

令和元年9月3日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09790

研究課題名(和文) ヒトステロール血症における脂質代謝異常の解明 トレーサー研究からのアプローチ

研究課題名(英文) Abnormal Lipoprotein Metabolism in Sitosterolemia- Approach utilizing Stable Isotope -

研究代表者

池脇 克則 (Ikewaki, Katsunori)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・内科学・教授)

研究者番号：40287199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では3名のシトステロールホモ接合体患者に安定同位体を使ったトレーサー実験を実施した。その結果、VLDL、IDLアポ蛋白B代謝は健常対照者と有意な差を認めなかったが、LDL apoB濃度が高く( $86.5 \pm 5.8$  vs  $74.6 \pm 8.5$  mg/dl,  $p=0.06$ )、異化速度が有意に遅延していた( $FCR 0.300 \pm 0.05$  vs  $0.42 \pm 0.06$  poos/day,  $p=0.026$ )、一方、産生速度に有意差は認めなかった。以上から、シトステロール血症ではLDLの異化障害が存在することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シトステロール血症は平成27年難病としてされ、国としても病態解明に注力している疾患である。本研究は、世界で初めての試みで、シトステロール血症でLDLの代謝障害があることを見いだした。今後、この知見に基づいた治療への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this project, we performed kinetic studies using stable isotope in 3 homozygous patients with sitosterolemia. We found that there were no significant changes in VLDL apoB kinetic parameters, but there were marginally elevated LDL apoB concentration which were due to significantly delayed rates of catabolism. In conclusions, sitosterolemia is associated with impaired LDL apoB catabolism, resulting in elevated LDL apoB concentrations. While VLDL and IDL apoB metabolism are preserved in sitosterolemia.

研究分野：脂質代謝、動脈硬化

キーワード：シトステロール血症 アポ蛋白B LDL 安定同位体 トレーサー

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

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) シトステロール血症の病態

シトステロール血症は、小児期から皮膚や腱の黄色腫を来し典型例では著明な高コレステロール血症を呈することから pseudohomozygous familial hypercholesterolemia(FH)と呼ばれる。FH ホモ接合体との違いは、血中植物ステロールが著明に高値で点である。シトステロール血症では、特に小児期に不明熱、関節痛、溶血、血小板減少症などを認める点から、植物ステロールの蓄積が直接的に、あるいは脂質代謝異常を介して惹起する早発性動脈硬化症以外にも多面的に波及することを示唆する。スタチンが無効であることは広く知られており、陰イオン交換樹脂が、最近では小腸のコレステロールトランスポーターである NPC1L1 阻害薬であるエゼチミブが標準治療となっている。

### (2) 病態解明の有力なツールとしての安定同位体を使ったトレーサー研究

研究代表者は、1990 年から 4 年間の NIH 留学時に安定同位体を使った内因性標識法を習得して帰国後の一貫してこの研究手法を使ったアポ蛋白代謝の解明を行ってきた。

## 2. 研究の目的

ABCG5/ABCG8 の稀な遺伝子疾患であるシトステロール血症は、著明な黄色腫とともに早発性冠動脈疾患を合併する予後不良の疾患である。我が国では、H27 年から難病指定されたが、これはシトステロール患者の実態把握、医療費負担の軽減とともに、治療法の確立、社会に対する啓発活動などに国が積極的に取り組む姿勢を示したものである。治療法確立のためには、シトステロール血症患者における脂質代謝異常の病態解明が必須であるが、トレーサーを使ったアポ蛋白体内代謝動態の検討は実施されていない。こうした背景から、本研究では、研究代表者が国内で独占的に行っている安定同位体を使ったトレーサー実験によって、シトステロール血症患者のアポ蛋白代謝異常とエゼチミブによるアポ蛋白代謝改善効果を明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

