

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15401

研究課題名（和文）臨床検査への応用を目指した高比重リポ蛋白の新たな機能測定法の開発

研究課題名（英文）Development of novel measurement methods for high-density lipoprotein function aimed at clinical examination

研究代表者

亀田 貴寛 (Kameda, Takahiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80758558

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：HDLには粥状動脈硬化を抑制する機能の存在が知られており、その代表的な機能であるコレステロール引き抜き能（CEC）は心血管疾患の発症リスクの予知に有用であるとされている。我々は新たなCEC評価法として固相化リポソーム結合ゲルビーズを用いた分析法の開発を進めてきた。また、この手法を応用し、蛍光リン脂質含有リポソームを利用した新規リン脂質引き抜き能の評価法の開発を試みた。ゲルへ固相化した蛍光リン脂質は従来のCECに比べ引き抜き量は予想を下回る値であったものの、改良を重ねることでリン脂質引き抜き能へも十分応用可能な方法であることが示唆された。同時にラジカル捕捉剤を用いた簡易抗酸化測定法も検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化性疾患の予防において血中のリポ蛋白コレステロールの管理は重要な課題である。しかし、コレステロール量のみでの評価では説明できない残余リスクの存在が新たに注目され、リポ蛋白をターゲットにした治療・予防戦略は「量から質」への転換期を迎えている。HDLの代表的な抗粥状動脈硬化機能であるコレステロール引き抜き能（CEC）が知られている。我々は従来の培養細胞に代わる蛍光標識コレステロールを含むゲルビーズを開発し、この方法をリン脂質引き抜き能への応用を試みた。将来、広く臨床検査の現場でHDL機能を多面的に測定することで動脈硬化症の病態把握や予防医学への貢献を期待している。

研究成果の概要（英文）：high-density lipoprotein (HDL) has anti-atherosclerosis functions, and cholesterol efflux capacity (CEC) is regarded as a key role for preventing of developing cardiovascular disease. We have been developing a novel CEC assay using immobilized liposome-bound gel beads. In addition, we attempted to develop a new evaluation method for phospholipid efflux ability using fluorescent phospholipid-containing liposomes. Although the amount of fluorescent phospholipid immobilized on the gel was lower than expected compared to the amount of CEC. It was suggested that the ability of phospholipid efflux could be evaluated by improving this method. Examination of a simple antioxidant measurement method using a radical scavenger was also investigated.

研究分野：臨床化学

キーワード：高比重リポタンパク 粥状動脈硬化 コレステロール引き抜き能 リン脂質引き抜き能 抗酸化能

1 . 研究開始当初の背景

動脈硬化の検査として、低比重リポ蛋白 (LDL) および高比重リポ蛋白 (HDL) コレステロールの検査が普及している。疫学研究の結果から LDL-コレステロールは低いほうが良く、LDL コレステロール低下薬により、動脈硬化性疾患への一定の効果が認められている。一方で、LDL が基準範囲にも関わらず心血管イベント発生を引き起こす残余リスクの存在が新たに注目されている。多くの前向き研究により、低 HDL 血症が心血管疾患の独立した危険因子であることが明らかになった。しかし、薬物介入による HDL 増加の臨床試験が次々に行われたが、いまだ心血管イベントのリスクを低下させるような結果は示されていない。従来のコレステロール量のみの評価には限界があり、HDL をターゲットにした治療・予防戦略は「量から質」への転換期を迎えている。

