

ヒト血漿 pre $\beta$ 1-HDL の測定系確立と生成機序および存在様式の解明

日本大学大学院生物資源科学研究科

宮崎 修

2013

## 目次

### 略語のリスト

序論	1
第1章 抗 pre $\beta$ 1-HDL 抗体を用いた測定系の確立	6
第1節 緒言	7
第2節 材料及び方法	9
第3節 実験結果	18
第4節 考察	21
第2章 pre $\beta$ 1-HDL の生成機序の解明	37
第1節 緒言	38
第2節 材料及び方法	39
第3節 実験結果	41
第4節 考察	43
第3章 pre $\beta$ 1-HDL の存在様式の解明	50
第1節 緒言	51
第2節 材料及び方法	53
第3節 実験結果	60
第4節 考察	63
総合考察	79
要約	86
引用文献	87
謝辞	108

## 略語のリスト

アポ： アポリポ蛋白

TG： トリグリセライド

VLDL： 超低比重リポ蛋白

LPL： リポ蛋白リパーゼ

LDL： 低比重リポ蛋白

TC： 総コレステロール

LDL-C： LDL コレステロール

HDL： 高比重リポ蛋白

ABCA1： ATP-binding cassette transporter A1

LCAT： Lecithin-cholesterol acyltransferase

SR-B1： Scavenger receptor class B type 1

CETP： コレステロールエステル転送蛋白

HDL-C： HDL コレステロール

PAGE： ポリアクリルアミドゲル電気泳動

ELISA： Enzyme-linked immunosorbent assay

HRP： 西洋ワサビペルオキシダーゼ

PAG： ポリアクリルアミドゲル

OPD： オルトフェニレンジアミン塩酸塩

PBS-T： Phosphate buffered saline with Tween20 (0.05%)

DAB： ジアミノベンチジン

FPLC： Fast protein liquid chromatography

DTNB : 5,5' -dithiobis(2-nitrobenzoic acid)

HTGL : 肝性トリグリセライドリパーゼ

FFA : 遊離脂肪酸

PLTP : リン脂質転送蛋白

sPLA2 : Group IIA secretory phospholipase A2

SAA : 血清アミロイド A

BMI : Body mass index

PPAR $\alpha$  : Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$



## 序論

コレステロールは、細胞膜の構成成分やホルモンの原料として生体に不可欠の成分であり、食事からの摂取及び肝臓での合成により供給される。食事から摂取されたコレステロールは、小腸で吸収され、アポリポ蛋白（アポ）B48 と結合し、カイロミクロンと呼ばれるリポ蛋白として血中へ分泌され肝臓へと運ばれる。肝臓に蓄積及び肝臓で合成されたコレステロールは、アポ B100 と結合し、トリグリセライド（TG）を多く含む超低比重リポ蛋白（VLDL）として血中へ分泌される。VLDLは、粒子中のTGが血管壁に存在するリポ蛋白リパーゼ（LPL）により水解されることにより低比重リポ蛋白（LDL）となる。LDL中のコレステロールは、その後血中を循環し末梢へと運ばれる<sup>1)</sup>。血中の総コレステロール（TC）濃度及びLDLコレステロール（LDL-C）濃度は、冠動脈疾患の発症率と相関することが多くの疫学研究により明らかになっている<sup>2)</sup>。HMG-CoA還元酵素阻害剤（スタチン）によるLDL-C低下療法により冠動脈疾患のリスクをある程度下げることが可能になった<sup>3)</sup>。しかし、LDL-C低下療法のみでは冠動脈疾患のリスクを下げることに限界があることから、近年コレステロール逆転送系の活性化による冠動脈疾患の治療や予防の試みが注目されている<sup>4-9)</sup>。コレステロール逆転送系は、末梢組織に過剰に蓄積したコレステロールを肝臓へと戻す経路であり、様々なリポ蛋白、レセプター、酵素、脂質転送蛋白が関わる複雑な経路である<sup>10,11)</sup>。末梢組織に過剰に蓄積したコレステロールは、まず、高比重リポ蛋白（HDL）及びHDLを構成するアポ蛋白、主にアポ A-1によって引き抜かれる。アポ A-1は $\alpha$ ヘリックス構造を有する28kDaの蛋白であり、肝臓及び小腸の細胞で合成される<sup>10,12)</sup>。合成されたアポ A-1は直接血中に分泌されるか、あるいは臓器内の細胞膜上に存在するATP-binding cassette transporter A1

(ABCA1)を介し細胞膜上のリン脂質及び遊離型コレステロールを取込み pre $\beta$ -Nascent HDL として血中に分泌される<sup>13)</sup>。直接分泌されたアポ A-1 即ち lipid-free apoA-1 は、末梢組織に存在する ABCA1 を介し細胞膜上のリン脂質及び遊離型コレステロールを取込み pre $\beta$ -Nascent HDL となる<sup>14)</sup>。pre $\beta$ -Nascent HDL は、Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) の作用で粒子中の遊離型コレステロールがエステル化され粒子内部へ移行するのと同時に、粒子表面のコレステロール密度が低下することにより細胞膜上のコレステロールを取込み、成熟した HDL ( $\alpha$ -HDL) になると考えられている<sup>10-14)</sup>。エステル化された HDL 中のコレステロールは、肝臓の主要な HDL レセプターである Scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) を介し直接取込まれるか、あるいはコレステロールエステル転送蛋白 (CETP) の作用により LDL に転送後 LDL レセプターを介し肝臓に取込まれる<sup>4,5)</sup>。このようにコレステロール逆転送系の中心的役割を担っているのは HDL であり、血漿中の HDL コレステロール (HDL-C) 濃度と冠動脈疾患の発症率は逆相関することから、HDL-C は冠動脈疾患発症リスクの指標や脂質代謝マーカーとして臨床検査で採用されている<sup>15)</sup>。一方、CETP 欠損症において HDL-C が高い群では逆に冠動脈疾患の発症率が高いことや、家族性高コレステロール患者にプロブコールを投与すると、血漿 TC の著しい低下と黄色種の退縮が認められるにも関わらず、血漿 HDL-C は著しく低下することが知られている<sup>16-18)</sup>。これらのことから、HDL の量だけでなく質を評価する検査が求められている<sup>11,18,19)</sup>。

HDL は均一な粒子でなく、粒子サイズや脂質含量、アポ蛋白構成が異なる種々の亜分画が存在する<sup>6,20)</sup>。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き抜き能は高いことが報告されている<sup>21)</sup>。血漿 HDL を

荷電強度の違いによりアガロース電気泳動で分離すると、量的に主要な  $\alpha$ -HDL と僅かな pre $\beta$ -HDL に分離される<sup>22)</sup>。pre $\beta$ -HDL は、更に粒子サイズの違いにより非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) で分離すると pre $\beta$ 1、pre $\beta$ 2、pre $\beta$ 3 の 3 つの画分に分離される<sup>23)</sup>。pre $\beta$ 1-HDL は、血中で最も粒子サイズが小さいアポ A-1 含有粒子であり、細胞コレステロールのイニシャルアクセプターとして注目される<sup>23-26)</sup>。pre $\beta$ 1-HDL は血漿アポ A-1 の 1~5% しか存在しないが、培養細胞に血漿を添加するコレステロール引き抜き実験において、抗 pre $\beta$ 1-HDL 特異抗体の添加や血漿からの pre $\beta$ 1-HDL の除去により細胞から血漿へのコレステロール引き抜き量が著しく減少することから、コレステロール引き抜きに重要な役割を果たすと考えられている<sup>27-29)</sup>。しかし、pre $\beta$ 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<sup>30)</sup>。

pre $\beta$ 1-HDL が HDL の質を評価する検査として採用されるためには、様々な疾患や病態での血中濃度を測定し、臨床的な測定意義を明らかにすることが必要である。また、多数検体を精度良く簡便に測定する方法が必要となる。従来、血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は主に非変性二次元電気泳動法で測定されてきた<sup>31,32)</sup>。また、報告例は極めて少ないが、Ultrafiltration-isotope dilution 法による測定法も知られている<sup>33)</sup>。非変性二次元電気泳動法は、HDL の全ての亜分画が測定可能である反面、操作が煩雑であり、多数検体を同時に測定することができない。また、Ultrafiltration-isotope dilution 法は、放射性同位元素の使用が必要であることから、精度管理が容易でなく、また、限られた施設でしか測定できない。そこで、本研究の第 1 の目的を「血漿 pre $\beta$ 1-HDL の簡便な測定法の確立」とした。

pre $\beta$ 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 $\beta$ 1-HDL が解離する経路が知られている<sup>34)</sup>。また、潜在的な生成経路として TG-rich リポ蛋白から解離する経路が知られている<sup>35)</sup>。血中の TG-rich リポ蛋白は、食後に小腸から分泌されるカイロミクロンと肝臓から常時分泌される VLDL があり、何れも微量ではあるがアポ A-1 を含む<sup>1, 36-38)</sup>。カイロミクロン中のアポ A-1 は、以前から HDL 中のアポ A-1 の前駆体的一部分であると言われている<sup>39, 40)</sup>。また、カイロミクロンと VLDL から LPL の作用で pre $\beta$ -HDL が生成するとの報告がある<sup>35)</sup>。しかし、この pre $\beta$ -HDL は、構造的に pre $\beta$ 1-HDL と異なる pre $\beta$ 2-HDL 等の他の pre $\beta$ -HDL を含むことから、TG-rich リポ蛋白から pre $\beta$ 1-HDL が生成する根拠としては必ずしも十分ではない。著者は、本論文の第 1 章において、血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は脂質異常症患者で高いことを示した<sup>41)</sup>。脂質異常症は血漿コレステロール濃度または TG 濃度が高い疾患である。TG-rich リポ蛋白はその両方を多く含むことから、TG-rich リポ蛋白からの pre $\beta$ 1-HDL の生成亢進が脂質異常症患者における血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度の高値化と関係することが考えられた。本研究で用いた血漿は、一夜絶食した対象者から早朝採血した検体であることから、血漿中の TG-rich リポ蛋白としては主に肝臓由来の VLDL であると推察される。そこで、本研究の第 2 の目的を VLDL からの pre $\beta$ 1-HDL の生成機序の解明とした。

pre $\beta$ 1-HDL の存在様式については、様々な異なる結果が報告されていることから、明確になっていない<sup>23, 24)</sup>。アポ A-1 が細胞膜上の ABCA1 を介してコレステロールを引き抜き、成熟 HDL のもとになる pre $\beta$ -Nascent HDL が形成されることが 1999 年に明らかになった<sup>13, 14)</sup>。このことにより、pre $\beta$ 1-HDL がこの反応の基質である lipid-free apoA-1 または微量のリン脂質のみを含む

lipid-poor apoA-1 であるのか、あるいは、細胞から引き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 $\beta$ -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。pre $\beta$ 1-HDL は、タンジール病患者の血漿中に唯一のアポ A-1 含有粒子として存在することが知られている<sup>42,43)</sup>。タンジール病は、ABCA1 遺伝子の変異によりアポ A-1 によるコレステロール引き抜きが損なわれる疾患である<sup>44-46)</sup>。タンジール病患者の繊維芽細胞では、lipid-free apoA-1 (脱脂アポ A-1) によるコレステロール及びリン脂質の引き抜きが全く起こらず HDL が形成されない<sup>47)</sup>。従って、血漿 pre $\beta$ 1-HDL は ABCA1 を介するコレステロール引き抜き反応の基質となる lipid-free or poor apoA-1 であると考えられる。しかし、pre $\beta$ 1-HDL がコレステロールを含むとの報告<sup>25,48,49)</sup>があり、また、pre $\beta$ 1-HDL が 2 分子のアポ A-1 を含むことや円盤型の粒子であることが多くの論文で述べられている<sup>6,11,34)</sup>。そこで、本研究の第 3 の目的を血漿 pre $\beta$ 1-HDL の存在様式の解明とした。

本論文の第 1 章では抗 pre $\beta$ 1-HDL モノクローナル抗体の作製、及びその抗体を用いたサンドイッチ ELISA による血漿 pre $\beta$ 1-HDL 測定系の確立について<sup>41)</sup>、第 2 章では LPL による VLDL からの pre $\beta$ 1-HDL の生成について<sup>50)</sup>、第 3 章では血漿 pre $\beta$ 1-HDL の存在様式について<sup>51)</sup>検討した結果を示す。総合考察では、本研究で得られた結果とこれまでの知見をもとに、pre $\beta$ 1-HDL の生理的意義、及び pre $\beta$ 1-HDL の生成や異化に影響を与える血中因子と様々な疾患における血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度との関係を考察し、pre $\beta$ 1-HDL のバイオマーカーとしての可能性を論じる。

## 第 1 章

### 抗 pre $\beta$ 1-HDL 抗体を用いた測定系の確立

## 第1節 緒言

サンドイッチ ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) は、様々な高分子化合物を迅速、簡便且つ正確に測定する方法として検査や研究の分野で広く利用されている<sup>52)</sup>。サンドイッチ ELISA による血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度の測定法を確立するため、アポ A-1 を免疫原として抗 pre $\beta$ 1-HDL モノクローナル抗体の作製を試みた。アポ A-1 に対するモノクローナル抗体は様々な報告があり、その多くは認識部位の違いにより種々の HDL 亜分画に対する反応性が異なることが報告されている<sup>27, 53-58)</sup>。著者らは、アポ A-1 のみを含む pre $\beta$ 1-HDL とアポ A-1 とアポ A-2 の両方を含む HDL では、粒子中のアポ A-1 の立体構造が異なること、即ち抗体が結合可能な粒子表面に露出するアポ A-1 上の部位が異なると推測し、独自に考案したスクリーニング法を用いて pre $\beta$ 1-HDL 中のアポ A-1 のみに反応する抗体を選択した。獲得した抗体の特異性は、血漿中の各蛋白に対する反応性をウェスタンブロット法で、LpA-1 (アポ A-1 のみを含むリポ蛋白) 及び LpA-1:A-2 (アポ A-1 とアポ A-2 の両方を含むリポ蛋白) に対する反応性及び血漿ゲルろ過フラクションに対する反応性をサンドイッチ ELISA で、pre $\beta$ 1-HDL 及び他の HDL 亜分画に対する反応性を非変性二次元電気泳動法で検討した。獲得抗体のエピトープは、アポ A-1 の各種合成ペプチドに対する反応性をペプチド競合 ELISA で、臭化シアン分解物に対する反応性をウェスタンブロット法で検討し、また、2種の抗体のエピトープの競合性を抗体競合 ELISA で検討した。次に獲得した抗体とヤギ抗アポ A-1 抗体を用いたサンドイッチ ELISA による pre $\beta$ 1-HDL 測定系を構築し、検量線の形状、希釈直線性、及び同時再現性等の基本性能を確認した。更に構築した測定系の臨床的意義を検討するため、健常者と脂質異常者の血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度を測定し、両群の値を比較した。以上の