シトステロール血症ホモ接合体 3 名と健常者を対象として安定同位体を使ったトレーサー実験を行った。

### (1) 代謝実験のプロトコール

対象

- ・シトステロール血症ホモ接合体患者 3 名
- ・健常コントロール 7 名

トレーサー

- ・アポ蛋白代謝実験  
2H3-leucine(Cambridge Isotope) 10mg/kg

採血スケジュール：前、10、30、60min、1、2、3、4、5、6、8、10、12、14、24、36、48hour

- ・FH 患者に対するスタチン投与プロトコール

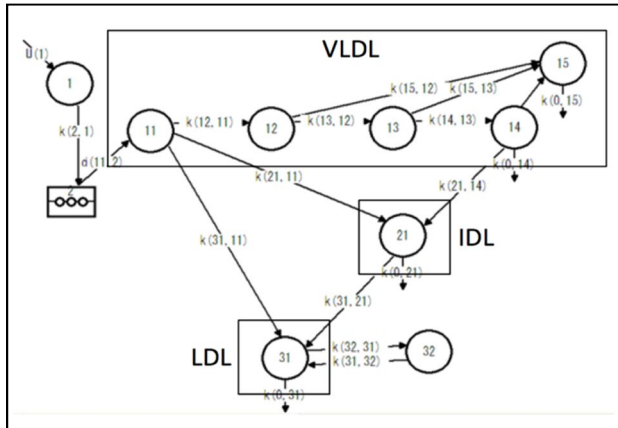
アトロバスタチン 10mg/日を 12 週間投与し、上記トレーサー試験を再度実施する。

- ・アポ蛋白代謝実験のサンプル処理

血清分離後、超遠心法にて VLDL、IDL、LDL、HDL に分画する。HDL 以外の分画はイソプロピルアルコールにてアポ蛋白 B-100 のみを沈殿させる。加水分解後、アミノ酸修飾を行ない、ガスクロマトグラム質量分析計(H5973, ヨコガワアナリティカルシステムズ、現有機器)に注入し、T/T ratio を測定する。また、血清 0.3ml を陰イオン交換樹脂にかけてアミノ酸を抽出する。アミノ酸修飾は、N-heptafluorobutyl isobutyl ester 法で行ない GC-MS で T/T ratio を測定する

