

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09130

研究課題名(和文) HDLの質は心血管病の治療ターゲットとして有望か？

研究課題名(英文) Is HDL quality a good candidate for novel therapeutic target of cardiovascular disease?

研究代表者

小倉 正恒(Ogura, Masatsune)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長

研究者番号：30532486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高比重リポタンパクコレステロール(HDL-C)は善玉コレステロールと呼ばれてきたが、単純にHDL-C量を増加させることでは心臓病を予防できない。そこでHDLの研究は量(HDL-C値)から質(HDL機能とその規定因子)にパラダイムシフトした。我々はHDL機能として細胞からのコレステロール引き抜き能と抗酸化能の測定法を確立し、高率に冠動脈疾患を発症する家族性高コレステロール血症患者および吹田研究に参加した一般住民において動脈硬化性疾患の予測因子としてHDL機能がHDL-C値よりも有用であることを明らかにした。今後はHDL機能規定因子を探索し、新たなバイオマーカーの開発や創薬を目指したい。

研究成果の概要(英文)：Drug interventions that increase high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), which was thought as “the good cholesterol”, have not reduced cardiovascular events in patients already prescribed statin. These evidences support the importance of HDL functionalities over the simple measurement of HDL-C levels. We demonstrated both cholesterol efflux capacity and anti-oxidant property were better surrogate markers for predicting atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD) than HDL-C levels in patients with familial hypercholesterolemia. Moreover, we investigated the association between cholesterol efflux capacity and incident ASCVD outcomes in a Japanese general population cohort (The Suita study). We found cholesterol efflux capacity was inversely associated with the incidence of all ASCVD events. Further studies are needed to identify the determinants of HDL functionalities. It will lead to develop novel biomarkers and drugs to reduce residual risks after LDL lowering therapy.

研究分野：脂質代謝学

キーワード：HDL機能 HDLコレステロール 家族性高コレステロール血症 一般住民コホート コレステロール引き抜き能 抗酸化能

### 1. 研究開始当初の背景

低 HDL-C 血症は動脈硬化性疾患の強い危険因子であるにもかかわらず、単純に HDL-C 量を増加させる臨床的なベネフィットは現時点では得られていない (Keene et al, BMJ2014)。そこで HDL の質、すなわち抗動脈硬化作用を高める治療の開発が期待されている。HDL の抗動脈硬化作用には M からコレステロールを引き抜き肝臓へ逆転送する作用や抗酸化作用がある。最近報告された症例対照研究において、後述する方法で測定したコレステロール引き抜き能は HDL-C 濃度よりも強く冠動脈疾患 (CAD) のリスクと関連していた (Khera et al, NEJM2011)。しかし、HDL 機能と心血管病の発症との関連を示した研究は横断研究と症例対照研究に限られ、HDL 機能のリスクマーカーとしての位置づけは未解決課題であった。

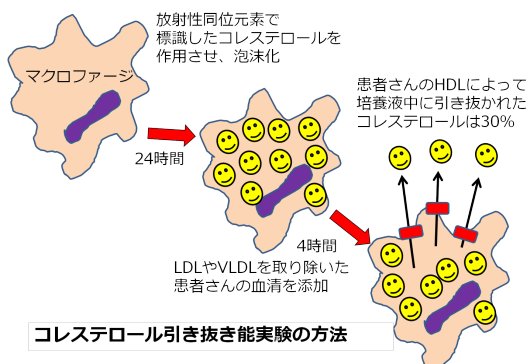
### 2. 研究の目的

本研究は HDL 機能が動脈硬化性心血管疾患のリスクかどうかをコホート研究及び横断的症例対照研究により明らかにする臨床研究に加え、血清 HDL-C 濃度が同程度でもなぜ HDL 機能に個人差が生じるのかという疑問を解決するために、HDL 機能を規定する因子を見つけ、HDL 機能をターゲットとした介入研究や創薬などへの応用の基盤を築くことを目的とする。HDL 機能は、マクロファージからのコレステロール引き抜き能と抗酸化能の測定法を確立し、臨床検体を測定した。

