

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 6 月 15 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009～2011

課題番号：21590644

研究課題名（和文）アポ E-rich HDL-C 測定法の開発と臨床応用に関する研究

研究課題名（英文）Development and clinical applications of a method for measuring apoE-rich HDL-C

研究代表者 杉内 博幸 (SUGIUCHI HIROYUKI)
熊本保健科学大学 医学検査学科 教授

研究者番号：70435163

研究成果の概要（和文）：コレステリルエステル転送蛋白（CETP）阻害剤は、アポリポ蛋白（アポ）E を多く含み粒子サイズの大きいアポ E-rich HDL を上昇させることが知られているが、本 HDL の測定法やコレステロール引き抜き能などの抗動脈硬化能については報告されていない。本研究で、我々は、CETP 阻害剤と同様にアポ E-rich HDL が上昇する CETP 欠損や胆汁うっ滞患者血清を用いて、本 HDL の抗動脈硬化能を明らかにし、さらに、アポ E-rich HDL に反応特異性の高いポリアルキレングリコール誘導体の界面活性剤を用いて、アポ E-rich HDL を含む総 HDL のコレステロール測定法を開発した。

研究成果の概要（英文）：Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitors increase the concentration of HDL having large particle size and an abundance of apolipoprotein (apo) E, which is known as “apoE-rich HDL”. However, there have been no published studies to date on techniques for measuring apoE-rich HDL and anti-atherogenic functions such as the ability removing cholesterol. In this study, we demonstrated the anti-atherogenic action of apoE-rich HDL using serum samples from patients with CETP deficiency or cholestasis associated with elevated levels of this type of lipoprotein like CETP inhibitors. Furthermore, we developed a method for measuring total HDL cholesterol (HDL-C) including apoE-rich HDL using a nonionic surfactant, a polyalkylene glycol, with high specificity for this HDL.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010 年度	400,000	120,000	520,000
2011 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

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：脂質、HDL、アポリポ蛋白 E、アポ E-rich HDL、コレステロール

1. 研究開始当初の背景

高脂血症治療薬であるスタチン系薬剤の特許切れに伴い、それに代わる動脈硬化治療薬として、最近、コレステリルエステル転送蛋白 (CETP) 阻害剤が開発され、欧米で臨床治験が進んでいる。スタチンは動脈硬化の原因となる LDL を主に低下させるが、CETP 阻害剤は抗動脈硬化作用のある HDL を上昇させる。本薬を継続的に服用すると、アポリポ蛋白 (アポ) E が豊富で粒子サイズが通常の HDL より大きなアポ E-rich HDL が増加する。ところが、現在の HDL コレステロール (HDL-C) 測定法は、アポ E-rich HDL コレステロール (アポ E-rich HDL-C) を完全には測り込まないので薬の効果判定ができないことが問題となっている。本 HDL-C は、健常人血清に含まれる量が微量 (約 5%) であるため、臨床的には重要視されなかったが、本薬の登場により測定法の見直し論が浮上している。また、本 HDL のコレステロール引き抜き能などの抗動脈硬化能についても確認されていないため、測定の意義が曖昧である。従来、アポ E-rich HDL-C を測定する方法としては、沈殿法である 13%ポリエチレングリコール (PEG) 法とデキストラン硫酸リンタングステン酸マグネシウム (DS-PT-Mg) 法との差から求める方法がある。13%PEG 法では、上清にアポ E-rich HDL を含む全ての HDL が回収され、DS-PT-Mg 法ではアポ E-rich HDL は沈殿し、上清には回収されないことを利用した方法であるが、遠心操作など煩雑であるため、前処理なしに自動分析装置で直接測定できる簡易法の開発が求められている。

2. 研究の目的

多くの製薬会社が同様の阻害剤の治験を予定しており、CETP 阻害剤が市場化される可能性が高まっている。このため、本研究では、現在の HDL-C 測定法のアポ E-rich HDL-C に対する反応特異性を検討した上で、(1) CETP 阻害剤が市場化される前にアポ E-rich HDL-C を含む総 HDL-C 直接法を確立する、(2) アポ E-rich HDL の細胞からのコレステロール引き抜き能を調べる、を主目的とする。

