

論文審査の結果の要旨

氏名：宮 崎 修

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名： ヒト血漿pre β 1-HDLの測定系確立と生成機序および存在様式の解明

審査委員：（主 査） 教授 春 見 隆 文

（副 査） 教授 小 田 宗 宏 教授 関 泰一郎

背景：

コレステロールは生体に不可欠の成分であるが、血管壁に過剰に蓄積すると動脈硬化症の原因になることが知られている。末梢に蓄積したコレステロールはHDL(高比重リポタンパク)によって引き抜かれ、肝臓へと転送される。HDLは俗に善玉コレステロールと呼ばれ、血中HDL-C値が高いほど冠動脈疾患の発症率が低いことが知られている。しかし、CETP欠損症(CETP:コレステロールエステル転送タンパク)やプロブコール投与例などHDLの量だけでは評価できない症例があり、HDLの質を評価する検査が求められている。HDLは均一な粒子でなく、粒子サイズや脂質含量、アポタンパク構成が異なる亜分画が存在する。粒子サイズが小さく脂質含量が低い亜分画ほど細胞からのコレステロール引抜き能は高いことが報告されている。pre β 1-HDLは血中HDLの1~5%しか存在しないが、最も粒子サイズが小さい亜分画として注目されている。しかし、pre β 1-HDLに関しては、様々な疾患や病態での血中濃度、生成経路、また、存在様式など不明な点が多い。血漿pre β 1-HDL濃度は、これまで非変性二次元電気泳動で測定されてきた。この方法は、HDLの全ての亜分画を同時に測定できる反面、操作が煩雑であることから、簡便な測定法の確立が求められている。pre β 1-HDLの生成機序として、肝臓と小腸から直接分泌される経路、HDLからpre β 1-HDLが解離する経路が知られている。もう一つ潜在的な経路としてVLDL(超低比重リポタンパク)中のTG(トリグリセライド)がLPL(リポタンパクリパーゼ)の作用で加水分解するときにpre β 1-HDLが解離する経路が考えられているが、明確な証拠はない。pre β 1-HDLの存在様式についても様々な異なる報告があり明確にわかっていない。1999年にアポA-1が細胞膜上のABCA1(ATP-binding cassette transporter A1)を介してコレステロールを引抜き、それと同時にHDLのもとになる幼若HDLが形成されることが明らかになると、pre β 1-HDLがこの反応の基質であるlipid-free apoA-1であるのか、あるいは、細胞から引抜いた遊離型コレステロールとリン脂質、及び2分子のアポA-1で構成される円盤型のpre β -Nascent HDLであるのかを明確にすることが重要な意義を持つこととなった。

以上の背景から、本研究の目的を(1)血漿pre β 1-HDLの簡便な測定法の確立、(2)pre β 1-HDLの生成機序の解明、(3)血漿pre β 1-HDLの存在様式の解明とした。

1. 抗pre β 1-HDL抗体を用いた測定系の確立

(1) 抗体作製

血漿pre β 1-HDLの免疫学的測定法を確立するため、まず抗pre β 1-HDLモノクローナル抗体の作製を試みた。免疫原は、pre β 1-HDLの構成蛋白であるアポA-1を用いた。血漿から超遠心分離法によりHDLを分取し、アポA-1を精製した。これをBalb/cマウスに免疫し、6週間後、脾臓を摘出した。脾臓細胞とマウスミエローマ細胞をポリエチレングリコール法で細胞融合し、96穴プレートでHAT選択培地にて培養した。1週間後各wellの培養上清を用いスクリーニングを行った。アポA-1は他のHDL亜分画にも存在する蛋白であるが、脂質やアポ蛋白組成によって各HDL亜分画におけるアポA-1の立体構造が異なると推測し、pre β 1-HDL上のアポA-1のみに反応する抗体の選択を試みた。ELISAプレートにヤギ抗マウスIgG抗体を固相化後、培養上清中の抗体、ヒト血漿、HRP標識ヤギ抗アポA-1抗体またはHRP標識ヤギ抗アポA-2抗体の順で反応させた。ヤギ抗アポA-1抗体の系で反応し、ヤギ抗アポA-2抗体の系で反応しない2株を選択し、クローニ

ングした。樹立細胞をマウス腹腔に投与し、腹水を採取後、プロテイン A カラムで IgG 画分を精製した。

(2) 抗体の特異性とエピトープ

獲得抗体 (Mab55201、55205) の特異性を検討した結果、血漿ゲル濾過画分に対し分子量 67kD 以下のアポ A-1 含有粒子のみに反応すること、血漿と混和後非変性二次元電気泳動法で分析すると pre β 1-HDL のスポットのみ消失する結果から、2 種の抗体は、pre β 1-HDL 中のアポ A-1 と特異的に反応することが確認された。次に抗体のエピトープを明らかにするため、合成ペプチドに対する反応性、アポ A-1 の臭化シアン分解物に対する反応性、及び両抗体のアポ A-1 に対する反応競合性を調べた。その結果、エピトープは特定できなかったものの、Mab55201 と 55205 はアポ A-1 中の異なる部位を認識することが判明した。