### 3. 研究の方法

(1)HDL によるマクロファージからのコレステロール引き抜き能測定法の確立 (使用血清量 75  $\mu$ L/人)

放射性コレステロール ( $^3$ H-cholesterol) でマウスマクロファージ細胞株 J774.1 細胞をラベルし、患者血清から分離した HDL を添加することで行う。HDL 分画の単離は 13% ポリエチレングリコール (PEG) による沈殿法を用いて行い、培地中の放射活性を、培地および細胞の活性で除した値をコレステロール引き抜き能とする (下図)。プレート間の誤差を補正するためにコントロールとして



大量にプールした標準血清を用いて毎回補正を行う。

(2)HDL の抗酸化能測定法 (Oxygen Radical Absorbance Capacity(ORAC)アッセイ) の確立

PEG 沈殿法で単離された患者 HDL 分画に含まれる抗酸化物質によるラジカル吸収能を 96 ウェルプレートを使用した蛍光検出により測定する。ORAC 法の原理は、活性酸素種により分解する蛍光物質の蛍光強度を測定し経時的に減少する曲線を描いた場合、抗酸化物質の存在下ではその蛍光強度の減少速度が遅延することを利用するものである。

(3)家族性高コレステロール血症 (FH) 患者におけるコレステロール引き抜き能の臨床的意義に関する研究

すでにスタチンを処方されている FH ヘテロ接合体患者 227 名のコレステロール引き抜き能を測定し、身体的所見である角膜輪、アキレス腱の厚さ、頸動脈内膜中膜複合体厚、心血管疾患の有無との関連について横断的に解析した。

(4) 家族性高コレステロール血症 (FH) 患者における抗酸化能の臨床的意義に関する研究

すでにスタチンを処方されている FH ヘテロ接合体患者 334 名の抗酸化能を ORAC 法で測定し、コレステロール引き抜き能との相関性、身体的所見である角膜輪、アキレス腱の厚さ、頸動脈内膜中膜複合体厚 (IMT)、心血管疾患の有無との関連について横断的に解析した。

(5) HDL 機能と循環器疾患発症一次予防との関連についてのコホート解析 (吹田コホート研究)

HDL 機能と心血管疾患発症リスクとの関連を明らかにするために、吹田研究参加者のうち、1994 年度に追跡のための健診を受診し血清検体が凍結保存されており、かつ、その後の心血管疾患発症について追跡調査されている参加者約 2,200 人を対象とした前向きコホート研究である。コレステロール引き抜き能を測定し、これまでの研究結果を集積している吹田研究の既存データベースから、追跡調査における心血管疾患 (脳卒中、冠動脈疾患) 発症・死亡の有無や循環器疾患の関連要因を抽出し、HDL 機能と心血管疾患発症リスクとの関連について古典的危険因子を含む関連要因の調整も含めて詳細に検討するとともに、HDL 機能と関連する要因等についても探索的な検討を行った。

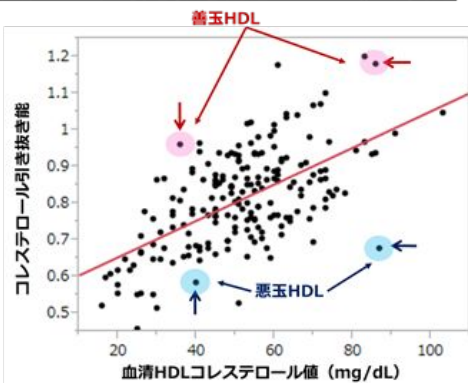
### 4. 研究成果

(1) 家族性高コレステロール血症 (FH) 患者

におけるコレステロール引き抜き能の臨床的意義に関する研究

当院通院中ですでにスタチンを内服中のFHヘテロ接合体患者227名のコレステロール引き抜き能を測定したところ、HDL-C値との関連は比較的良好であったが、同じHDL-C値の患者間において引き抜き能に差があることが判明した(下図)。

