

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590560

研究課題名（和文）脂質代謝を制御する酵素活性の新たな測定法の開発とその臨床応用

研究課題名（英文）Novel method of measuring activities of enzymes involved in lipid metabolism

研究代表者

小林 淳二（KOBAYASHI JUNJI）

金沢大学・医学系研究科・特任教授

研究者番号：60302577

研究成果の概要（和文）：

脂質代謝を制御する酵素である LPL と HTGL の活性を測定する簡便な系を確立し、その臨床意義を検討した。LPL 活性は TG、RLP-TG、sdLDL と逆相関、HDL-C と正相関したが、ANGPTL3 と相関なし。一方、HTGL 活性は TG、RLP-TG、sdLDL と相関せず、HDL-C、ANGPTL3 と逆相関した。ANGPTL3 による HTGL 活性抑制は見られなかった。以上から、ANGPTL3 と HTGL 両者の上流にそれらの制御にかかわる因子が存在し、それぞれを逆方向に制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have established a simple and reliable system for measuring LPL and HTGL activities in post-heparin plasma and investigated clinical significance of measuring those activities. LPL activities showed inverse relations with TG, RLP-TG and sdLDL and positive relations with HDL-C but had no relation with ANGPTL3. HTGL activities showed no relation with TG, RLP-TG and sdLDL but had inverse relations with HDL-C and ANGPTL3. In vitro experiment showed that ANGPTL3 did not inhibit HTGL activities at all, suggesting unidentified molecule may regulate ANGPTL3 and HTGL each other in opposite directions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：LPL, HTGL, ANGPTL3

## 1. 研究開始当初の背景

リポ蛋白リパーゼ(LPL)と肝性リパーゼ(HTGL)は脂質代謝に必須な酵素である。両者は共通の遺伝子ファミリーに属し構造的

に極めて類似する(Wong H, 2002)。LPL は脂肪細胞や骨格筋などで合成され、血管内皮細胞表面に局在し、カイロミクロンや超低比重リポ蛋白(VLDL)中のトリグリセリド(TG)を加水分解することより、この酵素の低下はそ

これらのリポ蛋白を増加させ、高TG血症を呈する。また、その欠損症は急性膵炎の発症と深く関わる(Brunzell 2001)。LPLはインスリンによって制御され、インスリン抵抗性はこその発現を低下させる(Kobayashi J 2001)。LPL酵素活性測定には、アイソトープをラベルした基質を用いた測定が従来行われていたが、煩雑な方法であり、専門機関の実験室に限定されていた。しかし、LPL活性測定はLPL欠損症の診断のみならず、インスリン抵抗性、メタボリックシンドロームなどの病態の把握に必須である。一方、HTGLはこれらの病態や2型糖尿病で増加することが知られ、その機能は中間比重リポタンパク(IDL)やカイロミクロンレムナント中のTGを分解することである。しかし、その臨床的意義は不明な面が多い。

## 2. 研究の目的

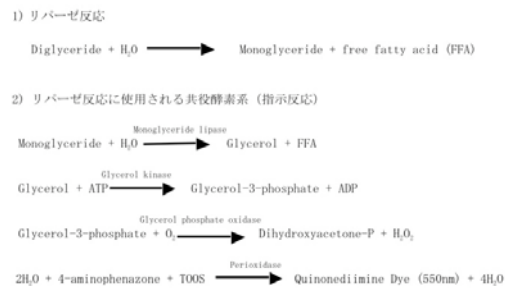
LPL、HTGLの簡便な活性測定法を確立するとともにその臨床的有用性を明らかにする。更に、研究当初の背景に加え、近年、Angiopoietin-like protein 3 (ANGPTL3)がLPLやHTGLの制御と密接に関係することが動物モデルの成績を中心に解明されてきた。ANGPTL3過剰発現マウスは著明な高トリグリセリド(TG)血症をきたす(Koishi R 2002)。一方、in vitroでANGPTL3はLPL活性を阻害する(Shimizukawa 2002)。しかし、ヒトでは、血清ANGPTL3濃度はTGとの相関は弱くHDL-Cと正相関する(Moon HD 2008)。これらから、本研究目的の一つとして、肥満患者を対象として、ANGPTL3濃度とLPL、HTGL酵素活性との関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