通り、本章では pre $\beta$ 1-HDL 中のアポ A-1 を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製、及び獲得した抗体の特異性とエピトープ、構築したサンドイッチ ELISA による血漿 pre $\beta$ 1-HDL 測定系の基本性能、及びその測定系を用い測定した健常者及び脂質異常症患者の血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度について検討した結果を示す。



## 第2節 材料及び方法

### 1. 材料

健常者は、積水メディカル（株）の社員で血漿 TC が 220 mg/dl 未満、且つ TG 濃度が 150 mg/dl 未満のボランティアを対象とした。脂質異常症は、千葉大学病院の外来患者で血漿 TC が 220 mg/dl 以上、または TG 濃度が 150 mg/dl 以上の被験者を対象とした。研究プロトコールは、千葉大学医学部の治験審査委員会により承認され、全ての被験者から事前にインフォームドコンセントを取得した<sup>41)</sup>。各被験者から早朝空腹時に静脈血を EDTA 入りの真空採血管（テルモ）に採取し、即時に氷水に浸し冷却した。遠心分離（4 °C、2000 rpm、30 min）により血漿を分離し、使用するまで氷水中で保存した。ヤギ抗アポ A-1 抗体、及びヤギ抗アポ A-2 抗体は、ヒト血清より精製したアポ A-1 及びアポ A-2 をヤギに免疫して得た抗血清から精製した IgG 画分を用いた。抗アポ A-1 モノクローナル抗体（14208）は、以前積水メディカル社内で取得された抗アポ A-1 モノクローナル抗体ライブラリーの中から、アポ A-1 に特に強く反応する抗体を選択した。抗体の西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）標識は、Nakane らの方法<sup>59)</sup>に従い、過ヨウ素酸法で行った。抗体の Biotin 標識は、EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin（Thermo Scientific）を用いメーカー推奨の方法で行った。SDS-PAGE に使用したポリアクリルアミドゲル（PAG）、及びウエスタンブロットの転写に使用した蛋白質転写セットは、コスモバイオより購入した。アポ A-1 の 25 種類のペプチドは、蛋白精製工業（群馬）に合成を依頼した。各ペプチドの分子量は MALDI-TOF MS で理論値と同等であること、純度は HPLC で 95% 以上であることを確認した。

## 2. 脱脂アポ A-1 の調製

健常者血漿を Harvel らの方法<sup>60)</sup>に従って超遠心分離により比重が 1.063～1.21 の HDL 画分を分取した。1 ml の HDL に対し、約 30 倍量のエタノール、エーテルの混合液 (3:2, v/v) を加え、4 °C で回転振とう機を用い一夜振とうした。これを遠心分離 (5000 rpm, 10 min) し、上清を除去した。残存した沈殿にエーテルを加え、振とう (4°C, 1h)、遠心分離 (5000 rpm, 10 min)、上清除去を 2 回行い、脂質成分を除去した。沈殿に窒素ガスを吹きかけエーテルを完全に除去した。沈殿を少量の 8 mol/l の尿素で溶解し、Sephacryl S-200 (GE Healthcare) を用いたゲルろ過クロマトグラフィーで蛋白を分離した。SDS-PAGE で分子量約 28,000 の単一のバンドを有するフラクションを確認し、プールした。これを PBS (0.15 mol/l NaCl, 20 mmol/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH7.2) で透析し、脱脂アポ A-1 (精製アポ A-1) とした。脱脂アポ A-1 の濃度は Micro BCA Protein Assay Reagent (Thermo Scientific) を用い BSA を標準品として測定した。

## 3. 抗体作製

### (1) 免疫

免疫原として脱脂アポ A-1 (50  $\mu\text{g}$ ) を完全フロイントアジュバント (GIBCO) と 1 対 1 で混和乳化後、6 週齢の雌 Balb/c マウスの皮下に 1～2 週間間隔で 3～7 回投与した。細胞融合 2～4 日前に最終免疫として脱脂アポ A-1 (0.1 mg) を腹腔に投与した。尚、本研究におけるマウスを用いた実験は、積水メディカル (株) の動物実験倫理規定に基づき、動物実験倫理委員会の承認を得て実施

した。

## (2) 細胞融合

免疫後のマウスを頸椎脱臼で安楽死させ、無菌的に脾臓を摘出した。単一にした脾臓細胞とマウスミエローマ細胞株 SP2/0-Ag14 を 6 対 1 の割合で混合し、Kohler と Milstein の方法<sup>61)</sup>に従い 50% ポリエチレングリコール 1540 (和光純薬) 存在下にて細胞融合を行った。融合細胞は脾臓細胞として  $2.5 \times 10^6$  /ml になるように HAT 液 (コスモバイオ) を含む 15% FCS-RPMI1640 培地に懸濁し、96 穴培養プレート (CORNING) に分注 (0.2 ml/well) した。37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養し、1~2 週間後に各ウェルの培養上清を用いスクリーニングを行った。

## (3) スクリーニング

96 穴 ELISA プレート (Nunc) に PBS で 5 µg/ml の濃度に希釈したヤギ抗マウス IgG (Fc) 抗体 (Jackson) を分注 (50 µl/well) し、4°C で一夜静置した。プレートを PBS で洗浄後、1% BSA-PBS を分注 (100 µl/well) し、室温で 1 時間静置した。1% BSA-PBS を除去後、各ウェルの培養上清を分注 (50 µl/well) し、室温で 1 時間静置した。1% BSA-PBS で洗浄後、1% BSA-PBS で 1000 倍希釈した血漿を分注 (50 µl/well) し、室温で 1 時間静置した。1% BSA-PBS で洗浄後、Biotin 標識ヤギ抗アポ A-1 抗体または Biotin 標識ヤギ抗アポ A-2 抗体を分注 (50 µl/well) し、室温で 1 時間静置した。1% BSA-PBS で洗浄後、HRP 標識 Streptavidin (Thermo Scientific) を分注 (50 µl/well) し、室温で 1 時間静置した。1% BSA-PBS で洗浄後、0.2% の OPD (オルトフェニレンジアミン塩

酸塩) (東京化成) 及び 0.02%の過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 (pH 5.2) を分注 (50  $\mu$ l/well) し、室温で 10 分間静置した。0.75 mol/l 硫酸を分注 (50  $\mu$ l/well) し、プレートリーダー (マルチスキャンプラス MK II, タイターテック) で 492 nm における吸光度を測定した。Biotin 標識抗アポ A-1 抗体を用いた系で高い反応性を示し、且つ Biotin 標識抗アポ A-2 抗体を用いた系で反応性を示さない株を選択した。

#### (4) モノクローナル抗体の調製

選択した抗体産生株を限界希釈法によりクローニングし、増殖培地 (15% FCS-RPMI1640) にて継代培養した。回収した細胞を 2 週間前に Pristane (2, 6, 10, 14-tetra-methyl-pentadecane, Sigma) を投与しておいた 12 週齢の雌 Balb/c マウスの腹腔内に投与し、2 週間後に腹水を採取した。腹水を等量のプロテイン A 吸着用緩衝液 (3 mol/l NaCl, 1.5 mol/l Glycine-NaOH, pH 8.5) と混和後、プロテイン A-Sepharose カラム (GE Healthcare) に IgG を吸着させた。0.1 mol/l クエン酸緩衝液 (pH 3.0) で溶出後、PBS で透析しモノクローナル抗体を回収した。

## 4. 抗体の特異性確認

獲得した 2 種類のモノクローナル抗体 (MAb55201、MAb55205) の特異性を検討するため、次の実験を実施した。

### (1) 血漿蛋白に対する反応性

ヒト健常者血漿を SDS-PAGE 用サンプル処理液 (コスモバイオ) で 500 倍希

釈し、5 分間煮沸処理した。これを PAG 15/25 (コスモバイオ) に添加 (5  $\mu$ l/well) し、40 mA で 1 時間 SDS-PAGE を行った。セミドライプロッター (コスモバイオ) を用いゲル中の蛋白を PVDF 膜に転写 (80 mA, 1 h) した。PVDF 膜を 3% スキムミルク-PBS-T (Phosphate buffered saline with 0.05% Tween20) でブロッキング後、一次抗体として各モノクローナル抗体 (5  $\mu$ g/ml) を、二次抗体として HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Biosource) を反応させた。PVDF 膜を PBS-T で洗浄後、2% の DAB (ジアミノベンチジン, Dojindo) 及び 0.03% の過酸化水素を含む 0.1 mol/l Tris 塩酸緩衝液 (pH 7.6) を基質として加え、染色した。

## (2) LpA-I、LpA-I:A-II に対する反応性

ELISA プレートに PBS で 5  $\mu$ g/ml の濃度に希釈した各モノクローナル抗体を分注 (50  $\mu$ l/well) し、4  $^{\circ}$ C で一夜静置した。プレートを PBS で洗浄後、1% BSA-PBS を分注 (100  $\mu$ l/well) し、室温で 1 時間静置した。1% BSA-PBS を除去後、1% BSA-PBS で 2121 倍希釈したヒト健常者血漿を分注 (50  $\mu$ l/well) し、室温で 1 時間静置した。0.1% BSA-PBS で洗浄後、Biotin 標識ヤギ抗アポ A-1 抗体または Biotin 標識ヤギ抗アポ A-2 抗体を分注 (50  $\mu$ l/well) し、室温で 1 時間静置した。洗浄後、HRP 標識 Streptavidin を分注 (50  $\mu$ l/well) し、室温で 30 分間静置した。洗浄後、次の通り HRP 活性を測定した。OPD 及び過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 (pH 5.2) を分注 (50  $\mu$ l/well) し、室温で 10 分間静置した。0.75 mol/l 硫酸を分注 (50  $\mu$ l/well) し、プレートリーダーで 492 nm における吸光度を測定した。

## (3) 血漿ゲル濾過画分に対する反応性

ヒト健常者血漿 (0.2 ml) をゲル濾過用カラム 4 本 (TSK-GEL G3000SW, 7.5 mm ID x 60 cm 2 本、同 G3000SW, 7.5 mm ID x 30 cm、Superdex 200 HR 10/30) を接続させた Fast protein liquid chromatography (FPLC, GE Healthcare) を用い、0.9% NaCl を溶出液として流速 0.15 ml/min. で分離した。分離開始から 180 分経過後、フラクションコレクターを作動させ、0.45ml/Fr. で溶出液を回収した。各フラクションに対する各モノクローナル抗体の反応を次のサンドイッチ ELISA で調べた。ELISA プレートに PBS で 5  $\mu$ g/ml の濃度に希釈した各モノクローナル抗体を分注 (50  $\mu$ l/well) し、4 $^{\circ}$ C で一夜静置した。プレートを PBS で洗浄後、1% BSA-PBS を分注 (100  $\mu$ l/well) し、室温で 1 時間静置した。1%BSA-PBS を除去後、1% BSA-PBS で 101 倍希釈した各フラクションを分注 (50  $\mu$ l/well) し、室温で 1 時間静置した。0.1% BSA-PBS で洗浄後、HRP 標識ヤギ抗アポ A-1 抗体を分注 (50 $\mu$ l/well) し、室温で 1 時間静置した。洗浄後、(2) と同様に HRP 活性を測定した。

#### (4) 加温処理血漿に対する反応性

ヒト健常者血漿 (1 ml) にリン酸バッファー ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 mol/l, pH7.4) で 20 mmol/l で溶解した 5, 5' -dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, Sigma) またはリン酸バッファーを各 0.1 ml 添加し、37  $^{\circ}$ C でインキュベートした。経時的に 50  $\mu$ l ずつ分取し、50% スクロースで 11 倍希釈後氷冷した。測定直前に 1% BSA-PBS で更に 101 倍希釈し、各加温処理血漿に対する各モノクローナル抗体の反応を (3) と同じサンドイッチ ELISA で調べた。

#### (5) 非変性二次元電気泳動法による分析

獲得したモノクローナル抗体 MAb55201 又は Control マウス IgG を等量の健常者血漿と混和し、4 °C で 5 分間静置した。これを 0.75% アガロースゲル (50 mmol/l バルビタールバッファー, pH8.6) を用いた電気泳動で分離した。泳動後のアガロース切片を 2-15% PAG を用いた電気泳動で分離した。分離した PAG 中の HDL 亜分画はニトロセルロース膜に転写後、<sup>125</sup>I 標識ヤギ抗アポ A-1 抗体を用いたウェスタンブロッティング法<sup>62)</sup>で検出した。

## 5. 抗体のエピトープの検討

獲得した 2 種類のモノクローナル抗体 (MAb55201、MAb55205) のエピトープを調べるため、次の実験を実施した。

### (1) ペプチド競合 ELISA

ELISA プレートに PBS で 0.5 µg/ml の濃度に希釈した脱脂アポ A-1 を分注 (50 µl/well) し、4°C で一夜静置した。プレートを PBS-T で洗浄後、1% BSA-PBS-T を分注 (100 µl/well) し、室温で 1 時間静置した。1 %BSA-PBS-T を除去後、段階希釈した各ペプチド (25 µl/well) を、続いて 200 ng/ml の各モノクローナル抗体を分注 (25 µl/well) し、室温で 1 時間静置した。洗浄後、HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を分注 (50 µl/well) し、室温で 1 時間静置した。洗浄後、4 の (2) と同様に HRP 活性を測定した。

