

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07444

研究課題名(和文) 自己免疫的機序に基づく高脂血症の診断法の開発

研究課題名(英文) Development of diagnosis 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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：全国の医療機関より紹介された、診断に難渋している脂質異常症例について、脂質代謝関連分子に対する自己抗体を検索し、apoC-II、GPIHBP1に対する自己抗体が原因と考えられる自己免疫性高中性脂肪血症症例を見出した。

次に、抗apoB-100自己抗体の臨床的意義を検討した。大血管合併症を有する糖尿病症例では抗apoB-100自己抗体価が有意に低値であったが、細小血管合併症とは明らかな関連を認めなかった。安定狭心症男性症例ではプラークの安定性と抗apoB-100自己抗体価との間に正相関を認めた。従って、抗apoB-100自己抗体は動脈硬化症の発症・進展の負のマーカーになることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究をもとに自己免疫性脂質異常症が2015年に本邦の指定難病「原発性高カイロミクロン血症」の原因の1つに追記されたが、診断法が確立しておらず、臨床の実態は明らかではない。今回の研究では診断に難渋していた患者の確定診断に寄与できた。さらに、脂質代謝に関わる分子のうち、LDL-コレステロールの代謝に関わるアポ蛋白B-100の自己抗体価が、大血管障害をもつ糖尿病患者では低値であること、男性安定狭心症患者の責任冠動脈のプラークが安定しているものでは高値であることを見出した。従って、抗apoB-100自己抗体は動脈硬化症の発症・進展と関連し、患者の予後判定のマーカーとなる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Autoantibodies against lipid metabolism-related molecules were investigated in the undiagnosed dyslipidemic patients with whom we were consulted by medical institutions nationwide. Among them, we identified two cases of hypertriglyceridemia induced by the autoantibodies against either apoC-II or GPIHBP1.

We also determined the clinical significance of anti-apoB-100 autoantibodies. First, we found that the serum anti-apoB-100 autoantibody levels were significantly low in diabetic patients with macroangiopathy comparing to those without. No clear association was found between serum anti-apoB-100 autoantibody levels and diabetic microangiopathy. Second, serum anti-apoB-100 autoantibody levels were positively correlated with plaque stability of culprit coronary vessels in male patients with stable angina. These results suggest that anti-apoB-100 autoantibodies would be a negative marker for the onset and progression of arteriosclerosis.

研究分野：内分泌・代謝内科学，臨床検査医学

キーワード：自己免疫性脂質異常症 自己抗体 アポリポ蛋白 GPIHBP1 リポ蛋白リパーゼ

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化リスクの正しい評価と管理は健康寿命の延長に重要である。脂質異常症は、高血圧や糖尿病と並ぶ動脈硬化の大きなリスク因子の1つであり、スタチン等の薬剤を用いた治療戦略とその有効性が示されてきた。しかし、重症脂質異常症の一部には病因が同定できないもの、従前の治療に抵抗性を示すものも散見され、未知の脂質代謝制御因子の存在や自己免疫的機序の関与が想定されている。

自己免疫性脂質異常症は1970年代に Beaumont がその疾患概念を提唱した後、我々はこれまでに lipoprotein lipase (LPL) や apolipoprotein C-II (apo C-II) に関連する自己免疫性脂質異常症を発見し、これらの研究をもとに、2015年には本邦の指定難病「原発性高カイロミクロン血症」の原因に追記されることとなった。しかしこれまでに確立した診断法が存在せず、臨床現場での実態は十分に解明されていないため、自己免疫性脂質異常症の報告は少なく、実際の臨床現場での実情とは乖離している。また近年では、新規癌治療薬として免疫チェックポイント阻害剤が多用されているが、治療経過中に間質性肺炎、甲状腺疾患、1型糖尿病、下垂体機能低下症などの自己免疫的機序に基づく様々な疾患の発症が副作用として報告されている。自己免疫性脂質代謝異常症も同様に惹起される可能性もあるものの、正確な診断法がないことから、その実態が正しく把握できていない状況にあると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 症例解析

