

コレステロール排泄機構の破綻と動脈硬化重症化に共通する脂質分子の探索と臨床応用

小倉正恒

国立循環器病研究センター研究所 病態代謝部

【研究の背景】

血中 HDL-C 値を単純に増加させる戦略は動脈硬化性心血管疾患 (ASCVD) 発症を予防しない¹⁾。そこで「HDL は濃度 (量) よりも機能 (質) が重要」という考えに基づき、放射性コレステロールで標識した培養細胞に患者 HDL 分画を作用させ、培地中に引き抜かれた放射能をカウントする「コレステロール引き抜き能」(以下、引き抜き能) の測定系が開発され、米国の臨床研究^{2,3)}において、引き抜き能は HDL-C 値よりも冠動脈疾患の良い予測指標であることが報告された。我々も引き抜き能が HDL-C 値よりも家族性高コレステロール血症患者における冠動脈疾患発症⁴⁾、端野・壮警町住民コホートにおける頸動脈硬化の重症度⁵⁾の良い予測指標であることを明らかにした。このように引き抜き能は HDL-C 値よりも有用な ASCVD 発症のサロゲートマーカーとしての地位を確立したが、各施設の培養細胞と保存プール血漿を用いるため、臨床検査としての標準化は不可能である。

【目 的】

本研究の目的は引き抜き能低下と ASCVD の発症・重症化の共通脂質分子を特定することである。

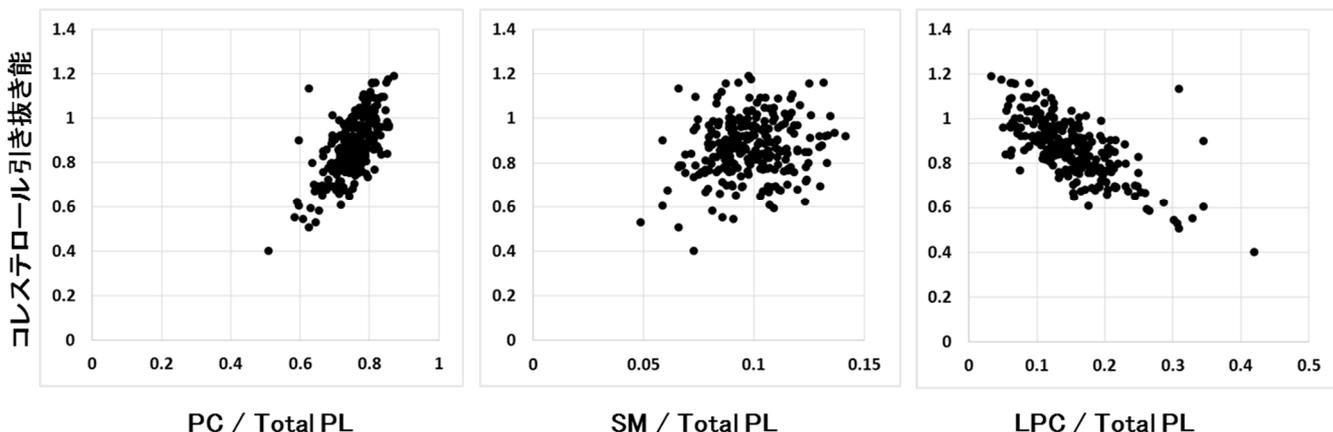
【方 法】

1. 高コレステロール血症患者 250 名の引き抜き能と酵素法で測定した HDL 分画 (ポリエチレングリコール (PEG) 沈殿で得たアポリポタンパク B 除去血漿) 中のホスファチジルコリン (PC)、スフィンゴミエリン (SM)、リゾ PC (LPC) 濃度との関連を検討した。
2. 若年性心筋梗塞患者 3 名と心筋梗塞未発症者 7 名の上記 HDL 分画を共同研究者の馬場健史教授 (九州大学・生体防御医学研究所・教授) に送付し、超臨界流体クロマトグラフィ・質量分析法 (SFC/MC) により HDL 分画中のリン脂質について脂肪酸側鎖の結合部位の違いまで含めて定量解析し、引き抜き能との関連を検討した。
3. 心筋梗塞患者でその血中濃度が高く、かつ引き抜き能と負の関連を示す HDL 分画中の悪玉脂質を探索した。