### (2) アポ A-1 の臭化シアン分解物に対する反応性

アポ A-1 の臭化シアン断片は、Morrison らの方法<sup>63)</sup>で次のように調製した。0.1 mg の脱脂アポ A-1 を精製水で透析後凍結乾燥し、0.2 ml の 70% TFA に溶

解した。1 mg/ml の濃度で 70% TFA に溶解した臭化シアン（和光）を 0.2 ml 添加し、窒素ガスを吹きかけながら密栓し、暗黒下、室温で 2 時間静置した。3 ml の精製水を添加後凍結乾燥した。各断片は、SDS-PAGE における分子量と N 末端アミノ酸解析で特定した。アポ A-1 の臭化シアン分解物（5  $\mu\text{g}/\text{lane}$ ）を SDS-PAGE で分離後、4 の（1）と同様にウェスタンブロットを行い、各モノクローナル抗体が反応するバンドを確認した。

### （3）抗体競合 ELISA

（1）のペプチド競合 ELISA と同様に脱脂アポ A-1 をコートしたプレートに各濃度に希釈した未標識の各モノクローナル抗体（25  $\mu\text{l}/\text{well}$ ）を、続いて Biotin 標識の各モノクローナル抗体（1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を分注（25  $\mu\text{l}/\text{well}$ ）し、室温で 1 時間静置した。洗浄後、HRP 標識 streptavidin を分注（50  $\mu\text{l}/\text{well}$ ）し、室温で 30 分間静置した。洗浄後、4 の（2）と同様に HRP 活性を測定した。

## 6. サンドイッチ ELISA による pre $\beta$ 1-HDL 測定系

ELISA プレートに PBS で 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度に希釈した MAb55201 を分注（50  $\mu\text{l}/\text{well}$ ）し、4  $^{\circ}\text{C}$  で一夜静置した。プレートを PBS で洗浄後、1% BSA-PBS を分注（100  $\mu\text{l}/\text{well}$ ）し、室温で 1 時間静置した。1% BSA-PBS を除去後、1% BSA-PBS で希釈した脱脂アポ A-1（標準品）またはヒト血漿を分注（50  $\mu\text{l}/\text{well}$ ）し、室温で 1 時間静置した。0.1% BSA-PBS で洗浄後、HRP 標識ヤギ抗アポ A-1 抗体を分注（50  $\mu\text{l}/\text{well}$ ）し、室温で 1 時間静置した。洗浄後、4 の（2）と同様に HRP 活性を測定した。標準品の吸光度から検量線を作成し、血漿中 pre $\beta$ 1-HDL



濃度を算出した。

## 7. 脂質関連項目の測定

血漿中の TC、TG、及び HDL-C は酵素法、アポ A-1 濃度は免疫比濁法による各自動分析用試薬（積水メディカル）を用い測定した。

### 第3節 実験結果

#### 1. モノクローナル抗体の作製

抗 pre $\beta$ 1-HDL モノクローナル抗体の作製を試みた結果、アポ A-1 と反応する約 120 株の中から、ヤギ抗アポ A-1 抗体を用いた系で反応し、且つヤギ抗アポ A-2 抗体を用いた系で反応しないモノクローナル抗体を産生する 2 種類 (55201、55205) のハイブリドーマが選択された。これらをクローニング後、腹水化及び IgG 精製を行った結果、高純度の IgG が得られた。サブクラスを調べた結果、両抗体ともに IgG1 ( $\gamma$ 1,  $\kappa$ ) であった。

#### 2. モノクローナル抗体の特異性

各抗体の血漿蛋白に対する反応性をウェスタンブロット法で調べた結果、獲得した 2 種類の抗体 (MAb55201、MAb55205) 及び MAb14208 は分子量約 28,000 のアポ A-1 に対して特異的に反応することが確認された (Fig. 1-1)。血漿 LpA-1 及び LpA-1:A-2 に対する反応を調べた結果、MAb55201、及び MAb55205 は Biotin 標識ヤギ抗アポ A-1 抗体の系のみで反応し、Biotin 標識ヤギ抗アポ A-2 抗体の系では反応が認められなかった。一方、MAb14208 は、両方の ELISA 系で強い反応が認められた (Fig. 1-2)。血漿のゲルろ過フラクションに対する反応を調べた結果、MAb55201、及び MAb55205 は分子量 67,000 以下の pre $\beta$ 1-HDL が含まれるフラクションとのみ反応を示した。一方、MAb14208 は、分子量 67,000 以下のフラクションだけでなく高分子量の HDL を含むフラクションにも反応を示した (Fig. 1-3)。加温処理血漿を用いてアポ A-1 含有粒子に対する反応を調べた結果、MAb55201、及び MAb55205 のアポ A-1 含有粒子に対する反応は血漿の加温処理時

間に応じて著しく減少し、DTNB の添加でその減少が阻止されることが判明した。一方、MAb14208 のアポ A-1 含有粒子に対する反応は血漿の加温処理の有無で影響が見られなかった (Fig. 1-4)。血漿と MAb55201 又は Control IgG の混合液を非変性二次元電気泳動法で分析した結果、MAb55201 添加系では pre $\beta$ 1-HDL のスポットが消失し、代わりに抗体と pre $\beta$ 1-HDL との複合体と思われるスポットが検出された。一方、pre $\beta$ 1-HDL 以外の HDL 亜分画については、変化が認められなかった (Fig. 1-5)。

### 3. モノクローナル抗体のエピトープ

ペプチド競合 ELISA でアポ A-1 の 25 種類のペプチドに対する各抗体の反応を調べた。その結果、MAb14208 は aa97-116 のペプチドのみに反応したことから、MAb14208 のエピトープは aa97-116 に含まれることが判明した。一方、MAb55201 及び MAb55205 は何れのペプチドにも反応しなかった (Table 1-1)。ウェスタンブロット法により、アポ A-1 の臭化シアン分解物に対する各抗体の反応を調べた結果、MAb55201 は F4(aa149-243)に僅かに反応を示したが、F2-4(aa87-243)、及び F3-4 (aa113-243) には反応しなかった。MAb55205 は F2-4 (aa87-243) に弱い反応、F1-3 (aa1-148) 及び F3-4 (aa113-243) に明確な反応を示したが、F3(aa113-148)には反応を示さなかった (Fig. 1-6)。抗体競合 ELISA で MAb55201 と MAb55205 のアポ A-1 に対する反応の競合性を調べた結果、非標識の MAb55205 は Biotin 標識 MAb55201 のアポ A-1 に対する反応を阻害せず、また、非標識の MAb55201 は Biotin 標識 MAb55205 のアポ A-1 に対する反応を阻害しなかった (Fig. 1-7)。このことから、MAb55201 と MAb55205 は互いに異なるエピトープ

を認識することが判明した。

#### 4. サンドイッチ ELISA の構築

MAb55201 を用いサンドイッチ ELISA による血漿 pre $\beta$ 1-HDL 測定系の構築を試みた。脱脂アポ A-1 を段階希釈し各濃度における反応を調べた結果、0 から 100 ng/ml まで濃度依存的な吸光度の上昇が確認された (Fig. 1-8)。これを検量線として段階希釈した血漿 3 検体を測定した結果、何れの検体も希釈倍率に応じた測定値となり、良好な希釈直線性が確認された (Fig. 1-9)。濃度の異なる 3 検体を用いプレート内同時再現性を検討した結果、CV が 3.1%から 5.3%と良好な結果が得られた (Table 1-2)。

#### 5. 患者検体の測定

構築したサンドイッチ ELISA で 47 名の脂質異常症患者及び 25 名の健常者の血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度を測定した。対象者の背景を Table 1-3 に示す。血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は、脂質異常症群が健常群に比べ有意に高値となった ( $39.3 \pm 10.1$  vs.  $22.5 \pm 7.5$  mg/l,  $p < 0.001$ ) (Fig. 1-10)。一方、総アポ A-1 濃度は両群で有意な差が無かった ( $144.2 \pm 28.4$  vs.  $145.3 \pm 16.3$  mg/dl) (Fig. 1-10)。

#### 第4節 考察

pre $\beta$ 1-HDL の免疫学的な測定系を確立するため、pre $\beta$ 1-HDL 中のアポ A-1 を特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を試みた。アポ A-1 は pre $\beta$ 1-HDL 以外の HDL にも存在するが、著者らはアポ A-1 のみを有する pre $\beta$ 1-HDL とアポ A-2 など他のアポリポ蛋白も有する HDL で粒子中のアポ A-1 の存在様式、即ち粒子表面に露出されているアポ A-1 上の局所部位が異なると推測した。この推測の下、第2節で示した2種類のサンドイッチ ELISA によるスクリーニングを行った結果、有望な2種類のモノクローナル抗体を得ることができた。

獲得したモノクローナル抗体の特異性を確認するため、pre $\beta$ 1-HDL の特徴を踏まえた試験を行った。血漿ゲルろ過分離フラクションに対しては、一般的なアポ A-1 抗体のスクリーニング法で取得した MAb14208 が HDL の全てのフラクションで反応したのに対し、本研究で獲得した有望抗体 (MAb55201、MAb55205) は pre $\beta$ 1-HDL を含む分子量 67kD 以下のフラクションのみに反応した。加温処理血漿に対しては、MAb14208 が加温処理による影響がなかったのに対し、有望抗体は加温時間に応じて反応が低下し DTNB の添加によりその低下が抑制された。血漿を 37°C で加温すると血漿 pre $\beta$ 1-HDL は加温時間に応じて著しく減少すること、及びその濃度の減少は LCAT 活性を阻害する DTNB の添加により抑制されることが知られている<sup>64)</sup>。このことから、MAb55201 及び MAb55205 は加温による血漿 pre $\beta$ 1-HDL の濃度変化に応じて反応が変化したと考えられた。非変性二次元電気泳動法による検討では、MAb55201 は pre $\beta$ 1-HDL とのみ反応し、pre $\beta$ 1-HDL 以外の HDL 亜分画には反応が認められなかった。以上の結果から、MAb55201 及び MAb55201 は何れも pre $\beta$ 1-HDL 中のアポ A-1 を特異的に認識する抗体であることが示唆された。

MAb55201 及び MAb55201 のエピトープを検討するため、25 種類のアポ A-1 ペプチド及びアポ A-1 の臭化シアン分解物に対する反応、及び抗体競合 ELISA で両抗体のエピトープ競合性を調べた。その結果、両抗体が互いに異なるエピトープを認識することは確認できたが、両抗体の各エピトープを特定することはできなかった。原因として、両抗体がアポ A-1 上のかなり長い配列を認識するか、あるいはアポ A-1 上の不連続エピトープを認識することが考えられた。Sviridov ら<sup>65)</sup>は、著者との共同研究においてアポ A-1 の各種リコンビナントを用い MAb55201 のエピトープを検討した。MAb55201 は aa210-243 を欠除したりリコンビナントに反応するのに対し、aa140-150 を欠除したりリコンビナント及び aa150-243 を欠除したりリコンビナントに反応しないことから、エピトープは aa140 から aa210 の間に存在することが推定された<sup>65)</sup>。本研究において MAb55201 は F4 (aa149-243) に反応したことから、エピトープは aa149-210 の間に存在すると考えられるが、F4 に対する反応性が非常に弱いことから断定はできない。pre $\beta$ 1-HDL 中のアポ A-1 を特異的に認識する抗体としては、Fielding らによる報告がある<sup>27)</sup>。この抗体 (Mab-9) は、アポ A-1 の aa137-144 をエピトープとし、血漿を用いたコレステロール引き抜き実験で細胞からのコレステロールの引き抜きを阻止することが報告されている<sup>27)</sup>。Sviridov らは著者との共同研究において MAb55201 を用いて同様の実験を行った。その結果、MAb55201 は細胞からのコレステロール引き抜きを阻止しなかった<sup>65)</sup>。Mab-9 と MAb55201 でエピトープが異なることがコレステロール引き抜きに対する作用が異なる原因と思われた。Lipid-free apoA-1 に対する特異抗体としては、725-1E2 が知られている<sup>66-68)</sup>。この抗体は著者が作製し、Okuhira ら<sup>66)</sup>が lipid-free apoA-1 に反応し HDL 中のアポ A-1 に反応しないことを確認した抗体である。この抗体

を用いることにより、HDL から解離した lipid-free apoA-1 が ABCA1 を介して細胞膜上のコレステロールを引き抜くことが証明された<sup>66)</sup>。本論文ではデータを示さないが、725-1E2 は 55201 及び 55205 と同じ特異性を示すことが確認されている。著者は 725-1E2 のエピトープについても同様に検討したが、特定することはできなかった。

獲得したモノクローナル抗体 (MAb55201) を用いサンドイッチ ELISA による血漿 pre $\beta$ 1-HDL 測定系を構築した。構築した測定系は血漿検体を測定するのに測定範囲 (1.56~100ng/ml)、再現性ともに十分な性能を示した。また、その後の検討で本測定系が従来法である非変性二次元電気泳動法と良好な相関性を示すことが確認された (Fig. 1-11)<sup>69)</sup>。本測定系はキット化され、これを用いることにより簡便に精度良く多数検体を短時間 (約 2.5 時間) で測定することが可能となった。更に、本測定系は高い測定感度を有することから、血液以外の検体の測定も可能であり、pre $\beta$ 1-HDL の基礎研究用としても有用と思われる。

本測定系の臨床的意義を検討するため、脂質異常症患者及び健常者の血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度を測定し比較した結果、血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は健常群に比べ脂質異常症群が著しく高値となることが判明した (Fig. 1-10)。高コレステロール血症や高 TG 血症で血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度が高値であることは、Miida らによる非変性二次元電気泳動法での結果と一致した<sup>32, 62)</sup>。しかし、コレステロール逆転送系の最初のステップで重要な役割を果たすと言われる pre $\beta$ 1-HDL が動脈硬化を惹起する疾患で高値化する原因については不明であり、今後の検討が必要である。

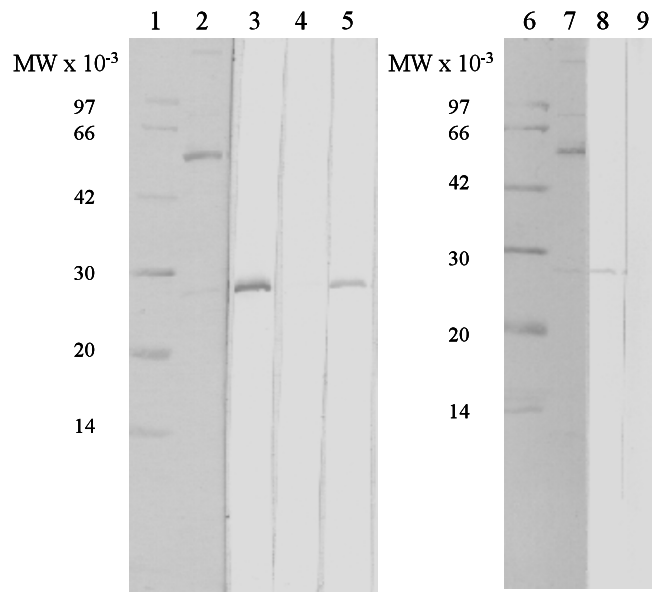


Fig. 1-1 Western blot analysis to confirm the reactivity of each monoclonal antibody to apoA-1 in plasma.

