

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19174

研究課題名(和文) 赤血球関連コレステロール代謝のメカニズムとその破綻の解明

研究課題名(英文) Investigation erythrocyte-associated cholesterol metabolism and its disorder.

研究代表者

大川 龍之介(Ohkawa, Ryunosuke)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・助教

研究者番号：50420203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：赤血球は血液中で血清と同程度のコレステロールを含み、コレステロール代謝に深く関与すると考えられるが、その機構は十分に解明されていない。よって、赤血球関連コレステロール代謝およびその破綻について調べた。結果、赤血球は高比重リポタンパク(HDL)や低比重リポタンパクと多量のコレステロールの受け渡しを行い、コレステロール逆転送系においてコレステロールプールの役割を担っていることが明らかになった。また、赤血球関連コレステロール代謝に質的異常を持ったHDLがどのように関わるかを調べる目的で、炎症時に肝臓より分泌される血清アミロイドA(SAA)を含有するSAA含有HDLの作製とキャラクタライズに成功した。

研究成果の概要(英文)：Since erythrocyte contains cholesterol abundantly at the same degree as that in plasma, it is speculated that the erythrocyte is associated with cholesterol metabolism but the mechanism has not been fully elucidated. Hence, we investigated the erythrocyte-related cholesterol metabolism and its disorder. Our results demonstrated that the erythrocyte was involved in cholesterol acceptance and delivery with high-density lipoprotein (HDL) and low-density lipoprotein, and played a role in reverse cholesterol transport pathway as a cholesterol pool. In addition, we successfully produced and characterized one of dysfunctional HDL (dys-HDL), serum amyloid A-contained HDL, which is produced from liver during inflammation, in order to investigate an association between erythrocyte-related cholesterol metabolism and dys-HDL.

研究分野：病態検査学

キーワード：赤血球 コレステロール 高比重リポタンパク 低比重リポタンパク 血清アミロイドA

1. 研究開始当初の背景

粥状動脈硬化発症のリスク評価検査として、血清中の低比重リポタンパク (LDL) や高比重リポタンパク (HDL) コレステロール濃度が測定されている。LDL コレステロール降下剤は粥状動脈硬化に対して、一定の効果を上げているが、完全には予防できておらず、また粥状動脈硬化症の約3割は、コレステロール検査が基準値内であることが知られている。これは、高LDLや低HDLといった血清中におけるコレステロール“濃度”によらない、他の粥状動脈硬化の原因の存在を示唆している。HDLはコレステロールの逆輸送をはじめとして、抗炎症作用、抗酸化作用など多彩な抗動脈硬化作用を発揮するリポタンパクであるが、炎症や酸化ストレスなどにより様々な修飾を受け、“質的異常”をもったHDL (Dys-HDL) となることが近年注目されてきている。

一方、全血液中では血清以外に赤血球もまた、血清と同程度の量のコレステロールを運搬している。近年の研究で、³H 標識コレステロールを含有した泡沫細胞をマウスに注射すると、正常マウスでは³H 標識コレステロールはHDLによって引き抜かれるのに対し、HDLの主要なアポリポタンパクであるアポリポタンパク A-I (apoA-I) をノックアウトしたマウスでは、³H 標識コレステロールはHDLよりもむしろ赤血球に含まれ、やがて便として排出されることが報告された (Hung et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012)。さらには、血管内皮細胞の生存維持、増殖などに関わっている生理活性脂質であるスフィンゴシン 1-リン酸の血中濃度には赤血球からの放出が最も重要であることがマウスの実験によって示唆され (Pappu et al., *Science*, 2007)、また、研究代表者は、実際に健常者ヒト血中において、スフィンゴシン 1-リン酸と赤血球数に正の相関性があることを明らかにした (Ohkawa et al., *Ann Clin Biochem*, 2008)。このように、赤血球は生体内における脂質代謝に非常に重要な役割を果たしていることが示唆されるが、そのメカニズムについてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

研究代表者は先行研究において、生理食塩水で洗浄した赤血球と血漿を 37 °C でインキュベーションを行うと、24 時間後には血漿コレステロール濃度が約 20 mg/dL 増加し、さらにインキュベーション後の赤血球からコレステロールを抽出し含有量を測定するとインキュベーション前より含有量が低下していることを見出した (未発表)。また、超遠心により血漿を各リポタンパク分画に分け、それぞれの分画と赤血球を 37 °C でインキュベーションすると、HDL 分画を添加した際には血漿と同等のコレステロール濃度の増加が認められたが、LDL、超低比重リポタ