【結 果】

1. コレステロール引き抜き能と HDL 分画中の PC、SM、LPC 濃度との関連
図1に示すようにコレステロール引き抜き能は HDL 分画中の総リン脂質 (Total PL) に占める PC の割合と強く正に関連し ($R=0.73$)、SM の割合とは弱く負に関連した ($R=-0.38$)。また LPC の割合とは強く負に関連し ($R=-0.78$)、興味深いことに同じ程度の LPC/Total PL 比であってもコレステロール引き抜き能が大きく異なることから、各リン脂質の脂肪酸側鎖情報の違いが同じリン脂質クラスの中でも引き抜き能に影響を及ぼす可能性が考えられた。
2. SFC/MC による HDL 分画中脂質分子の定量
10 名の患者プロフィールを表に示す。これらの患者の血漿を PEG 沈殿して得られた HDL 分画を SFC/MC によりリピドーム解析を実施したところ、PC は 29 種類、SM は 15 種類、LPC は 25 種類の脂質分子種が定量できた。

図1. HDL分画中の総リン脂質に占める各リン脂質(酵素法)の割合と引き抜き能の関連



3. 悪玉脂質分子の探索

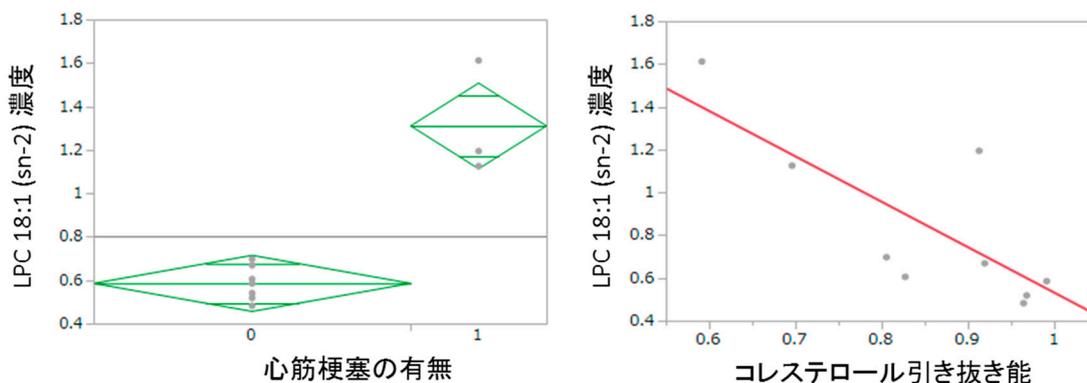
すべての測定できたリン脂質が患者の HDL-C 濃度と正に関連してしまうため正確な評価を行うためにゲルろ過クロマトグラフィ法による HDL 粒子数を求め(スカイライトバイオテック社に外注)、各脂質分子種量を粒子数で序した値をパラメーターとして採用した。心筋梗塞患者でその血中濃度が高く、かつ引き抜き能と負の関連を示す HDL 分画中の悪玉脂質として LPC 16:0 (sn-1、以下(1)), LPC 16:0 (sn-2、以下(2)), LPC 16:1 (1), LPC 18:0 (1), LPC 18:0 (2), LPC 18:1 (1), LPC 18:1 (2), LPC 18:2 (1), LPC 18:2 (2), LPC 20:2, LPC 20:3 (1), LPC 20:4 (1), LPC 20:4 (2), LPC 22:6 (1)など 14 種類が同定でき、特に脂肪酸側鎖が 18:1(オレイン酸)または 18:2(リノール酸)である LPC が特に心筋梗塞患者の血中で高く、引き抜き能と強く負に関連していた。

表. HDL分画のリピドーム解析を実施した患者10名の臨床的特性

年齢	性別	心筋梗塞	HDL-C	引き抜き能	HDL粒子数
66	M	未発症	64	0.968	17190.19
50	F	未発症	64	0.964	15150.36
39	M	36歳	42	0.913	12714.42
70	F	未発症	78	1.046	18185.42
51	F	未発症	49	0.805	11510
45	F	未発症	47	0.827	11583.66
39	M	35歳	34	0.696	10022.54
41	M	41歳	33	0.592	8744.94
47	F	未発症	77	0.919	15843.8
67	F	未発症	64	0.991	19081.7

図2. 心筋梗塞患者で血中濃度が高く、引き抜き能と負の関連を示す悪玉脂質の例

(sn-2位にオレイン酸が結合したリゾホスファチジルコリン)



【考 察】

本研究において HDL 分画中の LPC 濃度がコレステロールと負に関連していること、LPC のうち脂肪酸側鎖がリノール酸またはオレイン酸であるものが特に心筋梗塞患者の血中で高く、かつコレステロール引き抜き能と負に関連する悪玉候補脂質であることが示された。