そこで我々は動脈硬化にともなう HDL の化学修飾に着目し、機能の評価と疾患と関連するリスクマーカーの探索を進めてきた。HDL が担う動脈硬化に対する好ましい機能とは、マクロファージなどの抹消細胞からのコレステロール引き抜き能、抗酸化能、抗炎症作用、内皮機能保護作用、抗血栓作用などが示されている。しかし、従来から用いられている HDL の機能の測定法は、臨床検査への直接の応用は極めて困難であった。なぜなら、HDL の機能測定は培養細胞や放射性同位元素を用いた研究レベルでの評価法が中心である点や、実用化には臨床検査の標準化を行う必要がある点があげられる。したがって、将来の臨床検査の現場への応用のためには、上記の問題点を解決した新たな HDL の機能測定法の開発が必要となる。また、同時に HDL の機能の改善をフォローアップするサロゲートマーカーの開発も期待される。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、従来の基礎研究で用いられてきた HDL の機能検査をもとに、臨床検査の現場にも応用可能な測定法を開発することで社会に貢献することである。従来の HDL を対象とした機能測定法は、臨床検査への直接的応用は極めて困難であるという側面を持つ。例えば代表的なコレステロール引き抜き能測定法は、「細胞の使用、放射性同位体の使用、手技が煩雑、装置化が困難」という問題点をもつ。また、抗酸化能の評価においても脂質の酸化による共役ジエン構造の増加を吸光度測定で追跡する共役ジエン法がその評価法のひとつとして利用されてきたが、評価尺度が経時変化であり定量性に欠けるといった問題点を有している。本研究によって、これらの問題を解決することは、動脈硬化に関わる多くの基礎研究の発展へのサポートにつながると考えられる。加えて、臨床検査にも応用可能な測定法の構築が達成されることによって、HDL 機能改善を目的とした創薬や、治療効果のフォローアップに、強力な研究基盤技術の提供が期待される。

3 . 研究の方法

臨床検査に応用可能な機能の測定法を開発するために、主として HDL の中心的機能である「コレステロール引き抜き能」と「抗酸化能」についてフォーカスし、新たな評価手法の確立を試みた。

(1) 固相化リポソーム結合ゲルビーズを用いたコレステロール引き抜き能の評価

高比重リポタンパク (HDL) は抗粥状動脈硬化能を有するリポタンパクであり、その機能の一つとしてコレステロール引き抜き能 (Cholesterol Efflux Capacity; CEC) が知られている。

リポソーム結合ゲルビーズ (Immobilized Liposome-Bound Gel Beads; ILG) の作製

蛍光 (Boron-Dipyrromethene; BODYPY) 標識コレステロールを含むリポソーム乳濁液に乾固処理ゲルビーズを加えて 30 分間室温で静置後、十分に混和した。本研究におけるリポソーム固定化用のゲルビーズは Sephacryl S-300 を用いた。- 80 凍結処理と流水解凍を 7 回繰り返し、ゲルビーズをバッファー (1 M Tris-HCl 10 mL, 4M NaCl 37.5 mL, EDTA-Na 372.4 mg, D.W. 952.5 mL) で十分洗浄した後、再度バッファーに懸濁してリポソーム結合ゲルビーズ (ILG) 混濁液とした。作製後は遮光した状態にて 4 で保存した。

ILG 混濁液に対して、サンプルを 2 : 3 の割合にて添加、遮光条件下でインキュベーション (室温, 18 時間) 後、遠心分離して得られた上清の蛍光強度を測定した。

沈殿法による (ApoB-Depleted Serum; BDS) の回収

血清に対して 20% ポリエチレングリコール溶液 (200 mM Glycine buffer; pH 7.4) を 100 : 40 の割合で添加し、20 分間、室温でインキュベーションした後、10,000 rpm, 30 min, 4 で遠

心し、上清を apoB 含有リポタンパク除去血清 (BDS) として回収した。

上記測定法を用いて、HDL の多様性がコレステロール引き抜き能に与える影響について評価した。

(2) 固相化リポソーム結合ゲルビーズを用いたリン脂質引き抜き能の評価

HDL はコレステロール以外にリン脂質も引き抜くことが知られているが、このリン脂質を引き抜く能力 (Phospholipid Efflux Capacity; PEC) と粥状動脈硬化抑制効果の関係やその評価法は十分に確立されていない。