#### コレステロール引き抜き能とHDL-C値の関連



FH患者のうち、角膜輪を有する者はコレステロール引き抜き能が年齢・性別で調整した多変量解析においても有意に低かった。またアキレス腱の厚さおよび頸動脈IMTはコレステロール引き抜き能と負の関連を示し、この関連は年齢・性別・古典的冠危険因子で調整した多変量解析を実施しても不変であった。しかし、HDL-C値を調整した場合にこの関係性は弱まった。

心血管疾患の有無との関連については、心血管疾患を有する者で引き抜き能は有意に低く、この関連性は年齢・性別およびHDL-C値を含む古典的冠危険因子で調整しても不変であり、かつコレステロール引き抜き能はHDL-C値よりも有用な心血管疾患の残余リスクマーカーであることが明らかになった(下表)。

#### コレステロール引き抜き能はスタチン内服中の

#### FH患者における冠動脈疾患の予測因子

	オッズ比	P値
年齢	1.03	0.0570
性別(女性)	0.65	0.4114
高血圧症	3.13	0.0055
糖尿病	1.49	0.4257
喫煙歴	1.82	0.2076
肥満	1.68	0.3202
LDLコレステロール値	0.98	0.0046
中性脂肪値	1.63	0.2438
HDLコレステロール値	0.99	0.6821
コレステロール引き抜き能	0.95	0.0260

本研究結果はArterioscler Thromb Vasc Biol誌(業績論文)に掲載され、同日にプレスリリースを実施、2015年12月24日に日本経済新聞や読売新聞に「コレステロール、質が重要」等の記事として掲載された。また

動脈硬化性疾患ガイドラインのFHの項にもその他の危険マーカーとして本論文が引用され記載された(業績論文)。

(2) 家族性高コレステロール血症(FH)患者における抗酸化能の臨床的意義に関する研究

すでにスタチンを処方されているFHヘテロ接合体患者334名の抗酸化能をORAC法で測定し、HDL-C値およびコレステロール引き抜き能との相関性を評価したところ、それぞれ $R=0.2$ 程度と関連性は弱かった。抗酸化能の低下は角膜輪の存在と関連があり、この関連性は、年齢・性別およびHDL-C値を含む古典的冠危険因子で調整しても不変であった。興味深いことにアキレス腱の厚さ、頸動脈内膜中膜複合体厚(IMT)とは弱い負の関連性は認められたが、多変量解析により弱まった。心血管疾患の有無との関連については抗酸化能の低下(ORAC値の低値)はコレステロール引き抜き能の低値と独立して、両方ともHDL-C値よりも有用なバイオマーカーであることが判明した(下表)。

#### 動脈硬化性疾患の予測因子(多変量解析)

	Odds Ratio (95%CI)	P value
年齢	1.04 (1.01-1.07)	0.0024
性別(女性)	0.64 (0.26-1.53)	0.3111
高血圧症	2.50 (1.24-5.11)	0.0107
糖尿病	1.72 (0.73-4.08)	0.2129
喫煙歴	2.05 (0.95-4.45)	0.0670
肥満	1.70 (0.77-3.75)	0.1891
LDLコレステロール値	0.99 (0.98-1.00)	0.0050
Log TG値	1.43 (0.73-2.83)	0.2996
HDLコレステロール値	0.98 (0.95-1.02)	0.3520
Cholesterol Efflux Capacity	0.95 (0.91-0.99)	0.0119
ORAC value	0.97 (0.95-1.00)	0.0292

本研究の成果は各種学会で発表を実施した(学会発表欄)。現在は抗酸化能を司る規定因子としてHDL粒子中のビタミンE(トコフェロール)(学会発表欄)やパラオキシナーゼ活性の測定を進めており、現在論文作成に取り掛かっているところである。

(3) HDL機能と循環器疾患発症一次予防との関連についてのコホート解析(吹田コホート研究)

1994年に追跡調査のために受診した吹田研究参加者約2200名のコレステロール引き抜き能を測定し、そのうち心血管イベントを発症しておらず、かつ全てのデータが揃った1815名の解析を実施した。平均年齢は59歳、追跡期間の中央値は11.1年であった。追跡期間中に121名に心血管イベントが発症した(冠動脈疾患55名、脳血管疾患66名)。ベースライン時のコレステロール引き抜き能の値により3分位に群わけし、全心血管イ

