

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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590535

研究課題名（和文）アポEリッチ HDL 亜分画の変動と HDL ホモジニアス法の反応性との関係について

研究課題名（英文）The relation between changes of ApoE-rich HDL subclasses and reactivity to HDL-C homogenous assay

研究代表者

平山 哲 (HIRAYAMA SATOSHI)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10345506

研究成果の概要（和文）：

高比重リポ蛋白(HDL)には、ApoE-rich HDL と ApoE-poor HDL が存在する。ApoE-rich HDL を含む HDL 亜分画の分布と保存安定性について、非変性二次元電気泳動を用いて検討し、以下の知見を得た。1) ApoE-rich HDL には、大粒子および小粒子の分画が存在する。2) 37℃で保存した場合、4 時間後でも小粒子分画が変動する。3) 4℃で長期保存した場合、保存時間の経過とともに小粒子分画が変動し、大粒子分画はやや増加する。以上より、ApoE-rich HDL 亜分画は、保存時に LCAT による粒子成熟が影響を受け、HDL 亜分画の組成が変動する可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

High-density lipoprotein (HDL) has several subclasses which abundantly or poorly contain apolipoprotein E (ApoE-rich or ApoE-poor HDL). We investigated the distribution and stability of HDL subclasses during the short-term or long-term storage using native 2-dimensional gel electrophoresis. The findings are as follows, 1) ApoE-rich HDL consists of the large- and small-particles. 2) Small-particles were converted into large-particles after 4h-storage at 37°C. 3) Small-particles were decreased or increased, and large-particles were slightly increased after long-term storage even at 4°C. These findings suggest that LCAT activity may change the composition of ApoE-rich HDL subclasses during storage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：ApoE-rich HDL、HDL-C ホモジニアス法、脂質異常症、非変性二次元電気泳動

1. 研究開始当初の背景

高比重リポ蛋白(HDL)は、動脈硬化の抑制因子として知られ、粒子サイズやアポリポ蛋白組成、脂質組成の異なる亜分画が存在する。HDL 亜分画には、ApoE-rich HDL と ApoE-poor HDL が存在し、大型の ApoE-rich HDL は CETP 欠損症や胆汁うっ滞時に増加する。しかし、小粒子の ApoE-rich HDL の挙動は疾患時だけでなく健常人においても不明である。また、HDL-C ホモジニアス法では、ApoE-rich HDL に対する反応性の試薬間差が存在し、HDL-C 測定法の標準化は進んでいない。特に ApoE-rich HDL を含む HDL 亜分画の長期保存における安定性についての検討は少なく、ApoE-rich HDL を精密に解析する方法も確立されていない。HDL-C 測定法の標準化のために、ApoE-rich HDL の血中動態や特徴を明らかにする必要がある。

2. 研究の目的

ApoE-rich HDL 亜分画の分布と長期保存における安定性を検討し、ApoE-rich HDL の血中での特性と臨床的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

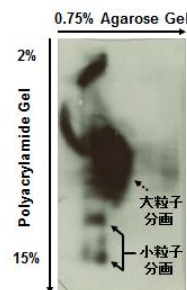
12 時間以上絶食後の正脂血症および脂質異常症から EDTA 採血により新鮮血漿を採取した。血漿は 0°C に保ち、(1) ApoE-rich HDL と ApoE-poor HDL 亜分画の分布を比較した。さらに、(2) 37°C で DTNB 非添加および添加下に 4 時間保存後、および、(3) 4°C で DTNB 非添加下に 0 日、2 日、7 日間保存後、に ApoE-rich HDL 亜分画の分布を比較し、保存温度と保存時間の影響を検討した。ApoE-rich HDL 亜分画の分布は、非変性二次元電気泳動法(一次元目、0.75%アガロースゲ

ル; 二次元目、2-15%濃度勾配ポリアクリルアミドゲル)で解析した。分離した HDL 亜分画は、ニトロセルロース膜へ転写し、抗 ApoE 抗体と ¹²⁵I でラベルした二次抗体を用いたウェスタンブロット法で検出した。各亜分画の定量は、ニトロセルロース膜から分離した各亜分画を切り出し、γ カウンターにより計測して求めた。

