

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07461

研究課題名(和文) レドックス状態に着目したapoEの臨床病理学的意義の確立とその臨床応用

研究課題名(英文) Redox status of apolipoprotein E and its pathophysiological significance

研究代表者

山内 一由 (Yamauchi, Kazuyoshi)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：70419414

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)：蛋白質のCysteine-thiol基のレドックス状態(RSCT)の変化は当該蛋白質の生理機能に影響を及ぼすことが示されてきているが、Apolipoprotein E (apoE) については明らかになっていない。本研究では、apoEの病態生理学的機能に及ぼすRSCTの影響について検討した。apoEのRSCTはトリグリセライドに富むリポ蛋白とグルコースの代謝に密接に関与していることを見出した。さらに、血清apoEのRSCTは動脈硬化症患者群と対照群とで有意差があり、その評価は動脈硬化性疾患やアルツハイマー病など酸化ストレスを起因とする諸疾患の診断や予防に有用である可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が加速化する中で動脈硬化性疾患やアルツハイマー病など酸化ストレスを起因とする諸疾患の予防法と早期診断法の開発とそれに不可欠な病態メカニズムの解明は喫緊の課題である。apoEはこれらの疾患の発症に関与する重要な分子である。本研究では、apoEのRSCTが脂質および糖代謝に影響し、動脈硬化症の病態形成に関与していることを見出した。これらの知見は、臨床検査による血清apoEのRSCTの評価が酸化ストレスを起因とする諸疾患の診断や予防に有用である可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The redox status of cysteine-thiol (RSCT) is involved in various pathophysiological regulations. However, the RSCT of apolipoprotein E (apoE) has not been studied in detail. In the present study, we investigated effects of the RSCT of apoE on its pathophysiological functions. We found the possibility that the RSCT of apoE is closely involved in triglyceride-rich lipoproteins and glucose metabolism. We also found significant differences in the RSCT of serum apoE between the patients with atherosclerosis and control subjects. The estimation of the RSCT of serum apoE could be helpful in the diagnosis and prognosis of oxidative stress-related diseases, such as atherosclerotic diseases and Alzheimer's disease.

研究分野：臨床化学

キーワード：アポリポ蛋白 E Cystein-thiol レドックス状態 酸化ストレス 動脈硬化症 アルツハイマー病 リポ蛋白代謝

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1 . 研究開始当初の背景

apoE は脂質代謝を司る重要な血漿タンパクであり、心血管疾患をはじめとする種々の動脈硬化性疾患やアルツハイマー病(AD)の病態形成に密接に関与していることがよく知られている。しかしながら、これら apoE が関与する疾患の病態メカニズムは不明な点が多い。高齢化が急速に進む中で、動脈硬化性疾患や AD に対する有効な予防法の開発とそれに不可欠な病態メカニズムの解明は喫緊の課題となっている。

AD の病態メカニズムの解明においては、危険因子である apoE4 がどのような病態生理学的機能を担っているかがカギを握っているが、apoE3 や E2 の機能にも目を向ける必要がある。AD の 20 ~ 30% は apoE4 非保有者で占められているからである。また、apoE3 や E2 の機能にも目を向けた研究は動脈硬化性疾患の病態メカニズム解明にも寄与し得ると考えられる。

apoE の 3 つの主要アイソフォームのアミノ酸レベルでの違いは 112 番目と 158 番目の Cys/Arg 置換に過ぎないが、Cys 基の有無が脂質代謝に大きく影響することが知られている。一方、タンパク質のもつ Cys-thiol 基のレドックス変化は、生体内のレドックス変化に応答して生じる翻訳後修飾であり、種々の重要な生体調節機能を司るシグナル伝達に関与していることが明らかになっている。apoE-Cys-thiol 基のレドックス変化は apoE においても同様にその病態生理学的機能に重要な影響を及ぼすことが強く示唆されるが、これに着目した研究は行われていないのが現状である。

2 . 研究の目的

Cys-thiol 基のレドックス変化が apoE の機能に及ぼす影響を明らかにするとともに、健常者および患者の血清 apoE の Cys-thiol (apoE-Cys-thiol) 基のレドックス状態を評価することにより、apoE のレドックス解析の臨床的意義を確立することが本研究の目的である。