ンパク、リポタンパクの含まれていない血漿 (lipoprotein depleted plasma) を赤血球に添加した場合においては、コレステロールの増加量は少ないことを明らかにした。また、増加したコレステロールはほとんどがエステル型であったが、56 °C、30 分の不活化処理によって HDL に含まれるコレステロールエステル化酵素である Lecithin cholesterol acyl transferase を失活させた後、同様の操作を行うと、エステル型ではなく遊離型コレステロールが増加することを明らかにした (未発表)。以上のことから、先行研究において、赤血球は HDL を介して血漿中に多量の遊離型コレステロールを放出していることを明らかにした。

このように、赤血球は流血中において、泡沫細胞やリポタンパクと緻密なクロストークを行っていることが推察されるが、そのメカニズムはほとんど明らかになっていない。また、質的異常をきたした Dys-HDL は上記の赤血球関連コレステロール代謝に何らかの影響を与えていることが推察される。よって本研究では、赤血球コレステロール代謝のメカニズムの解明とリポタンパクの質的異常によるその機能の破綻の有無について検索することを目的とし、粥状動脈硬化の発症機序の一端を明らかにしていきたい。

3. 研究の方法

(1) 赤血球からのコレステロール放出のアクセプター同定および放出機構の解析

健常者血清より HDL 中に含まれる apoA-I、アポリポタンパク ApoA-II (apoA-II) やアポリポタンパク E 含有 HDL を精製した。精製したそれぞれのアポリポタンパクを赤血球と混和し、コレステロール放出反応の有無を解析した。次に、アデニン、オルトパナジン (V) 酸ナトリウム (各種 ATP-binding cassette transporter (ABC) 阻害剤)、グリブライド (ABCA1 阻害剤) で赤血球を処理した後、同様に血漿と反応させた。

さらに赤血球から血漿へのコレステロール転送のメカニズムを解明するために、蛍光標識したコレステロール (23-(dipyrometheneboron difluoride)-24-norcholesterol; BODIPY-Chol) を用いた赤血球膜表面のラベリングを試みた。この蛍光標識赤血球と血漿を混和、インキュベーションを行い、その後の血漿中の蛍光強度を解析することで赤血球から放出されたコレステロールの動態を追跡した。

(2) 泡沫細胞から赤血球へのコレステロール輸送経路の同定

前述した泡沫細胞から赤血球へのコレステロールの移動の詳細な機構を *in vitro* において解明するために、コレステロール引き抜き能を評価する系を確立した。ヒト単球性白血球細胞株 (THP-1) を phorbol 12-myristate 13-acetate によって 2 日間刺激し、マクロファージ化した後、³H 標識コレステロールおよ

びアセチル LDL を取り込ませ泡沫細胞を作製，泡沫細胞に apoA-I, HDL および赤血球を添加し，反応させた．インキュベーション後の，赤血球内への ^3H 標識コレステロールの移動をシンチレーションカウンタにて調べ，赤血球によるコレステロール引き抜きの関与の有無を調べた．

(3)Dys-HDL の作製と性状，機能の解析

当研究室では，炎症時に産生されるミエロペルオキシダーゼやキマーゼなどの各種酵素および動脈硬化と関連が知られているホモシステインがアポリポタンパク A-I を修飾し，抗動脈硬化作用に影響を与えること，また実際に抗動脈硬化性疾患患者の血清中にこれら修飾アポリポタンパクが多いことを既に見出している (Usami et al., J Immunol Methods, 2011, Kameda et al., Ann Clin Lab Sci, 2012, Miyazaki et al., Biological Chemistry, 2014) .今回あらたに，Dys-HDL の一つとして炎症時に産生される血清アミロイド A を含有する HDL の作製およびその性状を解析した．