まず、診断に難渋している脂質異常症例の診断を行うこととした。診断法が未確立であるために見逃されたり、未診断のまま治療をされたりしている自己免疫性脂質異常症症例では、不適切な治療法が漫然と選択され、そのために治療抵抗性・難治性と判断されることも多い。そこで、全国の医療機関から当研究室に紹介された、診断に難渋している脂質異常症例について、その臨床データを踏まえて候補となる脂質代謝関連分子に対する自己抗体を検索し、自己免疫性脂質異常症の可能性を明らかにし、臨床診断に寄与することを目的とした。

(2) 抗 apoB-100 自己抗体の臨床的意義の検討

自己免疫性脂質異常症で検出される脂質代謝に関わる分子に対する自己抗体は、脂質異常症の原因となるが、自己抗体のその他の臨床的意義については十分に解明されていない。そこで、今回は LDL-コレステロール代謝に関わる apoB-100 分子に着目し、糖尿病患者や男性安定狭心症患者における抗 apoB-100 自己抗体と動脈硬化との関係を検討した。

3. 研究の方法

(1) 症例解析

全国の医療機関から紹介された脂質異常症症例の臨床データをもとに、解析する脂質代謝関連分子を選択した。選択された脂質代謝関連分子に対する患者血清中の自己抗体の免疫グロブリンの各分画は、我々が2014年に報告した免疫沈降・ウェスタンブロット法を組み合わせる方法で検出し (Yamamoto H, et al (2014) J Clin Endocrinol Metab)、複数の健常人血清との比較を行って、増加しているか否かを判定した。続いて、検出された自己抗体の機能解析を行なった。今回は、硫酸アンモニウムにより免疫グロブリン分画を粗精製した患者血清を使用し、生化学的手法を用いて LPL 活性に対する影響を検討した。

(2) 抗 apoB-100 自己抗体の臨床的意義の検討

抗アポ B-100 部分ペプチドを用いた自己抗体を測定する home-made ELISA 系を構築した。抗原として、人工的に合成した apoB-100 の 661-680 番アミノ酸に相当する p45、3136-3155 番アミノ酸に相当する p210 を用いた ELISA 系を作成し、NTT 西日本大阪病院糖尿病内分泌代謝内科通院中の糖尿病患者の残余血清中の自己抗体価を測定し、各免疫グロブリン分画の自己抗体価と臨床データとの関連を統計学的に解析した。また、県立西宮病院循環器内科通院中の男性安定狭心症症例でも同様の方法で自己抗体価を測定し、血管内超音波法 (IVUS; intravascular ultrasonography) で評価された責任冠動脈病変の各種パラメータ、臨床データとの関連を統計学的に解析した。尚、本研究は大阪大学倫理委員会、NTT 西日本大阪病院倫理委員会、県立西宮病院倫理委員会の承認を得て行なった。

4. 研究成果

(1) 症例解析

症例 1 : 11 歳女児。両膝関節痛を主訴として受診。当初は若年性関節リウマチが疑われた。2 ヶ月後には関節痛の症状が全身に進行し、血液検査所見から SLE (systemic lupus erythematosus) と診断され、その際に初めて血中中性脂肪 (TG ; triglyceride) 5,972 mg/dL の著明な高中性脂肪血症を認めた。経口での食事制限や脂肪制限食を施行した上で、原疾患に対する治療としてプレドニンとミコフェノール酸モフェチルを用いるとともに、高中性脂肪血症に対してフィブラート系薬剤を投与し、中性脂肪は正常化した。この症例では、血中 apoC-II 7.3 mg/dL、apoC-III 54.9 mg/dL と apoC-II / apoC-III 比の異常を認めたため、apoC-II に対する自己抗体の存在を疑って精査を行なった。

患者血清と健常人 (#1~#4) の血清を抗 apoC-II 抗体で免疫沈降 (ip; immunoprecipitation) し、その後抗ヒト IgA、IgG、IgM 抗体でイムノブロット (ib; immunoblot) した (図 1(a))。その結果、患者血清には apoC-II に共沈する IgG、IgM 分画の免疫グロブリンが健常人血清に比べて濃いバンドとして検出された。従って、患者血清には IgG、IgM 分画の抗 apoC-II 自己抗体が増加していると考えられた。さらに、この自己抗体のバンドは、プレドニンとミコフェノール酸モフェチルによる治療後に減少しており、病態と関連していることが推察された (図 1(b))。