3 . 研究の方法

(1) apoE のレドックス状態の解析方法

試料を Polyethylene glycol-photocleavable maleimide (PEG-PC-Mal) と 37 °C , 40 分間反応させた後、10% SDS-PAGE を行った。電気泳動後のゲルに 15 分間 UV 照射した後、分離タンパクを PVDF 膜に転写し、HRP 標識抗 apoE 抗体を用いたウエスタンブロット法により apoE と特異的に反応するバンドを化学発光法で検出した。デンストメトリー法により各分画値を求め、別途測定した apoE 濃度を乗じて各分画濃度を求めた。

(2) 酸化ストレス下における apoE-Cys-thiol 基のレドックス状態の変化

健常者プール血清から超遠心分離法で分取した apoE3 含有リポ蛋白(VLDL, HDL) とリコンビナント apoE2, apoE3 を試料として H₂O₂ 酸化を加え上記の方法で apoE-Cys-thiol 基のレドックス状態の変化を解析した。

(3) apoE-Cys-thiol 基のレドックス修飾が脂質との相互作用に及ぼす影響

H₂O₂, tris(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP), N-ethylmaleimide, diamide, apoAII をそれぞれ反応させたリコンビナント apoE2, apoE3, apoE4 を用いて dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(DMPC)-liposome クリアランス実験を行い、apoE-Cys-thiol 基のレドックス修飾が脂質との相互作用に及ぼす影響について検討した。

(4) 血清 apoE-Cys-thiol 基のレドックス状態の評価指標とその意義

同意の得られた 280 名の患者血清を試料として血清 apoE-Cys-thiol 基のレドックス状態の解析を行い、レドックス状態の評価に適した指標 (redox-IDX-apoE) を探索した。また、多変量解析を用いて候補となった redox-IDX-apoE に影響を与える因子について検討した。さらに、動脈硬化症患者と非動脈硬化症患者の redox-IDX-apoE の違いを検討した。

4 . 研究成果

(1) 血清 apoE-Cys-thiol 基のレドックス状態

PEG-PC-Mal との反応により、血清 apoE3 では monomer, apoE3-AII complex, homodimer に加え monomer に 1 分子の PEG-PC-Mal が付加した約 40 kDa のバンドが検出された。血清 apoE2 では、monomer, apoE2-AII complex, homodimer のバンドに加え apoAII-E2-AII と apoE2 monomer に 2 分子の PEG-PC-Mal が付加した約 45 kDa のバンドを検出した。一方、血清 apoE4 では monomer のバンドのみを検出した。apoE2 と apoE3 において PEG-PC-Mal と付加体を形成する apoE を還元型 apoE (red-apoE) , apoE-AII complex, apoAII-E2-AII complex, homodimer を可逆的酸化型 apoE (roxi-apoE) , PEG-PC-Mal との反応後も monomer として残存する apoE を非可逆的酸化型 apoE (oxi-apoE) として以降の解析を行った。

(2) 酸化ストレス下の apoE に対する apoAII の影響

red-apoE は apoAII 添加の有無に関わらず減少した。oxi-apoE の増加は apoAII 添加により抑制された。apoE-AII complex は H₂O₂ との反応により減少したが、その減少はほぼ一定であり、apoAII 非添加時に認められた H₂O₂ 濃度に依存した減少は認められなかった (図1)。

(3) apoE 含有リポ蛋白に及ぼす酸化の影響

red-apoE3 の分布は HDL 分画に比べ VLD 分画優位であった ($p < 0.05$)。一方、apoE3-AII complex の分布は HDL 分画優位 ($p < 0.05$) であった。H₂O₂ 酸化により VLDL, HDL いずれにおいても red-apoE は減少し homodimer は増加したが、その変化率はいずれも HDL の方が大きい傾向にあった。oxi-apoE と apoE-AII complex の挙動については VLDL と HDL で明らかな違いが認められ、酸化によって HDL の oxi-apoE は有意に減少し ($p < 0.05$)、HDL の apoE-AII complex は有意に増加した ($p < 0.05$) (図2)。

(4) apoE の DMPC クリアランス能に及ぼす Cys-thiol 基修飾の影響

TCEP 処理による Cys-thiol 基の還元は apoE2 と apoE3 の DMPC クリアランス能を有意に増強した。一方、H₂O₂ 酸化は全てのアイソフォームの DMPC クリアランス能を有意に低下させた (図3A)。N-ethylmaleimide 処理による Cys-thiol 基の maleimide 化および diamide 処理によるジスルフィド結合形成は apoE2 と apoE3 の DMPC クリアランス能を有意に低下させた (図3B, C)。apoAII 処理による apoE-AII complex 形成は apoE2 と apoE3 の DMPC クリアランス能を有意に増強した (図3D)。

