

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11717

研究課題名(和文) マクロファージのリポ蛋白リパーゼ新規断片を用いた動脈硬化の超早期診断システム開発

研究課題名(英文) Development of an ultra-early diagnosis system for atherosclerosis using a novel fragment of macrophage lipoprotein lipase

研究代表者

高木 敦子 (Takagi, Atsuko)

大阪大学・生物学国際交流センター・招へい研究員

研究者番号：90179416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リポタンパク質リパーゼ(LPL)が、N末40kDaLPL(N-LPL40)とC末LPL(C-LPL21)に切断されることを見い出した。心疾患患者血漿で、C-LPL21に加え、新規のC末20kDaのLPL(C-LPL20)をウエスタン法で検出し、このC-LPL20が動脈硬化バイオマーカーになると考えた。C-LPL20の特異的検出法、固相化LPL抗体-レクチン-サンドイッチ-ELISAを開発し、臨床検体血漿からLPL抗体でC-LPL20/21を部分精製後、C-LPL20を濃度依存的に測定できた。N-LPL40測定は、2種類のN末認識モノクローナル抗体でのサンドイッチ-ELISAにより可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、LPL分子がタンパク質分解酵素によってN-末ドメイン(N-LPL40)とC-末ドメイン(C-LPL20/21)に分解され血漿中に存在することを初めて明らかにした。ウエスタン法により心疾患において、特異的にC-LPL20が検出されることを明らかにし、簡便な検出系の開発(固相化LPL抗体とレクチンによるサンドイッチ-ELISA)に成功した。C-LPL20の定量は、動脈硬化の発症・進展・破綻の病態を把握できる鋭敏なバイオマーカーになる。動脈硬化薬の超早期診断法の開発は動脈硬化発症の予防を可能とし、医療費削減や国民の健康長寿等の社会的波及効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：Lipoprotein lipase (LPL) is cleaved by proteolytic enzymes into an N-terminal 40 kDa LPL (N-LPL40) and a C-terminal LPL (C-LPL21). In addition to C-LPL21, a novel C-terminal 20 kDa LPL (C-LPL20) was detected in plasma from patients with atherosclerotic heart disease by Western blotting, and we hypothesized that this C-LPL20 could be a biomarker to determine the onset and progression status of atherosclerosis. The applicant has successfully developed a LPL monoclonal antibody and lectin-sandwich-ELISA that can specifically detect C-LPL20. After partial purification of C-LPL20/21 from plasma of clinical samples by LPL-Mab(B4D4) resin, C-LPL20 was detected in a concentration-dependent manner by this ELISA method. Measurement of N-LPL40 was made possible by sandwich-ELISA using solid-phase 1-6F9C1 and HRP-labeled 1-7A5F6 that are N-terminal recognition. Concentration-dependent quantification of N-LPL40 in plasma of clinical specimens was achieved.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：リポタンパク質リパーゼ 動脈硬化 心疾患 バイオマーカー サンドイッチ-ELISA

1. 研究開始当初の背景

(1) 粥状動脈硬化初期病変の早期診断の重要性

動脈硬化は無症状で進展し、冠動脈等に単球由来のマクロファージ (Mφ) が内膜下に侵入し、Mφは TG とコレステロールエステル (CE) に富む動脈硬化惹起性リポ蛋白を取込み、細胞内 CE を異常蓄積して泡沫細胞になり、粥状動脈硬化巣を形成することが病理学的に確認されている(図1)。動脈硬化巣の進展による破裂と血栓形成で急激な血流障害が生じ、急性心筋梗塞等が発症し、死に至る場合があります。日本における死因の30%を占めている。粥状動脈硬化性血管病の早期診断法の確立は、本症の予防や適切な治療計画の作成を可能とし、国民の健康推進活動において極めて重要な課題である。