1, 6: Molecular weight marker, 2-5, 7-9: Plasma, 1, 2, 6, 7: CBB staining, 3-5, 8, 9: Immunostaining, 3: MAb14208, 4, 9: Control mouse IgG, 5: 55201, 8: 55205



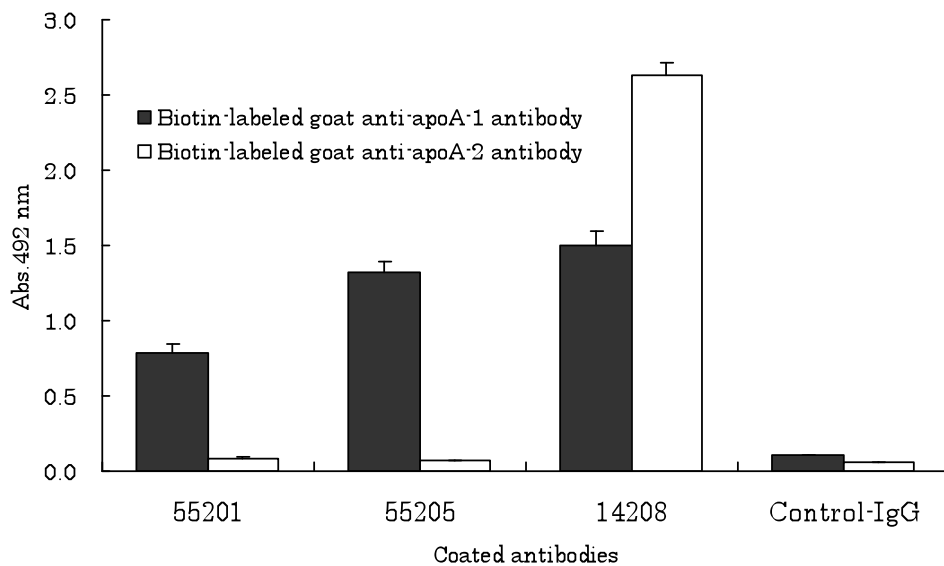


Fig. 1-2 Reactivity of each monoclonal antibody with LpA-1 and LpA-1:A-2. Error bars represent the SD of three measurements.

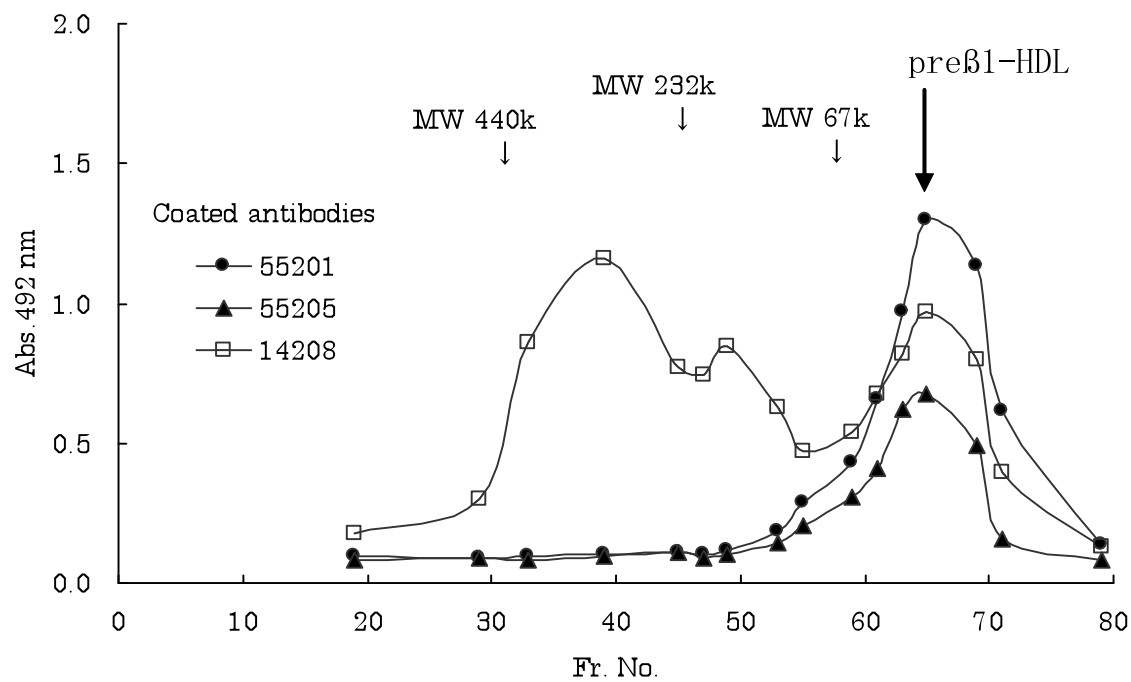


Fig. 1-3 Reactivity of each monoclonal antibody with plasma lipoprotein fractions separated by gel filtration chromatography. Each point represents the average of duplicate measurements.

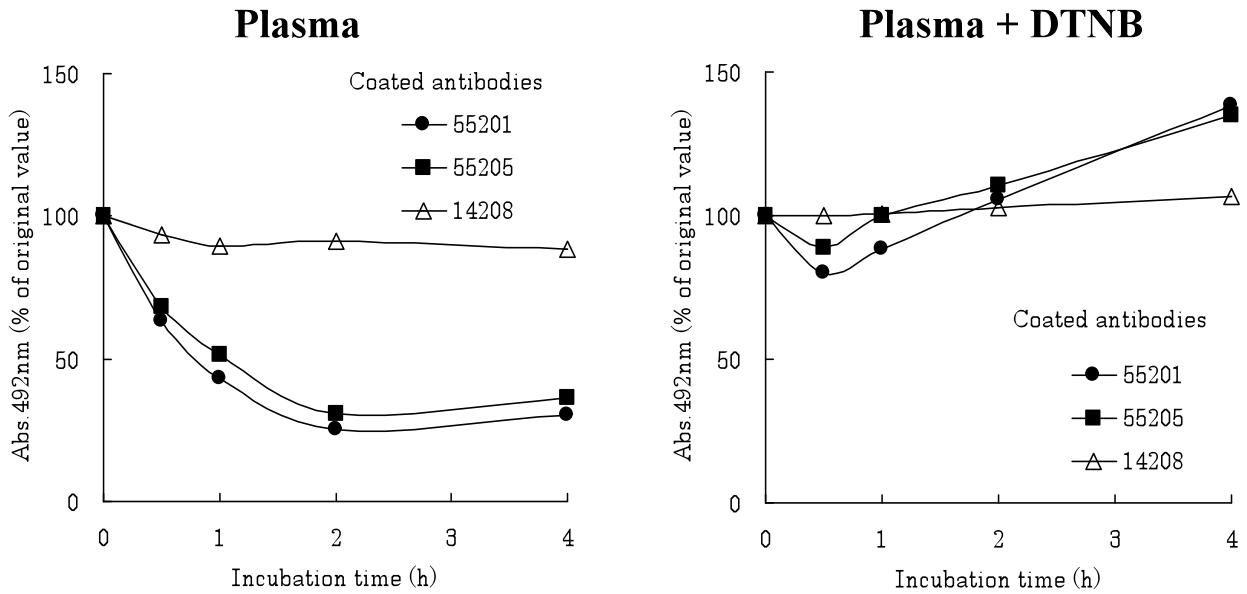


Fig. 1-4 Effects of incubation at 37°C in the presence and absence of DTNB on the reactivity of each monoclonal antibody with plasma apoA-1-containing particles. Values are expressed as % of the baseline value (before incubation). Each point represents the average of duplicate measurements.

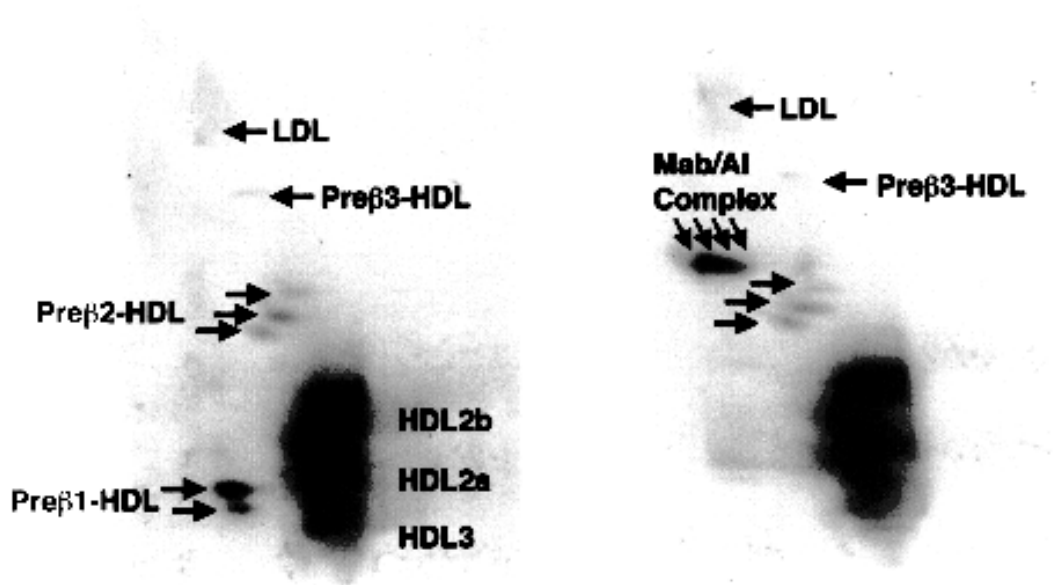


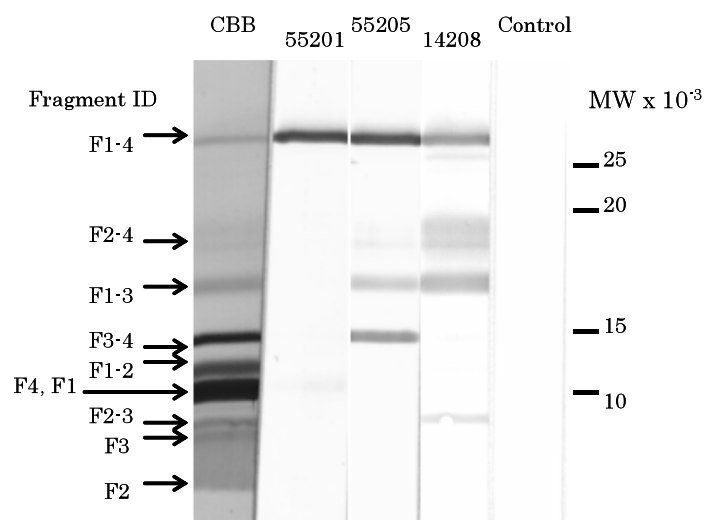
Fig. 1-5 Non-denaturing two dimensional electrophoresis of human plasma pre-incubated with MAb55201 (right) and control mouse IgG (left).

Table 1-1 Reactivity of each monoclonal antibody to apoA-1 peptides, defined by competitive ELISA.

Peptide	Sequence	IC50 ( $\mu\text{mol/l}$ )		
		55201	55205	14208
aa1-20	D E P P Q S P W D R V K D L A T V Y V D	>100	>100	>100
aa13-32	D L A T V Y V D V L K D S G R D Y V S Q	>100	>100	>100
aa25-44	S G R D Y V S Q F E G S A L G K Q L N L	>100	>100	>100
aa37-56	A L G K Q L N L K L L D N W D S V T S T	>100	>100	>100
aa49-68	N W D S V T S T F S K L R E Q L G P V T	>100	>100	>100
aa61-80	R E Q L G P V T Q E F W D N L E K E T E	>100	>100	>100
aa73-92	D N L E K E T E G L R Q E M S K D L E E	>100	>100	>100
aa85-104	E M S K D L E E V K A K V Q P Y I D D F	>100	>100	>100
aa97-116	V Q P Y I D D F Q K K W Q E E M E L Y R	>100	>100	7.9
aa109-128	Q E E M E L Y R Q K V E P L R A E L Q E	>100	>100	>100
aa121-140	P L R A E L Q E G A R Q K L H E L Q E K	>100	>100	>100
aa129-143	G A R Q K L H E L Q E K I S P	>100	>100	>100
aa134-153	L H E L Q E K I S P L G E E M R D R A R	>100	>100	>100
aa144-158	L G E E M R D R A R A H V D A	>100	>100	>100
aa149-168	R D R A R A H V D A L R T H L A P Y S D	>100	>100	>100
aa159-173	L R T H L A P Y S D E L R Q R	>100	>100	>100
aa164-183	A P Y S D E L R Q R L A A R L E A L K E	>100	>100	>100
aa174-188	L A A R L E A L K E N G G A R	>100	>100	>100
aa179-198	E A L K E N G G A R L A E Y H A K A T E	>100	>100	>100
aa189-203	L A E Y H A K A T E H L S T L	>100	>100	>100
aa194-213	A K A T E H L S T L S E K A K P A L E D	>100	>100	>100
aa204-218	S E K A K P A L E D L R Q G L	>100	>100	>100
aa209-228	P A L E D L R Q G L L P V L E S F K V S	>100	>100	>100
aa219-235	L P V L E S F K V S F L S A L E E	>100	>100	>100
aa224-243	S F K V S F L S A L E E Y T K K L N T Q	>100	>100	>100

IC50: Concentration of competitive peptide required to cause 50% inhibition

>100: Inhibition was not detected even at peptide concentrations of 100  $\mu\text{mol/l}$ .