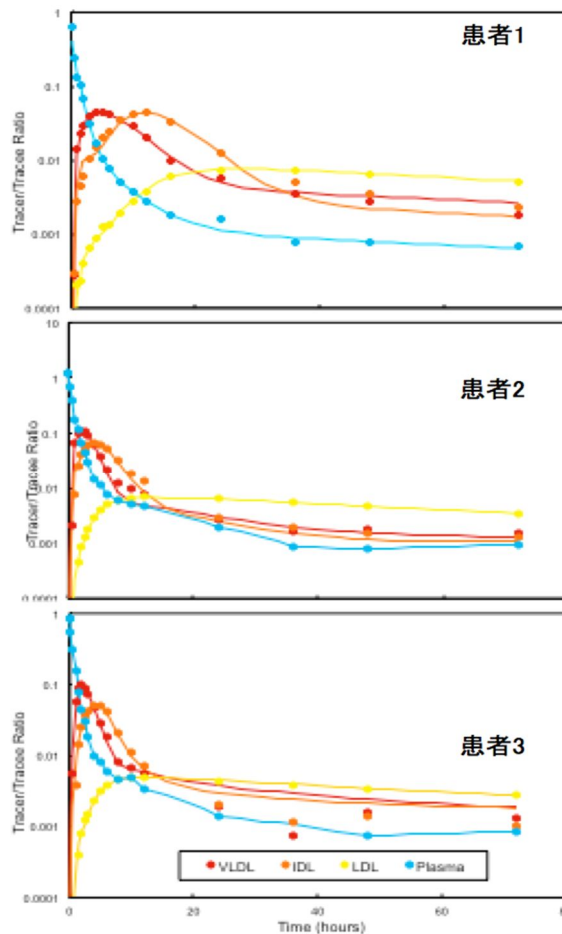
- ・代謝モデルの開発

専用ソフト(SAAMI II, ワシントン大学, 現有ソフト)を使用して、下に示したアポ蛋白 B-100 のモデルを開発して解析に使用した。



#### 4. 研究成果

##### (1) シトステロール患者の Tracer/Tracee curves と代謝パラメーター



	VLDL apoB		
	Conc.	FCR	PR
	mg/dl	pools/d	mg/kg-d
Sitosterolemia	4.2±2.1	5.7±3.5	7.5±3.1
Controls	4.0±1.4	7.1±3.4	10.6±4.4
p value	0.84	0.57	0.30

	IDL apoB		
	Conc.	FCR	PR
	mg/dl	pools/d	mg/kg-d
Sitosterolemia	3.7±1.0	7.4±2.5	10.3±2.2
Controls	3.4±2.1	8.9±4.1	9.6±2.6
p value	0.83	0.56	0.67

	LDL apoB		
	Conc.	FCR	PR
	mg/dl	pools/d	mg/kg-d
Sitosterolemia	86±6	0.30±0.05	11.1±1.2
Controls	75±9	0.42±0.06*	14.5±4.2
p value	0.06	0.03	0.22

シトステロール血症患者では、VLDL、IDL アポ蛋白 B代謝に健常者と有意の差を認めなかったが、LDL アポ蛋白 B の異化速度は有意に低下した。一方、LDL アポ蛋白 B 産生速度に差はなく、血中濃度は増加傾向を示した。LDL 異化障害の原因は、LDL 受容体活性の低下、あるいは LDL 粒子の LDL 受容体への親和性の低下である。この点について検討ができておらず今後の検討課題であるが、LDL 受容体活性を増加させるスタチンが無効である点から前者の可能性は低いと推測する。(引用文献)

1. Millar JS, Maugeais C, Ikewaki K et al: Complete deficiency of the LDL receptor is associated with increased apolipoprotein B-100 production. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25: 560-5
2. Cuchel M, Bloedon LT, Szapary PO et al: Reduction in Cholesterol in Homozygous Familial Hypercholesterolemia with an Inhibitor of the Microsomal Triglyceride Transfer Protein. *N. Engl. J*

Med. 2007; 356: 148-156.