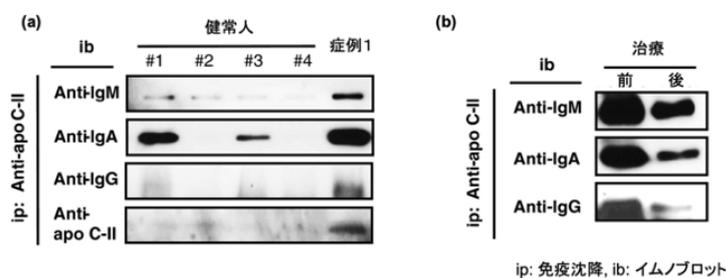


図 1 症例1における抗アポC-II自己抗体の検出(a)と治療前後での変化(b)

次に、LPL 活性に与えるこの自己抗体の影響を生化学的手法で検討した。まず、硫酸アンモニアを用いて患者、健常人血清の免疫グロブリン分画を濃縮・粗精製した。ヒト LPL cDNA を強制発現させた HEK293 細胞の細胞溶解液を LPL として用い、apoC-II サプライヤーとして健常人血清、脂質はイントラリポス (大塚製薬) を使用し、これに粗精製した患者、あるいは健常人血清を添加し、LPL 活性を測定した (図 2)。患者の粗精製血清の添加により、LPL 活性は健常人の精製血清添加時の約 50% となり、有意な減少であった。これらの結果から、症例 1 は apoC-II に対する自己抗体による自己免疫性高中性脂肪血症であると診断された。

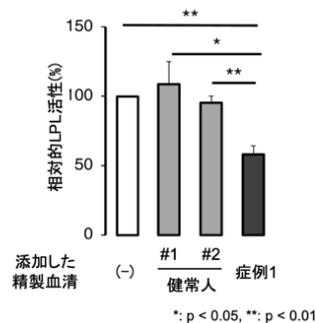


図 2 症例1の粗精製血清はLPL活性を低下させた

症例 2 : 15 歳女児。生来健康であったが、急性膵炎での緊急入院時に TG 1,489 mg/dL の高中性脂肪血症を認めた。食事制限とフィブラート系薬剤などの一般的な脂質降下治療により TG は 300-400 mg/dL までは低下したが、時々誘因なく上昇した。経過中、肝機能障害、レイノー症状、自己抗体の増加が認められたため、SLE と診断され、プレドニンによる治療を開始した。その後、TG は 150-200 mg/dL に低下し、更なる脂肪制限食の徹底により TG は正常化した。この症例の LPL 活性は 20 mg/dL と著明に低下しており、apoC-II/apoC-III 比も正常であったため、LPL を血管内腔に運搬する GPIHBP1 (glycosylphosphatidylinositol-anchored high density lipoprotein-binding protein 1) の障害を疑い、抗 GPIHBP1 自己抗体を検索することとした。

症例 1 と同様に患者血清と健常人血清を抗 GPIHBP1 抗体で免疫沈降し、GPIHBP1 と共沈する自己抗体を調べたところ、患者では IgA、IgM 分画の自己抗体の増加を認めた (図 3 (a))。このうち IgA 分画の自己抗体はプレドニン治療後に減少しており (図 3 (b))、症例 2 では、GPIHBP1 に対する自己抗体による自己免疫性高中性脂肪血症であると診断された。

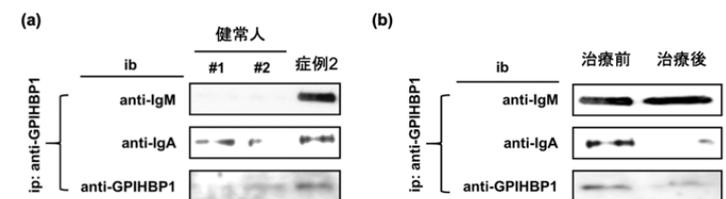


図 3 症例2における抗GPIHBP1自己抗体の検出(a)と治療前後での変化(b)

今回、自己免疫性高中性脂肪血症と初めて診断できた 2 症例を経験した。自己免疫性脂質異

常症は自己免疫性疾患に合併することが多いことは知られるものの、症例2のようにSLEの発症に先んじて発症する場合もあることから、後天性脂質異常症の場合には自己免疫性脂質異常症も鑑別診断に想定する必要があることを示唆する興味深い症例と考えられた。