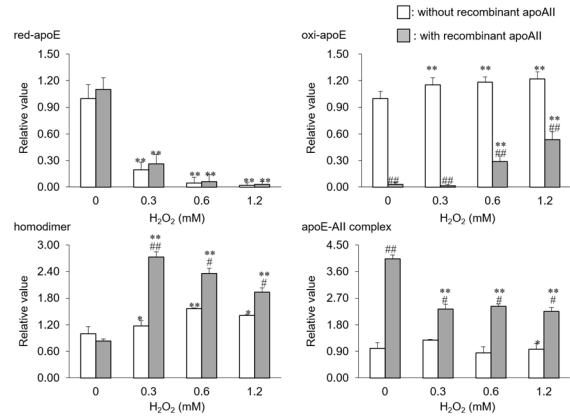


図1 酸化ストレス下の apoE に対する apoAII の影響
* $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$ as compared with each non-oxidized control (0 mM H₂O₂); # $p < 0.01$ and ## $p < 0.001$ as compared with each recombinant apoAII-free sample under the same oxidation conditions.

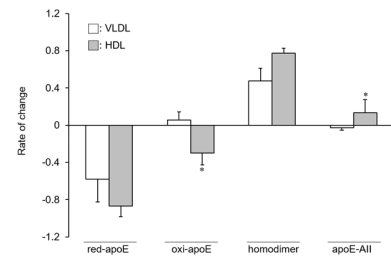


図2 apoE 含有リポ蛋白に及ぼす酸化の影響
* $p < 0.005$

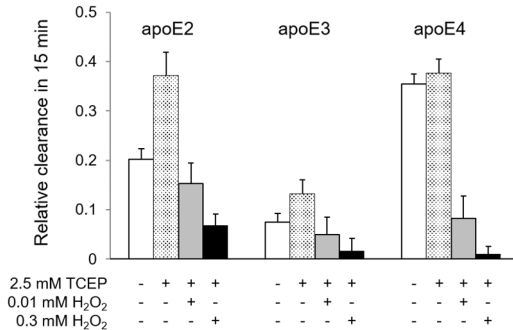


図3A apoE の DMPC クリアランス能に及ぼす TCEP 処理、H₂O₂ 処理の影響

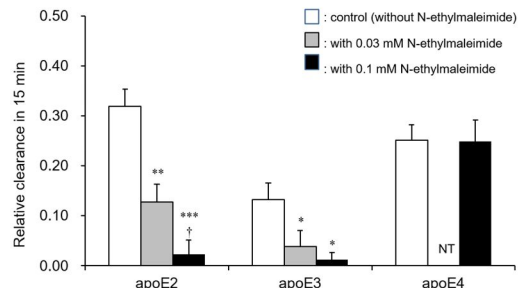


図3B apoE の DMPC クリアランス能に及ぼす N-ethylmaleimide 処理の影響

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and *** $p < 0.001$ compared with each control; and † $p < 0.05$ compared with apoE2 incubated with 0.03-mM N-ethylmaleimide. NT, not tested.

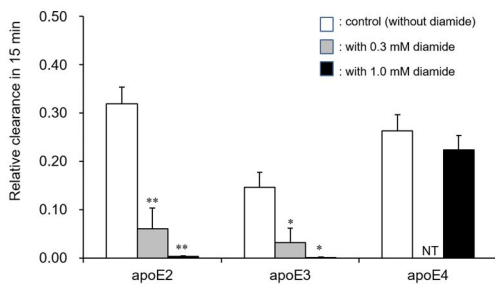


図3C apoE の DMPC クリアランス能に及ぼす diamide 処理の影響
* $p < 0.01$ and ** $p < 0.005$ compared with each control. NT, not tested.

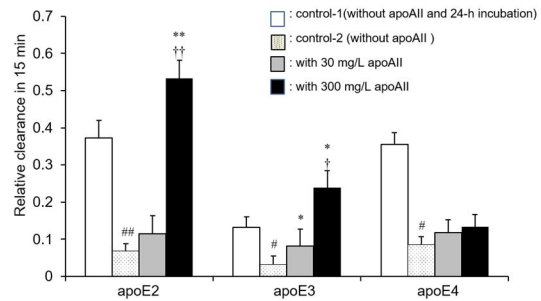


図3D apoE の DMPC クリアランス能に及ぼす apoAII 処理の影響
$p < 0.05$ and ## $p < 0.005$ compared with each control-1; and * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$ compared with each control-2; and †† $p < 0.001$ compared with apoE2 incubated with 30-mg/L apoAII and † $p < 0.05$ compared with apoE3 incubated with 30-mg/L apoAII.