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 19 件 ) 全て査読あり

1. Arai H, Teramoto T, Daida H, Ikewaki K, Maeda Y, Nakagomi M, Shirakawa M, Kakikawa T, Numaguchi H, Johnson-Levonas AO, Vaidya S, Blaustein RO. Efficacy and safety of the cholesteryl ester transfer protein inhibitor anacetrapib in Japanese patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2016 249:215-23.
2. Koba S, Ayaori M, Uto-Kondo H, Furuyama F, Yokota Y, Tsunoda F, Shoji M, Ikewaki K, Kobayashi Y. Beneficial Effects of Exercise-Based Cardiac Rehabilitation on High-Density Lipoprotein-Mediated Cholesterol Efflux Capacity in Patients with Acute Coronary Syndrome. *J Atheroscler Thromb*. 2016 23(7):865-77
3. Kadoya M, Kadoya A, Onoue H, Ikewaki K, Shimizu J, Kaida K. Repeated treatments with rituximab in a patient with amyloid-like IgM deposition neuropathy. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016 3(3):e220
4. Yakushiji E, Ayaori M, Nishida T, Shiotani K, Takiguchi S, Nakaya K, Uto-Kondo H, Ogura M, Sasaki M, Yogo M, Komatsu T, Lu R, Yokoyama S, Ikewaki K: Probucoyl Oxidized Products, Spiroquinone and Diphenylquinone, Promote Reverse Cholesterol Transport in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016 36(4):591-7
5. Kadoya M, Kaida K, Koike H, Takazaki H, Ogata H, Moriguchi K, Shimizu J, Nagata E, Takizawa S, Chiba A, Yamasaki R, Kira JI, Sobue G, Ikewaki K: IgG4 anti-neurofascin155 antibodies in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: Clinical significance and diagnostic utility of a conventional assay. *J Neuroimmunol*. 2016 301:16-22.
6. Harada-Shiba M, Ikewaki K, Nohara A, Otsubo Y, Yanagi K, Yoshida M, Chang Q, Foulds P. Efficacy and Safety of Lomitapide in Japanese Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*. 2017 24(4):402-411
7. Nakaya K, Takiguchi S, Ikewaki K. A New Frontier for Reverse Cholesterol Transport: The Impact of Intestinal Microbiota on Reverse Cholesterol Transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017 37(3):385-386.
8. Yakushiji E, Ota S, Komatsu T, Ayaori M, Ikewaki K Massive Hemoptysis due to Right Inferior Phrenic Artery-to-Right Pulmonary Artery Fistula in the Right Middle Lobe of the Lung. *Intern Med*. 2017 56(6):687-689.
9. Teramoto T, Daida H, Ikewaki K, Arai H, Maeda Y, Nakagomi M, Shirakawa M, Watanabe Y, Kakikawa T, Numaguchi H, Johnson-Levonas AO, Blaustein RO. Lipid-modifying efficacy and tolerability of anacetrapib added to ongoing statin therapy in Japanese patients with dyslipidemia. *Atherosclerosis*. 2017 261:69-77.
10. Hirata H, Uto-Kondo H, Ogura M, Ayaori M, Shiotani K, Ota A, Tsuchiya Y, Ikewaki K Xanthohumol, a hop-derived prenylated flavonoid, promotes macrophage reverse cholesterol transport. *J Nutr Biochem*. 2017 47:29-34.
11. Nakaya K, Ikewaki K: Microbiota and HDL metabolism *Curr Opin Lipidol*. 2018 29(1):18-23.
12. Mune M, Uto-Kondo H, Iteya I, Fujii Y, Ikeda S, Ikewaki K: Vitamin E supplementation improves high-density lipoprotein and endothelial functions in end-stage kidney disease patients undergoing hemodialysis. *Clin Nephrol*. 2018 90(3):212-221.
13. Sakuma I, Ikewaki K: Should Measures of High-Density Lipoprotein Function Be Added to the Low-Density Lipoprotein Cholesterol Target Level-Based Guidelines for Prevention of Atherosclerotic Disease? *Circ J*. 2018 82(5):1251-1252
14. Nakagawa K, Kadoya M, Matsumoto H, Moriuchi H, Ikewaki K, Kaida K.: A 15-year-old girl with congenital cytomegalovirus infection presenting with sensorineural hearing impairment and cerebral white matter lesions but no intellectual disability. *Rinsho Shinkeigaku*. 2018 58(5):320-323.
15. Takiguchi S, Ayaori M, Yakushiji E, Nakaya K, Sasaki M, Iizuka M, Uto-Kondo H, Terao Y, Yogo M, Komatsu T, Ogura M, Ikewaki K: Hepatic Overexpression of Endothelial Lipase Induces a Markedly Low HDL-Cholesterol but Maintains Macrophage Reverse Cholesterol Transport in Mice: Role of SR-BI/ABCA1-dependent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018 38(7):1454-1467.
16. Nohara A, Otsubo Y, Yanagi K, Yoshida M, Ikewaki K, Harada-Shiba M, Jurecka A: Safety and Efficacy of Lomitapide in Japanese Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia

- (HoFH): Results from the AEGR-733-301 Long-Term Extension Study. *J Atheroscler Thromb*, 2019 Apr 1;26(4):368-377
17. Ito M, Ikwaki K: Postprandial Hyperlipemia is an Indication for Additional Risk in Sitosterolemia. *J Atheroscler Thromb*. 2018 Dec 1;25(12):1183-1184.
  18. Kameyama N, Maruyama C, Kitagawa F, Nishii K, Uenomachi K, Katayama Y, Koga H, Chikamoto N, Kuwata Y, Torigoe J, Arimoto M, Tokumaru T, Ikwaki K, Nohara A, Otsubo Y, Yanagi K, Yoshida M, Harada-Shiba M.: Dietary Intake during 56 Weeks of a Low-Fat Diet for Lomitapide Treatment in Japanese Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*. 2019 Jan 1;26(1):72-8.
  19. Komatsu T, Sakurai T, Wolska A, Amar MJ, Sakurai A, Vaisman BL, Sviridov D, Demosky S, Pryor M, Ikwaki K, Remaley AT.: Apolipoprotein C-II Mimetic Peptide Promotes the Plasma Clearance of Triglyceride-Rich Lipid Emulsion and the Incorporation of Fatty Acids into Peripheral Tissues of Mice. *J Nutr Metab*. 2019 Feb 3;2019:7078241.

〔学会発表〕(計 29 件)

1. 池脇克則：HDL function as an emerging risk factor for coronary artery disease トピック 1 スタチン時代の残余リスク 第 80 回日本循環器学会学術集会 2016
2. Ikwaki K: Current status of lipid control in Japan. Asian Session Current lipid control for vascular protection in Asia 第 80 回日本循環器学会学術集会 2016
3. Shiotani K: Probucol oxidized products, spiroquinone and diphenoquinone, promote reverse cholesterol transport in mice. The 84th Congress of the European Atherosclerosis Society 2016.
4. Nishida T: Beneficial effect of azilsartan and amlodipine on endothelial function in hypertensive patients. The 84th Congress of the European Atherosclerosis Society 2016.
5. Hirata H: Xanthohumol, a prenylated flavonoid in hops, promotes macrophage reverse cholesterol transport in hamster. The 84th Congress of the European Atherosclerosis Society 2016
6. Harada-Shiba M: Lomitapide Efficacy and Safety in Japanese Patients with Homozygous Familial Hypercholesterolemia on Concurrent Lipid-Lowering Therapy The 48th Annual Scientific Meeting of the Japan Atherosclerosis Society 2016
7. Ikwaki K: HDL-targeted therapy Symposium 8 Novel Agents on the Horizon for Dyslipidemia The 48th Annual Scientific Meeting of the Japan Atherosclerosis Society 2016
8. 池脇克則：HDL-C の意義を再考する-量から質へのパラダイムシフト- 第 64 回日本心臓病学会学術集会 2016
9. 小松知広：S100A12 の動脈炎症および血清脂質に及ぼす影響についての検討 第 20 回日本適応医学会学術集会 2016
10. 伊藤美沙：2 型糖尿病患者における血糖コントロール前後の FGF19 の変化及び LDL-C との関連 第 20 回日本適応医学会学術集会 2016
11. 伊藤利光：SD-LDL 濃度に及ぼす ADRB3(Trp64Arg)変異と食習慣の関連について 第 20 回日本適応医学会学術集会 2016
12. 佐々木誠：HDL 機能検査法について 第 49 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2017
13. 亀山詞子：低脂肪食事療法を継続した家族性高コレステロール血症ホモ接合体患者の食事摂取状況の検討 第 49 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2017
14. 荒川純子：肝臓 Liver X 受容体シグナルはマウス血中 HDL コレステロール濃度およびコレステロール逆転送を正に制御する 第 39 回日本臨床栄養学会総会 2017
15. Hagiwara K: Aminolevulinic acid attenuates atherosclerotic plaque progression of LDL receptor deficient mice by an antioxidant action. American Heart Association Scientific Sessions 2017
16. 仁田玲子：禁煙による血中 CRP および S100A12 濃度の低下効果 第 72 回日本栄養・食糧学会大会 2018
17. Nishida T: Hepatic LXRs promote reverse cholesterol transport in cholesterol-fed mice. 第 50 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2018
18. Ito M: Renin-angiotensin system inhibition by olmesartan and imidapril both promote endothelial function and reduce circulating aldosterone levels in hypertensive patients: results of a randomized crossover trial. 第 50 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2018
19. 仁田玲子：禁煙による血中 CRP および S100A12 濃度の低下効果—バレニクリンによる禁煙が HDL 機能および循環性炎症マーカーに及ぼす影響— 第 50 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2018