上記 ILG 法を応用し、蛍光リン脂質含有リポソームを利用した新規評価法の開発を目的とし、測定条件について検討を行った。ILG 法で用いるゲル作製の条件検討として、蛍光標識リン脂質をゲルに固相化する際、異なる回数 (1, 3, 5, 7 回) の凍結融解を行い、それぞれのゲルに固相化された蛍光標識リン脂質を測定した。健康人の血漿から超遠心法を用いて HDL と LDL を分離、また沈殿法を用いて血清から apoB 含有リポタンパク除去血清 (BDS) を作製した。HDL (1.0 mg protein/mL), LDL (1.0 mg protein/mL), アルブミン (1.0 mg/mL), BDS (3%~60%) をサンプルとし、蛍光標識リン脂質を固相化したゲルを用いてそれぞれの PEC を測定した。

(3) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) を用いた血清抗酸化能測定系の検討

DPPH Antioxidant Assay Kit (同仁化学研究所) を用いた。安定ラジカルでありエタノール溶液中で深紫色を呈する DPPH が、抗酸化物質を含む検体との反応により還元され無色化し、517 nm に有する強い吸収が低下することを利用する。この吸光度減少をラジカル消去率として抗酸化能の指標とするほか、4 濃度以上で作成した検体希釈系列のラジカル消去率のプロットから回帰直線を得ることで、ラジカル消去率が 50% となる点を指す 50% 阻害濃度 (Inhibitory Concentration (50%); IC50) を求めて多種類の検体の抗酸化能の比較が可能である。

また標準物質としてトコフェロールの水溶性アナログである Trolox を検体と同時に測定し、検体と Trolox の IC50 の比を Trolox 等価活性 (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity; TEAC) とし、測定間差を相殺した抗酸化能の比較も可能である。

本測定法の改良および検討事項として、マニュアルの 2 倍量として検体 40 μ L, Assay buffer 160 μ L 及び DPPH 試薬 200 μ L を混合し、ボルテックスミキサーでよく混和、インキュベーション (20~30 min, 室温または 37 $^{\circ}$ C) したのち、遠心 (10,000~15,000 rpm, 3~10 min, 25 $^{\circ}$ C) により得られた上清 200 μ L を 96 穴マイクロプレートのウェルに分注して 517 nm での吸光度を測定した。本測定法における検体希釈直線性、反応温度、反応時間の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 固相化リポソーム結合ゲルビーズを用いたコレステロール引き抜き能の評価

我々は新たな CEC 評価法として固相化リポソーム結合ゲルビーズ (ILG) を用いた分析法の開発を進めてきた。

基礎的検討および従来法との相関 ($r = 0.932$) から、ILG が培養細胞に代わるコレステロールドナーとして有効であることが確認された。さらに、ILG 法において apoB を含むリポタンパク (HDL 以外のリポタンパク) を沈殿除去した上清 (BDS) が HDL の代用として有用であることを明らかにした。

(2) HDL 亜分画による違いがコレステロール引き抜き能へ与える影響の解析

HDL 亜分画の違いが CEC に及ぼす影響を評価するため、HDL₂, HDL₃ を対象に ILG 測定法と THP-1 細胞株を使用した従来法にて評価を試みた。

両方法において、これらの HDL の CEC は同様の結果を示した。蛋白等量の条件においては HDL₂ が、総コレステロール等量の条件においては HDL₃ がより高い CEC を示した。これらの CEC は HDL 亜分画中の総コレステロール濃度 / 総蛋白濃度比の違いに起因し、既存のコレステロール引き抜き能に関する知見と一致するものであった。

(3) HDL 中コレステロールのエステル化とコレステロール引き抜き能との関連

HDL のメタボリズムが CEC に及ぼす影響を評価するために、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (Lecithin-Cholesterol Acyltransferase; LCAT) に着目し、ILG 測定法と従来法にて LCAT が CEC に与える影響の評価を試みた。