3. 研究の方法

(1) 材料

CETP 阻害剤の服用でアポ E-rich HDL が上昇した検体入手するのは困難なため、本研究では、同様のアポ E-rich HDL が増加する CETP 欠損 1 例および胆汁うっ滞患者血清 45 例を用いた。検体は、熊本大学医学部附属病院 中央検査部に検査依頼があった患者血清で、高 HDL-C (80 mg/dl 以上) を示した症例のうち、アポ E の増加した血清を用いた。また、対照として、健常人ポランティア血清を

用いた。尚、検体中のアポ E-rich HDL は、エパライザ 2 (株式会社ヘレナ研究所) を用いてアガロースゲル電気泳動を行い、スロー α の位置のブロードなバンドの有無で同定した。本研究では、これらの検体のうち、アポ E-rich HDL の分離には、血清量が多い検体を抽出し、CETP 欠損 1 例、胆汁うっ滞患者血清 3 例を用いた。尚、本研究は、熊本大学倫理審査委員会にて承認 (倫理第 400 号) を得て行った。

(2) HDL-C 測定試薬

- ① HDL-C 直接法：デタミナー-L HDL-C (協和メデックス)、コレステスト N HDL (積水メディカル)、HDL-EX (デンカ生研)、L タイプワコー HDL-C・M (和光純薬)、HDL-C 試薬・KL「コクサイ」(シスメックス)、HDL-L (セロテック) を用いた。測定機器は、日立 7170 形自動分析装置を用い、試薬メーカーのパラメータに従って測定した。
- ② 沈殿法：13%PEG 法 (自家製)、DS-PT-Mg 法 (積水メディカル)、ヘパリンマンガン (Hep-Mn) 法 (自家製)、デキストラン硫酸マグネシウム (DS-Mg) 法 (自家製)。
- ③ その他の試薬：アポ A-I、A-II、B、C-II、C-III、E は免疫比濁法 (積水メディカル)、総コレステロール (TC)、トリグリセライド (TG)、遊離コレステロール (FC)、リン脂質 (PL) は酵素法 (協和メデックス) を用いた。

(3) アポ E-rich HDL の分離

患者血清から超遠心法 (Hatch & Lees 法) にて HDL 画分 (比重 1.063~1.210) を分離し、その 0.5 ml をヘパリンカラム装着の蛋白質精製システム AKTA prime (GE Healthcare Bioscience, Japan) に注入し、10 mM リン酸緩衝液とリン酸緩衝液に 2M NaCl を添加した溶液を用いてグラジエント溶出を行った。ヘパリンカラムをスルーしたサンプルをアポ A-I 優位のアポ E-poor HDL として回収し、塩濃度が上昇するに従いカラムから遊離溶出してきたサンプルをアポ E 優位のアポ E-rich HDL として回収し、30 K フィルターチューブ (Millipore, Tokyo, Japan) を用いて室温で 2,000 g、30 分遠心し、限外濾過 (Fuji Film, Tokyo, Japan) を行った。これらの HDL 分離の正確性は、ゲル濾過カラム superose 6 HR 10/300 (GE Healthcare Bioscience, Japan) を 2 本装着しポストカラム法による HPLC 脂質分析システム (Waters, MA, USA)、および抗アポ A-I 抗体、抗アポ E 抗体を用いたウェスタンブロッティング法を用いて確認した。

(4) 基準法の確立

新しい HDL-C 直接法の開発のためには、基準となる測定法の確立が必要となる。このた

め、各種沈澱法のアポ E-rich HDL の回収量を検討し、基準法としての妥当性を検討した。方法として、超遠心法で血清から分離した HDL 画分に各種沈澱試薬を加え、遠心分離を行い、上清中に存在する HDL 中のアポ A-I、アポ E 濃度を ELISA 法で定量し回収量を求めた。回収量が最も高い沈澱法を選択し、基準法の確立を行った。

(5) 界面活性剤の検討

超遠心分離の HDL、LDL、VLDL、カイロミクロン (CM) の 4 画分、ヘパリンカラムで分離したアポ E-rich HDL 血清を対象として、428 種類の界面活性剤 [陽イオン性 (n=25)、陰イオン性 (n=82)、非イオン性 (n=286)、両性 (n=8)、その他 (n=27)] のアポ E-rich HDL および HDL 選択性を検討した。各種界面活性剤を自家製のコレステロール試薬に終濃度 0.2% になるように添加し、日立 7170 形自動分析装置を用いて、各リポ蛋白画分を測定した。HDL 選択性の高い界面活性剤のスクリーニングには、便宜上、測定試薬の HDL、LDL、VLDL、CM に対する反応の吸光度から計算した HDL 選択指数 (SI HDL) を用いた。SI HDL = (HDL/100) × [(HDL × 3) / (LDL + VLDL + CM)]