20. 四條裕里：「日本食」摂取が体格・脂質代謝指標に及ぼす影響—脂質異常症患者における無作為化比較介入試験中間報告— 第 50 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2018
21. 亀山詞子：脂質異常症患者における食品および栄養素等摂取量の実態 第 50 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2018
22. Arakawa J: A Xanthine Oxidase Inhibitor Febuxostat Improves Endothelial Function as Evaluated by Flow-Mediated Vasodilatation in Hyperuricemic Patients. American Heart Association Scientific Sessions 2018
23. Arakawa J: Reverse Cholesterol Transport is Maintained Despite Knockdown of CYP27A1 in Mice. American Heart Association Scientific Sessions 2018
24. 荒川純子：キサンチンオキシダーゼ阻害薬 Febuxostat は高尿酸血症患者の血管内皮機能を改善する 第 22 回日本適応医学会学術集会 2018
25. 亀山詞子：脂質異常症患者における栄養指導前の食品および栄養素等摂取量の実態 第 22 回日本病態栄養学会年次学術集会 2019
26. 佐藤愛紗：脂質異常症患者における「日本食」摂取が血清リポタンパク質中脂肪酸組成に及ぼす影響—無作為化比較介入試験— 第 22 回日本病態栄養学会年次学術集会 2019
27. 梅澤愛理子：「日本食」摂取の血中カロテノイドとトコフェロール濃度への影響：脂質異常症における検討 第 73 回栄養食糧学会 2019
28. Nakamura H: High-density Lipoprotein Cholesterol Efflux Capacity as a Relevant Predictor of Major Adverse Cardiac Events in Patients with Coronary Artery Disease. 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019
29. Ukaji T: Impaired High-density Lipoprotein Cholesterol Efflux Capacity for Development of De novo Coronary Stenosis under Pharmacological Secondary Prevention for Coronary Artery Disease. 第 83 回日本循環器学会学術集会 2019

〔図書〕(計 5 件)

1. 池脇 克則、遠藤 康弘 診断と治療社 LDL-コレステロールが低下しないときの脂質異常症治療薬の使い方を教えてください 糖尿病治療薬 クリニカルクエスチョン 2016 234-6
2. 池脇 克則、遠藤 康弘 診断と治療社 CPK が上昇しやすい患者の脂質異常症治療薬の使い方を教えてください 糖尿病治療薬 クリニカルクエスチョン 2016 236-7
3. 伊藤美沙、池脇克則 文光堂 HDL の代謝と作用機序を理解しよう そうだったんだ！脂質異常症 2016 26-31
4. 遠藤康弘、池脇克則 文光堂 フィブラートで LDL コレステロールが増加することがある そうだったんだ！脂質異常症 2016 201-203
5. 佐々木誠、池脇克則 最新医学社 高 TG 血症と HDL 代謝 高 TG 血症 2018 60-66

〔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 なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

池脇克則(IKEWAKI Katsunori)

防衛医科大学校・医学教育部医学科進学  
課程及び専門課程、動物実験施設、共同  
利用研究・教授

研究者番号：40287199

### (2)研究分担者

塩谷一紗(SHIOTANI Kazusa)

防衛医科大学校・医学教育部医学科進学  
課程及び専門課程、動物実験施設、共同  
利用研究・助教

研究者番号：20773641