

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590683

研究課題名(和文) コレステリルエステル転送蛋白欠損におけるリン脂質代謝異常と抗糖尿病性

研究課題名(英文) Altered phospholipid metabolism and anti-diabetic effect of CETP deficiency

研究代表者

稲津 明広 (INAZU, Akihiro)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：80293348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：コレステリルエステル転送蛋白(CETP)欠損症は、常染色体劣性(一部、共優性)遺伝で、HDLの中に含まれる脂質をVLDLやLDLなどに転送するCETPが欠損する。本研究では、スフィンゴミエリン(SM)、ApoE、そして脂質転送活性の内因性インヒビターであるApoC-1を測定し、コントロールと比較した。リポ蛋白の分離には超遠心分離法とポリエチレングリコール(PEG)沈殿法で検討した。結果、CETP欠損で見られるHDL2(比重1.063-1.125)はSMが多く、CEが蓄積することにより、比重が小さくなり、LDL分画に一部混入して測られている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency is autosomal recessive (in part, co-dominant) disease/trait manifesting increased HDL-CE because the deficiency of CE transfer between VLDL or LDL and HDL. HDL2, large HDL found in CETP deficiency is reported to have decreased sphingomyelin levels. In this study, SM and apoE as well as apoC-1 were determined in subjects with CETP deficiency. Isolation of HDL was done by ultracentrifugation or PEG precipitation. CETP deficiency may have increased SM and CE in HDL2, some of large HDL is so buoyant as to be found in the LDL fraction.

研究分野：臨床化学

キーワード：高HDL血症 脂質代謝異常 遺伝子変異 リン脂質 脂質転送蛋白 CETP欠損症 スフィンゴミエリン
リポ蛋白

1. 研究開始当初の背景

血清中のコレステロールエステル転送蛋白(CETP)欠損症は,常染色体劣性(一部, 共優性) 遺伝で本邦の HDL コレステロール高値の遺伝的素因として重要である. いわゆる善玉リポ蛋白として知られている高比重リポ蛋白(HDL)の中に含まれるエステル型コレステロール (CE) を悪玉リポ蛋白である VLDL や LDL などに転送する CETP という脂質転送する糖蛋白が欠損する脂質代謝異常では, HDL の中に CE が蓄積し, 反対に LDL のコレステロールが低下する. 高 HDL 血症は一般的に, 抗動脈硬化性があるといわれているが, CETP 欠損症によって生じる高 HDL 血症と低 LDL 血症の動脈硬化惹起性が長く議論されてきた. 少なくとも染色体 16q13 にある CETP 遺伝子の機能性多型のうちイントロン 1 にある Taq1B 多型では HDL-コレステロールの増加と共に, 心血管イベントの低下がメタアナリシスで報告されている.

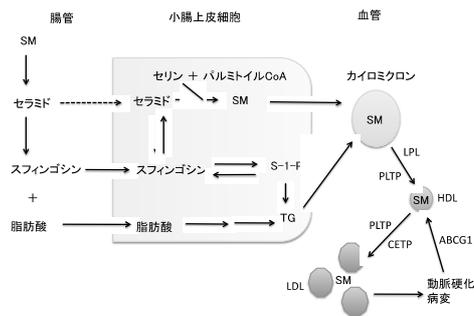


図 1. スフィンゴミエリンの代謝

しかしながら, CETP 阻害薬 2 剤の第 III 相臨床試験において, 心血管イベント抑制効果は認められず, その原因を HDL 機能異常に原因を求める考えがある. こうした観点から遺伝性 CETP 欠損症の HDL 組成を検討することは意義あるものと考えられる.

2. 研究の目的

これまで CETP 欠損では大粒子 HDL が増加するが, さらに大粒子 HDL (HDL2 分画) のスフィンゴミエリン (SM) がコントロールと比較して有意に低値であること, HDL の ApoE が増加し, レシチン:コレステロール アシル転移酵素(LCAT) 活性が亢進することが報告されている(Matsuura et al. J Clin Invest, 2006). また, 冠動脈疾患患者はコントロールと比較して血清 SM が有意に高値であり (Schlitt et al. Nutr Metab, 2006), 一方, 冠動脈疾患のない患者は HDL-SM が高い傾向にあることが報告されている(Horter et al. 2002). SM はコレステロールとの親和性が高いので, LDL の SM 高値は LDL 凝集促進に働く可能性からリポ蛋白表面の SM の分布調節因子としての CETP の役割が示唆される(図 1).

本研究では, リポ蛋白 SM, ApoE, そして脂質転送活性の内因性インヒビターである ApoC- を測定し, CETP 欠損の HDL の特徴を検討した. また, 現在リポ蛋白の分離に使われている超遠心分離法とより簡便な方法としてポリエチレングリコール(PEG)沈殿法を用いて CETP 欠損のリポ蛋白を検討した.