4. 研究成果

(1) ApoE-rich HDL は、粒子サイズの大きい分画だけでなく、粒子サイズの小さい分画も存在した(図参照)。小粒子の ApoE-rich HDL は、正脂血症、高 LDL-C 血症、高 TG 血症、高 HDL-C 血症のいずれにも存在した。

図 非変性二次元電気泳動法による ApoE-rich HDL の分布



(2) 小粒子の ApoE-rich HDL は、37°C で DTNB 非添加にて、4 時間保存後には 0°C 保存より有意に減少した。LCAT 活性を DTNB 添加により阻害すると、37°C で 4 時間保存後には逆に 0°C 保存より有意に増加した。37°C では比較的短時間の保存でも LCAT による粒子の成熟が影響を受ける可能性が考えられた。

(3) 正脂血症 (n=5) の ApoE-rich HDL は、4°C 保存後、保存時間の経過とともに小粒子分画が軽度減少し、大粒子分画はやや増加した。

一方、脂質異常症 (n=7) では、4℃保存後、保存時間の経過とともに小粒子分画と大粒子分画はやや増加する傾向であった。しかし、保存前の亜分画量が多いため、保存前後の変動は小さかった。ApoE-rich HDL 亜分画は、4℃での長期保存の場合、LCAT による粒子成熟が影響を受け、小粒子や大粒子分画などの HDL 亜分画の組成が変動する可能性があると考えられた。

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 12 件)

- 1) Miida T, Nishimura K, Okamura T, Hirayama S, Ohmura H, Yoshida H, Miyashita Y, Ai M, Tanaka A, Sumino H, Murakami M, Inoue I, Kayamori Y, Nakamura M, Nobori T, Miyazawa Y, Teramoto T, Yokoyama S. A multicenter study on the precision and accuracy of homogeneous assays for LDL-cholesterol: Comparison with a beta-quantification method using fresh serum obtained from non-diseased and diseased subjects. *Atherosclerosis* 225: 208-15, 2012, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.022 (査読有)
- 2) Hirowatari Y, Kon M, Shimura Y, Hirayama S, Miida T. Anion-exchange HPLC separation of five major rabbit lipoproteins using a non-porous diethylaminoethyl-ligated gel with a perchlorate-containing eluent. *Biomedical chromatography* 26: 434-40, 2012, doi: 10.1002/bmc.1683 (査読有)
- 3) Fukushima Y, Ohmura H, Mokuno H, Kajimoto K, Kasai T, Hirayama S, Miyauchi K, Miida T, Amano A, Daida H. Non-high-density lipoprotein cholesterol is a practical predictor of long-term cardiac death after coronary artery bypass grafting. *Atherosclerosis* 221: 206-11, 2012, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.12.012 (査読有)
- 4) Fukushima Y, Hirayama S, Ueno T, Dohi T, Miyazaki T, Ohmura H, Mokuno H, Miyauchi K, Miida T, Daida H. Small dense LDL cholesterol is a robust therapeutic marker of statin treatment in patients with acute coronary syndrome and metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* 412: 1423-7, 2011, doi: 10.1016/j.cca.2011.04.021 (査読有)
- 5) Nagasaka H, Yorifuji T, Takatani T, Okano Y, Tsukahara H, Yanai H, Hirano KI, Hui SP, Hirayama S, Ito T, Chiba H, Miida T. CD36 deficiency predisposing young children to hypoglycemia. *Metabolism* 60: 881-7, 2011, doi: 10.1016/j.metabol.2010.08.008 (査読有)
- 6) Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Ishige-Wada M, Usui H, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Miida T, Fukui M, Okano Y. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 103: 220-5, 2011, doi: 10.1016/j.ymgme.2011.03.019 (査読有)
- 7) Nagasaka H, Tsukahara H, Takatani T, Sanayama Y, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Wada M, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Hirayama S, Miida T, Fujimoto H, Mochizuki H, Hattori T, Okano Y. Cross-sectional study of bone metabolism with nutrition in adult classical phenylketonuric patients diagnosed by neonatal screening. *J Bone Miner Metab* 29: 737-43, 2011, doi:

- 10.1007/s00774-011-0276-6 (査読有)
- 8) Hirayama S, Soda S, Ito Y, Matsui H, Ueno T, Fukushima Y, Ohmura H, Hanyu O, Aizawa Y, Miida T. Circadian change of serum concentration of small dense LDL-cholesterol in type 2 diabetic patients. Clin Chim Acta 411: 253-7, 2010 (査読有)
 - 9) Kon M, Hirayama S, Horiuchi Y, Ueno T, Idei M, Fueki Y, Seino U, Goto S, Maruyama H, Iino H, Fukushima Y, Ohmura H, Hirowatari Y, Miida T. Profiles of inflammatory markers and lipoprotein subclasses in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis. Clin Chim Acta 411: 1723-7, 2010, doi: 10.1016/j.cca.2009.11.017 (査読有)
 - 10) Ikeuchi T, Hirayama S, Miida T, Fukamachi I, Tokutake T, Ebinuma H, Takubo K, Kaneko H, Kasuga K, Kakita A, Takahashi H, Bujo H, Saito Y, Nishizawa M. Increased levels of soluble LR11 in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. Dement Geriatr Cogn Disord 30: 28-32, 2010, doi: 10.1159/000315539 (査読有)
 - 11) Horiuchi Y, Hirayama S, Soda S, Seino U, Kon M, Ueno T, Idei M, Hanyu O, Tsuda T, Omura H, Miida T. Statin therapy reduces inflammatory markers in hypercholesterolemic patients with high baseline levels. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 17: 22-9, 2010 (査読有)
 - 12) Kimura S, Mitsuma W, Ito M, Suzuki M, Hosaka Y, Hirayama S, Hanyu O, Hirono S, Kodama M, Aizawa Y. Inverted Takotsubo contractile pattern caused by pheochromocytoma with tall upright T-waves, but not typical deep T-wave inversion. Int J Cardiol 139: e15-7, 2010, doi: 10.1016/j.ijcard.2008.06.073 (査読有)
- [学会発表] (計 17 件)
- 1) Ikeuchi T, Hirayama S, Miida T, Fukamachi I, Tokutake T, Kasuga K, Bujo H, Saito Y, Nishizawa M. Quantification of soluble LR11/SorLA in CSF and plasma of patients with Alzheimer disease. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Keystone, U.S.A., 2012 (2/26-3/2)
 - 2) 平山哲. ワークショップ 1・各種疾患と膜トランスポーター・受容体・関連蛋白 アルツハイマー病と可溶性 LR11. 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会, 山梨 (9/23-25), 臨床化学 第 39 巻 Suppl. 1: 71-72, 2010
 - 3) 平山哲. オープニング・レクチャー 脂質異常症におけるコレステロール合成・吸収マーカー. 第 18 回日本臨床化学会関東支部総会, 東京 (6/19), プログラム・抄録集: 4, 2010
 - 4) 長坂博範, 平山哲, 千葉仁志, 三井田孝. ワークショップ 1・各種疾患と膜トランスポーター・受容体・関連蛋白 小児の低血糖と CD36. 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会, 山梨 (9/23-25), 臨床化学 第 39 巻 Suppl. 1: 70, 2010
 - 5) 平山哲, 上野剛, 西岡笑子, 松川岳久, 出居真由美, 堀内裕紀, 牧野真太郎, 北村文彦, 横山和仁, 竹田省, 三井田孝. 周産期における糖・脂質代謝動態の変動. 第 59 回日本臨床検査医学会学術集会, 京都 (11/29-12/1), 臨床病理 第 60 巻 補: 89, 2012
 - 6) 上野剛, 平山哲, 西岡笑子, 松川岳久, 堀内祐紀, 三宅一徳, 昆美香, 牧野真太郎, 北村文彦, 竹田省, 横山和仁, 三井田孝. 周産期の貧血に及ぼす血清鉄および亜鉛の影響. 第 52 回日本臨床化学会年次学術集会, 盛岡 (9/7-8), 臨床化学