(6) 直接法の確立

HDL-C 選択性の高い界面活性剤をコレステロール自家調整試薬に添加し、HDL、LDL、VLDL、CM、アポ E-rich HDL との反応性を確認しながら、界面活性剤および試薬成分の至適条件を決定した。

(7) 細胞からのコレステロール引き抜き能

コレステロール引き抜き作用実験は、マウスマクロファージ様細胞株である J774.1 (American Type Culture; VA, Manassas) を用いて、10% 非動化ウシ胎児血清 (Gibco, Carlsbad, CA) にて培養を行った。J774.1 細胞 (1.5 × 10⁵ 個/ml) を 6 ウェル培養プレートに敷き、1 μg/ml のリポポリサッカライド (LPS) (Sigma-Aldrich Japan) で細胞を活性化させ、Basu らの方法 (Proc Natl Acad Sci. USA 73, 3178-3182, 1976) によってアセチル化した LDL、分離したアポ E-rich HDL の順に添加し 36 時間後、トリプシン処理にて細胞を回収、破碎し、遠心後、上清のコレステロールと蛋白測定を行った。得られたコレステロール値を蛋白値で除した値を細胞内コレステロール濃度とした。

4. 研究成果

(1) HDL-C 測定法の反応特異性

13%PEG 法と DS-PT-Mg 法の差が 20 mg/dl 以上を示し、アガロースゲル電気泳動にてアポ E-rich HDL のバンドが検出された CETP 欠損、胆汁うっ滞患者血清を用いた。これらの検体

の脂質プロファイルを表 1 に示す。

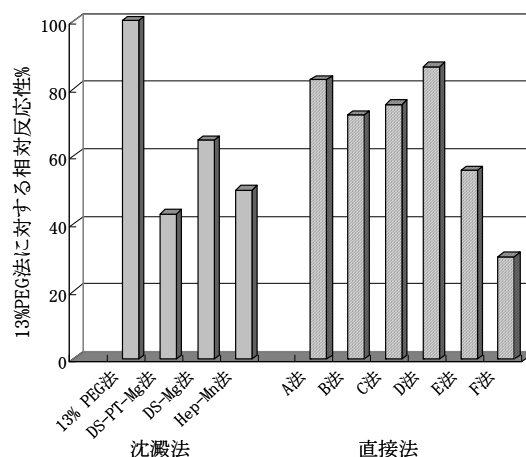
表1 アポE-rich HDL-C増加検体における脂質分布

	TC (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)			LDL-C (mg/dl)	TG (mg/dl)
		13%PEG 法	DS-PT- Mg法	bias (アポE- rich HDL)		
健常人-1	189	101	99	3	78	57
健常人-2	226	90	90	0	123	50
胆汁うっ滞-1	348	171	73	98	130	47
胆汁うっ滞-2	285	65	24	41	202	56
胆汁うっ滞-3	301	192	64	128	91	49
CETP欠損	447	349	240	109	46	572
基準範囲	≤220	40~90			≤140	≤150

	アポ蛋白 (mg/dl)					
	A-I	A-II	B	C-II	C-III	E
健常人-1	156	28	62	2.5	7.1	4.2
健常人-2	157	29	86	3.2	6.2	4.1
胆汁うっ滞-1	150	57	79	16.5	27.4	39.9
胆汁うっ滞-2	161	56	75	8.7	21.6	18.6
胆汁うっ滞-3	148	43	61	9.1	19.1	33.1
CETP欠損	306	51	74	9.2	33.8	17.9
基準範囲	122~161	25~35	69~105	1.6~4.2	5.5~9.5	2.7~4.5

胆汁うっ滞-1, 2: 原発性胆汁性肝硬変、胆汁うっ滞-3: 総胆管癌

これらの検体の HDL-C 濃度を各種の沈澱法と直接法で測定した。その結果、13%PEG 法と比較して 30~87% の測定値を示し、測定法間の差が大きかった (図 1)。また、これらの症例の経過観察から、アポ E-rich HDL-C 濃度の増加に比例して測定法間の乖離が大きくなるという結果が得られた。これらの結果から、現在の HDL-C 測定法は、アポ E-rich HDL-C を完全には測定できないことが確認された。