HDL 中の LCAT の活性の阻害調節は、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸); DTNB または熱非働化処理によって行い、遊離型コレステロール (FC) からエステル型コレステロール (EC) への変換が阻害されることを確認した。LCAT 阻害が HDL の CEC に及ぼす影響に関して ILG 測定法と従来法では、同様の結果が得られ、HDL 中の FC/EC 比の多寡による CEC の有意な差は認められなかった。また、同タンパク濃度に調整した HDL₂ と HDL₃ の CEC を比較したところ、HDL₂ において高い CEC が認められたことから、LCAT は直接コレステロールの引き抜き段階に関与しているというよりは HDL の組成に関わるメタボリズムの結果として間接的に CEC に関与していることが示唆された。

(4) 固相化リポソーム結合ゲルビーズを用いたリン脂質引き抜き能の評価

上記の ILG 法を応用し，蛍光リン脂質含有リポソームを利用した新規リン脂質引き抜き能の評価法の開発を試みた。

ILG 作製における凍結融解の回数は，回数の増加に伴ってゲルに固相化されるリン脂質が増加することが確認され，凍結融解の回数が多いゲルでは，洗浄時の蛍光標識リン脂質の損失が少なく，安定であることが確認された。サンプルによる PEC の比較検討に関して，BDS 20%以上の条件において濃度依存的また時間依存的に蛍光リン脂質の引き抜き量の増加が観察された。

蛍光リン脂質のゲルへの固相化に成功したが，従来の CEC で用いられていたアクセプターによるリン脂質の引き抜き量は予想を下回る値であった。ILG 法のリン脂質引き抜き能の応用への実現可能性は示唆されたが，効率的な引き抜きを目指した測定法の改良が今後の課題である。

