

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590611

研究課題名（和文） 冠動脈疾患のNear-Term-Riskを予見可能な血清バイオマーカーの開発

研究課題名（英文） Development of the serum biomarkers to predict the near-term-risk for cardiovascular disease

研究代表者

戸塚 実 (TOZUKA MINORU)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究科・教授

研究者番号：60431954

研究成果の概要（和文）：心血管疾患発症のリスクを予見可能な血清バイオマーカー候補として、体内において切断や修飾を受けたアポリポ蛋白A I、すなわち本研究ではC末端切断アポA I、N-ホモシステイン化アポA I、およびアポA I-アポA II複合体に注目し、それらが健常人血清中に存在することを証明した。また、それらの測定法を開発し、一部については心筋梗塞患者と健常者の比較において、血清バイオマーカーとして有用である可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We pay attention to truncated and/or modified apolipoprotein AI (apoAI), such as C-terminally truncated apoAI, N-homocysteinylation apoAI, and apoAI-apoAII heterodimer, as the potential candidates of predictive biomarker for cardiovascular disease. We identified those truncated and modified apoAI in normal human serum and developed the quantitative methods for those candidates. In the preliminary experiment, the possibility that apoAI-apoAII heterodimer would be a useful biomarker for acute myocardial infarction was indicated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：臨床化学

1. 研究開始当初の背景

冠動脈疾患による高い死亡率は先進諸国に共通した事象である。血清コレステロールや血圧などの危険因子を標的とした取り組みは、心筋梗塞による死亡数を3分の2程度に減少させたが、その効果は十分とはいえない。それは、これらの危険因子が集団において有意な危険因子であること、危険性の高い時期を特定するものではないことに起因し

ている。現在、電子ビームCT (EBCT) による冠動脈石灰化定量、血管超音波検査 (IVUS) などが粥状硬化症による冠動脈疾患発症のリスクを評価するために有用とされているが、これらの検査は侵襲性が大きいこと、高い技術が必要とすること、汎用性に乏しいこと、およびランニングコストが高いことを考慮するとスクリーニング等に使用することには限界がある。したがって、個人のリスク

をよりリアルタイムに反映する簡易に測定可能な血清バイオマーカーの開発が望まれる。一方、粥状硬化症に脂質代謝が関与していることは明白であるが、粥状硬化症は炎症性疾患であり、酸化ストレス性疾患でもあるという多因性から考えて、1種類のバイオマーカーがそのリスクを完全に反映することには自ずと限界があると考えられる。また、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、ホモシステイン、酸化物といった比較的大きな括りの検査は、その存在様式から考えてリアルタイム (near-term) バイオマーカーとしての可能性は小さいと思われる。したがって、HDL あるいはそのサブフラクションが修飾や変性を受けた微小分画にターゲットを絞って、より高感度のリスクバイオマーカー開発を考える必要がある。

2. 研究の目的

粥状硬化は脂質異常による疾患であると同時に、炎症性疾患、酸化ストレス性疾患であることが広く知られている。HDL は reverse cholesterol transport 作用によって抗動脈硬化的に働くことが知られているほか、抗炎症、抗酸化の面でも重要な役割を果たしている。しかし、それらの機能には高度な分子機構が関与しており、全 HDL-コレステロールの高低だけで診断できるようなものではない。

当研究室では、粥状硬化層で起こりえる HDL の変性等が病巣の進展をリアルタイムに反映するとともに、HDL の reverse cholesterol transport 作用や抗炎症作用、抗酸化作用の低下をきたす可能性に着目し、apoAI の C 末端 18 アミノ酸残基が truncate された apoAI フラグメント (truncated apoAI)、あるいは apoAI のリシン残基がホモシステイン化された N-ホモシステイン化 apoAI、及び myeloperoxidase の作用によって形成される apoAI-apoAII heterodimer に着目し、粥状硬化層を評価できるバイオマーカーとしての可能性を明らかにすることを目的とした。また、様々な修飾あるいは変性を受けた HDL 微小分画の定量を行なうことで、単に脂質代謝だけでなく、炎症あるいは酸化ストレスといった粥状硬化の多因性を考慮した複数項目の測定法を確立し、個人の病態をよりの確に反映し、近々のリスクを予見可能なバイオマーカー群の構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 既に作成済みの truncated apoAI に特異的に反応するモノクローナル抗体 (mAb16-4) を用いてその特性を明らかにし、健常者血清中に truncated apoAI が存在することを証明するとともに、ELISA 法を用いた測定法を開発する。