A法: デタミナーL HDL-C、B法: コレステストN HDL、C法: HDL-EX、D法: LタイプワコーHDL-C・M、E法: HDL-C試薬・KL、F法: HDL-L

図1 HDL-C 測定法の反応特異性

(2) アポ E-rich HDL の分離

ヘパリンカラムで分離したアポ E-rich HDL とアポ E-poor HDL、原血清、超遠心分離 HDL を HPLC にて分析した。その結果、原血清の LDL と HDL₂ の間にアポ E-rich HDL の存在が確認され、ヘパリンカラムで分離したアポ E-rich HDL とピークが重なり、アポ E-poor HDL は HDL₂~HDL₃ のピークと重なった。さらに、これらの検体で、ウェスタンブロッティ

ング法でアポ E およびアポ A-I の存在を確認した。アポ E-poor HDL ではアポ A-I のみ、アポ E-rich HDL ではアポ E のみが検出され、それぞれのリポ蛋白の純度の高い分離が確認された (図 2)。

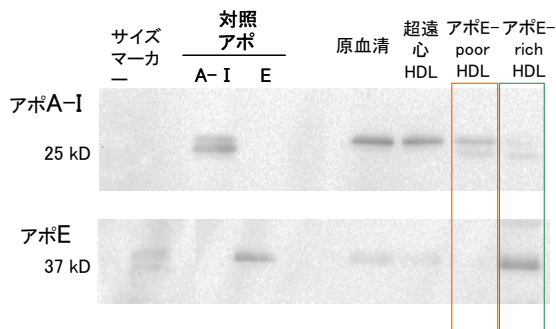


図 2 ウェスタンブロッティング法によるアポ E-rich HDL 分離の確認

(3) 基準法の確立

アポ E-rich HDL-C を含む総 HDL-C 測定のための基準法を確立するために、患者血清に 13%PEG 法、DS-PT-Mg 法、Hep-Mn 法および DS-Mg 法の沈殿試薬を加え遠心分離し、その上清中に存在する HDL の主要アポリポ蛋白質であるアポ A-I、アポ E を 2 ステップサンドイッチ ELISA 法で測定した (図 3)。13% PEG 法におけるアポ E の回収率は 95% で他の沈殿法に比し有意に高く、同法がアポ E-rich HDL-C を最も正しく測定し得るものと考えられた。

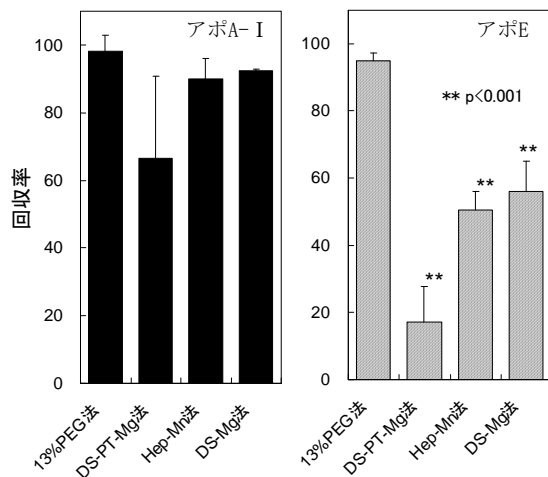


図 3 ELISA 法による沈殿法上清のアポ蛋白 (A-I、E) の回収試験

次の段階として、総 HDL-C 測定の定量性を増すために、PEG の至適濃度を検討した。アポ E-rich HDL-C が検出された患者血清について、様々な濃度の PEG を用いた沈殿法で処理し、各リポ蛋白画分中のコレステロール

濃度を測定した結果、最も純粋に HDL 中のコレステロール濃度を測定し得た PEG 濃度は 15% であった。また、この際に得られた上清のアポ E の回収率を調べたところ、こちらも 15% PEG 沈殿法が最良で、アポ E がほぼ 100% 回収された。このため、15%PEG 法を総 HDL-C 測定のための基準法とした。