apoE のジスルフィド結合複合体形成が apoE のレドックス状態の維持調節および脂質代謝機能に影響しているという以上の研究成果を踏まえ、適切な指標を用いた血清 apoE の Cys-thiol 基のレドックス状態の評価は動脈硬化症やアルツハイマー病などの apoE 関連疾患の診療において有用であると考え、有望な指標 (redox-IDX-apoE) を探索するとともに臨床的有用性について検討を行った。

(5) 血清 apoE-Cys-thiol 基のレドックス状態の評価指標とその意義

red-apoE, roxi-apoE, oxi-apoE の各濃度とこれらから求めた 9 種類の比について解析を行った結果、年齢と性の影響を受けない 3 つの比 roxi/total, red/roxi, (red+oxi)/roxi が redox-IDX-apoE の有力な候補になり得ると考えられた。多変量解析の結果より、3 つの比に影響を与える独立因子は血清トリグリセライド (TG) 濃度と HbA1c 値であり、これら 2 項目と roxi/total は負の相関、red/roxi と (red+oxi)/roxi は正の相関を示した (表 1)。一方、動脈硬化症を伴った 2 型糖尿病患者血清では対照血清に比べ TG と HbA1c は高値を呈したが、red/roxi と (red+oxi)/roxi は低値を示した (図 4)。

表 1 血清redox-IDX-apoE の単変量解析と多変量解析

objective variable	explanatory variable	Univariate analysis					Multivariate analysis				
		B	SE	β	t	p	B	SE	β	t	p
roxi/total	HDL-C (mg/dL)	0.0013	0.0004	0.236	3.5693	<0.001			NS		
	non-HDL-C (mg/dL)	-0.0008	0.0002	-0.2749	-4.2028	<0.001			†		
	TG (mg/dL)	-0.0005	0.0001	-0.4832	-8.0926	<0.001	-0.0005	0.0001	-0.4649	-7.7552	<0.001
	TG/HDL-C	0.0499	0.0050	0.5619	10.0053	<0.001			†		
	HbA1c (%)	-0.0181	0.0063	-0.1915	-2.8668	<0.005	-0.0116	0.0057	-0.1222	-2.0381	<0.05
red/roxi	HDL-C (mg/dL)	-0.0047	0.0011	-0.2766	-4.2295	<0.001			NS		
	non-HDL-C (mg/dL)	0.0021	0.0006	0.2470	3.7455	<0.001			†		
	TG (mg/dL)	0.0017	0.0002	0.5421	9.4584	<0.001	0.0014	0.0002	0.472	7.4124	<0.001
	TG/HDL-C	0.0824	0.0053	0.7254	15.5221	<0.001			†		
	HbA1c (%)	0.0534	0.0196	0.1825	2.7287	<0.01	0.0292	0.107	0.0944	0.0994	<0.05
[red + oxi]/roxi	HDL-C (mg/dL)	-0.0077	0.0020	-0.2563	-3.8972	<0.001			NS		
	non-HDL-C (mg/dL)	0.0036	0.001	0.2374	3.5919	<0.001			†		
	TG (mg/dL)	0.0028	0.0003	0.5152	8.8141	<0.001	0.0027	0.0003	0.4991	8.4886	<0.001
	TG/HDL-C	0.1089	0.0111	0.7181	15.2018	<0.001			†		
	HbA1c (%)	0.0949	0.0347	0.1829	2.7341	<0.01	0.0560	0.0305	0.1078	1.8329	<0.05

† Non-HDL-C and TG/HDL-C were excluded from the objective variables of multivariate analysis since they showed a linear combination with HDL-C and TG levels. NS, not significant.

