

平成 29 年 8 月 21 日現在

機関番号：32625

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460640

研究課題名(和文)冠動脈疾患リスク因子レムナントリポ蛋白の代謝酵素を標的とした臨床検査法の確立

研究課題名(英文)Development of lipoprotein lipase assays targeted to remnant lipoproteins in cardiovascular diseases.

研究代表者

中嶋 克行(Nakajima, Katsuyuki)

女子栄養大学・付置研究所・客員教授

研究者番号：10444051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：食後、血中の中性脂肪(TG)が著明に上昇するが、それに伴って食後血中リポ蛋白リパーゼ(LPL)が増加すると言われてきたが、ヘパリン非投与血清を用いて測定した血清LPL濃度が、脂肪負荷、糖負荷後により増加しないことを証明した。その結果として、食後TGの増量はレムナント・リポ蛋白のTGが著明に増加することを証明した。つまり、食後に血中TG濃度が増加する場合、レムナント分画中のTG含量が、食後4-6時間前後で著明に増加し、その占める割合は脂肪負荷の場合は90%近くになることが明らかとなった。レムナントに結合したLPL濃度が低いことが、肝臓でのレムナントの取り込みの程度に関連する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Plasma TG levels are known to increase after food intake. Also it has been believed that plasma LPL levels increase associated with the increase of plasma TG. However, we found that LPL levels don't change after fat load and sugar intake in non-heparin plasma. We also found that most of the increased TG after food intake was found in remnant lipoprotein fraction as RLP-TG. RLP-TG increased greatest in 4-6 h after food intake which was associated with the LPL concentration in remnant lipoproteins (LPL/RLP-TG interaction).

研究分野：臨床検査

キーワード：リポ蛋白リパーゼ(LPL) レムナントリポ蛋白 脂肪負荷 中性脂肪 肝性リパーゼ(HTGL)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は1993年に、レムナント研究のブレークスルーとなったレムナント単離精製法並びに血中濃度測定法を確立した。このレムナント測定法を用いて、リポ蛋白代謝に関連するリポ蛋白リパーゼ(LPL)ならびに肝性TGリパーゼ(HTGL)の新規活性測定(基質分解活性)法と、新たに独自の高感度LPL、HTGL濃度測定法(ELISA)を開発した。

### 2. 研究の目的

レムナント代謝に関与することが知られているリポ蛋白リパーゼ(LPL)や肝性TGリパーゼ(HTGL)に対して、ヘパリン投与有無の血漿を用いての測定を行い、ヘパリン投与なしでの測定法の日常検査での臨床的有用性について検討した。

### 3. 研究の方法

以下の条件について検討した。(1)ヘパリン投与前後(有無)の症例における糖負荷や脂肪負荷試験(OFTT)後の検体を、我々が新たに開発した高感度の脂質代謝酵素(LPLならびにHTGL)の濃度測定(ELISA)と活性測定(基質分解活性)法で測定し、血中レムナント(RLP)ならびに関連検査項目との関係を解析し、これらの酵素活性の測定にヘパリン投与なしの検査が実際可能かどうかを調べた。(2)特にプレヘパリンLPL測定を行い、血清RLP値の増加が観察されている糖尿病、冠動脈疾患、メタボリック症候群患者におけるLPL濃度とRLP値との関係を検討した。HTGLに関してはヘパリン投与なしでは濃度、活性共に測定不能であったので、ヘパリン投与なしで測定可能なELISA法の開発を行った。

### 4. 研究成果

(1)初年度は糖尿病、冠動脈疾患、メタボリック症候群患者のヘパリン投与なし

の血清LPL濃度は、健常群よりも有意に低値をしめし、LPLはレムナントの粒子サイズと負の相関を示し、粒子サイズの大きなレムナントは少数のLPLと結合し小さいレムナントは多数のLPLと結合している可能性が示された。従って、LPL濃度の測定にはヘパリン投与を行う必要がないことが示された。

(2)次年度はヘパリン投与なしの血漿中のLPL濃度の測定が、ヘパリン投与後の血漿のLPL活性に代わりうることを証明するため、高感度LPL-ELISAを用いてRLP分画中のLPLの測定をこない、循環血中に存在するLPLがRLPとどのような関係にあるのかを検討した。つまり、ヘパリン投与によって血管内皮表面から放出されたLPLがRLPにどのように結合しているのか、ヘパリン採血後の経時的変化「0、15、30、60分後」に伴う血中LPL活性とLPL濃度とRLP中のそれらの関係を検討した。特に、ヘパリン投与なしの血清中のLPL濃度の80%以上がRLP分画にあることが明らかとなった。ヘパリン非投与血清中のLPLは活性がないことが知られているが、その理由としてRLPと結合していることが知られているアポC1とアポC3(LPLインヒビター)がLPLを不活性化している可能性が示唆された。またヘパリン投与後、活性を持つLPLが血管内皮から循環血中に大量に遊離されるが、活性を持つLPLと不活性型のLPLは血中でどのような存在形態であるのか、その結合しているリポ蛋白分画を確認するため、スーパーローズ6Bを用いたゲル濾過と高感度LPL-ELISAを用いて検討した。その結果、活性型LPLの大半はHDL

分画位に結合していることが明らかとなり、LPL ならび HTGL 活性のインヒビターである tetrahydro lipstatin を用いた場合、ヘパリン採血後の LPL は RLP と結合していることが明らかとなった。HTGL はレムナント分画には結合していないことが明らかとなった。