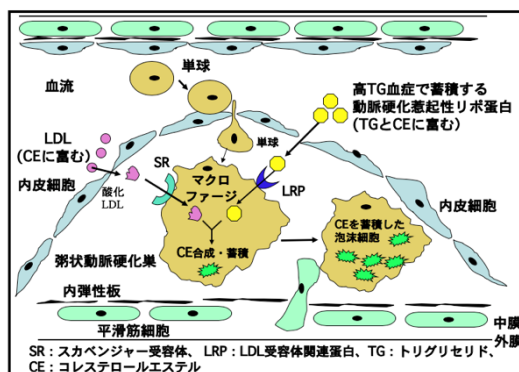


図1 動脈硬化巣形成における単球由来マクロファージ(Mφ)の関与

(2) 動脈硬化発症への危険因子となるリポ蛋白

動脈硬化の発症には、内皮細胞の障害と酸化LDL(低比重リポ蛋白)が関与するが、LDL 降下療法の治療効率は約30%程度であり、他の動脈硬化への危険因子に対するアプローチが必要とされている。最近、生活習慣病である高血圧、糖尿病や高トリグリセリド(TG)血症等が合併した病態(メタボリックシンドローム)が、動脈硬化性心血管病への危険因子となり、治療対象となっている。高TG血症の持続により、TGとCEに富む動脈硬化惹起性リポ蛋白の蓄積が認められている(図1)。

(3) LPL 酵素と動脈硬化惹起性高TG血症

LPLは、主に脂肪細胞で、約60kDaの分子として合成・分泌され、内皮細胞表面に係留し、流血中のリポ蛋白であるカイロミクロンや超低比重リポ蛋白(VLDL)のTGを加水分解する働きをしている。LPL遺伝子異常によるTG分解活性低下は高TG血症の原因となる。申請者はヘパリンを静脈内投与後の血漿を臨床検体として、LPL活性(文献1)とLPL蛋白の測定系(文献2)を開発し、日本人のLPL機能を失う変異を集積してきた[基盤(C)代表(2009-2011年度と2012-2014年度)](文献3-10)。日本人で集積された25種類のLPL変異検出方法を用いて、吹田市(大阪府)一般住民の性と年齢の階層毎の無作為抽出による検体(吹田研究: 3650名)からLPL変異ヘテロ者を11名検出し(0.3%の頻度)、これらLPL変異ヘテロ者は正常者と比して、5倍高TG血症になりやすかった(オッズ比4.99、95%CI: 1.52-16.41)。環境因子として、肥満、高アルコール摂取、及び高血糖状態が、血清TG値上昇に相加的に関与した。興味ある点として、高TG血症(オッズ比1.46、95%CI: 1.01-2.11)は、高血圧(オッズ比1.90、95%CI: 1.35-2.68)と共に動脈硬化性心疾患の独立危険因子となる結果を得ている(Takagi A et al, 投稿準備中)。

(4) 動脈硬化性疾患の診断法

動脈硬化性疾患の診断は、脈派伝導速度(PWV)測定、頸動脈エコーによる頸動脈の内膜肥厚測定、造影剤を用いる心臓の冠動脈を検査する心臓-CT(Computed Tomography)検査法や心筋を調べる心臓-MRI検査法などの画像検査にて行われ、冠動脈の狭窄度や心筋梗塞の有無が評価されている。また、炎症マーカー(CRP: C-reactive protein)やマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の血中濃度測定により、心血管イベントの予測に関する研究も行われている。しかし、これらの診断法は、いずれも症状がある場合であり、動脈硬化の程度の診断には有効であるが、未病状態での動脈硬化性疾患のMφが関与する初期病変の検出には困難性を伴っている。

(5) Mφ由来のLPL分子のタンパク質分解酵素により生じた断片と動脈硬化症との関連

LPL分子は活性中心を構成する約40kDaのN末ドメイン(N-LPL40)とリポ蛋白に結合する部位を

含む C 末ドメイン(付加する糖鎖のサイズの違いにより C-LPL20 または C-LPL21)からなっている。申請者は 14 例の健常者と 3 例の動脈硬化性疾患者の血漿を SDS 電気泳動と LPL-モノクローナル抗体(Mab)によるウェスタン法によって解析し、C-LPL20 が動脈硬化性疾患において高値に検出されることを発見した[基盤(B)(分担; 2008~2010年度)と基盤(C)(代表; 2015-2018年度)]。この C-LPL20 が動脈硬化性疾患の早期診断のバイオマーカーになると考え (文献 11 の特許)、研究を継続している。

## 2. 研究の目的

LPL は主に脂肪組織で合成・分泌される分子量 6 万の糖蛋白(LPL60)で、流血中の大型リポタンパク質のトリグリセリド (TG)を分解し、脂肪酸を必要とする組織に供給する働きをしている。動脈硬化初期病変形成に関与する白血球細胞の一つである単球細胞がマクロファージ(M $\phi$ )に分化し、この M $\phi$  細胞が粥状動脈硬化巣の形成・進展に密接に関与していることに着目し、この M $\phi$  細胞の存在を特異的に検出できるバイオマーカーを末梢血から検出できれば、超初期段階での動脈硬化巣の形成段階が診断できると考えた。この M $\phi$  細胞から由来する特異的な因子として、単球では全く合成されないが、M $\phi$  細胞に分化すると合成が開始される LPL を選択し、バイオマーカーとして利用することで、超早期動脈硬化診断に役立てるために、簡便にこのバイオマーカーを測定できる系を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象者