Fragment	Residues	MW x 10 <sup>-3</sup>	MAb reactivity			
			55201	55205	14208	Control
F1-4	1-243	28.3	+	+	+	-
F2-4	87-243	18.2	-	+/-	+	-
F1-3	1-148	17.3	-	+	+	-
F3-4	113-243	15.0	-	+	-	-
F1-2	1-112	13.1	-	-	-	-
F4	149-243	10.7	+/-	-	-	-
F1	1-86	9.9	-	-	-	-
F2-3	87-148	7.4	-	-	+	-
F3	113-148	4.2	-	-	-	-
F2	87-112	3.2	-	-	-	-

Fig. 1-6 Western blot analysis to examine the reactivity of each monoclonal antibody with apoA-1 CNBr-fragments.

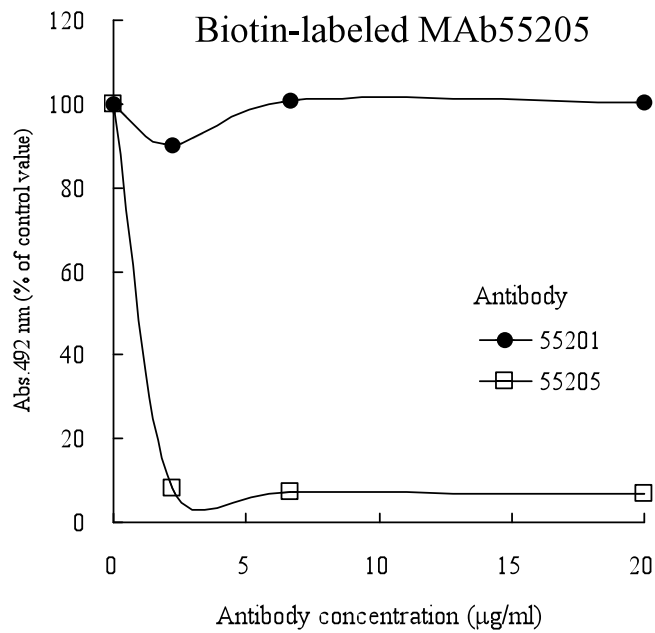
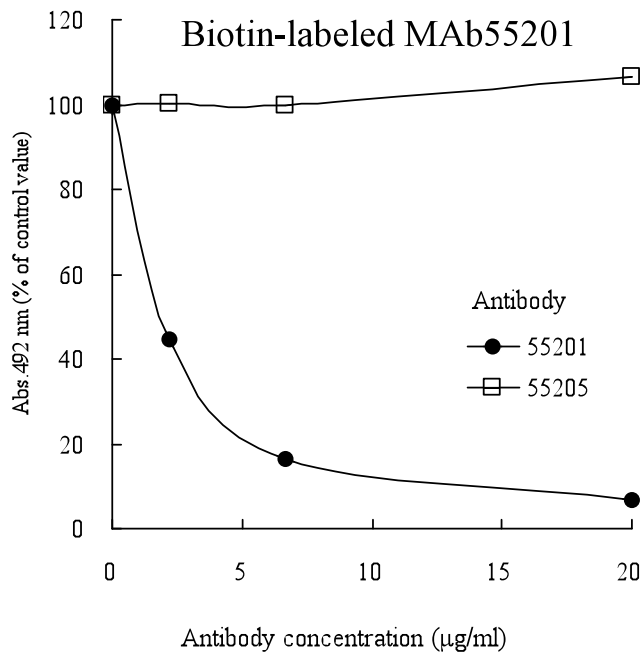


Fig.1-7 Antibody-competitive ELISA using biotin-labeled MAb55201 or biotin-labeled MAb55205. Values are expressed as % of the control value (without competitive antibody). Each point represents the average of duplicate measurements.

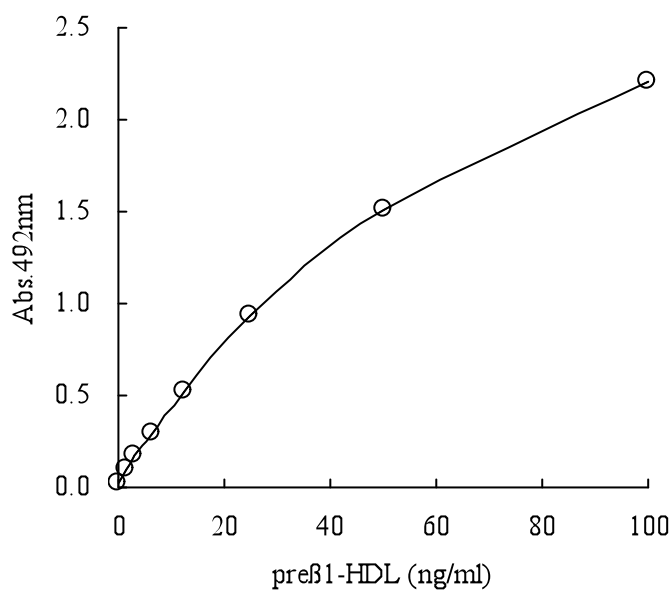


Fig. 1-8 Calibration curve in the newly developed ELISA.

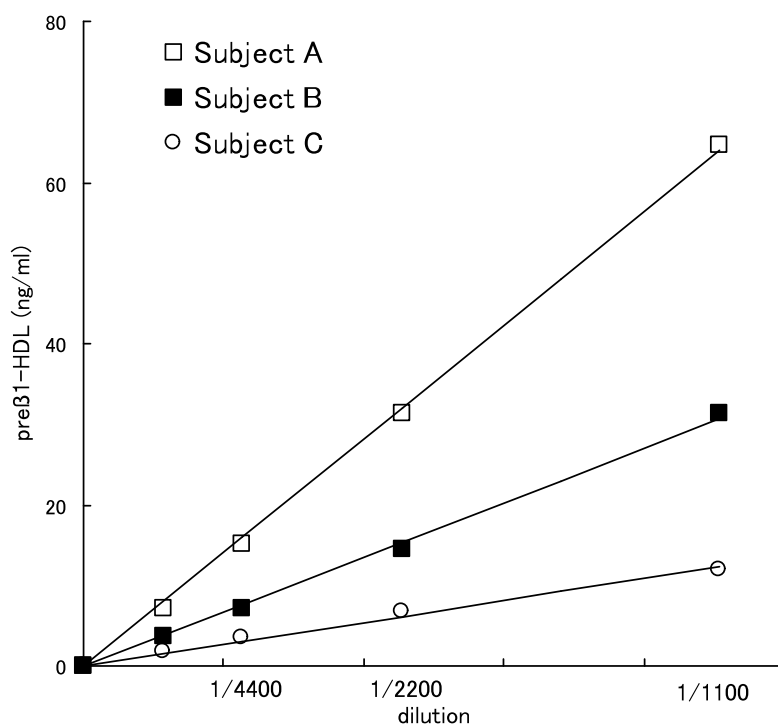


Fig. 1-9 Dilution linearity of preβ1-HDL levels of plasma samples in the newly developed ELISA.



Table 1-2 Intra-assay reproducibility in the newly developed ELISA.

	pre $\beta$ 1-HDL concentration (ng/ml)		
	Sample 1	Sample 2	Sample 3
Data (n=12)	65.8	41.1	17.2
	60.1	41.1	16.6
	64.3	37.4	17.4
	69.3	41.0	18.7
	67.0	36.0	17.7
	59.6	37.6	17.4
	65.5	37.6	17.9
	66.6	39.3	18.2
	69.1	40.6	17.4
	64.1	41.5	17.2
	59.5	40.4	17.1
	65.8	41.6	17.6
mean	64.7	39.6	17.5
SD	3.4	1.9	0.5
CV (%)	5.3	4.9	3.1

Table 1-3 Characteristics of study subjects.

	Dyslipidemic subjects (n=47)	Normolipidemic subjects (n=25)
Male	22 (47%)	15 (60%)
Age (years)	55 ± 14	36 ± 9.3
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25 ± 4.5	23 ± 3.5
Cholesterol (mg/dl)	245 ± 64	183 ± 28
Triglyceride (mg/dl)	232 ± 280	80 ± 34
HDL-C (mg/dl)	51 ± 23	62 ± 15

Data are shown as n (%) for gender and mean ± SD for other items.

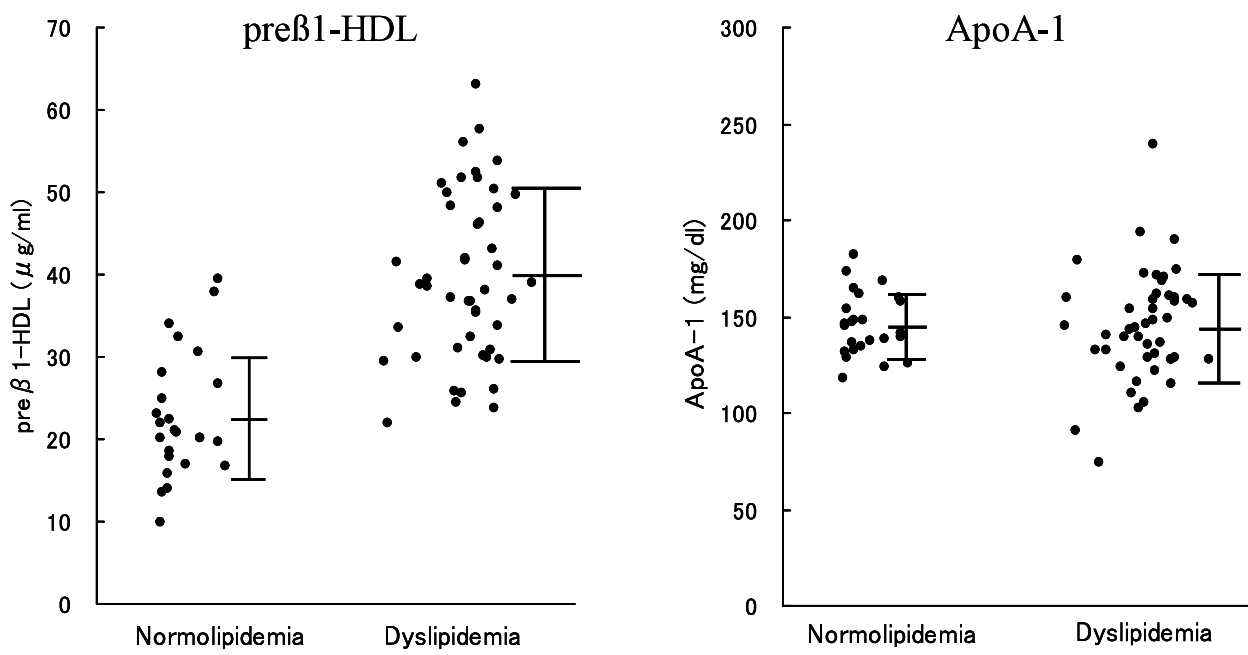
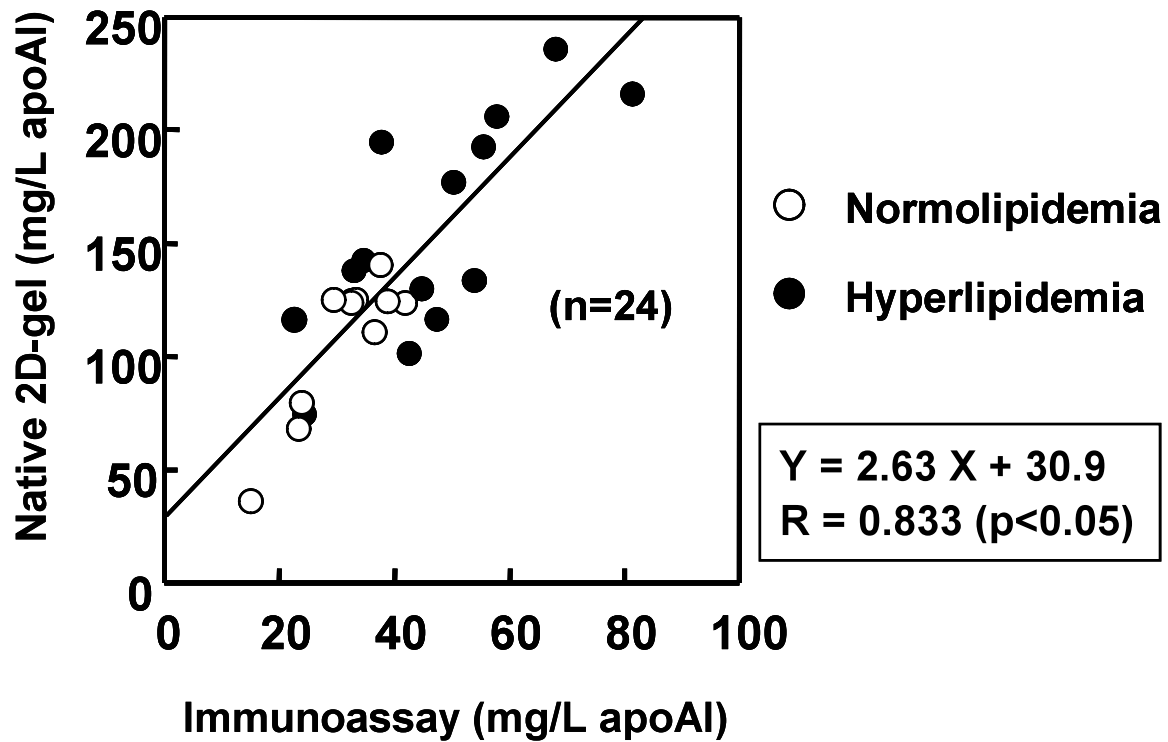


Fig. 1-10 Plasma preβ1-HDL and apoA-1 levels in normolipidemic and dyslipidemic subjects.