(3) 最終年度は食後の TG の上昇と LPL、レムナントの関係について検討した。食後、血中の中性脂肪(TG)が著明に上昇するが、従来それに伴って食後血中リポ蛋白リパーゼ(LPL)が増加すると言われてきたが、ヘパリン非投与血清を用いて測定した血清 LPL 濃度が、脂肪負荷、糖負荷後により増加しないことを証明した。その結果として、食後レムナント・リポ蛋白の TG が著明に増加する可能性を報告した。つまり、食後に血中 TG 濃度が増加する場合、レムナント分画中の TG 含量が、食後 4-6 時間前後で著明に増加し、その占める割合は脂肪負荷の場合は 90%近くになることが明らかとなった。レムナントに結合した LPL 濃度が低いことが、肝臓でのレムナントの取り込みの程度に関連する可能性を示唆した。また HTGL は食後の TG 代謝には関与しない可能性が明らかとなった。さらに血管内皮にあるアンカー蛋白 GPIHBP1 と LPL の関係について UCLA の Prof. Stephen Young との共同研究を進めた。

#### 引用文献

**(1). Shirakawa T, Nakajima K, Shimomura Y, Kobayashi J, Stanhope K, Havel P, Machida T, Sumino H, Murakami M. Comparison of the effect of post-heparin and pre-heparin lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase on remnant lipoprotein metabolism. Clin. Chim**

**Acta 2014, 440; 193-200.**

**(2). Shirakawa T, Nakajima K, Yatsuzuka S, Shimomura Y, Kobayashi J, Machida T, Sumino H, Murakami M. The role of circulating lipoprotein lipase and adiponectin on the particle size of remnant lipoproteins in patients with diabetes mellitus and metabolic syndrome. Clin Chim Acta. 2014; 440: 123-132**

#### 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 8 件)

**1. Brenta G, Berg G, Miksztoicz V, Lopez G, Lucero D, Faingold C, Murakami M, Machida T, Nakajima K, Schreier L. Atherogenic Lipoproteins in Subclinical Hypothyroidism and Their Relationship with Hepatic Lipase Activity: Response to Replacement Treatment with Levothyroxine. Thyroid. 2016 ; 26(3):365-72**

**2. Sato K, Okajima F, Miyashita K, Imamura S, Kobayashi J, Stanhope K, Havel P, Tetsuo Machida T, Hiroyuki Sumino H, Murakami M, Nakajima K. Most lipoprotein lipase is bound to remnant lipoproteins in plasma: A new definition for remnant lipoproteins. Clin Chim Acta 2016; 461: 114-125**

**3. Allan CM, Larsson M, Hu X, He C, Jung RS, Mapar A, Voss C,**

**Miyashita K, Machida T, Murakami M, Nakajima K, Bensadoun A, Ploug M, Fong LG, Young SG, Beigneux AP. An LPL-specific monoclonal antibody, 88B8 that abolishes the binding of LPL to GPIHBP1. J Lipid Res. 2016; 57:1889-1898.**

4. Hu X, Sleeman MW, Miyashita K, Linton MF, Allan CM, He C, Larsson M, Tu Y, Sandoval NP, Jung RS, Mapar A, Machida T, Murakami M, Nakajima K, Ploug M, Fong LG, Young SG, Beigneux AP. 109. Monoclonal antibodies that bind to the Ly6 domain of GPIHBP1 abolish the binding of LPL. J Lipid Res. 2017; 58: 208-215.

5. Beigneux AP, Miyashita K, Ploug M, Blom DJ, Ai M, Linton MF, Khovidhunkit W, Dufour R, Garg A, McMahan MA, Pullinger CR, Sandoval NP, Hu X, Allan CM, Larsson M, Machida T, Murakami M, Reue K, Tontonoz P, Goldberg IJ, Moulin P, Charrière S, Fong LG, Nakajima K, Young SG. . Autoantibodies against GPIHBP1 as a Cause of Hypertriglyceridemia. N Engl J Med. 2017; 376:1647-1658.

6. **Ishiyama N, Sakamaki K, Shimomura Y, Kotani K, Tsuzaki K, Sakane N, Miyashita K, Fukamachi I, Kobayashi J, Stanhope KL, Havel PJ, Tokita Y, Machida T, Murakami M. Nakajima K. Lipoprotein Lipase Does Not Increase in the**

**Postprandial Plasma. Clinica Chimica Acta 2017; 464: 204-210**

7. Nakajima K, Tokita Y, Sakamaki K, Shimomura Y, Kobayashi J, Kamachi K, Tanaka A, Stanhope KL, Havel PJ, Wang T, Machida T, Murakami M. Triglyceride content in remnant lipoproteins is significantly increased after food intake and is associated with plasma lipoprotein lipase. Clinica Chimica Acta 2017; 465: 45-52

8 . Tokita Y, Maejima Y, Shimomura K, Takenoshita S, Ishiyama N, Akuzawa M, Shimomura Y, Nakajima K. Non-alcoholic fatty liver disease is a risk factor for type 2 diabetes in middle-aged Japanese men and women. Internal Medicine 2017; 56: 763-771.

〔学会発表〕(計 15 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋克行 (Nakajima, Katsuyuki)  
女子栄養大学栄養科学研究所、客員教授  
研究者番号：10444051

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

研究者番号：

(4) 研究協力者

岡島史和 (Okajima, Fumikazu)  
群馬大学生体調節研究所、教授

研究者番号：30142748