市販の健常者(5名)および心疾患患者(5名)の血漿および他施設からの高 TG 血症者の解析依頼があったケース(26名)を対象者とする。所属施設と依頼施設の倫理委員会の承認後、対象者から同意を文書でいただいた。

### (2) LPL の C 末端断片(C-LPL20 と C-LPL21)のウェスタン法による検出法

対象者の血漿 5 mL-20 mL をヘパリン-Sepharose カラム(1 mL)に添加し、0.8 M NaCl により LPL 酵素を部分精製し、その後、LPL 抗体-Sepharose カラム(B4D4-Mab-Sepharose)により、LPL を濃縮精製した検体を使用する。濃縮検体を SDS-PAGE、NC 膜に転送、LPL の C 末端断片を認識する LPL 抗体(D2B2)反応、HRP 標識 2 次抗体(ヤギ抗マウス IgG 抗体)反応、HRP 酵素の基質 ECL 反応によりタンパク質バンドを検出する。

### (3) LPL の C 末認識マウス抗ヒト LPL 抗体から Fc 部位の除去による F(ab')<sub>2</sub> の作成

抗体、IgG の Fc 部位は糖鎖を含むことは、よく知られている。抗体を固相化し、抗原をサンドイッチして抗原得意的な糖鎖をレクチンで解析する方法の開発において、抗体の Fc 部位の糖鎖が問題となるので、Fc の除去が必要となる。マウスの IgG1 の場合、Fc を除去する方法として Ficin のタンパク分解酵素の使用が可能である。市販の Ficin-Agarose を用いて、LPL の C 末認識マウス抗ヒト LPL 抗体から Fc 部位の除去を以下の様に行う。5mg の抗体を Ficin-Agarose で 37 度、20 時間反応後、Protein-A カラムにより F(ab')<sub>2</sub> を回収し、ゲル濾過法により F(ab')<sub>2</sub> を精製する。

### (4) LPL の N 末認識マウス抗ヒト LPL 抗体のスクリーニング法

His6-40kLPL-cDNA を COS 発現し、HisTrap カラムにより精製した His6-40kLPL を 96 穴プレートに固相化し、抗原と反応する LPL 抗体産生ハイブリドーマ(精製ヒト LPL60 を抗原として、マウスに免疫して作成したハイブリドーマを、精製ヒト LPL60 を用いて、スクリーニングしたもの)のスクリーニングを HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体により行う。

## 4. 研究成果

### (1) 臨床検体の LPL-C 末端断片(C-LPL20 と C-LPL21)のウェスタン法による検出

健常者 5 名、心疾患患者 5 名の市販の血漿をヘパリンカラムおよび B4D4-樹脂のアフィニティー法による LPL-C 末端断片(C-LPL20 と C-LPL21)の分離精製を行い、ウェスタン法への検体とした。健常者 5 名から、明瞭に C-LPL21 のバンドが検出されたが、C-LPL20 は極めて微量あるい

はゼロであった。一方、心疾患患者 5 名中の 4 名は、明瞭に、C-LPL21 バンドと C-LPL21 バンドより小さい C-LPL20 のバンドが検出され、残り 1 名からも明らかに、健常者よりも高濃度の C-LPL20 が検出された。これらの結果は、以前の我々の結果とよく一致していた（文献 11）。C-LPL20 と C-LPL21 の分子量の違いは、結合している糖鎖構造の違いによることを明らかにし、両者をレクチンによって分別可能であることが判明した。