(2) N-ホモシステイン化 apoAI を検出およ

び定量するための方法を開発し、健常者血清中に N-ホモシステイン化 apoAI が存在することを証明するとともに、その特性を明らかにする。

(3) apoAI-apoAII heterodimer が健常者血清中に同定できることはすでに報告されているが、その特性を明らかにするとともに、定量法を開発する。

(4) これらの開発された測定法を用いて、心筋梗塞患者および健常者間に有意な差が認められるかどうか明らかにする。

4. 研究成果

(1) C-terminally truncated apoAI

① mAb16-4 を結合させたアフィニティーカラムに健常者血清を流し、結合分画をイムノプロット法によって解析したところ、健常者血清中に truncated apoAI が存在することが、確認された (図 1)。ポリクローナル抗 apoAI 抗体と反応したカラムに non-specific に結合した intact apoAI のバンドと specific に結合した truncated apoAI のバンドの発色強度から見て、健常者血清中の truncated apoAI は極めて微量であることが推察された。

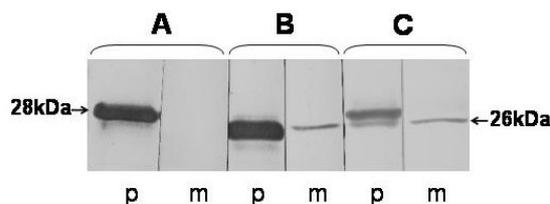


図 1 健常者血清中 truncated apoAI の同定

精製 apoAI (A)、chymase 処理 apoAI (B)、および mAb16-4 結合アフィニティーカラム結合分画 (C) の各試料におけるポリクローナル抗 apoAI 抗体 (p) および mAb16-4 モノクローナル抗体 (m) を用いたイムノプロット像を示す。

② mAb16-4 作成時に用いたペプチドをコーティングした競合 ELISA 法によって truncated apoAI の測定を試みた (図 2)。試料として同ペプチドの希釈系列を用いた場合は予想どおりきれいな競合曲線が得られた。また、chymase 処理した apoAI では競合曲線が得られるが、未処理 apoAI では競合しないことが確認された。しかし、健常者血清中の truncated apoAI を測定できる感度は得られなかった。これは、前述のように血清中 truncated apoAI が極めて微量であることが考えられた。これを裏付ける知見として、apoAI の chymase 処理によって得られる truncated apoAI (C 末端の 18 アミノ酸が切断されたもの) はマイナーな分画であり、その他の位置で truncate された apoAI フラグメントのほうが量的に多いことが示された (図 3)。

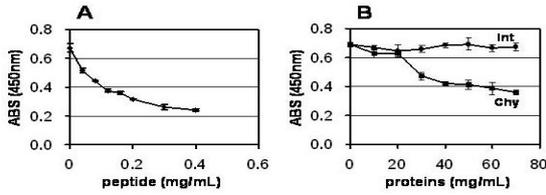


図2 競合 ELISA 法による truncated apoAI の定量 mAb16-4 作成時に用いたペプチドを ELISA プレートにコーティングし、それぞれ同ペプチド (A)、未処理 apoAI (B ; Int) および chymase 処理 apoAI (B ; Cym) の希釈系列を試料として競合 ELISA 測定を行った。