(5) DPPH を用いた血清抗酸化能測定系の検討

将来の HDL 抗酸化機能の量的評価を見据え，DPPH を用いた血清の抗酸化能測定法の開発に取り組んだ。

血清の抗酸化能は，検体の 2 から 4 倍までの希釈域で濃度依存的な相関が確認され ($r = 0.998$)，直線回帰が認められた ($p < 0.05$)。また，日常検査への応用を目指し，反応条件を 37℃，20 分に変更し従来法と比較した。反応条件を改良しても従来法と同様の結果が得られた。汎用的な温度条件及び短縮された反応時間で測定可能であり，血清検体中の総合的な抗酸化能を定量的に評価できる手法としての有用性が示唆された。本測定法による BDS および超遠心分離 HDL を用いた検討を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Horiuchi Y, Ohkawa R, Lai SJ, Shimano S, Hagihara M, Tohda S, Kameda T, Tozuka M	4. 巻 39(4)
2. 論文標題 Usefulness of apolipoprotein B-depleted serum in cholesterol efflux capacity assays using immobilized liposome-bound gel beads.	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/BSR20190213	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 Horiuchi Y, Lai S-J, Yamazaki A, Nakamura A, Ohkawa R, Yano K, Kameda T, Okubo S, Shimano S, Hagihara M, Tohda S, Tozuka M	4. 巻 -
2. 論文標題 Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells.	5. 発行年 2018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/BSR20180144	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 Sato M, Ohkawa R, Low H, Nishimori M, Okubo S, Yoshimoto A, Yano K, Kameda T, Yatomi Y, Tozuka M	4. 巻 63
2. 論文標題 Serum amyloid A does not affect high-density lipoprotein cholesterol measurement by a homogeneous assay.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 97-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.clinbiochem.2018.10.008	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 該当する
1. 著者名 Horiuchi Y, Ohkawa R, Lai SJ, Yamazaki A, Ikoma H, Yano K, Kameda T, Tozuka M	4. 巻 400(2)
2. 論文標題 Characterization of the cholesterol efflux of apolipoprotein E-containing high-density lipoprotein in THP-1 cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 209-218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1515/hsz-2018-0284	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 Horiuchi Yuna, Lai Shao-Jui, Kameda Takahiro, Tozuka Minoru, Ohkawa Ryunosuke	4. 巻 40
2. 論文標題 Comparison of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposome-bound gel beads with the conventional method	5. 発行年 2020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/BSR20201495	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 堀内 優奈, 頼 勁睿, 山崎 あずさ, 中村 文香, 大川 龍之介, 矢野 康次, 亀田 貴寛, 大久保 滋夫, 島野 志都子, 萩原 三千男, 東田 修二, 戸塚 実
2. 発表標題 固相化リポソームを用いたコレステロール引き抜き能評価法の開発と評価
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Horiuchi Y, Lai S-J, Yamazaki A, Nakamura A, Ohkawa R, Yano K, Kameda T, Okubo S, Shimano S, Hagihara M, Tohda S, Tozuka M
2. 発表標題 Validation and application of a novel cholesterol efflux assay using immobilized liposomes as a substitute for cultured cells.
3. 学会等名 XVIIIth International Symposium on Atherosclerosis 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Horiuchi Y., Lai S.J., Shimano S., Kameda T., Ichimura N., Tohda S., Tozuka M. and Ohkawa R.
2. 発表標題 Novel cholesterol efflux assay using immobilized liposome-bound gel beads: confirmation and improvement for application in clinical laboratory.
3. 学会等名 2020 AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo 2020.12.16 On-line (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀内 優奈, 頼 劭睿, 島野 志都子, 亀田 貴寛, 市村 直也, 東田 修二, 戸塚 実, 大川 龍之介.
2. 発表標題 無細胞系コレステロール引き抜き能測定法におけるreference serumに代わるタンパクの探索.
3. 学会等名 第67回日本臨床検査医学会学術集会 2020.11.20 岩手 (on-line とのハイブリッド形式)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀内 優奈, 島野 志都子, 頼 劭睿, 亀田 貴寛, 市村 直也, 東田 修二, 戸塚 実, 大川 龍之介.
2. 発表標題 無細胞系コレステロール引き抜き能測定法の臨床現場での測定に向けた検討.
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会 学生シンポジウム 2020.11.01
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀内 優奈, 島野 志都子, 頼 劭睿, 亀田 貴寛, 市村 直也, 東田 修二, 戸塚 実, 大川 龍之介.
2. 発表標題 無細胞系コレステロール引き抜き能測定法の臨床現場での測定に向けた検討.
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会 2020.10.30
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 亀田 貴寛, 島野 志都子, 堀内 優奈, 矢野 康次, 頼 劭睿, 市村 直也, 東田 修二, 栗原 由利子, 戸塚 実, 大川 龍之介.
2. 発表標題 MPO酸化修飾およびN-ホモシステイン化修飾がHDLの血管内皮修復能に及ぼす影響について.
3. 学会等名 第60回日本臨床化学会年次学術集会 2020.10.30
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 陸田 優芽, 堀内 優奈, 島野 志都子, 藤井 祐葵, 山崎 あずさ, 頼 劭睿, 亀田 貴寛, 市村 直也, 藤田 浩二, 東田 修二, 戸塚 実, 大川 龍之介.
2. 発表標題 炎症患者における血清アミロイドAによる高比重リポタンパクのコレステロール引き抜き能への影響.
3. 学会等名 日本医療検査科学会第52回大会 2020.10.01 On-line
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀内 優奈, 山崎 あずさ, 島野 志都子, 亀田 貴寛, 市村 直也, 東田 修二, 戸塚 実, 大川 龍之介.
2. 発表標題 培養細胞および放射性物質を用いない新たな測定法によるコレステロール引き抜き能とHbA1cの関連の検討.
3. 学会等名 第52回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2020.0717.名古屋オンライン開催
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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