ント発症、冠動脈疾患発症、全脳血管疾患発症、脳梗塞発症のハザード比を年齢・性別・古典的冠危険因子・HDL-C 値で調整した多変量解析モデルを用いて算出した。もっとも引き抜き能が低い群のハザード比を1とした場合、引き抜き能が最も高い群の全心血管イベントのハザード比(95%CI)は0.54(0.30-0.98)と有意に低かった。また引き抜き能が最も高い群の脳梗塞発症のハザード比は0.28(0.10-0.83)と有意に低く、コレステロール引き抜き能が一般住民コホートにおいてHDL-C 値よりも有用なリスクマーカーであることを明らかにできた。ここまでの結果はすでに学会発表を実施した(学会発表欄)が、現在、さらにイベントの追跡期間を5年間延長したデータを取っており、総イベント数が約30件増えるとのことである。その結果を含めて論文投稿する予定である。

#### (4)その他

本研究期間中にHDL機能測定系を確立し、各学会等で発表を展開した結果、様々なコラボレーションが生まれた。例えば、札幌医科大学の古橋講師らとの共同研究では端野・壮警町研究の住民コホートの検体250名分のコレステロール引き抜き能を測定し、頸動脈IMTと負の関連を示すことと、その動脈硬化の重症度と引き抜き能の低下に共通する分子として脂肪酸結合タンパクFABP5を同定し、Scientific Reports誌に発表することができた(論文業績)。

また東京大学薬学部との共同研究ではリポタンパク粒子に脂溶性の薬剤が搭載され、運搬されること、重症FH患者においてLDL吸着療法(アフエレス)を実施すると薬剤も一緒に吸着されてしまうことを見出し、HDLを含むリポタンパクの機能を評価する際には脂溶性薬物の内服状況等も重要な因子であることを学習した。本研究結果は同じくScientific Reports誌に発表することができた(論文業績)。

加えてLDL低下治療後の残余リスクについて議論する国際ワーキングショップに招待され、そのときのディスカッション内容をAtherosclerosis Supplement誌にまとめて発表した(論文業績)。

さらに防衛医科大学校、サッポロホールディングス株式会社との共同研究で、ヒトと同じくコレステリルエステル転送タンパクを有するハムスターを用いて、ビールに含まれるホップの成分キサントフモールがHDL機能を改善することをJ Nutr Biochem誌に報告した(論文業績)。

今後はHDL機能を規定する因子の探索研究も進めていく。

#### 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15件)

Harada-Shiba M, Ogura M, Yokote K et al; Working Group by Japan Atherosclerosis Society for Making Guidance of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for Diagnosis and Treatment of Familial Hypercholesterolemia 2017. J Atheroscler Thromb. 2018 in press 査読有 doi: 10.5551/jat.CR003.

Takiguchi S, Ogura M, Ikewaki K et al. Hepatic Over-expression of Endothelial Lipase Lowers HDL (High-Density Lipoprotein) but Maintains Reverse Cholesterol Transport in Mice: Role of SR-BI (Scavenger Receptor Class B Type I)/ABCA1 (ATP-Binding Cassette Transporter A1)-Dependent Pathways. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018 in press 査読有 doi:10.1161/ATVBAHA.118.311056.

Ogura M. PCSK9 inhibition in the management of familial hypercholesterolemia. J Cardiol. 2018; 71(1): 1-7. 査読有 doi:10.1016/j.jjcc.2017.07.002.

Hirata H, Ogura M, Ikewaki K et al. Xanthohumol, a hop-derived prenylated flavonoid, promotes macrophage reverse cholesterol transport. J Nutr Biochem. 2017; 47: 29-34. 査読有 doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.04.011.

Averna M, Stroes E, Ogura M, et al; lipid alterations beyond LDL expert working group. How to assess and manage cardiovascular risk associated with lipid alterations beyond LDL. Atheroscler Suppl. 2017; 26: 16-24. 査読有 doi: 10.1016/S1567-5688(17)30021-1.