(Miida et al. *J. Lipid Res.*, 2003, **44**, 645-650)

Fig. 1-11 Comparison of enzyme immunoassay with native 2D-gel electrophoresis as analytical techniques for measuring pre $\beta$ 1-HDL concentrations in plasma samples.

## 第 2 章

### pre $\beta$ 1-HDL の生成機序の解明

## 第1節 緒言

本章では、VLDL 中の TG が LPL の作用で加水分解する過程で VLDL から pre $\beta$ 1-HDL が生成するか否かを *in vivo* および *in vitro* の実験で検討した。まず、*in vivo* の実験としてヘパリン静注実験を行った。LPL は血管壁にヘパリン硫酸を介して結合している<sup>70)</sup>。ヘパリンを静脈注射することで LPL が血管壁から遊離し、VLDL 中の TG を加水分解することが知られている<sup>70)</sup>。この反応に伴い、pre $\beta$ 1-HDL が生成するかを検証した。また、ヘパリン静注時に LPL 以外に肝性トリグリセライドリパーゼ (HTGL) も血中に遊離することが知られている<sup>71)</sup>。LPL は主にカイロミクロンや VLDL 中の TG を加水分解する酵素であるのに対し、HTGL は主に HDL 中の TG を加水分解する酵素である<sup>72, 73)</sup>。そこで、ヘパリン静注前後の血漿をゲルろ過クロマトグラフィーで分離し、VLDL および HDL の増減を調べた。次に、*in vitro* の実験として血漿から分離した VLDL に市販で入手可能なウシ LPL を添加し、pre $\beta$ 1-HDL が生成するか否かを検討した。

## 第2節 材料及び方法

### 1. ヘパリン静注実験

積水メディカル（株）に勤務する4名の日本人男性を被験者とした。研究プロトコールは、千葉大学医学部の治験審査委員会により承認され、全ての被験者から事前にインフォームドコンセントを取得した<sup>50)</sup>。各被験者（Subject）の背景及び血漿中脂質関連項目の値（ヘパリン静注前）をTable 2-1に示す。12時間以上絶食した各被験者から早朝空腹時に静脈血を採取した。採血管は抗凝固剤としてEDTA-2Naを含む真空採血管（テルモ）を用いた。採血直後に体重1kg当たり30IUのヘパリン製剤を静脈注射した。ヘパリン静注15分及び30分後に同様に採血した。採取した血液は、直後に氷水中で冷却後、遠心分離（4℃, 2000 rpm, 30 min.）を行い、血漿を分離した。各血漿のpre $\beta$ 1-HDL濃度、及びHDL-C、TC、TG、LPL、及び遊離脂肪酸（FFA）濃度を測定し、ヘパリン静注前後の変動を調べた。

### 2. 脂質関連項目の測定

TC、LDL-C、HDL-C、TG、FFA、及びアポA-1濃度は、自動分析装置用試薬（積水メディカル）を用い測定した。LPL濃度は、サンドイッチELISAによる測定キット（積水メディカル）で測定した<sup>72)</sup>。pre $\beta$ 1-HDL濃度は、第1章で確立したサンドイッチELISAで測定した。

### 3. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析

ヘパリン静注前及び静注 15 分後の被験者 3 の血漿 (0.2 ml) をゲル濾過用カラム 4 本 (Superose 6 HR 10/30、Superdex 200 HR 10/30、Superose 12 HR 10/30 2 本) を接続させた FPLC を用い、0.9% NaCl を溶出液として流速 0.15 ml/min. で分離した。分離開始から 180 分経過後、フラクションコレクターを作動させ、0.6 ml/Fr. で溶出液を回収した。各フラクションの TC、TG、及び pre $\beta$ 1-HDL 濃度を測定した。

#### 4. LPL 添加実験

血漿から超遠心分離で分離した VLDL (TC: 99.4 mg/dl, TG: 434 mg/dl) 0.1 ml に市販 (Sigma) のウシ LPL (0~20  $\mu$ g/ml) を添加後 37°C でインキュベートし、反応時間ごとに FFA 濃度と pre $\beta$ 1-HDL 濃度を測定した。



### 第3節 実験結果

#### 1. ヘパリン静注後の血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度と脂質関連項目の変化

ヘパリン静注後、血漿 TG 濃度は低下し、FFA 及び LPL 濃度は上昇した。これに伴い pre $\beta$ 1-HDL 濃度は、著しく上昇した。一方、TC 及び HDL-C 濃度は変化が無かった。pre $\beta$ 1-HDL 濃度の上昇は、15 分後で有意であったが、30 分後では有意でなかった。被験者 4 名中血漿脂質の値が正常な 3 名は、30 分後に pre $\beta$ 1-HDL 濃度がヘパリン静注前のレベルに戻ったのに対し、脂質異常症の 1 名は、30 分後でも pre $\beta$ 1-HDL 濃度の上昇が認められた (Fig. 2-1)。

#### 2. ヘパリン静注後の血漿リポ蛋白濃度の変化

ヘパリン静注後の血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度上昇が最も著しかった被験者 3 について、ヘパリン静注前及び静注 15 分後の血漿をゲルろ過で分離し、各フラクションのコレステロール、TG、及び pre $\beta$ 1-HDL 濃度を測定した。その結果、ヘパリン静注後 VLDL 画分は著しく減少したのに対し、pre $\beta$ 1-HDL 画分は著しく上昇した。一方、LDL 及び HDL 画分はほとんど変化が無かった (Fig. 2-2)。

#### 3. 試験管内における VLDL からの pre $\beta$ 1-HDL の生成

超遠心分離により分取した VLDL をウシミルク LPL とインキュベートし、FFA 及び pre $\beta$ 1-HDL 濃度の変化を調べた。その結果、添加した LPL 濃度の増加及び反応時間に依存し、FFA 及び pre $\beta$ 1-HDL 濃度は上昇した (Fig. 2-3)。このことから、添加した LPL による VLDL 中の TG が加水分解する過程で pre $\beta$ 1-HDL が生

成することが示唆された。

#### 第4節 考察

LPL の作用により VLDL から pre $\beta$ 1-HDL が生成する可能性を *in vivo* 及び *in vitro* の実験で検討した。*in vivo* におけるヘパリン静注実験の結果、ヘパリン静注により血漿 TG 濃度の減少、FFA 及び LPL 濃度の増加とともに、血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は上昇した。また、pre $\beta$ 1-HDL 濃度の上昇が最も著しかった血漿をゲルろ過で分析した結果、ヘパリン静注後、VLDL の濃度が著しく減少するのにもない pre $\beta$ 1-HDL 濃度が著しく上昇した。血中の TG を多く含むリポ蛋白としては、食後、小腸から分泌されるカイロミクロンと食事と無関係に肝臓から分泌される VLDL があるが、本研究のヘパリン静注実験で使用した検体は、12 時間以上絶食したボランティアから採取した血漿であることから、カイロミクロンは含まれていないと考えられる。また、ヘパリン静注により血中に遊離し TG を加水分解する酵素としては、LPL 以外に HTGL があるが、HTGL が主な基質とする HDL はヘパリン静注前後の血漿で少なくともそのコレステロール濃度で変化はなく、ゲルろ過分析でも変化は認められなかった。更に *in vitro* の実験で血漿から精製した VLDL と市販の精製ウシ LPL を混和し 37°C でインキュベートした結果、LPL 濃度の増加及び反応時間の経過に伴い FFA 及び pre $\beta$ 1-HDL 濃度が上昇することが判明した。以上の結果から、LPL が VLDL 中の TG を加水分解し、FFA が生成する過程で pre $\beta$ 1-HDL が生成することが示唆された。

pre $\beta$ 1-HDL の生成機序としては、他に肝臓と小腸から直接分泌される経路、及び  $\alpha$ -HDL のリモデリングにより pre $\beta$ 1-HDL が生成する経路が知られている<sup>34)</sup>。pre $\beta$ 1-HDL の構成蛋白であるアポ A-1 は肝臓及び小腸のみで合成される<sup>10)</sup>。肝臓及び小腸由来の樹立細胞を用いた実験では、両細胞から lipid-free apoA-1 が一旦細胞外へ放出され、その後細胞膜上の ABCA1 を介して細胞脂質を引き抜

き lipid-poor apoA-1 になることが報告されている<sup>67,74)</sup>。pre $\beta$ 1-HDL が lipid-free apoA-1 または lipid-poor apoA-1 (pre $\beta$ -Nascent HDL) のどちらであるかは、本研究 (第 3 章) においてはじめて明らかになったが、何れにしても pre $\beta$ 1-HDL は肝臓と小腸で合成され血中へ分泌される。 $\alpha$ -HDL のリモデリングによって生成する経路は様々な促進因子が知られている<sup>23,24,30,34)</sup>。HTGL はレムナントリポ蛋白や HDL 中の TG を水解する酵素であり、HDL 中の TG を水解する過程で pre $\beta$ 1-HDL を産生する<sup>48,73)</sup>。リン脂質転送蛋白 (PLTP) は様々な血漿リポ蛋白間におけるリン脂質の転送に関与する蛋白であり、アポ B 含有リポ蛋白から HDL3 へリン脂質を転送し HDL2 を形成する過程で pre $\beta$ 1-HDL を産生する<sup>75)</sup>。また、PLTP 活性を亢進することで血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は著しく増加することが報告されている<sup>76,77)</sup>。CETP は HDL 中のエステル型コレステロールとアポ B 含有リポ蛋白中の TG を交換する蛋白である<sup>78)</sup>。CETP は HDL 中の TG 含量を増加させることで HTGL による TG の水解及び pre $\beta$ 1-HDL の生成を亢進する<sup>79,80)</sup>。Group IIA secretory phospholipase A2 (sPLA2) は炎症時に TNF- $\alpha$  及び IL-6 により発現が誘導されるリパーゼであり、HDL 表面のリン脂質を水解し HDL の粒子サイズを低下させる<sup>81,82)</sup>。また、CETP との共存で HDL2 から pre $\beta$ 1-HDL 様の lipid-poor apoA-1 の解離を著しく促進することが報告されている<sup>83)</sup>。血清アミロイド A (SAA) は炎症時に発現が誘導される蛋白であり、特に炎症時において HDL 中に多量に存在する<sup>84,85)</sup>。in vitro で血漿に SAA を添加すると HDL から pre $\beta$ 1-HDL が生成することが報告されている<sup>86)</sup>。アポ A-2 はアポ A-1 の次に HDL 中に多く存在するアポ蛋白である<sup>1)</sup>。アポ A-2 は  $\alpha$ -HDL のリモデリングに阻害的に働くとの報告<sup>87)</sup>もあるが、アポ A-2 が HDL に結合することにより HDL から pre $\beta$ 1-HDL が解離することが報告されている<sup>88)</sup>。また、HDL にアポ A-2 が

結合することで lipid-free apoA-1 が解離し ABCA1 を介するコレステロール引き抜きを促進するとの報告もある<sup>66, 89)</sup>。

このように pre $\beta$ 1-HDL は様々な経路で生成し、様々な生成促進因子の影響により血中濃度に変動すると考えられる。第 1 章で血漿コレステロール及び TG 濃度が高い脂質異常症で血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度が高いことが判明したことから、著者らは VLDL からの生成経路に着目し、本章の検討で pre $\beta$ 1-HDL が VLDL から生成されることを明らかにした。この生成経路と脂質異常症における血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度の高値化との関係は依然として不明であり、今後更なる検討を要する。

Table 2-1 Baseline characteristics of study subjects.

	Subjects				mean	SD
	1	2	3	4		
Age (years)	46	45	44	32	41.8	6.6
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.0	22.6	32.2	22.1	25.2	4.7
TC (mg/dl)	209	180	247	157	198	39
LDL-C (mg/dl)	133	103	179	51	117	54
HDL-C (mg/dl)	54	56	46	92	62.0	20.5
TG (mg/dl)	115	123	211	50	125	66
ApoA-I (mg/dl)	142	155	128	187	153	25
pre $\beta$ 1-HDL ( $\mu$ g/ml)	27.3	36.7	28.1	27.6	29.9	4.5
LPL (ng/ml)	34.9	40.9	27.6	46.4	37.5	8.1
FFA ( $\mu$ Eq/l)	710	1087	1020	568	846	248

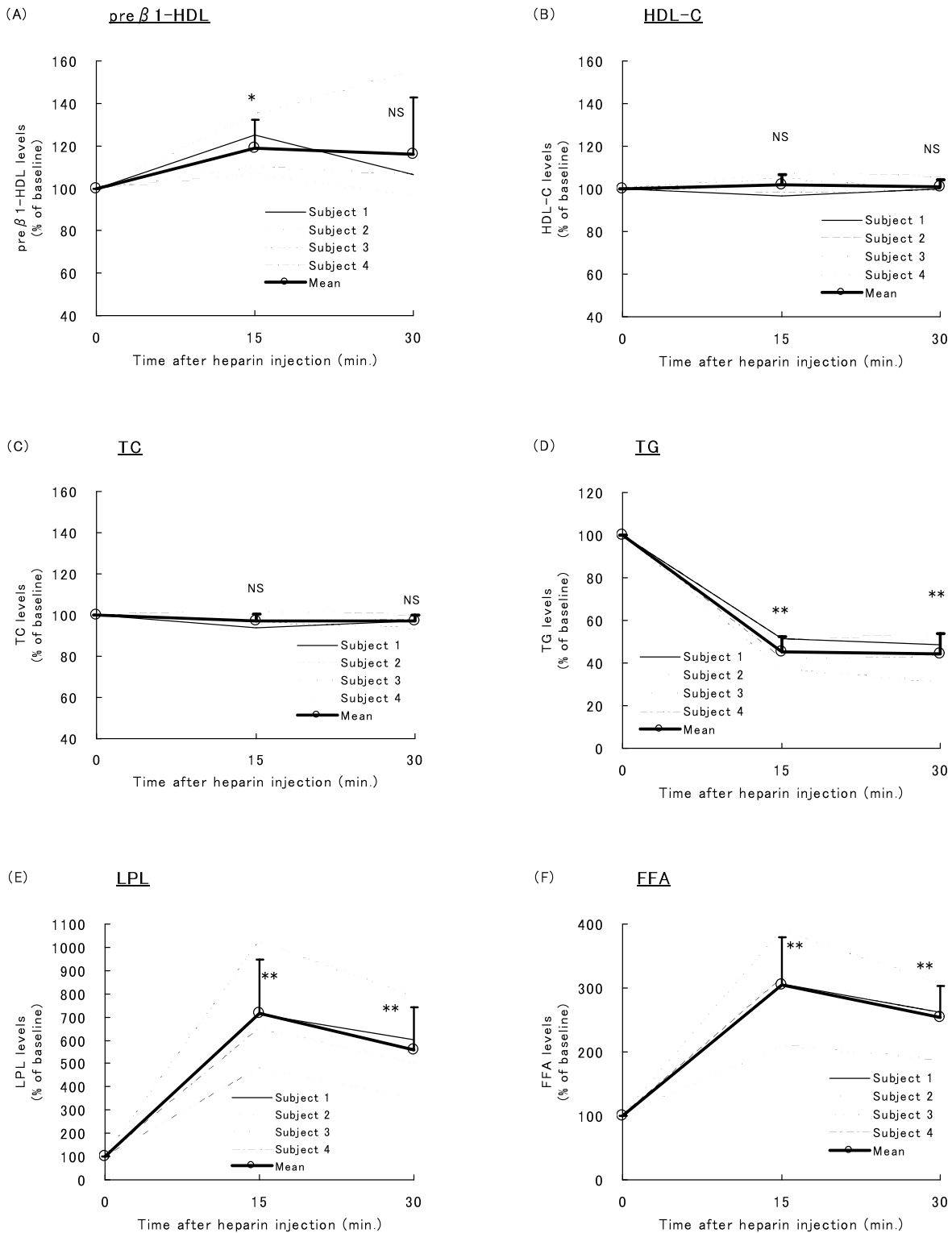


Fig. 2-1 Changes in plasma preβ1-HDL and other lipid marker levels after heparin injection.