4. 研究成果

(1) 赤血球からのコレステロール放出のアクセプター同定および放出機構の解析

洗浄した赤血球に apoA-I, apoA-II および apoE 含有 HDL を添加，37 でインキュベーションし，コレステロール濃度の変化を測定した．結果，HDL とは大きく異なり，apoA-I, apoA-II ではほとんど赤血球からのコレステロールの放出は認められなかった (図 1) . また，apoE 含有 HDL と apoE 非含有 HDL ではコレステロールの放出に大きな差は認められなかった (図 2) . よって，赤血球からのコレステロール放出には，上記以外のアポリポタンパク，脂質転送酵素，あるいは，リン脂質などの HDL に含まれる脂質が関与している可能性が示唆された．また，アデニン，オルトパナジン (V) 酸ナトリウム，グリブライドで赤血球を処理した後に血漿を混和すると，アデニンの添加により，コレステロールの放出量は増加する傾向にあった．

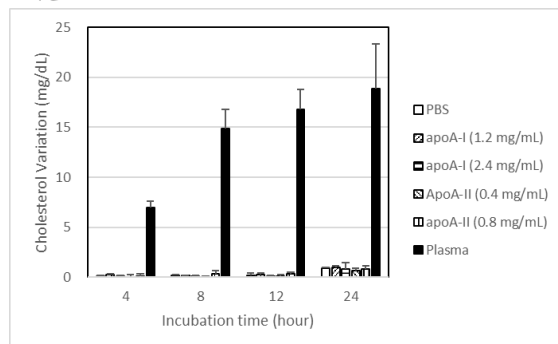


図 1 . 各種アポリポタンパクによる赤血球からのコレステロール放出量の違い

洗浄赤血球と二種類の異なるタンパク濃度の apoA-I, apoA-II PBS 溶液および血漿をインキュベーションした後のコレステロール濃度変化を示す．

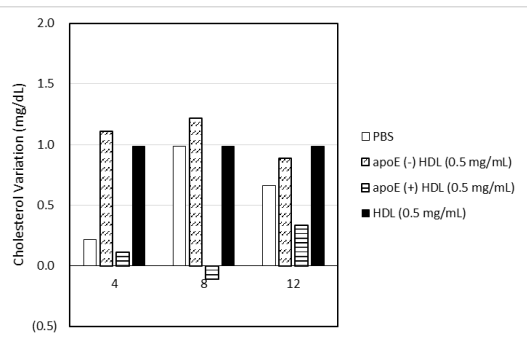


図 2. apoE 含有および非含有 HDL への赤血球からのコレステロール放出量の違い

洗浄赤血球と 0.5 mg/mL protein の apoE 含有 HDL (apoE(+))HDL) および apoE 非含有 HDL (apoE(-)HDL), 通常の HDL をインキュベーションした後のコレステロール濃度変化

赤血球膜表面に BODIPY-Chol のラベリングを試みた．溶媒の濃度を検討することで，赤血球を溶血させずに，膜表面を蛍光標識することに成功した (図 3) . 次に，この蛍光標識赤血球と血漿を混和，インキュベーションを行い，その後の血漿を解析することで赤血球から放出されたコレステロールの動態を追跡した．初めに BODIPY 標識赤血球においても通常の赤血球と同様に血漿中にコレステロールを放出することを確認した後，血漿から超遠心により全リポタンパク分画を抽出し，蛍光強度を測定した．結果，BODIPY-Chol 標識した赤血球とインキュベーションした場合，時間依存的に蛍光強度の増加が認められた (図 4) . さらに，全リポタンパクをゲル濾過クロマトグラフィーを用いて各リポタンパク分画 (VLDL, LDL, HDL) に分け，それぞれを蛍光検出器でモニタリングした．その結果，HDL と LDL 分画に蛍光コレステロールは転送され VLDL にはほとんど転送されないことが明らかになった (図 5) .

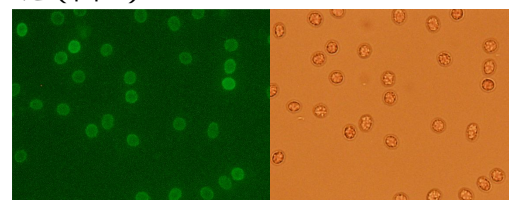


図 3 .BODIPY-Chol で標識した赤血球の顕微鏡画像 (左: 蛍光顕微鏡 / 右: 光学顕微鏡)

