常対照 2 名の血清を用いて免疫沈降・イムノプロットにより検出された自己抗体は図 2 の通りであった。

図 2: 内因性 apo C-II に結合する抗 apo C-II 自己抗体の検出



すなわち、#1 では IgA, G, M 全てのクラスの抗 apo C-II 自己抗体の存在が、#2, #3 の症例では IgM クラスの抗 apo C-II 自己抗体の存在が示唆された。尚、#1 は自己免疫性疾患を有さない 56 歳の男性症例であり、TG 460 mg/dL で虚血性心疾患の既往を有するが、糖尿病性細小血管合併症は認めなかった。

[結果3] 結果1 で得られた抗体値と各種臨床パラメータとの関連では、IgA クラスの抗体価は糖尿病性腎症の病期と関連する可能性が示唆されたが(p<0.05)、網膜症や神経障害の有無との関連、大血管障害との関連は認めなかった。また、IgG, M クラスの抗体価は細小血管症と大血管症いずれとも関連しなかった。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 2 件)

- 1) 山本 浩靖、木原 進士、中外医学社、自己免疫機序による脂質異常症 (Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2015)、2015、122-127
- 2) 山本 浩靖、日本臨床社、自己免疫性脂質異常症 (別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 免疫症候群)、2015、544-548

[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] なし

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

山本 浩靖 (YAMAMOTO, Hiroyasu)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 00631201

##### (2)研究分担者

木原 進士 (KIHARA, Shinji)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 20332736

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号:

(4)研究協力者

( )