## (2) C 末認識マウス抗ヒト LPL 抗体とレクチンによる C-LPL20 の検出法の確立

C 末認識マウス抗ヒト LPL 抗体を固相化し、C-LPL20 をキャプチャー後、レクチンでサンドイッチする測定方法において、問題となるのは、抗体に結合している糖鎖である。最初に固相化するモノクロー抗体の糖鎖の有無に関して検討した。図 2 に示す C 末認識抗体 6 種類、B4D4, 1-2F10, 1-3G11, 1-7B7, F8F9, D2B2 を還元後、SDS-PAGE によって解析した結果、図 2 の右側の Amido Black 染色により H 鎖と L 鎖が明瞭に検出された。これら H 鎖と L 鎖の糖鎖をレクチンにより解析した結果、左側に示す様に、B4D4 と 1-7B7 には、L 鎖にも糖鎖が結合していることから、固相化の抗体候補から除外し、残り 4 種類の 1-2F10, 1-3G11, F8F9, D2B2 を固相化の抗体候補とした。

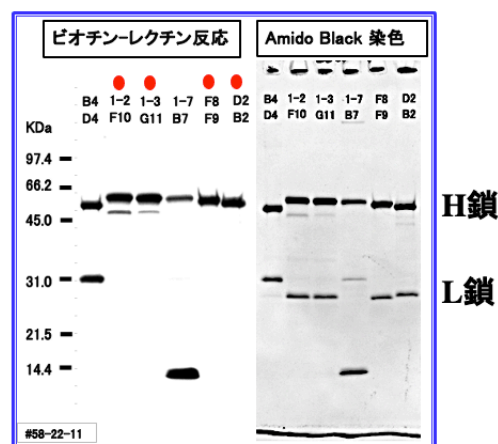


図2 モノクロー抗体 IgGのH鎖とL鎖の糖鎖解析

タンパク質分解酵素 Ficin を使用して、H 鎖の Fc 部位（糖鎖が結合している）を除去し、F(ab')<sub>2</sub> の作成を試みた。それぞれ作成した F(ab')<sub>2</sub> を固相化し、レクチンとの反応は、予想通り、非常に低値であった。一方、C-LPL20 をキャプチャー後、レクチンでサンドイッチする反応においては、F8F9-F(ab')<sub>2</sub> のみが、陽性であり、固相化 F8F9-F(ab')<sub>2</sub> とレクチンによるサンドイッチ-ELISA を確立することに成功した。

## (3) C 末認識マウス抗ヒト LPL 抗体 F8F9-F(ab')<sub>2</sub> とレクチンによる臨床検体の C-LPL20 の検出

精製した C-LPL20 を検出する場合、ウエルあたり 160ng（160ng/100uL）の存在が必要である。一般的臨床検体である血漿中の LPL-C 末端断片（C-LPL20 と C-LPL21）の濃度は、20-150ng/mL であるので、検体の精製濃縮が望ましい。血漿 10ml を B4D4-樹脂により LPL-C 末端断片（C-LPL20 と C-LPL21）を精製濃縮し、40ng/well, 80ng/well, 160ng/well の検体を F8F9-F(ab')<sub>2</sub> とレクチンによるサンドイッチ-ELISA により測定した結果、濃度依存的に検出できた。

## (4) LPL の N 末ドメインに対するエピトープを異にする 2 種類のハイブリドーマの検出とサンドイッチ-ELISA の確立

LPL 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングにより LPL の N 末認識の 2 種類の Mab、1-6F9C1 と 1-7A5F6 の検出に成功した。1-6F9C1 を固相化用 Mab に、1-7A5F6 を HRP 酵素標識し、LPL 抗原をサンドイッチできる ELISA を構築した。標準品として精製した 60k LPL を使用し、0-150ng/mL の濃度依存的標準曲線を得ることができた。

## (5) 臨床検体血漿の N-LPL40 のヘパリンカラムによる分離と検出

血漿をヘパリンカラムに添加し、0, 0.4M, 0.8M, 1.3M NaCl によるステップ法により検体を溶出し、1-6F9C1 固相化/1-7A5F6-HRP-ELISA 法により N-LPL40 を測定した結果、濃度依存的に N-LPL40 を測定することができ、N-LPL40 は C-LPL20 より低 NaCl によって溶出されることが判明した。