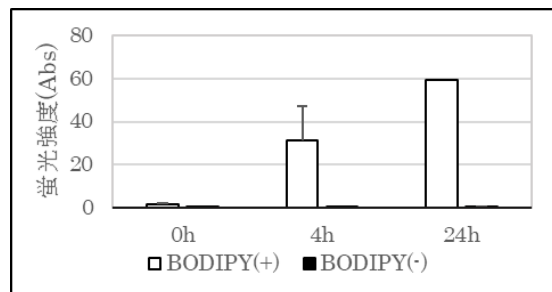


図 4 . 赤血球とインキュベーション後の全リポタンパク分画蛍光強度の変化

洗浄赤血球 (BODIPY (-)) および BODIPY-Chol 標識赤血球 (BODIPY (+)) と血漿をインキュベーションした後の血漿から抽出した全リポタンパク中の蛍光強度

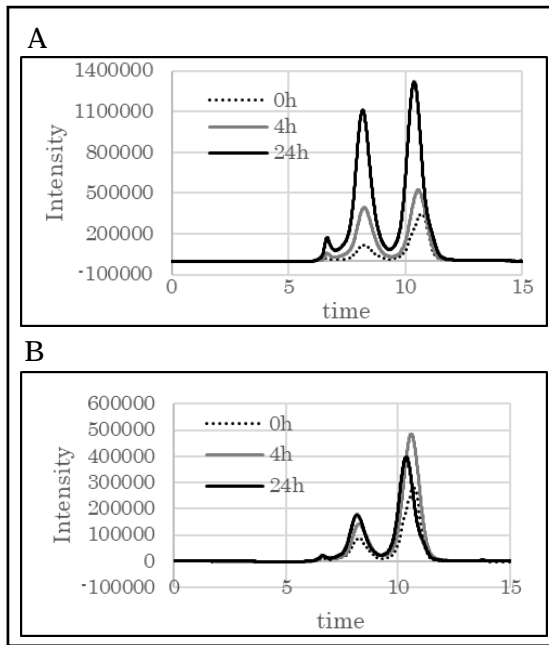


図 5. ゲル濾過クロマトグラフィー
洗淨赤血球 (BODIPY (-)) および BODIPY-Chol 標識赤血球 (BODIPY (+)) とインキュベーションした後の血漿から抽出した全リポタンパクをゲル濾過クロマトグラフィーにて分離, 蛍光 (Ex 480 nm/Em 510 nm) で検出した. ピークは左から VLDL, LDL, HDL

(2) 赤血球のコレステロール逆転送機構への関与の解析

赤血球によるコレステロール逆転送への関与を調べるために, 初めに, ^3H 標識コレステロールを用いた泡沫細胞からのコレステロール引き抜き能の測定系を確立した (発表論文 3). 次に, 確立した測定条件を用いて, apoA-I および HDL によるコレステロール引き抜きの際に, 赤血球も混在させ, その関与を調べた. その結果, 赤血球数依存的に泡沫細胞由来のトリチウム標識コレステロールが転送されることが明らかになった. また, apoA-I や HDL の存在下で赤血球へのコレステロール転送は増加した (図 6). さらに, 一度コレステロール引き抜き処理した apoA-I に赤血球を混和すると apoA-I から赤血球へコレステロールの転送が確認された (図 7). これらの結果より, 赤血球は泡沫細胞からコレステロール引き抜きを行った apoA-I や HDL からコレステロールを受け取り, コレステロール逆転送のプールとしての役割を担っていることが示唆された.

(3) 修飾 HDL の作製 (SAA 含有 HDL)

リコンビナント SAA を HDL とインキュベーションすると, SAA は HDL 分画中に検出され, SAA 含有 HDL が作製されたことを確認した. また, SAA を添加すると下層に apoA-I が多く検出された. つまり SAA により apoA-I が HDL から離脱されることが明らかになった (図 8). さらに, HDL の抗粥状動脈硬化作用のひとつである抗酸化能に関