(2) 抗 apoB-100 自己抗体の臨床的意義の検討

NTT 西日本大阪病院糖尿病内分泌代謝内科通院中の糖尿病患者 90 名（男性 73 名、女性 17 名）について、抗 apoB-100 自己抗体価を home-made ELISA で測定した。対象の年齢は 67 ± 9 歳、BMI 24.7 ± 3.7 kg/m²、空腹時血糖 129 ± 26 mg/dL、HbA1c 7.0 ± 0.7 %、糖尿病罹病期間は、 16 ± 10 年、LDL-C 96 ± 22 mg/dL、TG 126 ± 75 mg/dL であった。スタチン系薬剤は 52 名が使用していた。合併症は図4の通りであった。この症例での解析では、IgG 分画の抗 apoB-100 抗体価は HbA1c と正の相関、IgM 分画の自己抗体は LDL-C と負の相関を示した。IgG、IgM 分画の自己抗体価はいずれも糖尿病細小血管合併症との関連を認めなかったが、大血管障害を有する症例での IgG 分画の自己抗体価は有意に低値であった（図5）。さらに、スタチン使用群では、この自己抗体価と動脈硬化性疾患との関連が顕著であった。

【大血管合併症】

	人数
動脈硬化性疾患 あり	29
虚血性心疾患	23
脳血管疾患	8
下肢閉塞性動脈硬化症	6

【細小血管合併症】

	診断区分	人数
網膜症	(正常/単純/前増殖以上)	(64/13/9)
腎症	(1期/2期/3期以上)	(47/27/12)
神経障害	(無/有)	(52/33)

図4 糖尿病合併症の内訳

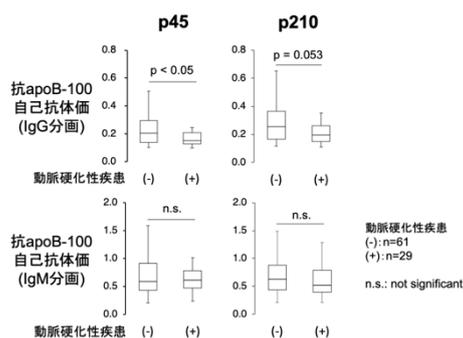


図5 抗apoB-100自己抗体と動脈硬化性疾患との関連

続いて、兵庫県立西宮病院循環器内科通院中の男性安定狭心症患者 88 名を対象とし、抗 apoB-100 自己抗体価を測定した。対象の平均年齢は 68 ± 10 歳、BMI 24.7 ± 3.5 kg/m²、LDL-C 99 ± 29 mg/dL、HbA1c 6.4 ± 1.2 % であった。また、スタチン未使用症例は 45 名であった。IVUS で評価した責任病変のプラーク体積率 (plaque burden; PB) は 71.3 ± 7.7 %、壊死性プラークの割合 (%N)、線維性プラークの割合 (%F) はそれぞれ 32.8 ± 12.3 %、 53.0 ± 14.2 % であった。全 88 症例では、apoB-100 部分ペプチド p45、p210 に対する自己抗体価はいずれも PB と有意な負の相関を示したが（図6）、プラークの性状と自己抗体価には明らかな相関を認めなかった。スタチン未使用群においては、抗 apoB-100 自己抗体価は PB との有意な負の相関が認められただけでなく、%N、%F とも各々有意な負、正の相関を認めたため（図7）、抗 apoB-100 自己抗体はプラーク安定性のマーカーであると考えられた。