以上より、apoE の Cys-thiol 基のレドックス状態は脂質・糖代謝に密接に関係しており、代謝異常に伴う病態の違いによって変化する可能性が示唆された。

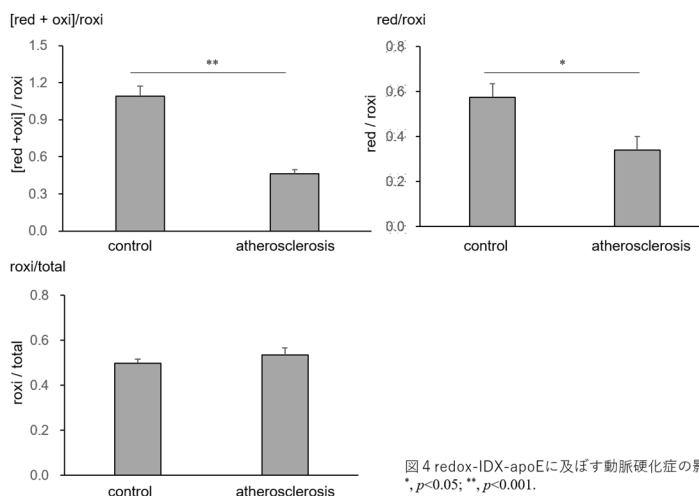


図 4 redox-IDX-apoE に及ぼす動脈硬化症の影響 * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

(本研究に関連して採択された論文)

- Redox equilibrium of serum apolipoprotein E3: a buffering effect of disulfide-linked complexes against oxidative stress on apolipoprotein E3-containing lipoproteins. *Biosci Rep* (2019) 39. doi: 10.1042/BSR20190184.
- The redox status of cysteine thiol residues of apolipoprotein E impacts on its lipid interactions. *Biol Chem* (2020) 401:617-627. doi: 10.1515/hsz-2019-0414.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamauchi Kazuyoshi, Kawakami Yasushi.	4. 巻 401
2. 論文標題 The redox status of cysteine thiol residues of apolipoprotein E impacts on its lipid interactions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 617-627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1515/hsz-2019-0414	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 Usami Yoko, Ichihara Kiyoshi, Uehara Takashi, Sugano Mitsutoshi, Ishimine Nau, Kawasaki Kenji, Yamauchi Kazuyoshi, Hamano Hideaki, Honda Takayuki	4. 巻 501
2. 論文標題 Evaluation of a novel serum IgG4 assay and determination of reference interval for the Japanese population.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 136-141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2019.10.032	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 Yamauchi Kazuyoshi, Iwasaki Shio, Kawakami Yasushi	4. 巻 39
2. 論文標題 Redox equilibrium of serum apolipoprotein E3: a buffering effect of disulfide-linked complexes against oxidative stress on apolipoprotein E3-containing lipoproteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BSR20190184	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 服部 圭一朗; 會田 雄一; 山内 一由; 二宮 治彦	4. 巻 11
2. 論文標題 臨床検査学教育における客観的臨床能力試験の有用性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床検査学教育	6. 最初と最後の頁 188-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Yamauchi Kazuyoshi, Iwasaki Shio, Kawakami Yasushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Redox equilibrium of serum apolipoprotein E3: A buffering effect of disulfide-linked complexes against oxidative stress on apolipoprotein E3-containing lipoproteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BSR20190184	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 Usami Yoko, Sugano Mitsutoshi, Uehara Takeshi, Koinuma Masayoshi, Ishimine Nau, Kawasaki Kenji, Yamauchi Kazuyoshi, Hamano Hideaki, Honda Takayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Cut-off values of serum IgG4 among three reagents, including a novel IgG4 reagent: a multicenter study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86024-5	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 會田 雄一; 山内 一由; 二宮 治彦
2. 発表標題 筑波大学における臨地実習前OSCEの実践と課題
3. 学会等名 2019年度 日臨技 首都圏支部・関甲信支部医学検査学会 (第56回)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 會田雄一、山内一由、関本道治、真家紘一郎、二宮治彦
2. 発表標題 大学と病院をつなぐ多職種連携医療専門職養成プログラムの成果
3. 学会等名 第67回日本医学検査学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 會田 雄一、服部 圭一朗、真家 紘一郎、関本 道治、山内 一由、二宮治彦
2. 発表標題 履修証明プログラム「多職種連携メディカルスタッフ教育プログラム」の普及とコンテンツ更新に関する課題
3. 学会等名 第11回日本保健医療福祉連携教育学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部圭一朗、會田雄一、真家紘一郎、山内一由、森川一也、中川嘉、吉田文代、小池朗、二宮治彦
2. 発表標題 臨地実習後の項目別自己評価：OSLE客観評価との関連性の検討
3. 学会等名 第13回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 金井 正光、奥村 伸夫、戸塚 実、本田 孝行、矢富 裕	4. 発行年 2020年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 2016
3. 書名 臨床検査法提要 改訂第35版	

1. 著者名 水口國雄、山内一由他	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 446
3. 書名 染色法のすべて	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------