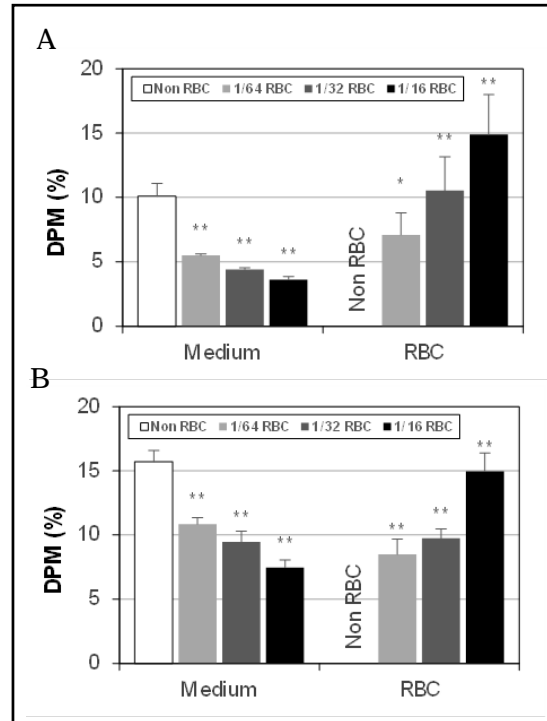


図 6. apoA-I および HDL のコレステロール引き抜き能における赤血球の影響

apoA-I ($10 \mu\text{g/mL}$) および HDL ($50 \mu\text{g/mL}$) に 4 濃度の洗淨赤血球 (なし, 16 倍, 32 倍, 64 倍希釈) を添加した後の培地中および赤血球中の放射性 (DPM%) を測定した.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs 赤血球なし.

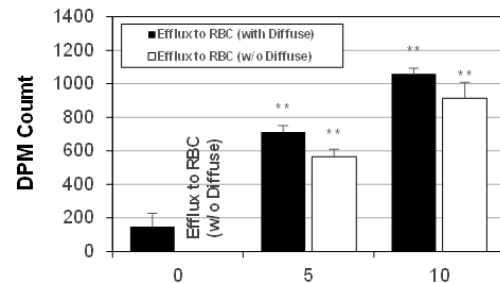


図 7. apoA-I から赤血球へのコレステロールの移動

^3H 標識コレステロール含有 apoA-I ($0, 5, 10 \mu\text{g/mL}$) と赤血球を 4 時間インキュベーションした後の赤血球中の放射性 () は apoA-I 未添加時の放射性 (diffuse) をそれぞれから引いた値. ** $p < 0.01$ vs apoA-I 未添加.

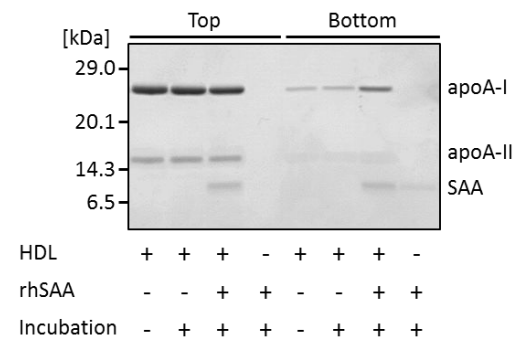


図 8. SAA 含有 HDL の作製

HDL にリコンビナント SAA (rhSAA) を添加しインキュベーション後, 超遠心 ($d = 1.210$) によって HDL 層 (Top) とそれ以外 (bottom) に分離した. それぞれの分画を SDS-PAGE 後, CBB にて染色した.