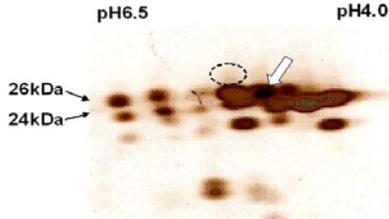


図3 chymase 処理 apoAI の 2 次元電気泳動像 chymase 処理した apoAI を試料とし、1 次元目に等電点電気泳動、2 次元目に SDS-PAGE を実施し、抗 apoAI 抗体で可視化した。白矢印の濃く染色されたスポットは mAb16-4 抗体および抗 apoAI 抗体のいずれとも反応した truncated apoAI を示す。点線で囲った部分は intact apoAI が泳動される位置を示す。

(2) N-ホモシステイン化 apoAI

①N-ホモシステイン化 apoAI の検出・定量法として、システアミン処理後に等電点電気泳動を行う方法を開発した。すなわち、分子中にシステイン残基を含まない apoAI は N-ホモシステイン化によって SH 基を有するため、システアミン処理によって等電点が増加することを利用している (図 4)。HDL のホモシステインチオラクトン処理による N-ホモシステイン化の結果、等電点が増加した多くのバンドが認められ、N-ホモシステイン化 apoAI が本法によって分別定量できることが示唆された (図 5)。

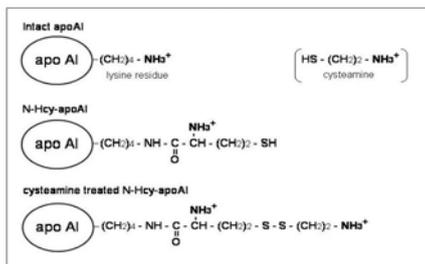
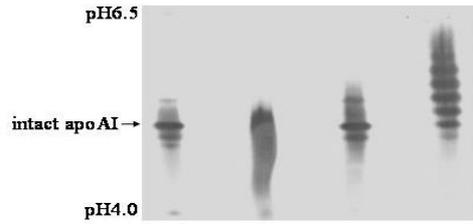


図4 システアミン処理による truncated apoAI 検出の原理

intact apoAI はシステイン残基 (SH 基) を含まないが、SH 基を含む N-ホモシステイン apoAI はシステアミン処理によって NH_3^+ に由来する +チャージが付加されるため、等電点が増加する。



HcyT	-	+	-	+
cysteamine	-	-	+	+

図5 HDL のホモシステインチオラクトン処理による apoAI の等電点電気泳動像の変化 ホモシステインチオラクトン未処理においてもシステアミン処理後に等電点が増加したバンドが確認されるが、ホモシステインチオラクトン処理によってその量および強度が劇的に増加することが確認された。

②健常者血清中に N-ホモシステイン化 apoAI が存在することが、本法を用いて証明された (図 6)。27 名の健常者から得られた血清を用いて N-ホモシステイン化 apoAI の基準範囲 (総 apoAI 中の比率として) を算出したところ、1.0-7.4%であった。

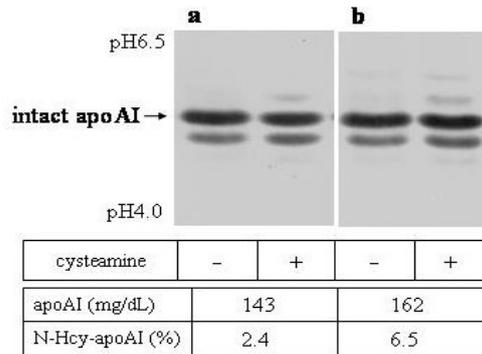


図6 健常者血清中 N-ホモシステイン化 apoAI の同定 2名の健常者 (a, b) より得られた血清中に N-ホモシステイン化 apoAI (システアミン処理によって intact apoAI の上に認められるバンド) が存在することが示された。

(3) apoAI-apoAII heterodimer

①健常者血清中に Tyr-Tyr 結合を介した apoAI-apoAII heterodimer が存在することを確認した (図 7)。また、HDL を myeloperoxidase (MPO) で酸化することによって、その量が増加することが確認された (図 8)。