(4) 界面活性剤の検討

アニオン系、ノニオン系界面活性剤が HDL-C 選択指数 SI_{HDL} が高値を示した (図 4)。次に、 SI_{HDL} が 20 以上を示した界面活性剤について、コレステロール試薬内の界面活性剤濃度を 0~0.4% に調整し、各リポ蛋白画分との反応性を検討した。その結果、ノニオン系界面活性剤のポリアルキレングリコール誘導体では、濃度の上昇に伴って、CM、VLDL、LDL のコレステロールの反応性が低下したが、HDL 及びアポ E-rich HDL のコレステロールの反応性は低下しなかった (図 5)。このことから、本界面活性剤は、HDL のみを選択的に可溶化し、検体中のアポ E-rich HDL-C を含む総 HDL-C 測定系に使用可能と判断した。

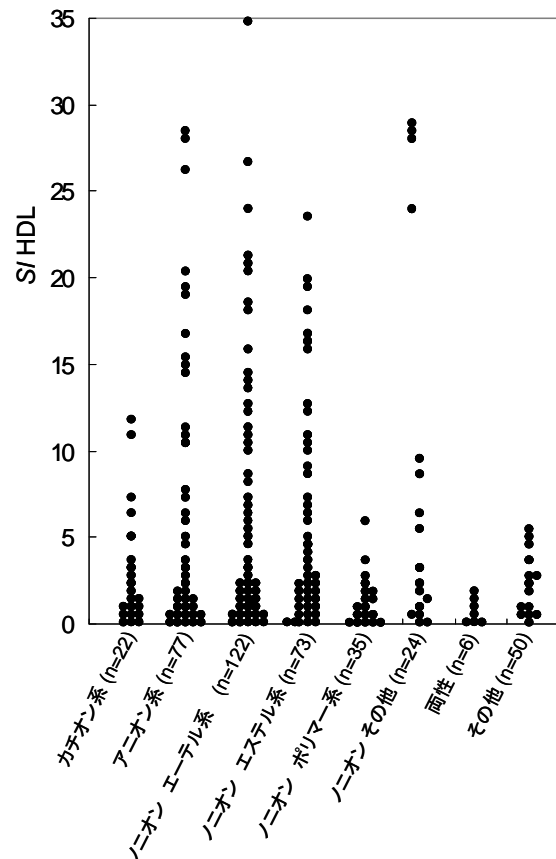


図 4 各種界面活性剤の HDL-C 選択性

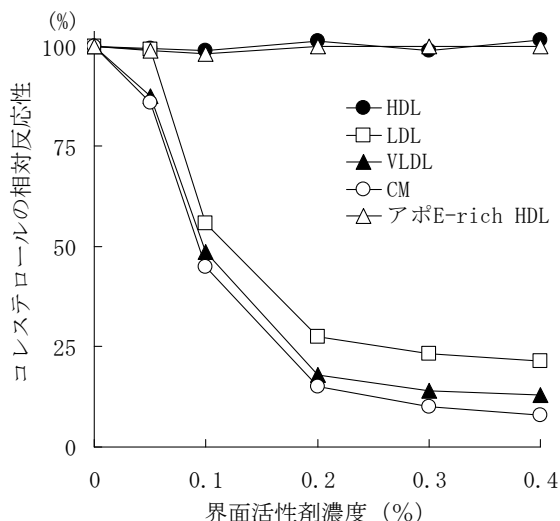


図5 各リポ蛋白画分コレステロールに対する界面活性剤の反応性

(5) 本法と15%PEG法(基準法)との相関

自家調製したコレステロール試薬に、ポリアルキレングリコール誘導体の界面活性剤を終濃度0.4%になるように添加した試薬(本法)を自動分析装置用に調製し、15%PEG法との相関性を検討した。相関の検討には、健常人血清10例および13%PEG法とDS-PT-Mg法との差(アポE-rich HDL-C)が5~20 mg/dlの患者血清20例を用いた。その結果、相関係数 $r=0.835$ 、回帰式 $y=0.735x+10.844$ となった(図6)。現在のところ、300 mg/dl以上の高TC検体、400 mg/dl以上の高TG検体では、非特異反応が認められるため、今後、さらに至適条件の検討を継続していく予定である。