(3) 測定系の確立

Mab55201 を用いたサンドイッチ ELISA を構築した。ELISA プレートに Mab55201 を固相後、血漿サンプルまたは標準品として脱脂アポ A-1、続いて HRP 標識ヤギ抗アポ A-1 抗体を反応させた。オルトフェニレンジアミンを含む基質液を反応させ 492nm における吸光度を測定した。各ステップにおける詳細な条件検討の結果、測定時間が 2.5 時間、測定範囲が 1.56~100 ng/ml、同時再現性が CV 10%以内の研究用試薬として十分な性能の測定系を確立した。

2. VLDL からの pre β 1-HDL の生成

VLDL から pre β 1-HDL が生成する可能性を検討した。まず、健常者にへパリン製剤を静脈注射し、その 15 分後及び 30 分後における血中 pre β 1-HDL、LPL、TG、及び遊離脂肪酸の各濃度変動を調べた。その結果、LPL 及び遊離脂肪酸濃度の上昇、及び TG 濃度の減少に伴い、pre β 1-HDL 濃度が上昇することが判明した。また、へパリン静注前後の血漿をゲル濾過クロマトグラフィーで分析した結果、VLDL 濃度の減少に伴い、pre β 1-HDL 濃度が上昇することが判明した。次に血漿より超遠心分離で分取した VLDL に市販のウシミルク LPL を添加後 37°C でインキュベートし、pre β 1-HDL 及び遊離脂肪酸濃度の変動を調べた。その結果、LPL 濃度及び反応時間の増加に伴い pre β 1-HDL 及び遊離脂肪酸濃度が上昇することが判明した。以上の結果から、LPL により VLDL 中の TG が加水分解することにより VLDL から pre β 1-HDL が生成することが判明し、この機序が pre β 1-HDL の生成機序の一つであることが確認された。

3. 血漿 pre β 1-HDL の存在様式の解明

健常者の新鮮血漿から Mab55201 結合 Sepharose カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィー及び Superdex 200HR カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーで高純度な pre β 1-HDL を精製し、その組成及び構造を分析した。リン脂質、コレステロール、及びトリグリセライド濃度を酵素法により測定した結果、何れの脂質も検出されなかった。SDS-PAGE 及び LC-MS/MS により蛋白組成を調べた結果、アポ A-1 のみが検出された。電子顕微鏡では、円盤型でなく球状の粒子のみが観察された。非変性 PAGE 及び非変性 2 次元電気泳動で血漿 pre β 1-HDL と lipid-free apoA-1 (脱脂アポ A-1) を比較した結果、違いは認められなかった。pre β 1-HDL 中のアポ A-1 が 1 分子あるいは 2 分子以上かを調べるため、2 種類の抗 pre β 1-HDL モノクローナル抗体 (Mab55201、Mab55205) を用いたサンドイッチ ELISA で Intact な血漿 pre β 1-HDL に対する反応性を調べた結果、血漿 pre β 1-HDL は、1 量体の lipid-free apoA-1 と同様に、エピトープが異なる抗体の組合せでは反応するが、同一抗体の組合せでは反応しなかった。以上の結果から、血漿 pre β 1-HDL は、脂質を含まない 1 量体のアポ A-1 であることが示唆された。

総括：

pre β 1-HDL 中のアポ A-1 を特異的に認識する抗 pre β 1-HDL モノクローナル抗体を獲得した。この抗体を用いサンドイッチ ELISA による簡便な pre β 1-HDL 測定系を確立した。これにより、動脈硬化症や脂質代謝研究における血中 pre β 1-HDL 濃度の簡便な測定が可能となった。

LPL の作用により VLDL から pre β 1-HDL が解離することを明らかにし、この機序が血中での pre β 1-HDL の生成経路の一つであることが確認された。

ヒト血漿 pre β 1-HDL は、1 分子のアポ A-1 からなる lipid-free apoA-1 であることが判明した。これにより、コレステロールの細胞外への搬出を担う ABCA1 のリガンドが血中を循環していることが証明された。

本論文の成果は、コレステロール逆転送経路の解明に重要な知見になるだけでなく、動脈硬化症や脂質

異常症の治療や予防、診断に関する研究の進展に寄与するものと考えられる。

よって本論文は、博士（生物資源科学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平 成 2 6 年 2 月 7 日