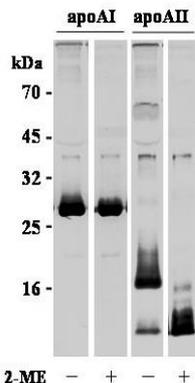


図7 健常者血清中 apoAI-apoAII heterodimer の同定メルカプトエタノールによって還元されない、抗 apoAI 抗体および抗 apoAII 抗体のいずれとも反応するバンド (矢印)、すなわち、apoAI-apoAII heterodimer が認められた。

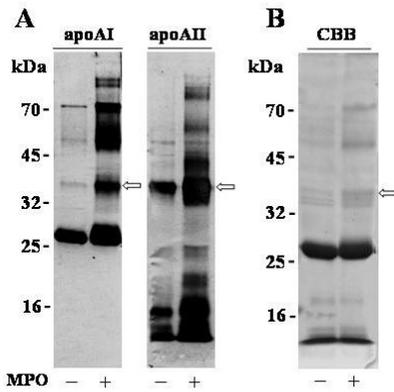


図 8 HDL の MPO 処理による apoAI-apoAII heterodimer の形成
MPO 処理によって、抗 apoAI 抗体および抗 apoAII 抗体を用いたイムノプロット像 (A)、さらには CBB 染色像 (B) のいずれにおいても apoAI-apoAII heterodimer のバンド強度増強が認められた (白矢印)。

②抗 apoAII 抗体を capture 抗体、抗 apoAI 抗体を detect 抗体として用いたサンドイッチ ELISA 法によって、apoAI-apoAII heterodimer が定量可能であり、良好な検量線 (図 9) が得られた。また、連続希釈試料の測定より、本測定法の定量性および正確性が概ね良好であることが確認された (図 10)。同時再現性の CV は 4.8%であった。

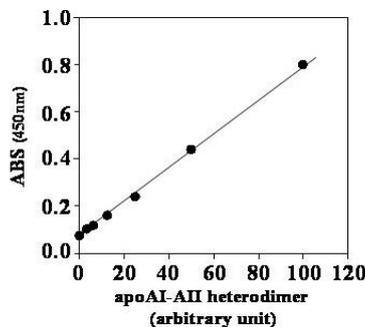


図 9 検量線の代表例

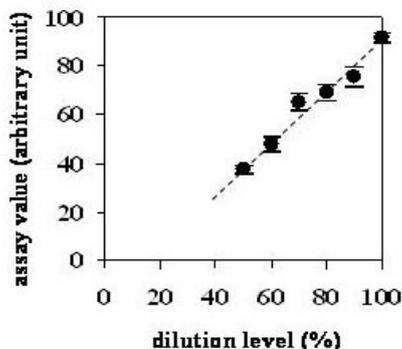


図 10 定量性および正確性の確認
任意濃度 100 unit とした血清を標準試料として作成して検量線を用いて、他の血清をそのまま、および 90%、80%、70%、60%、50% の濃度になるように希釈した試料を測定した。

(4) 心筋梗塞患者血清中 apoAI-apoAII heterodimer の測定

①上記に示した新たに開発した測定法のうち、apoAI-apoAII heterodimer について、健常者および心筋梗塞発症患者血清の濃度を比較した (図 11)。健常者に比べて心筋梗塞発症患者で有意に apoAI-apoAII heterodimer 濃度が高値であった。しかし、72 時間後には正常化が確認された。血清 MPO 活性と apoAI-apoAII heterodimer 濃度に比較的高い相関が認められ ($r=0.624$)、心筋梗塞のマーカーとして有用である可能性が示唆された。MPO は多くの炎症性疾患で上昇することが知られているが、apoAI-apoAII heterodimer が MPO 以上に心筋梗塞発症に特異的のマーカーであるかどうかを解明するには、更なる解析が必要である。