Values are expressed as % of baseline (pre-heparin) of each subject or the mean of four subjects. Error bars of the mean values represent standard deviations of four subjects. NS: no statistical significance versus baseline, \*:  $p < 0.05$  versus baseline, \*\*:  $p < 0.01$  versus baseline.

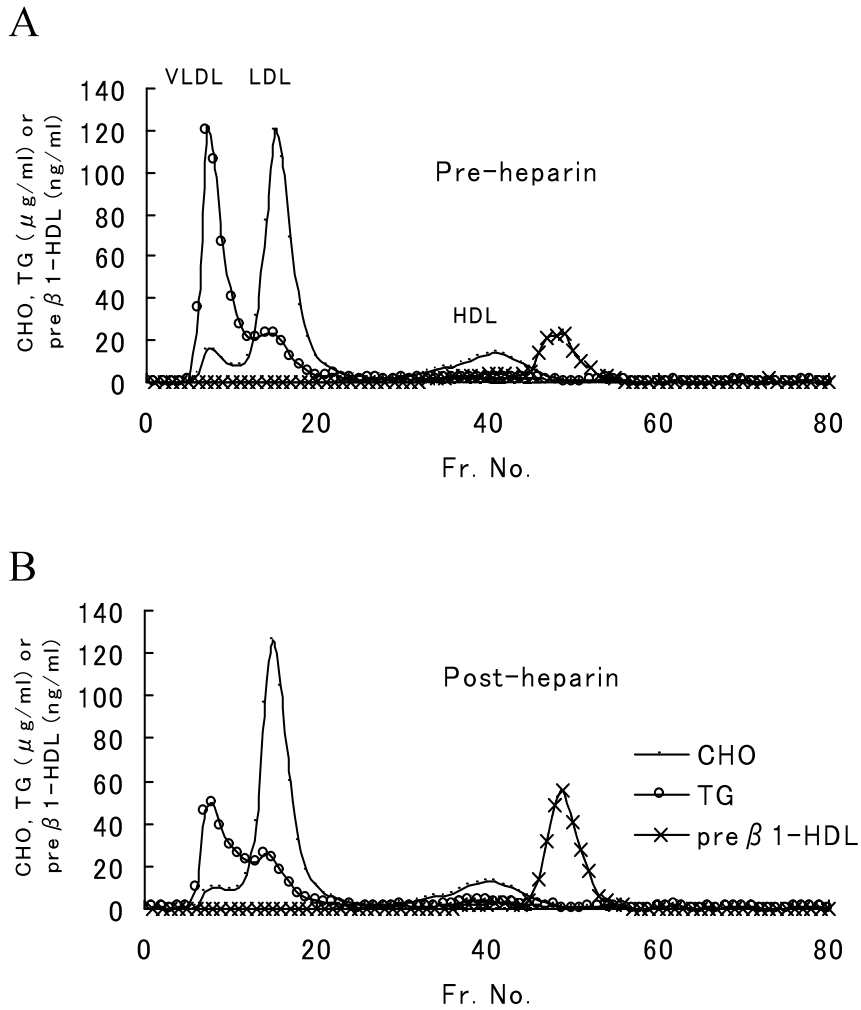


Fig. 2-2 FPLC analysis of plasma cholesterol, triglyceride and pre $\beta$ 1-HDL distributions in pre-heparin (A) and post-heparin (B) plasma.



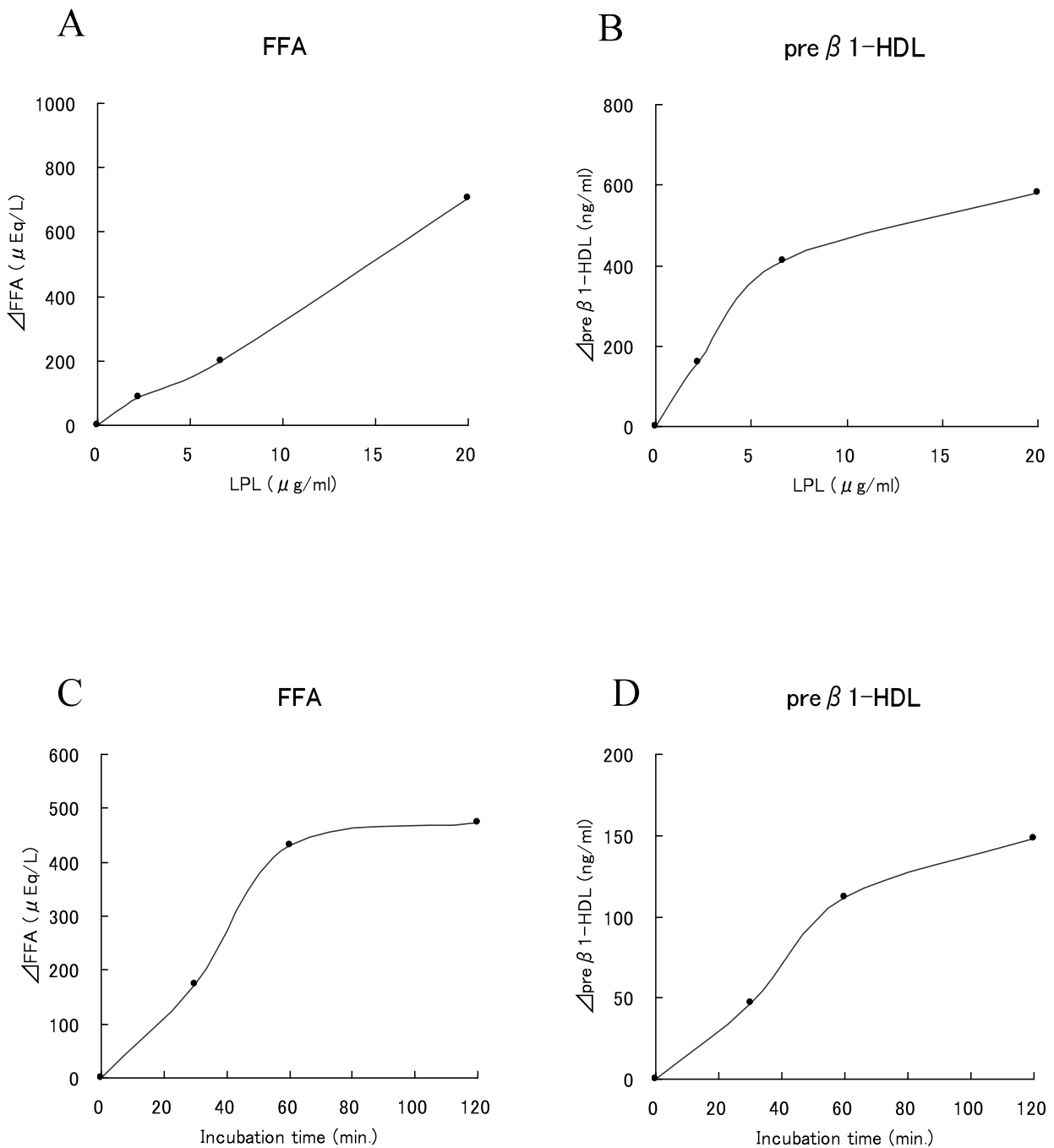


Fig. 2-3 In vitro production of pre $\beta$ 1-HDL through VLDL hydrolysis by LPL. A, B: Relationship between pre $\beta$ 1-HDL increase and the amount of LPL added (final LPL concentration, 0-20  $\mu\text{g/ml}$ ; incubation time, 60min.). C, D: Relationship between pre $\beta$ 1-HDL increase and incubation time (final LPL concentration, 20  $\mu\text{g/ml}$ ; incubation time, 0-120min.). Left and right panels show increase in NEFA and pre $\beta$ 1-HDL levels respectively. Data points represent means in duplicate.

## 第 3 章

### pre $\beta$ 1-HDL の存在様式の解明

## 第1節 緒言

血漿 pre $\beta$ 1-HDL の組成については、これまでいくつか異なる結果が報告されている<sup>25, 48, 49, 90)</sup>。Castro と Fielding は血漿を非変性二次元電気泳動で分離後ポリアクリルアミドゲルから抽出した微量の pre $\beta$ 1-HDL を分析し、その pre $\beta$ 1-HDL はアポ A-1、リン脂質、及び遊離型コレステロールで構成されることを報告した<sup>25)</sup>。この報告は血漿 pre $\beta$ 1-HDL がリン脂質と遊離型コレステロールを含むことの根拠となっている。Nanjee らは分析用の2種類のゲルろ過用カラムを用い血漿から粒子サイズ 5.8-6.3 nm の超小型アポ A-1 含有粒子を分離した<sup>90)</sup>。その粒子は、血漿中の含量が全アポ A-1 の 2~15%であること、血漿中で最も粒子サイズが小さいアポ A-1 含有粒子であること、アガロース電気泳動で pre $\beta$  位に泳動されること、及び血漿を 37 °C で 2 時間インキュベートするとその粒子の濃度が著しく減少することから pre $\beta$ 1-HDL と同じであることが推察される。その粒子は、アポ A-1 とリン脂質のみがモル比 1 対 2 で含まれることが示されている。pre $\beta$ 1-HDL の組成については、この他コレステロールエステルや TG を含むとの報告がある<sup>48, 49)</sup>。

pre $\beta$ 1-HDL の化学組成及び構造がこれまで明確になっていない背景としては、分析に必要な量の血漿 pre $\beta$ 1-HDL を容易に精製できなかったことが考えられる。血漿 pre $\beta$ 1-HDL は、他の HDL 亜分画に比べ血漿中の濃度が低く、また、血漿中で非常に不安定である<sup>69)</sup>。本研究の第1章で獲得した MAb55201 及び MAb55205 は、血漿 pre $\beta$ 1-HDL 中のアポ A-1、及び脱脂アポ A-1 (lipid-free apoA-1) のみに反応し、血漿中に存在する pre $\beta$ 1-HDL 以外の HDL 亜分画中のアポ A-1 には反応しない抗体である<sup>41)</sup>。本章では、まず、MAb55201 を用いたアフィニティークロマトグラフィー及びゲル濾過クロマトグラフィーで健常者の新鮮血漿から

pre $\beta$ 1-HDL を精製し、pre $\beta$ 1-HDL の蛋白組成及び脂質組成を分析するとともに電子顕微鏡にてその形状を観察した。また、intact な血漿 pre $\beta$ 1-HDL と lipid-free apoA-1 とを比較するため、非変性 PAGE、非変性二次元電気泳動法、及びゲルろ過クロマトグラフィーで両者を分析するとともに、pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿に添加した lipid-free apoA-1 が血漿 pre $\beta$ 1-HDL の特徴的な現象である LCAT 依存性の異化反応を示すかを調べた。更に、エピトープが異なる 2 種類の抗 pre $\beta$ 1-HDL モノクローナル抗体 (MAb55201、MAb55205) を用いた免疫化学的手法により、血漿 pre $\beta$ 1-HDL 粒子を構成するアポ A-1 が 1 量体であるのか、あるいは 2 量体以上であるのかを検討した。