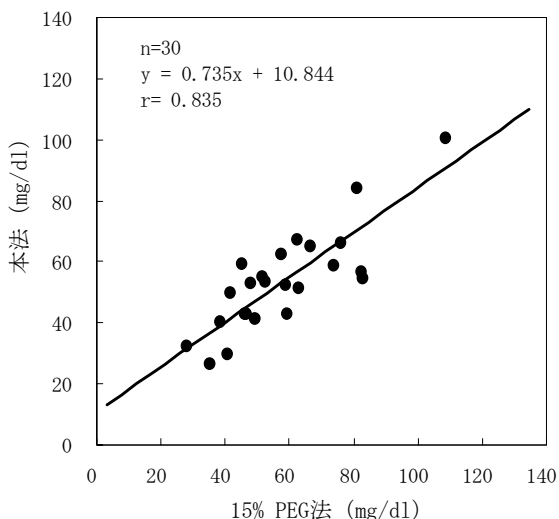
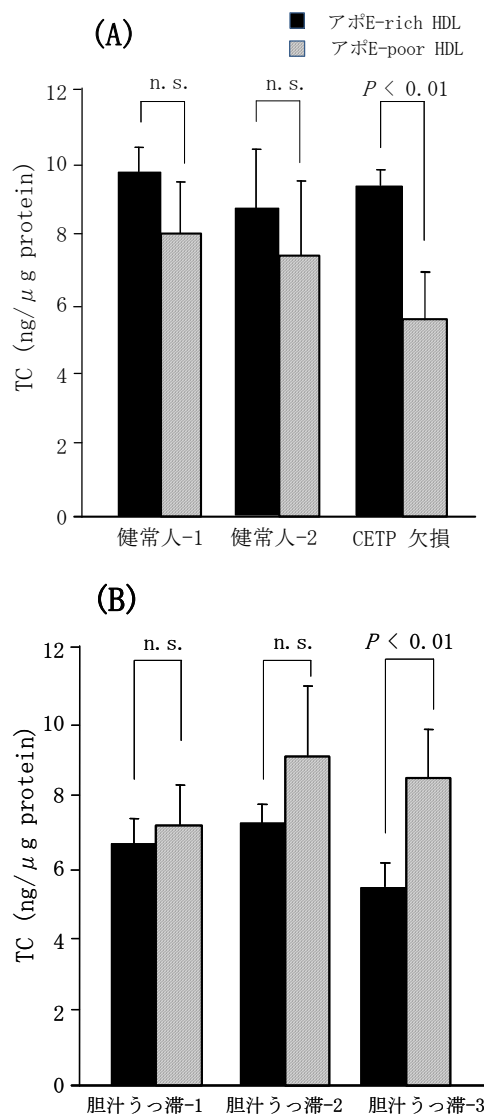


図6 15%PEG法との相関

(6) 細胞からのコレステロール引き抜き能

表1に示す健常人2例、CETP欠損症1例、

胆汁うっ滞3例について、超遠心法でHDL画分を分取し、脱塩処理後、ヘパリンカラムにてアポE-rich HDLとアポE-poor HDLに分離し濃縮を行った。次に、これらのHDLについて、マクロファージからのコレステロール引き抜き能の実験を3回繰り返し行った。図7-Aに示すように、CETP欠損由来のアポE-rich HDLは、アポE-poor HDLよりもコレステロール引き抜き量が大きかった($p < 0.01$)。健常人では、アポE-rich HDLのほうがアポE-poor HDLよりも引き抜き量が大きい傾向は認められたが有意差は認められなかった。しかしながら、図7-Bに示すように、胆汁うっ滞ではアポE-poor HDLよりもアポE-rich HDLの方がコレステロール引き抜き量は大きかった($p < 0.01$)。



A: 健常人及びCETP欠損、B: 胆汁うっ滞

図7 アポE-rich HDLの細胞からのコレステロール引き抜き能

(7) 本研究の成果と今後の展望

CETP 欠損患者血清のアポ E-rich HDL は細胞からのコレステロール引き抜き能はアポ E-poor HDL よりも大きいことを明らかにした。CETP 阻害剤では CETP 欠損と同様のメカニズムでアポ E-rich HDL は増加するので、引き抜き能は大きいと推測される。逆に、胆汁うっ滞のアポ E-rich HDL は、コレステロール引き抜き能が弱いことを初めて明らかにした。胆汁うっ滞では引き抜き能が弱い理由は明らかではないが、CETP 欠損とはアポ E-rich HDL の出現メカニズムが異なることに関係すると思われるが今後も継続して検討していきたい。測定法としては、アポ E-rich HDL-C を含む総 HDL-C の直接法を開発したが、非特異性反応の改善など、若干の課題が残されている。また、次の課題として、現在、HDL 亜分画であるアポ E-rich HDL、HDL₂、HDL₃ のコレステロールの分別定量法の検討も進めている。今後、これらの課題を早急にクリアし、臨床応用を実現化したい。