HDL 研究は量(HDL-C 値)から質(HDL 機能)にパラダイムシフトし、我々を含む国内外のグループが、搬出能が種々の疾患のサロゲートマーカーであることを報告している。しかし搬出能を規定する因子の探索研究はまだ少ない。冠動脈疾患を若年発症した高 HDL-C 患者(平均 86 mg/dL)では、同程度の HDL-C 値の健常者と比較して HDL 中の総リン脂質量が少なく、かつ引き抜き能が低下していた⁶⁾が、リン脂質の脂肪酸側鎖情報を含む組成の影響は明らかでない。LPC が動脈硬化惹起的か、抗動脈硬化的かについてはまだ結論が出ていないが、LPC の脂肪酸側鎖情報の議論が不十分なためと考え、本研究結果はある程度の道筋は示せたのではないかと考える。最近、神戸大学の津田らは、リポミクス解析を用いて冠動脈疾患患者 4 名の HDL には対照群 4 名に比較して炎症性脂質ロイコトリエン B4 を産生する酵素群が含まれ、マクロファージの炎症を惹起することを報告した⁷⁾。引き抜き能との関連は不明だが、リポミクス解析により HDL と細胞間の相互作用の一端を解明した。今後はこのような研究が進んでいくものと推測される。

本研究結果の課題、limitations としては以下の3点が挙げられる。1点目は、血中 LPC 濃度は比較的高いため PEG 沈殿で得られた HDL 分画の中にわずかに LDL や VLDL が残存していた場合やアルブミン等と結合してリポタンパク中に存在していない LPC の影響は除外しきれず、真の HDL 粒子上の LPC を測定できているか不明であることである。超遠心法を用いれば HDL を分離できるが、分離にいたる長時間の作業中に塩の暴露や酸化のリスクは避けられず、やはり課題は残存してしまう。2点目はリノール酸やオレイン酸が結合している LPC が引き抜き反応を減弱させるメカニズムが明らかになっていない点である。引き抜き能測定は37°Cで4時間インキュベーション後に実施するため、HDL 上で「細胞膜由来 PC+遊離コレステロール→LPC+コレステリルエステル+遊離脂肪酸(FFA)」という LCAT 反応が起きている。また血中のホスホオリパーゼ(PLA)も PC の sn-1、sn-2位の脂肪酸を加水分解し、LPC と FFA を産生する。さらに LPC アシル転移酵素(LPCAT)は LPC から PC への合成とともに脂肪酸の交換(リモデリング)を行う。すなわち引き抜き能測定中の培養液は放射性コレステロールを引き抜いた HDL の他に様々な脂肪酸側鎖を有するリン脂質、リン脂質から遊離した FFA、アラキドン酸由来のエイコサノイド等を含み、生理活性物質として細胞の炎症応答や転写因子活性、ABC トランスポーターの発現制御にも影響していると考えられる。今後はオレイン酸やリノール酸の代謝産物やその ABC トランスポーター発現への影響などを調べる必要がある。3点目は、リポミクス解析に供した血液検体は10名分とやや少ないことが挙げられる。若年で心筋梗塞を発症した3名を含むという点は強みと考えているが、この結果が一般化できるか否かは悪玉脂質の候補分子種をより多くの検体で測定し、コレステロール引き抜き能と動脈硬化の重症度との関連解析を実施する必要があるだろう。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究の進展により、真の悪玉脂質やその生成経路・作用機序が解明できれば、ASCVD 発症が多い少子高齢化社会における健全な食生活の提案、機能的食品開発、そして HDL-C よりも有用かつ標準化可能な「真の善玉バイオマーカー」測定系の開発、悪玉脂質の生成経路を阻害する薬剤の開発につながる。すなわち、LDL-C 低下治療だけでは ASCVD を予防できない患者の残余リスク制圧に HDL 機能向上という観点から貢献できるものと考えており、今後も研究を進めていきたい。

最後に本研究をご支援賜りました公益財団法人 先進医薬研究振興財団と関係者の皆様に深謝申し上げます。

【参考・引用文献】

1. Keene D, Price C, Shun-Shin MJ, et al. Effect on cardiovascular risk of high density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP inhibitors: meta-analysis of randomised controlled trials including 117,411 patients. *BMJ*; 349:g4379
2. Khara AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and

atherosclerosis. *N Engl J Med*; 364:127–135

3. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med*; 371:2383–2393
4. Ogura M, Hori M, Harada-Shiba M. Association Between Cholesterol Efflux Capacity and Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 36:181–188
5. Furuhashi M, Ogura M, Matsumoto M, et al. Serum FABP5 concentration is a potential biomarker for residual risk of atherosclerosis in relation to cholesterol efflux from macrophages. *Sci Rep*; 7:217
6. Agarwala AP, Rodrigues A, Risman M, et al. High-Density Lipoprotein (HDL) Phospholipid Content and Cholesterol Efflux Capacity Are Reduced in Patients With Very High HDL Cholesterol and Coronary Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 35:1515–1519
7. Tsuda S, Shinohara M, Oshita T, et al. Novel mechanism of regulation of the 5-lipoxygenase/leukotriene B4 pathway by high-density lipoprotein in macrophages. *Sci Rep*; 7:12989