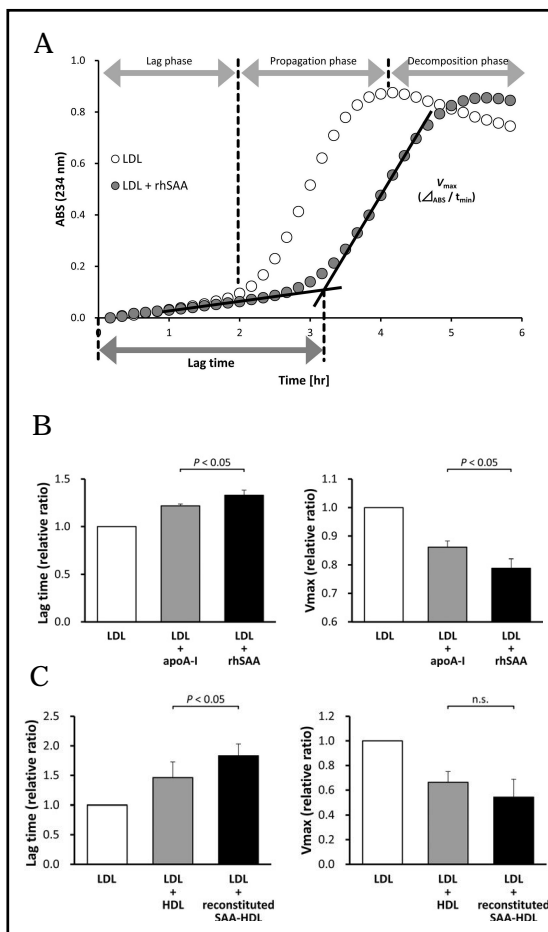


図 9. LDL 酸化に対する抗酸化能の評価

1 $\mu\text{mol/L}$ の硫酸銅で LDL を酸化した際の吸光度変化 (234 nm) のタイムコースを示す (A)。緩やかな反応である Lag phase と急激な反応である Propagation phase の交点までの時間を Lag time, 最大反応速度を V_{max} として, apoA-I およびリコンビナント SAA (rhSAA) (B), 通常の HDL および SAA 含有 HDL (reconstituted SAA-HDL) (C) の抗酸化能を評価した。

して, SAA による HDL への影響を調べた。LDL に硫酸銅を添加すると共役ジエンの生成とともに 234 nm の吸光度の増加が見られる (図 9A)。この緩やかな反応である Lag phase と急激な反応である Propagation phase の交点までの時間である Lag time より抗酸化能を評価した。結果, apoA-I よりリコンビナント SAA の方が抗酸化能を有していることが明らかになった。さらに, HDL と作製した SAA 含有 HDL の抗酸化能を比較すると, SAA 含有 HDL に高い抗酸化能が認められた (図 9B, 9C)。また, 非炎症 (SAA 8 $\mu\text{g/mL}$), 軽度炎症 (8 < SAA 100 $\mu\text{g/mL}$), 高度炎症 (SAA > 100 $\mu\text{g/mL}$) の患者血清より HDL を抽出し, 同様に抗酸化能を調べたところ, 作製した SAA 含有 HDL と同様に, 炎症が進むにつれて抗酸化能が増加することが明らかになった。今後, この通常とは異なる性質を持つ SAA 含有 HDL を用いて, 赤血球からのコレステロールの受け取りに変化が認められるか調べる。

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 5 件)

1. Ichimura, N., Sato, M., Yoshimoto, A., Yano, K., Ohkawa, R., Kasama, T., and Tozuka, M. High-density lipoprotein binds to Mycobacterium avium and affects the infection of THP-1 macrophages. *Journal of Lipids*. 2016 4353620, 2016 査読有 DOI: 10.1155/2016/4353620
2. Sato, M., Ohkawa, R., Yoshimoto, A., Yano, K., Ichimura, N., Nishimori, M., Okubo, S., Yatomi, Y., and Tozuka, M. Effects of serum amyloid A on the structure and antioxidant ability of high-density lipoprotein. *Bioscience Reports*. 36(4): e00369, 2016 査読有 DOI: 10.1042/BSR20160075
3. Yano, K., Ohkawa, R., Sato, M., Yoshimoto, A., Ichimura, N., Kameda T., Kubota, T., and Tozuka M. Cholesterol efflux capacity of apolipoprotein A-I varies with the extent of differentiation and foam cell formation of THP-1 cells. *Journal of Lipids*. 2016 9891316, 2016 査読有 URL: <https://www.hindawi.com/journals/jl/2016/9891316/>
4. Yoshimoto, A., Ohkawa, R., Yano, K., Sato, M., Ichimura, N., Usami, Y., Miyazaki, A., Sugano, M., Uehara, T., and Tozuka, M. Paraoxonase 1 associated with high-density lipoprotein transfers to oxidized low-density lipoprotein depending on the degree of oxidation. *Int J Anal Bio-Sci. Int J Anal Bio-Sci.* 4(4): 99-109, 2016 査読有 URL: <http://plaza.umin.ac.jp/~e-jabs/4/4.99.pdf>
5. Kameda, T., Ohkawa, R., Yano, K., Usami, Y., Miyazaki, A., Matsuda, K., Kawasaki, K., Sugano, M., Kubota, T., and Tozuka, M. Effects of myeloperoxidase-induced oxidation on antiatherogenic functions of high-density lipoprotein. *Journal of Lipids*. 2015:592594, 2015 査読有 DOI: 10.1155/2015/592594

[学会発表] (計 13 件)

1. Sato M., Ohkawa R., Yoshimoto A., Yano K., Okubo S., Yatomi Y., Tozuka M., Effect of SAA on the antioxidant ability of HDL. *American Association for Clinical Chemistry (AACC) 2016*