## (6) 臨床検体血漿の N-LPL40 の検出とその臨床的意義

臨床検体（n=29：市販の健常者 5 名と他施設からの検体 24 名）、ヘパリン静注後血漿中の LPL タンパク質量からの判定による LPL 欠損ホモ接合体者（n=4）、ヘテロ接合体者（n=6）、健常者（n=19）の血漿、50uL を用いて、1-6F9C1 固相化/1-7A5F6-HRP-ELISA 法により N-LPL40 を測定した結果、健常者（36.9±21.5 ng/mL; 平均±標準偏差）、ヘテロ接合体者（18.0±7.3

ng/mL)、ホモ接合体者(4.0±2.2 ng/mL)の値を得た。JMP統計解析ソフトの一元配置分散分析のTukey-KramerのHSD検定により、健常者とホモ接合体は有意に区別できる(p=0.0078)が、健常者とヘテロ接合体者(p=0.086)の区別およびヘテロ接合体者とホモ接合体者(p=0.4681)の区別には、困難性を伴った。興味ある結果として、他施設からの検体の自己免疫疾患患者2名(LPLタンパク質に対する自己抗体が産生されている)のN-LPL40は、それぞれ5と7 ng/mLであり、LPL欠損ホモ接合体群の範囲内であった。これらの結果は、本測定系ではLPL酵素の強度の合成異常者およびLPLに対する自己抗体を産生している自己免疫疾患等の検出が可能であることを示している。

#### <引用文献>

- [1] Ikeda Y, Takagi A and Yamamoto A. Purification and characterization of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase from human postheparin plasma: production of monospecific antibody to the individual lipase. *Biochim Biophys Acta* 1003:254-269 (1989).
- [2] Ikeda Y, Takagi A, Ohkaru Y, Nogi K, Iwanaga T, Kurooka S and Yamamoto A. A sandwich-enzyme immunoassay for the quantification of lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in human postheparin plasma using monoclonal antibodies to the corresponding enzymes. *J Lipid Res* 31:1911-1924 (1990).
- [3] Takagi A, Ikeda Y, Tsutsumi Z, Shoji T and Yamamoto A. Molecular studies on primary lipoprotein lipase (LPL) deficiency: one base deletion (G916) in exon 5 of LPL gene causes no detectable LPL protein due to the absence of LPL mRNA transcript. *J Clin Invest* 89:581-591 (1992).
- [4] Takagi A, Ikeda Y, Mori A, Tsutsumi Z, Oida K, Nakai T and Yamamoto A. A newly identified heterozygous lipoprotein lipase gene mutation (Cys239→Stop/TGC972→TGA; LPLobama) in a patient with primary type IV hyperlipoproteinemia. *J Lipid Res* 35:2008-2018 (1994).
- [5] Suga S, Tamasawa N, Kinpara I, Murakami H, Kasai N, Onuma T, Ikeda Y, Takagi A and Suda T. Identification of homozygous lipoprotein lipase gene mutation in a woman with recurrent aggravation of hypertriglyceridaemia induced by pregnancy. *J Intern Med* 243:317-321 (1998).
- [6] Takagi A, Ikeda Y, Tachi K, Shinozuka T and Yamamoto A. Identification of compound heterozygous mutations (G188E/W382X) of lipoprotein lipase gene in a Japanese infant with hyperchylomicronemia: the G188E mutation was newly identified in Japanese. *Clinica Chimica Acta*, 285:143-154 (1999).
- [7] Takagi A, Ikeda Y, Takeda E and Yamamoto A. A newly identified lipoprotein lipase (LPL) gene mutation (F270L) in a Japanese patient with familial LPL deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1502:433-446 (2000).
- [8] Ikeda Y, Goji K. and Takagi A. A compound heterozygote for a novel missense mutation (G105R) in exon 3 and a missense mutation (D204E) in exon 5 of the lipoprotein lipase gene in a Japanese infant with hyperchylomicronaemia. *Clin Sci (Lond)* 99:569-578 (2000).
- [9] Ikeda Y, Takagi A, Nakata Y, Sera Y, Hyoudou S, Hamamoto K, Nishi Y and Yamamoto A. Novel compound heterozygous mutations for lipoprotein lipase deficiency. A G-to-T transversion at the first position of exon 5 causing G154V missense mutation and a 5' splice site mutation of intron 8. *J Lipid Res* 42:1072-1081 (2001).
- [10] Ikeda Y, Takagi A, Nakata Y, Sera Y, Hyoudou S, Hamamoto K, Nishi Y and Yamamoto A. A family-based study of hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia in heterozygous lipoprotein lipase deficiency. *Clin Chim Acta* 316:179-185 (2002).
- [11] 池田 康行、高木 敦子. 動脈硬化性疾患の検出用バイオマーカーおよび動脈硬化性疾患の検査方法 特許第5581493号 登録日 2015年7月25日.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	池田 康行  (Ikeda Yasuyuki)	大阪大学・生物工学国際交流センター・招へい研究員  (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