Yamamoto H, Ogura M, Harada-Shiba M, et al. VLDL/LDL acts as a drug carrier and regulates the transport and metabolism of drugs in the body. Sci Rep. 2017; 7(1): 633. 査読有 doi: 10.1038/s41598-017-00685-9.

Furuhashi M, Ogura M, Harada-Shiba M, et al. Serum FABP5 concentration is a potential biomarker for residual risk of atherosclerosis in relation to cholesterol efflux from macrophages. Sci

Rep. 2017; 7(1): 217. 査読有 doi:  
10.1038/s41598-017-00177-w.

Yakushiji E, Ogura M, Ikewaki K et al. ProbucoI-Oxidized Products, Spiroquinone and Diphenquinone, Promote Reverse Cholesterol Transport in Mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016; 36(4): 591-597. 査読有 doi:  
10.1161/ATVBAHA.115.306376.

Ogura M, Hori M, Harada-Shiba M. Association between Cholesterol Efflux Capacity and Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Patients with Familial Hypercholesterolemia. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016; 36(1): 181-8. 査読有 doi:  
10.1161/ATVBAHA.115.306665.

小倉正恒:「シリーズ・危険因子: コレステロール引き抜き能」, 動脈硬化予防 Vol.16, No.2, 100-102, 2017 査読無

小倉正恒, 斯波真理子:「FH 診療 - これからの展望と課題」, BIO Clinica. Vol.31 No.13, 23-27, 2016. 査読無

小倉正恒, 斯波真理子:「リスクファクターコントロール: 脂質代謝異常 - さらなる LDL-C の低下と HDL への介入」, 医学のあゆみ. Vol.259 No.6, 689-694, 2016.

小倉正恒, 斯波真理子:「FH 診療の展望と課題」, 呼吸と循環. Vol.64 No.11, 1095-1101, 2016. 査読無

小倉正恒, 斯波真理子:「HDL 機能と心血管疾患 - FH 患者からの知見 - 」, 循環 plus. Vol.17 No.1,7-9, 2016. 査読無

小倉正恒:「動脈硬化・心血管疾患を防ぐ脂質管理」, 生活習慣病 News & Views. Vol.40, 3-4, 2016. 査読無

[学会発表(筆頭のみ)](計25件)

Masatsune Ogura, et al. Cholesterol efflux capacity and incident atherosclerotic cardiovascular disease events in a Japanese general population: The Suita Study. 第50回日本動脈硬化学会学術集会(招待講演). 2018年7月、大阪

小倉正恒. HDLの量と質. 第61回日本糖尿病学会年次学術集会(招待講演). 2018年5月、東京

Masatsune Ogura, et al. Association

between alpha-tocopherol concentration in HDL fraction and cholesterol efflux capacity in patients with familial hypercholesterolemia. 86th European Atherosclerosis Society Congress. 2018年5月、リスボン

小倉正恒, 廣渡祐史, 真仁田大輔, 斯波真理子. 家族性高コレステロール血症患者におけるHDL分画中の トコフェロール濃度とコレステロール引き抜き能、動脈硬化との関連. 第55回日本臨床分子医学会. 2018年4月、京都

Masatsune Ogura, et al. Cholesterol efflux capacity and incident atherosclerotic cardiovascular disease events in a Japanese general population: The Suita Study. 第82回日本循環器学会学術集会. 2018年3月、大阪

小倉正恒. HDLはまだ死んでいない. 日本生物工学会 第8回学際的脂質創生研究部会(招待講演). 2018年1月、広島

小倉正恒. 予防医学におけるHDLの量と質. 第57回日本臨床化学会年次学術集会(日本末病システム学会合同シンポジウム招待講演). 2017年11月、札幌

小倉正恒. HDL機能測定の臨床的意義と課題. 第57回日本臨床化学会年次学術集会(招待講演). 2017年11月、札幌

Masatsune Ogura, et al. Cholesterol Efflux Capacity and Incident Atherosclerotic Cardiovascular Disease Events in a Japanese General Population. European Society of Cardiology Congress 2017(国際学会). 2017年8月、バルセロナ