- 第 41 卷 Suppl. 1: 206, 2012
- 7) 堀内裕紀, 田部陽子, 三宅一徳, 出居真由美, 上野剛, 平山哲, 小倉加奈子, 藤原典子, 川崎誠治, 八幡悠里子, 小松則夫, 中道伊津子, 大坂顯通, 三井田孝. 微小血管障害性溶血性貧血を合併した胆嚢癌骨髄癌症の 1 例. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会, 岡山(11/17-20), 臨床病理 第 59 卷: 196, 2011
 - 8) 平山哲, 上野剛, 西岡笑子, 松川岳久, 出居真由美, 堀内裕紀, 牧野真太郎, 北村文彦, 竹田省, 横山和仁, 三井田孝. 周産期におけるインスリン抵抗性と脂質代謝. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会, 岡山(11/17-20), 臨床病理 第 59 卷: 94, 2011
 - 9) 平山哲, 中川沙織, 福島理文, 上村友実子, 上野剛, 大村寛敏, 樋口健一, 井上正則, 大和進, 三井田孝. 日本人の高コレステロール血症においてコレステロール吸収はコレステロール合成よりも LDL-C 濃度とより密接に関連する (Cholesterol absorption has more close association with LDL-C concentration than cholesterol synthesis in Japanese hypercholesterolemia). 第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 札幌(7/15-16), 日本動脈硬化学会総会プログラム・抄録集: 258, 2011
 - 10) 堀内裕紀, 三宅一徳, 出居真由美, 昆美香, 上野剛, 平山哲, 近藤成美, 田部陽子, 大坂顯通, 三井田孝: 横紋筋融解症の重症度に関する検討. 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会, 東京(8/26-29), 臨床病理 第 58 卷: 197, 2010
 - 11) 上村友実子, 中川沙織, 平山哲, 三井田孝, 大和進. エゼチミブ投与患者の血漿中コレステロール吸収・合成・代謝物の定量. 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会, 山梨(9/23-25), 臨床化学 第 39 卷 Suppl. 1: 124, 2010
 - 12) 長谷川絵梨, 中川沙織, 平山哲, 三井田孝, 眞山義民, 長坂博範, 大和進: GC-MS 定量法を用いた血漿中 oxysterol 濃度と加齢との関連性. 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会, 山梨(9/23-25), 臨床化学 第 39 卷 Suppl. 1: 119, 2010
 - 13) 桑原直子, 中川沙織, 平山哲, 三井田孝, 大和進: LC-MS/MS を用いる血漿中イソプレノイド測定法の開発. 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会, 山梨(9/23-25), 臨床化学 第 39 卷 Suppl. 1: 118, 2010
 - 14) 池内 健, 平山哲, 三井田孝, 深町勇, 矢島隆二, 徳武孝允, 春日健作, 金子博之, 田久保耕平, 海老沼宏幸, 武城英明, 西澤正豊: アルツハイマー病患者・髄液中では可溶性 LR11 が増加する. 第 29 回日本認知症学会学術集会, 名古屋(11/5-7), Dementia Japan 第 4 卷 3 号: 311, 2010
 - 15) 上野剛, 平山哲, 昆美香, 出居真由美, 堀内裕紀, 岩崎満, 山本茂一, 三井田孝: NST による介入症例の栄養指標 (CONUT 法) に及ぼすアルブミン測定法の影響. 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会, 東京(8/26-29), 臨床病理 第 58 卷: 186, 2010
 - 16) 平山哲, 中川沙織, 上野剛, 昆美香, 出居真由美, 堀内裕紀, 大和進, 三井田孝. 2 型糖尿病患者における血中ケトン体濃度と糖代謝関連指標についての検討. 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会, 東京(8/26-29), 臨床病理 第 58 卷: 109, 2010
 - 17) 平山哲, 昆美香, 上野剛, 堀内裕紀, 清野詩子, 和田庸子, 飯野則昭, 後藤眞,

丸山弘樹, 福島理文, 大村寛敏, 廣渡祐史, 三井田孝. 持続的携帯型腹膜透析下の末期腎不全患者におけるリポ蛋白質サブクラスと炎症マーカー (Lipoprotein subclasses and inflammatory markers in patients with end-stage renal disease undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis). 第42回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 岐阜 (7/16-17), 日本動脈硬化学会総会プログラム・抄録集: 284, 2010

[図書] (計1件)

- 1) Miida T, Hirayama S. Pre β 1-HDL: A native lipid-poor HDL, and its potential as a new marker for HDL metabolism (Chapter 12). In: The HDL Handbook – Biological Functions and Clinical Implications. (Tsugikazu Komoda, Ed), Academic Press, London (UK), Burlington, San Diego (U.S.A.), 243-259, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 哲 (HIRAYAMA SATOSHI)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号: 10345506

(2) 研究分担者

三井田 孝 (MIIDA TAKASHI)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号: 80260545