予め作成した反応液R-1 160  $\mu$  lに測定用の血漿サンプル3  $\mu$  lを添加し5分間インキュベーションし、反応液R-2 80  $\mu$  lを添加し、発色した溶液を吸光度計546nmで測定する。反応液R-1は50mM Tris-HCl (pH9.5), 0.5mM dioleoylglycerol, 0.4% polypxyethylene-nonylphenylether, 3mM ATP, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5mM CaCl<sub>2</sub>, monoacylglycerol specific lipase (0.75U/ml), glycerolkinase (0.75U/ml), glycerol-3-phosphate oxidase (37.5U/ml), 0.075% N,N-Bis-(4-sulfobutyl)-3-methylaniline-2Na, peroxidase (10U/ml), ascorbic acid oxidase (10U/ml)を包含、反応液R-2は 50mM Tris-HCl (pH9.5), 0.15% 4-aminoantypirineを包含する。測定は自動測定器を用いて行った。その一連の流

れを図1に示す。

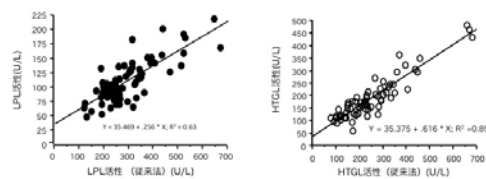
図1 リパーゼ反応



## 4. 研究成果

今回、我々の開発した、LPL活性、HTGL活性測定法は簡便、短時間で施行可能である。また、従来法と異なり、アイソトープを使用しないため、特殊な測定室を必要としない利点がある。図2に測定したそれらの活性と従来法で測定した活性との相関を示す。

図2 LPL活性、HTGL活性と従来法との相関



特に HTGL 活性測定系においてその相関性は良好であった。この測定系を用いて肥満者を対象として、脂質、リポ蛋白と、LPL 活性、HTGL 活性との相関を検討した(表1, 図3)。更に、上述したごとく、ANGPTL3 量との相関性も検討した。TG は RLP-C, RLP-TG, sdLDL-C と正相関し、HDL-C や LPL 活性と逆相関した。このことは LPL が TG を含有するリポ蛋白を分解し、HDL-C の形成に一部関与することを

表1A 脂質、リポ蛋白、酵素活性とANGPTL3との相関行列 (空腹時)

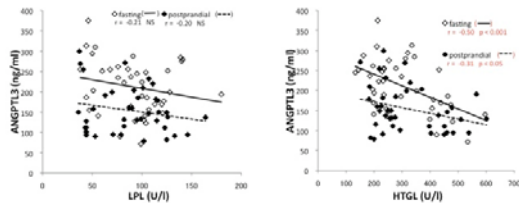
	TG	RLP-C	RLP-TG	sdLDL-C	HDL-C	LPL	HL
TG	-						
RLP-C	0.714***	-					
RLP-TG	0.871***	0.928***	-				
sdLDL-C	0.553***	0.252	0.381**	-			
HDL-C	-0.358*	-0.195	-0.207	-0.374**	-		
LPL	-0.625***	-0.415**	-0.469**	-0.433**	0.372**	-	
HTGL	-0.036	-0.039	0.060	-0.073	-0.492***	0.178	-
ANGPTL3	0.167	0.196	0.169	-0.194	0.355***	-0.209	-0.498***

表1B 脂質、リポ蛋白、酵素活性とANGPTL3との相関行列 (食後)

	TG	RLP-C	RLP-TG	sdLDL-C	HDL-C	LPL	HL
TG	-						
RLP-C	0.862***	-					
RLP-TG	0.948***	0.854***	-				
sdLDL-C	0.383**	0.325*	0.270*	-			
HDL-C	-0.409**	-0.302*	-0.409**	-0.281*	-		
LPL	-0.675***	-0.576***	-0.678***	-0.351*	0.452**	-	
HTGL	0.184	0.099	0.328*	-0.163	-0.504***	-0.115	-
ANGPTL3	0.083	0.276*	0.025	-0.076	0.227	-0.204	-0.305*