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 1 件)

1. 杉内博幸、松嶋和美、安東由喜雄. 脂質・リポ蛋白分画の測定法 HDLコレステロール・LDLコレステロール. MEDICAL TECHNOLOGY 38; 1322-1327, 2010 (査読無し)

[学会発表] (計 11 件)

1. 杉内博幸、松嶋和美、安東由喜雄. アポ E-rich HDL-C に対する HDL-C ホモジニアス法及び沈殿法の反応特異性. 第 49 回日本臨床化学会年次学術集会、2009/9/18 長崎市 (長崎大学医学部)
2. 杉内博幸. HDL-C、LDL-C ホモジニアス法について. 第 49 回日本臨床化学会年次学術集会 脂質・リポ蛋白基礎セミナー、2009/9/20 長崎市 (式見ハイツ)
3. 松嶋和美、杉内博幸、眞部正弘、西村仁志、安東由喜雄. HDL-コレステロール測定法の開発とその臨床的有用性に関する検討. 第 42 回日本臨床検査自動化学会、2010/10/8 神戸市 (国際会議場)
4. 松嶋和美、杉内博幸、眞部正弘、西村仁志、池田勝義、安東由喜雄. apoE-rich HDL-C に対する HDL-C 直接法の反応性に関する検討. 第 21 回生物試料分析科学会年次学術集会、2011/2/19 松山市 (愛媛大学城北キャンパス)
5. 杉内博幸、松嶋和美、前田香緒里、秋吉保男、安東由喜雄. アポ E-rich HDL の分離と HDL-C 直接法の反応性について. 第

51 回日本臨床化学会年次学術集会、2011/8/26 札幌市 (札幌医科大学)

6. 前田香緒里、松嶋和美、西村仁志、池田勝義、神力悟、庄野信、植田光晴、城野博史、大林光念、杉内博幸、安東由喜雄. apoE-rich HDL の測定法と抗動脈硬化作用に関する検討. 2011/8/27 札幌市 (札幌医科大学)
7. 松嶋和美、杉内博幸、西村仁志、池田勝義、片山有基、安東由喜雄. HDL₂ と HDL₃ コレステロールの直接測定法の開発と臨床応用. 第 51 回日本臨床化学会年次学術集会、2011/8/27 札幌市 (札幌医科大学)
8. 松嶋和美、杉内博幸、眞部正弘、西村仁志、池田勝義、安東由喜雄. HDL 亜分画コレステロールの直接法の開発と臨床応用. 第 43 回日本臨床検査自動化学会、2011/10/8 横浜市 (パシフィコ横浜・会議センター)
9. 杉内博幸、松嶋和美、秋吉保男、前田香緒里、安東由喜雄. シンポジウム”新しい臨床検査技術の開発” HDL-C、LDL-C 直接法の開発とその後の展開. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会、2011/11/17 岡山市 (岡山コンベンションセンター)
10. 前田香緒里、松嶋和美、川原理美、西村仁志、池田勝義、神力悟、庄野信、植田光晴、城野博史、大林光念、杉内博幸、安東由喜雄. apoE-rich HDL に対する HDL-C ホモジニアス法の反応性と抗動脈硬化作用に関する検討. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会、2011/11/20 岡山市 (岡山コンベンションセンター)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉内 博幸 (Sugiuchi Hiroyuki)
熊本保健科学大学 医学検査学科 教授
研究者番号: 70435163

(2) 研究分担者

松嶋 和美 (Matsushima Kazumi)
熊本保健科学大学 医学検査学科 講師
研究者番号: 00369125

安楽 健作 (Anraku Kensaku)

熊本保健科学大学 医学検査学科 講師
研究者番号: 80389543

安東 由喜雄 (Ando Yukio)

熊本大学大学院 生命科学研究部病態情報解析学分野・教授
研究者番号: 20253742