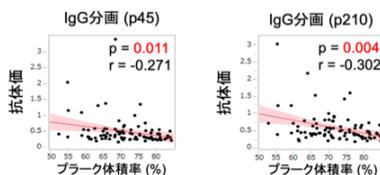


図6 男性安定狭心症患者における IgG分画の抗apoB-100自己抗体価とプラーク体積率との関連

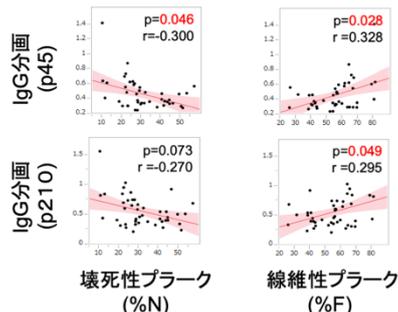


図7 スタチン非使用男性安定狭心症患者における IgG分画の抗apoB-100自己抗体価とプラーク性状との関連

今回の2疾患における検討から、抗 apoB-100 自己抗体は動脈硬化症の発症・進展と関連し、患者の予後判定の指標となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Imai M, Yamamoto H, Hashimoto T, Koyama H, Kihara S	4. 巻 62
2. 論文標題 Acquired marked hypertriglyceridemia with anti-GPIIb/IIIa antibodies.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 651-653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.14154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Imai M, Kawamura M, Kochi I, Matsuoka T, Kihara S, Yamamoto H	4. 巻 27
2. 論文標題 Anti-Apo B-100 Autoantibody is a Marker of Unstable Coronary Plaque.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 000-000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.58784	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inoue M, Kawamura M, Yamamoto H, Takahashi T, Kihara S	4. 巻 61
2. 論文標題 Juvenile onset systemic lupus erythematosus with severe hypertriglyceridemia induced by anti apolipoprotein C II antibody.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 201-203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ped.13736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto H, Kawamura M, Kochi I, Imai M, Murata Y, Suzuki T, Chen Y, Hashimoto K, Kihara S	4. 巻 26
2. 論文標題 Serum Anti-Apo B Antibody Level as Residual CVD Marker in DM Patients under Statin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Atherosclerosis and Thrombosis	6. 最初と最後の頁 931-943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5551/jat.46797	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川千穂、中山良朗、久高将太、玉城敦子、照屋理子、本間健一郎、屋比久賢光、照屋太輝、仲村武裕、吉村蘭、竹本のぞみ、上原盛幸、山城清人、木原進士、山本浩靖、益崎裕章
2. 発表標題 14歳で初めて高TG血症、急性膵炎を発症した抗GPIIb/IIIa抗体に伴う自己免疫性高TG血症の一例
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本浩靖、今井みなみ、小山英則、木原進士
2. 発表標題 自己免疫性高中性脂肪血症の小児2症例
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長谷川千穂、中山良朗、久高将太、玉城敦子、照屋理子、本間健一郎、屋比久賢光、照屋太輝、仲村武裕、吉村蘭、竹本のぞみ、上原盛幸、山城清人、木原進士、山本浩靖、益崎裕章
2. 発表標題 14歳で初めて高TG血症、急性膵炎を発症した抗GPIIb/IIIa抗体に伴う自己免疫性高TG血症の一例
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤智駿、山本浩靖、河村真里、今井みなみ、鈴木俊伸、陳瑛超、橋本久仁彦、木原進士
2. 発表標題 糖尿病合併症における抗アポC2自己抗体の意義
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 浩靖、河村 真里、鈴木 俊伸、陳 瑛超、橋本 久仁彦、木原 進士
2. 発表標題 日本人糖尿病患者における抗アボ B-100自己抗体の臨床的意義
3. 学会等名 第92回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井みなみ、山本浩靖、小山英則、木原進士
2. 発表標題 自己免疫性高中性脂肪血症の小児2症例
3. 学会等名 第29回臨床内分泌代謝Update
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 智駿、山本 浩靖、河村 真里、今井 みなみ、橋本 久仁彦、木原 進士
2. 発表標題 糖尿病合併症における抗アボ C- 自己抗体の意義
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井みなみ、山本浩靖、小山英則、木原進士
2. 発表標題 小児に認められた自己免疫性高中性脂肪血症の2症例
3. 学会等名 第20回日本内分泌学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 河村真里, 山本浩靖, 村田幸咲, 鈴木俊伸, 陳瑛超, 橋本久仁彦, 木原進士
2. 発表標題 日本人糖尿病患者における抗アボB-100自己抗体の臨床的意義
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河村真里, 山本浩靖, 村田幸咲, 鈴木俊伸, 陳瑛超, 橋本久仁彦, 木原進士
2. 発表標題 日本人糖尿病患者における抗アボB-100自己抗体の臨床的意義
3. 学会等名 第65回 日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	木原 進士 (KIHARA Shinji) (20332736)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------