小倉正恒. 新しい時代のFH治療~論語と算盤~. 第49回日本動脈硬化学会学術集会(招待講演). 2017年7月、広島

Masatsune OGURA, et al. Fatty acid-binding protein 5 as a residual risk for atherosclerotic cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. 85th European Atherosclerosis Society Congress. 2017年4月、プラハ

Masatsune OGURA, et al. Antioxidant property of HDL as a novel residual risk for atherosclerotic cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. 第81回日本循環器学会学術集会. 2017年3月、金沢

Masatsune OGURA, et al. Antioxidant property of HDL and cholesterol efflux capacity as mutually independent risk marker for atherosclerotic cardiovascular disease in patients with familial hypercholesterolemia. 3rd World Congress on Clinical Lipidology. 2017年2月、ブリスベン

小倉正恒. HDL機能としての抗酸化能とその臨床的意義. 日本生物工学会 第7回学際的脂質創生研究部会. 2017年1月、福岡

小倉正恒. HDL機能評価法の確立と臨床応用. 第56回日本臨床化学会年次学術集会(招待講演). 2016年12月、熊本

Masatsune Ogura, et al. Antioxidant property of HDL predicts the presence of atherosclerotic cardiovascular disease and corneal arcus in patients with familial hypercholesterolemia. European Society of Cardiology Congress 2016(国際学会). 2016年8月、ローマ

小倉正恒. 家族性高コレステロール血症の残余リスクとしてのHDL機能. 第48回日本動脈硬化学会学術集会(招待講演). 2016年7月、東京

小倉正恒. 家族性高コレステロール血症の残余リスク. 第52回日本循環器病予防学会学術集会(招待講演). 2016年6月、埼玉

Masatsune OGURA, et al. High-Density Lipoprotein Phospholipid Content and Apolipoprotein A-I Level Are Determinants of Cholesterol Efflux Capacity in Patients with Familial Hypercholesterolemia. 84th European Atherosclerosis Society Congress. 2016年5月、インスブルック

Masatsune OGURA, et al. Cholesterol Efflux Capacity as a Promising Biomarker for Atherosclerotic and Metabolic Diseases. 第81回日本循環器学会学術集会. 2016年3月、仙台

21 小倉正恒. HDL機能測定の現状と課題. 日本生物工学会 第6回学際的脂質創生研究部会. 2016年1月、徳島

22 小倉正恒. HDL機能測定法の開発~残余リスクの制圧を目指して~. 第55回日本臨床化学会年次学術集会(招待講演). 2015年10月、大阪

23 Masatsune OGURA, et al. Cholesterol Efflux Capacity in Patients with Familial

Hypercholesterolemia. 17th International Symposium on Atherosclerosis. 2015年5月、アムステルダム

24 Masatsune OGURA, et al. Cholesterol Efflux Capacity as a Residual Risk Factor for Familial hypercholesterolemia. Pre-satellite symposium of 17th International Symposium on Atherosclerosis. 2015年5月、東京

25 Masatsune OGURA, et al. Cholesterol Efflux Capacity as an Emergent Biomarker in Patients with Familial Hypercholesterolemia already prescribed statin. 第80回日本循環器学会学術集会. 2015年4月、大阪

〔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.ncvc.go.jp/res/divisions/molecular\\_innovation\\_in\\_lipidology/](http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/molecular_innovation_in_lipidology/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小倉 正恒 (OGURA, Masatsune)  
国立循環器病研究センター・研究所・室長  
研究者番号: 30532486

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

斯波 真理子 (HARADA-SHIBA, Mariko)  
国立循環器病研究センター・研究所・部長  
研究者番号: 70271575

宮本 恵宏 (MIYAMOTO, Hiroshi)  
国立循環器病研究センター・病院・部長  
研究者番号: 10312224

渡邊 至 (WATANABE, Makoto)  
国立循環器病研究センター・病院・医長  
研究者番号: 40343446

浅海 泰栄 (ASAUMI, Yasuhide)  
国立循環器病研究センター・病院・医長  
研究者番号: 20629315

### (4) 研究協力者

森本 めぐむ (MORIMOTO, Megumu)