- Annual Meeting and Clinical Lab Expo. 2016 7.31-8.4. Philadelphia (USA).
2. Yano K., Ohkawa R., Sato M., Yoshimoto A., Kubota T., Tozuka M., Effect of differentiation and foam cell formation on cholesterol efflux capacity of apolipoprotein A-I. American Association for Clinical Chemistry (AACC) 2016 Annual Meeting and Clinical Lab Expo. 2016 7.31-8.4. Philadelphia (USA).
 3. Morita M., Ohkawa R., Satou M., Yoshimoto A., Yano K., Kasama T., Tozuka M. Modification of apolipoprotein A-I in high-density lipoprotein by myeloperoxidase and chymase. The 32nd World Congress of Biomedical Laboratory Science. 2016 8.31-9.4. Hyogo (Japan).
 4. Ohkawa R., Lai SJ., Yoshimoto A., Sato M., Yano K., Tozuka M., Impact of Erythrocyte on the cholesterol metabolism. 14th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress. 2016 11.26-29. Taipei (Taiwan).
 5. Lai SJ., Ohkawa R., Yano K., Sato M., Yoshimoto A., Tozuka M., Erythrocyte is associated with cholesterol efflux from foam cell by apolipoprotein A-I. 14th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress. 2016 11.26-29. Taipei (Taiwan).
 6. Yoshimoto A., Ohkawa R., Sato M., Yano K., Tozuka M. Oxidized low-density lipoprotein receives antioxidant enzyme paraoxonase 1 from high-density lipoprotein. 14th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress. 2016 11.26-29. Taipei, (Taiwan).
 7. Ikoma H., Ohkawa R., Yoshimoto A., Yano K., Sato M., Kasama T., Tozuka M. Analysis of oxidative susceptibility and fatty acid profile in apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein. 14th Asia-Pacific Federation for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine Congress. 2016 11.26-29. Taipei, (Taiwan).
 8. 佐藤 恵美, 大川 龍之介, 島野 志都子, 吉本 明, 矢野 康次, 泉山 肇, 萩原 三千男, 東田 修二, 戸塚 実. 低比重リポタンパクおよび高比重リポタンパクコレステロール試薬の両方に異常反応を示した一症例 第 56 回日本臨床化学会年次学術集会 . 2016.12.4 . くまもと県民交流館パレオ (熊本) .
 9. 頼 劭睿, 大川 龍之介, 矢野 康次, 佐藤 恵美, 吉本 明, 戸塚 実. 赤血球はアポリポタンパク A-I による泡沫細胞からのコレステロール引き抜きに参与している 第 27 回生物試料分析科学会年次学術集会 . 2017.2.11 . 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟) .
 10. 矢野 康次, 大川 龍之介, 佐藤 恵美, 吉本 明, 市村 直也, 亀田 貴寛, 窪田 哲朗, 戸塚 実. コレステロール引き抜き能評価は細胞の分化・泡沫化の程度に大きく影響を受ける 第 27 回生物試料分析科学会年次学術集会 . 2017.2.11 . 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟) .
 11. Yoshimoto A., Sato M., Yano K., Usami Y., Miyazaki A., Sugano M., Ohkawa R., Tozuka M. Paraoxonase 1 participates in antioxidant ability of HDL as a constituent protein but not its enzymatic activity. EuroMedLab Paris 2015 the 21st IFCC-EFLM (European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine). 2015 6.21-25. Paris (France).
 12. 亀田 貴寛, 伊藤 さやか, 宇佐美 陽子, 宮崎 あかり, 栗原 由利子, 大川 龍之介, 細萱 茂実, 戸塚 実. リポタンパクがヒト末梢血単核球 (PBMC) のインターロイキン-1 前駆体の発現に与える影響の解析 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会, 2015.11.21 . 長良川国際会議場・岐阜都ホテル (岐阜) .
 13. 佐藤 恵美, 垂門 碧, 大川 龍之介, 吉本 明, 矢野 康次, 三上 周子, 生駒 勇人, 森田 真麻, 頼 劭睿, 戸塚 実. 血清アミロイド A が HDL の抗酸化能に与える影響 第 26 回生物試料分析科学会年次学術集会 . 2016.2.20 . 沖縄コンベンションセンター (沖縄) .
- 6 . 研究組織
- (1)研究代表者
大川 龍之介 (OHKAWA RYUNOSUKE)
東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・助教
研究者番号 : 50420203