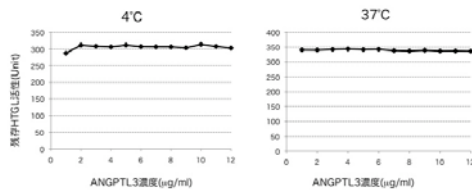
考えると妥当な結果である。

図3 ANGPTL3とLPL、HTGL活性の相関



また、催動脈硬化性の強い sdLDL が高 TG 血症において増加することにも一致する成績である。また、空腹時、食後とも ANGPTL3 は、HTGL と逆相関したが LPL とは相関しなかった。更に、ANGPTL3 は HDL-C と相関(あるいはその傾向)を示したが TG とは相関しなかった。以上から、人の場合は、マウスの場合と異なり、ANGPTL3 が、LPL ではなく HTGL を抑制する可能性を考えて in vitro での実験を行った。HTGL を含有するヘパリン静注後血漿を ANGPTL3 と 4 度、37 度で 2 時間インキュベーションした後に、血漿中に残存する HTGL 活性を測定した(図 4)。

図4 HTGL活性に及ぼすANGPTL3添加効果



その結果、今回の検討では、ANGPTL3 濃度 0 ~ 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度範囲では、4 度、37 度で incubation し、HTGL 活性の抑制度を検討したいずれの場合も明らかな抑制効果がみられなかった。このことから、上述の臨床データで観察された ANGPTL3 と HTGL 活性の逆相関は、前者が後者を抑制ということよりもむしろ、両者の上流にそれらの制御にかかわる因子が存在し、それぞれを逆方向に制御する現象を観察している可能性もある。

今後はその制御因子の解明に期待したい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 18 件)

- ① Kawashiri, M., Kobayashi, J., (他 9 名) Impact of bezafibrate and atorvastatin on lipoprotein subclass in patients with type III hyperlipoproteinemia: Result from a crossover study. Clin Chim Acta in press, 査読有
- ② Noguchi, T., Kobayashi, J., (他 12 名) Comparison of effects of bezafibrate and fenofibrate on circulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 and adipocytokine levels in dyslipidemic subjects with impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus: Results from a crossover study. Atherosclerosis. in press, 査読有
- ③ 小林淳二, 野口 徹, 野原 淳, 馬淵 宏, 原発性脂質異常症の分子病態, Annual Review 糖尿病 代謝 内分泌 (2011), 127-133, 査読無
- ④ 小林淳二, メタボリックシンドロームの薬物療法 スタチン系薬, 日本臨床 69 巻 (2011), 609- 613, 査読無
- ⑤ Nakajima, K., Kobayashi, J., (他 7 名), Association of angiopoietin-like protein3 (ANGPTL3) with HTGL and LPL activities in human plasma. Ann Clin Biochem, 47 (2010), 423-431, 査読有
- ⑥ 稲津明広, 小林淳二, 高 HDL コレステロール血症へどのように対応するか, Medical Practice 27 巻(2010), 478-481, 査読無
- ⑦ Oka, R., (他 14 名 16 番目), Kobayashi, J., Yamagishi, M. Impacts of visceral adipose tissue and subcutaneous adipose tissue on metabolic risk factors in middle-aged Japanese. Obesity (Silver Spring), 18 (2010), 153-160, 査読有
- ⑧ Oka, R., Kobayashi, J., (他 12 名), Difference between Fasting and Nonfasting Triglyceridemia; the Influence of Waist Circumference. J Atheroscler Thromb, 16(2009), 633-640, 査読有
- ⑨ Katsuda, S., (他 7 名 10 番目) Kobayashi, J., Michishita, I., Mabuchi, H., Yamagishi, M. Apolipoprotein B gene mutations and fatty liver in Japanese hypobetalipoproteinemia. Clin Chim Acta, 399 (2009), 64-68, 査読有
- ⑩ Tada, H., (他 7 名 9 番目) Kobayashi, J., Yachie, A., Mabuchi, H., Yamagishi, M. A Novel Method for Determining Functional LDL Receptor Activity in Familial Hypercholesterolemia: Application of the CD3/CD28 Assay in Lymphocytes. Clin Chim Acta, 400 (2009), 42-47, 査読有
- ⑪ Oka, R., (他 13 名 15 番目) Kobayashi, J. Comparison of waist circumference with body mass index for predicting abdominal adipose tissue. Diabetes Res