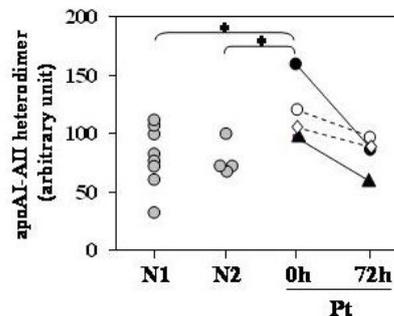


図 11 心筋梗塞発症時の apoAI-apoAII heterodimer 濃度
2つの健常者グループ (N1 and N2; 8例および4例) と心筋梗塞発症患者 (Pt; 4例) の発症時および72時間後の apoAI-apoAII heterodimer 濃度を測定した。
(* $P<0.05$)

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 2 件)

- 1) Ishimine N, Usami Y, Nogi S, Sumida T, Kurihara Y, Matsuda K, Nakamura K, Yamauchi K, Okumura N, Tozuka M. Identification of N-homocysteinylated apolipoprotein AI in normal human serum. *Ann Clin Biochem* 47: 453-459, 2010 査読有
- 2) Usami Y, Matsuda K, Sugano M, Ishimine N, Kurihara Y, Sumida T, Yamauchi K, Tozuka M. Detection of chymase-digested C-terminally truncated apolipoprotein A-I in normal human serum. *J Immunol Methods* 369: 51-58, 2011 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- 1) 宇佐美陽子, 野木世莉那, 隅田 環, 栗原

由利子, 松田和之, 山内一由, 戸塚 実,
血中 Truncated ApoAI の検出. (2009) 第
56 回日本臨床検査医学会学術集会, 57 :
243

- 2) 宇佐美陽子, 隅田 環, 亀田貴寛, 栗原
由利子, 原口 剛, 磯部光章, 戸塚 実.
心筋梗塞患者血漿中の ApoAI-AII
heterodimer の定量, 第 57 回日本臨床検
査医学会学術集会, 2010. 9. 10-12, 東京
- 3) 隅田 環, 宇佐美陽子, 榎本真那実, 亀
田貴寛, 山崎駿介, 石嶺南海, 栗原由利
子, 戸塚 実. 健常人における N-ホモシ
ステイン化 apoAI の定量化の試み, 第 50
回日本臨床化学会年次学術集会,
2010. 9. 23-25, 甲府
- 4) Usami Y, Sumida T, Kurihara Y, Tozuka M.
N-homocysteinylolation of apolipoprotein
AI and its effect on antioxidant ability
of HDL. 2011 AACC Annual Meeting, July
24-28, 2011
- 5) 榎本真那実, 山崎駿介, 亀田貴寛, 宇佐
美陽子, 宮崎あかり, 栗原由利子, 戸塚
実. apoE 含有 HDL の抗酸化能評価と定量
法の構築. 第 51 回日本臨床化学会年次
学術集会, 2011. 8. 26-28, 札幌
- 6) 山崎駿介, 亀田貴寛, 榎本真那実, 宇佐
美陽子, 宮崎あかり, 栗原由利子, 戸塚
実.
N-ホモシステイン化の標的となる
apolipoprotein AI 分子中リジン残基の
同定. 第 51 回日本臨床化学会年次学術集
会, 2011. 8. 26-28, 札幌
- 7) 亀田貴寛, 宇佐美陽子, 榎本真那実, 山
崎駿介, 宮崎あかり, 栗原由利子, 戸塚
実. HDL の抗酸化能に及ぼす
Myeloperoxidase の影響. 第 58 回日本臨
床検査医学会学術集会, 2011. 11. 17-20,
岡山

[図書] (計 1 件)

- 1) 戸塚 実, N-ホモシステイン化アポリポ
蛋白 A-I の測定とその臨床的意義. 検査
と技術, 39:559-560, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸塚 実 (TOZUKA MINORU)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究
科・教授

研究者番号 : 60431954

(2) 研究協力者

本田孝行 (HONDA TAKAYUKI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号 : 80238815

磯部光章 (ISOBE MITSUAKI)

東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教
授

研究者番号 : 80176263

栗原 由利子 (KURIHARA YURIKO)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究
科・助教

研究者番号 : 70291341