3. 研究の方法

超遠心分離法と簡便な PEG (分子量 20,000) 沈殿法でリポ蛋白を検討した. PEG 最終濃度 4.2%を LDL と HDL の分離条件とした. CETP 欠損患者 4 人, 対照 7 人を対象とした. SM 測定は, Hojjati and Jiang の方法に従い(J Lipid Res, 47:673-676, 2006), スフィンゴミエリナーゼ, アルカリフォスターゼ, コリンオキシダーゼを用いた酵素法で行った.

超遠心分離法は VLDL:0.96 ~ 1.006, IDL:1.006 ~ 1.019, LDL1:1.019 ~ 1.045, LDL2:1.045 ~ 1.063, HDL2:1.063 ~ 1.125,

HDL3:1.125~1.210 の比重で血清リポ蛋白を分離した。これらの方法は Tada らの論文 (2015) に詳解している。

4 . 研究成果

CETP欠損症は,超遠心分離による非HDL-SMと,PEG沈殿法による沈殿リポ蛋白中SM値は,2検体を除いてほぼ一致した。2つの測定法で乖離が見られた2検体は,CETP欠損(ヘテロ接合体)の重症型とCETP欠損(ホモ接合体)であり,超遠心分離法では大粒子HDLがLDL分画に含まれて測定される可能性が示唆された。CETP欠損は対照と比較してHDL2-SMが有意に高値であり,LDL2-SMもまた高い傾向にあった。図2のように,CETPとLDL2-SM,HDL2-SMは負の相関関係であり,HDL-SMとPEG沈殿の上清中ApoEは正の相関関係を示した。以上からCETP欠損でのHDLリン脂質組成は既報の結果とは異なり,SM豊富である可能性があり,さらに多数例での検討や液体クロマトグラフィーなど別のリポ蛋白分離法での検討が必要であると考えられた。

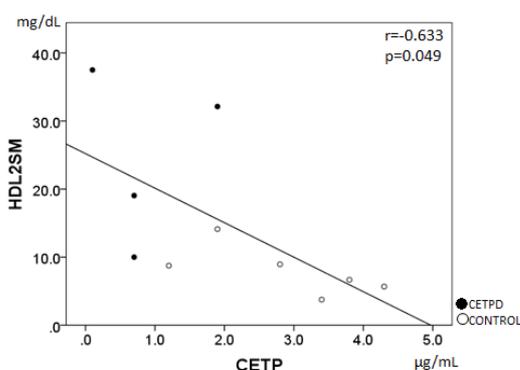


図2 . HDL 2-SMと血漿CETPとの相関関係

なお,CETP欠損症でのセラミドの測定など抗糖尿病性に関係する項目のアッセイ系は確立できなかった。また,当初計画したHDL-SMとLCATによるエステル化反応との関係や赤血球の膜リン脂質組成に関する検討はできなかった。

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 3 件)

1)Hayato Tada, Masa-aki Kawashiri, Atsushi Nohara, Akihiro Inazu, Hiroshi Mabuchi, Masakazu Yamagishi, Kenshi Hayashi
Lipoprotein metabolism in familial hypercholesterolemia: Serial assessment using a one- step ultracentrifugation method
Practical Laboratory Medicine, 1:22-27, 2015
査読あり

2)Hiroshi Mabuchi, Atsushi Nohara, Akihiro Inazu Cholesteryl ester transfer protein (CETP) deficiency and CETP inhibitors.
Mol Cells. 2014 Nov;37(11):777-84. doi: 10.14348/molcells.2014.0265. Epub 2014 Nov 6. 査読あり

3)稲津明広

「リポ蛋白関連ホスホリパーゼ A2」
日本臨床 71 巻 増刊号 3 脂質異常症
寺本民生編集 435-438 頁
2013 年 6 月 査読なし

〔学会発表〕(計 2 件)

1)稲津明広「HDL コレステロール基準範囲設定の問題点」プロジェクト報告「リポ蛋白検査専門委員会」第 5 4 回日本臨床化学会
2014 年 9 月 5 日 東京大学本郷キャンパス
(東京都文京区)

2)稲津明広 「HDL-C・non-HDL-Cの基準範囲について」シンポジウム6 血清脂質の基準範囲を考える第 5 4 回日本臨床化学会 2014年 9月7日 東京大学本郷キャンパス (東京都文京区)

〔図書〕(計 2 件)

1) Akihiro Inazu

Cholesteryl ester transfer protein inhibitors: a
hope remains. The HDL Handbook,
Biological functions and clinical implications.
Chapter 8, pages 195-220
2nd Ed. Editor Tsugikazu Komoda, 2014
Elsevier

2) 稲津明広

「アポリポ蛋白」

臨床検査ガイド 2015 改訂版

291-295 頁

編集 三橋知明、和田攻、矢崎義雄、 小

池和彦、小室一成

文光堂 2015 年 3 月 23 日

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

稲津 明広 (INAZU, Akihiro)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号 : 80293348