- Clin Pract, 83 (2009),100-105, 査読有
- ⑫ Nohara, A., Kobayashi, J., Mabuchi, H., Retinoid X receptor heterodimer variants and cardiovascular risk factors. J Atheroscler Thromb, 16 (2009),303-318, 査読有
  - ⑬ 小林淳二, インスリン抵抗性のマーカー—The LIPID 21; 27-31, 2010, 査読無
  - ⑭ Miyazaki, O., (他9名 11番目) Kobayashi, J., Formation of pre $\beta$ 1-HDL during lipolysis of triglyceride-rich lipoprotein. Biochem Biophys Res Commun, 379 (2009), 55-59, 査読有
  - ⑮ Kobayashi, J., Imamura, S., Sakasegawa, S., Nakajima, K., Mabuchi H., Development of Assay Methods for Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase (Activity, Mass and Activity). The Fats of Life. XXIII, (2009); 18-21, 査読無
  - ⑯ 小林淳二, 今村茂行, 酒瀬川信一, 野口徹, 野原 淳, 馬渕 宏, 肝性リパーゼ脂質検査アップデート, Medical Technology 37 巻(2009),149-153, 査読無
  - ⑰ Oka, R., (他9名 11番目) Kobayashi, J. Postprandial triglyceridemia in men with impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance and diabetes. Diabet Med, 25 (2008),1008-1010, 査読有
  - ⑱ Imamura, S., Kobayashi, J., (他9名) A novel method for measuring human lipoprotein lipase and hepatic lipase activities in post-heparin plasma. J Lipid Res, 49 (2008),1431-1437, 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 小林淳二, 中嶋克行, 野原 淳, 馬渕 宏, Angiotensin-like protein3 とリポ蛋白リパーゼ活性、肝性リパーゼ活性との相関性  
第31回日本肥満学会総会, 2010年10月1日, 前橋テルサ(群馬県)
- ② Kobayashi, J., Oka, R., Nohara, A., et al., Effect of Licorice flavonoid oil on plasma lipids in subjects with abdominal obesity.  
第42回日本動脈硬化学会総会, 2010年7月15日, 長良川国際会議場(岐阜県)
- ③ Nakajima, K., Kobayashi, J., Mabuchi, H., Association of ANGPTL3 with elevated HDL-C and decreased HTGL activity. The 6th International Atherosclerosis Society Sponsored Workshop on High Density Lipoproteins, 2010.5.17, Whistler Canada(Canada)

- ④ 小林淳二, 今村茂行, 大家理恵, 野原 淳, 川尻剛照, 馬渕宏, 脂質異常者における肝性リパーゼと血清脂質との関係  
第30回日本肥満学会総会, 2009年10月9日, アクトシティ浜松(静岡県)
- ⑤ 小林淳二, 大家理恵, 食後脂質異常と動脈硬化性疾患, 第41回日本動脈硬化学会総会, 2009年7月18日, 海峡メッセ下関(山口県)
- ⑥ Kobayashi, J., Miyazaki, O., Fukamachi, I., et al, Formation of pre  $\beta$ 1-HDL during lipolysis of triglyceride-rich lipoprotein, XV international symposium on Atherosclerosis, 2009.6.15, John B. Hynes Veterans Memorial Convention Center (USA)
- ⑦ 小林淳二, 今村茂行, 中嶋克行(他6名), 新たなリポ蛋白リパーゼ(LPL)活性、肝性リパーゼ(HL)活性測定法の確立,  
第40回日本動脈硬化学会総会, 2008年7月10日, つくば国際会議場(茨城県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林淳二 (KOBAYASHI JUNJI)  
金沢大学・医学系研究科・特任教授  
研究者番号: 60302577

### (2) 研究分担者

野原 淳 (NOHARA ATSUSHI)  
金沢大学・医学系研究科・特任助教  
研究者番号: 50313648