## 第 2 節 材料及び方法

### 1. 材料

血漿は、積水メディカルに勤務する 26 歳から 45 歳の男性で血漿脂質の値が正常 (TC < 220 mg/dl, TG < 150 mg/dl, HDL-C > 40 mg/dl) なボランティアから実験当日に採取した血液から分離した。各ボランティアからは、事前によるインフォームドコンセントを取得した。早朝空腹時に各ボランティアから、真空採血管 (テルモ、EDTA/2Na) を用い静脈血を採取した。採血後すぐに氷水 (0°C) につけて約 30 分後に遠心分離 (3000 rpm, 30 min., 2 °C) を行い、血漿を採取した。免疫原及び実験に使用した脱脂アポ A-1 (Lipid-free apoA-1) は、第 1 章第 2 節に記載したとおり、血漿から超遠心分離で得た HDL 画分 (1.063 g/ml < d < 1.21 g/ml) をエーテル、エタノール混合液 (3:2) で脱脂後、尿素を含む緩衝液で可溶化し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。脱脂したアポ A-1 は、溶液中のアポ A-1 濃度や塩濃度等の条件によって 2 量体以上の多量体を形成することが知られている<sup>91)</sup>。精製した脱脂アポ A-1 は多量体の形成を防ぐため、0.1 mg/ml 以下の濃度で PBS (0.15 mol/l NaCl-20 mmol/l phosphate buffer, pH7.2) に透析し、使用するまで -80°C で保存した。preβ1-HDL 中のアポ A-1 を特異的に認識する 2 種類のモノクローナル抗体 (MAb55201、MAb55201) は、本研究で獲得した (第 1 章記載)。全ての HDL 画分画中のアポ A-1 を認識する抗アポ A-1 モノクローナル抗体 (MAb14208) は、第 1 章第 2 節記載の抗体と同じである。Control IgG は積水メディカルで取得したマウス抗インフルエンザ A モノクローナル抗体を使用した。MAb55201 及び Control IgG 結合セファロース樹脂は、各 IgG を CNBr-activated Sepharose 4B (GE Healthcare) にメーカー推奨の方法により結合して作製した。非変性 PAGE 及び SDS-PAGE に

使用した PAG、及びウエスタンブロットの転写に使用した蛋白質転写セットは、コスモバイオ (Tokyo) より購入した。血漿加温実験で使用した DTNB (Sigma) は、使用直前にリン酸バッファー ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 mol/l, pH7.4) を用い 20 mmol/l の濃度で溶解後、終濃度 2 mmol/l になるよう血漿又は pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿に添加した。ヤギ抗アポ A-1 ポリクローナル抗体、及びヤギ抗アポ A-2 ポリクローナル抗体は、第 1 章と同様に調製した。Biotin 標識抗体は EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific) を用い標識した。

## 2. 血漿 pre $\beta$ 1-HDL の精製

血漿 40 ml を Control IgG 結合セファロースカラム (Bed volume: 5 ml) に通し、マウス IgG 及びセファロース樹脂に非特異的に結合する画分を除去した。その通過画分 (40 ml) を MAb55201 結合カラム (Bed volume: 2 ml) に添加し pre $\beta$ 1-HDL を結合させた。MAb55201 結合カラムの通過画分 (40 ml) は、pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿として後述の実験に使用した。MAb55201 結合カラムは、つづいて 30 ml の PBS で洗浄後、吸着画分を 10 ml の 0.15M NaCl 含有 0.1M グリシン-HCl バッファー (pH 2.0) で溶出させた。1 ml/Fr. で分取した溶出画分は 280 nm における吸光度を測定し、吸光度が 0.4 以上のフラクション (Fr. 4~Fr. 6) を即座に Superdex 200 16/60 prep grade (GE Healthcare) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーで分離した。ゲルろ過クロマトグラフィーは、0.15 mol/l NaCl を溶出液として 1.0 ml/min. で流し、フラクションコレクターで 1 ml ずつ回収した。各フラクションは、サンドイッチ ELISA で pre $\beta$ 1-HDL 濃度を測定し、比較的高濃度の pre $\beta$ 1-HDL を含むフラクションを回収した。精製は 4 名の健常者か

ら採取した各血漿を用い 4 回実施し、操作は全て 4 °C で実施した。精製 pre $\beta$ 1-HDL の純度は非変性二次元電気泳動法で確認し、濃度はサンドイッチ ELISA による pre $\beta$ 1-HDL 測定系で測定した。MAb55201 結合カラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーにおいてセファロース樹脂に結合した MAb55201 が HDL からアポ A-1 を解離させる可能性を検証するため、血漿の代わりに超遠心分離で調製した HDL (1.063 g/ml < d < 1.21 g/ml) を用い 10 分の 1 のスケールでアフィニティクロマトグラフィーを行った。2 ml の HDL (コレステロール濃度 : 140  $\mu$ g/ml) を MAb55201 結合カラム (0.2 ml) に添加した。3 ml の PBS でカラムを洗浄後、吸着画分を 1 ml の 0.15 mol/l NaCl 含有 0.1 mol/l グリシン-HCl バッファー (pH 2.0) で溶出させた。溶出画分を 0.05 ml の 2 mol/l Tris-HCl バッファー (pH8.0) で中和し、非変性 PAGE で分析した。

### 3. 非変性二次元電気泳動法

精製 pre $\beta$ 1-HDL 4  $\mu$ l、または、血漿 2  $\mu$ l をゲルボンドフィルム上に厚さ 1 mm で調製した 0.75% アガロースゲル (50 mmol/l バルビタールバッファー, pH 8.6) に添加し、540 V 定電圧で 60 分間冷却下にて電気泳動した。泳動後のアガロース切片を二次元用 10-20% PAG にセットし、75 V 定電圧で 24 h 冷却下にて電気泳動した。泳動バッファーは、90 mmol/l Tris, 80 mmol/l boric acid, 3 mmol/l EDTA (pH8.3) を用いた。分離した PAG 中の HDL 亜分画はセミドライブロッター (コスモバイオ) を用い PVDF 膜に転写後、ヤギ抗アポ A-1 抗体、HRP 標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (DAKO)、及び DAB を用いたウェスタンブロット法で検出した。

#### 4. 電子顕微鏡観察

カーボン支持膜を張った 400 メッシュに精製 pre $\beta$ 1-HDL 溶液を滴下し分散させた。2%酢酸ウラニル水溶液に 4 °C で 10 秒間浸しネガティブ染色を行った。透過型電子顕微鏡（日本電子、JEM-1200EX）を用い加速電圧 80kV で観察し、透過型電子顕微鏡専用 CCD カメラ（日本電子、VELETA、画素数：2048 x 2048 ピクセル）で撮影した。

#### 5. 蛋白組成の分析

蛋白含量は、マイクロ BCA キット（Thermo Scientific）を用い測定した。蛋白組成は SDS-PAGE 及び質量分析で次のように分析した。SDS と  $\beta$ -mercaptoethanol を含むサンプルバッファーで希釈した精製画分 0.22  $\mu$ g を煮沸後、15% PAG を用い電気泳動した。質量分析及びその前処理は、Mori らの報告<sup>92)</sup>と同様に実施した。ゲル中の蛋白を銀染色で検出後、検出されたバンドを切り出し 1.5 ml のチューブに移した。システインのジスルフィド結合は、ジチオスレイトールで還元し、ヨードアセトアミドでアルキル化した。ゲル内トリプシン消化を 37 °C で一夜実施後、5% TFA を含む 50% アセトニトリルでペプチドを抽出した。抽出物は、乾固後、0.1% キ酸で再溶解し、LC-MS/MS 解析に用いた。LC-MS/MS 解析は、Capillary HPLC system (Paradigm MS4, Michrom Bioresources, USA) を接続して nano-LC electrospray ionization source (AMR, Japan) を装着した LCQ Dada XP ion trap mass spectrometer (ThermoFinnigan, USA) を用いて



実施した。MS/MS データは、NCBI の蛋白データベース上の既知蛋白のシーケンスから得られた理論上のスペクトルと実験データとの相関性を認識するコンピュータプログラムである SEQUEST を用い解析した。

## 6. 脂質組成の分析

コリン含有リン脂質、コレステロール、及び TG 含量は、市販の酵素法による測定試薬（和光純薬）を用い、次のように測定した。精製 pre $\beta$ 1-HDL 溶液、または生理食塩水で段階希釈した各標準液 0.2 ml と酵素溶液 0.2 ml を混和後、37 °C で 5 分間インキュベートし、600 nm における吸光度を分光光度計（SHIMADZU, UV-2400PC）で測定した。また、各測定系の Validation のため、検出限界 (LOD; Limit of detection) 及び定量限界 (LOQ; Limit of quantification) を ICH ガイドライン<sup>93)</sup>に従い、次の式を用いて計算した。

$$\text{LOD}=3.3\sigma/S$$

$\text{LOQ}=10\sigma/S$  （ $\sigma$  はブランクの吸光度 (n=10) の標準偏差、S は検量線の傾きを示す）

## 7. 非変性 PAGE

血漿、及び pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿はサンプル処理液（31% Sucrose, 0.06% EDTA, 0.01% BPB）と 1 対 9 で混和、精製 pre $\beta$ 1-HDL、及び脱脂アポ A-1 (lipid-free apoA-1) は 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度になるようサンプル処理液で希釈した。超遠心分離で調製した HDL、及びそれをアフィニティークロマトグラフィーで分離した非

吸着画分及び溶出画分は、それぞれサンプル処理液と1対1で混和した。各サンプルを15-25% PAGに5  $\mu$ L/wellで添加し、75 V定電圧で24 h冷却下にて電気泳動した。以下、上記3の非変性二次元電気泳動法と同様にウェスタンブロッティングを行った。分子サイズマーカーは、High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis (GE Healthcare) を用いた。

## 8. ゲルろ過クロマトグラフィーによる分析

血漿、pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿、及び pre $\beta$ 1-HDL に添加した脱脂アポ A-1 をそれぞれ Nanjee らの方法<sup>90)</sup>に従いゲルろ過クロマトグラフィー (FPLC) で分離した。各サンプル 50  $\mu$ l を連結させた2本のカラム (Superdex 200 HR 10/30、Superdex 75 HR 10/30) に添加し、150 mmol/l NaCl, 1 g/l EDTA-2Na, 1 g/l NaN<sub>3</sub>-50 mmol/l Tris-HCl buffer (pH 7.4) で流速 0.25 ml/min. にて分離した。溶出液の初めの 12.5 ml を廃棄後各 0.5 ml で40フラクションを分取し、各フラクションの pre $\beta$ 1-HDL 及び lipid-free apoA-1 濃度を第1章で構築した pre $\beta$ 1-HDL-ELISA で測定した。血漿サンプルより分離したフラクションは、第1章第2節で記載したヤギ抗アポ A-1 抗体を用いたサンドイッチ ELISA で総アポ A-1 濃度も測定した。

## 9. 血漿加温実験

血漿、及び lipid-free apoA-1 添加 pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿各 0.5 ml を DTNB と共存及び非共存下において 37°C でインキュベートした。時間経過毎に 50% スク

コースを含む安定化液<sup>69)</sup>で 11 倍希釈後 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存し、後日、MAb55201 を用いた pre $\beta$ 1-HDL 測定サンドイッチ ELISA で pre $\beta$ 1-HDL、及び lipid-free apoA-1 濃度を測定した。

#### 10. 抗アポ A-1 モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA

血漿 pre $\beta$ 1-HDL を構成するアポ A-1 が 1 量体あるいは 2 量体以上であるかを検討するため、2 種の抗 pre $\beta$ 1-HDL モノクローナル抗体 (MAb55201, MAb55205) を組合せたサンドイッチ ELISA、及び対照として MAb14208 同士のサンドイッチ ELISA を行った。各モノクローナル抗体を  $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で 96 穴 ELISA プレートに  $50\ \mu\text{l}/\text{well}$  分注し、 $4^{\circ}\text{C}$  で一夜静置した。プレートを PBS で洗浄後、室温で 1 時間ブロッキングし、各濃度に希釈した lipid-free apoA-1 又は血漿を添加し室温で 1 時間静置した (第一反応)。洗浄後、Biotin 標識した各モノクローナル抗体 ( $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を  $50\ \mu\text{l}/\text{well}$  分注し室温で 1 時間静置した。洗浄後、HRP 標識 streptavidin (Thermo Scientific) を  $50\ \mu\text{l}/\text{well}$  分注し、室温で 30 分間静置した。洗浄後、第 1 章第 2 節の ELISA と同様に HRP 活性を測定した。尚、サンドイッチ ELISA におけるブロッキング液、抗原、Biotin 標識抗体、及び HRP-Streptavidin の各希釈液は、リポ蛋白の立体構造を保持するため、界面活性剤を含まない 1% BSA-PBS を使用し、第一反応以降の洗浄液は 0.1% BSA-PBS を使用した。

### 第3節 実験結果

#### 1. 血漿 pre $\beta$ 1-HDL の精製

健常者4名の血漿それぞれから pre $\beta$ 1-HDL の精製を試みた。MAb55201 結合カラムからの溶出面分をゲルろ過クロマトグラフィーで分離した結果、分子量158,000以上のピークと分子量44,000付近のピークが認められた(Fig. 3-1)。pre $\beta$ 1-HDL が含まれると考えられる分子量44,000付近で高濃度のフラクション(Fr. 26~Fr. 33)を精製画分として回収した。一方、分子量158,000以上のピークは、MAb55201が交差反応を示すHDL亜分画、あるいはpre $\beta$ 1-HDLが抗体カラムから溶出後形成された多量体に由来することが考えられた。精製画分のpre $\beta$ 1-HDL濃度は $19.0 \pm 1.7 \mu\text{g/ml}$  (mean $\pm$ SD, n=4)、回収量は $152 \pm 13.4 \mu\text{g}$  (mean $\pm$ SD, n=4)、回収率は $17.3 \pm 2.1\%$  (mean $\pm$ SD, n=4)であった。非変性二次元電気泳動法により精製画分の純度を調べた結果、精製画分ではpre $\beta$ 1-HDLと思われるスポットのみが検出された(Fig. 3-2)。

#### 2. 精製 pre $\beta$ 1-HDL の分析

精製 pre $\beta$ 1-HDL を電子顕微鏡で観察した結果、円盤状の粒子は認められず、球状の粒子のみが観察された(Fig. 3-3)。SDS-PAGEにより精製 pre $\beta$ 1-HDL の蛋白組成を調べた結果、分子量約28,000のバンドのみが検出された(Fig. 3-4)。そのバンドをLC-MS/MSで分析した結果、アポA-1のみが検出された(Table 3-1)。精製 pre $\beta$ 1-HDL の蛋白濃度を調べた結果、 $22.5 \pm 3.5 \mu\text{g/ml}$  (mean  $\pm$  SD, n=4)であった(Table 3-2)。一方、精製 pre $\beta$ 1-HDL のリン脂質、TC、及びTGの濃度を調べた結果、何れの脂質も全く検出されなかった。各脂質測定系の検出限界

は、リン脂質測定系が 89.9 ng/ml、コレステロール測定系が 69.4 ng/ml、TG 測定系が 339 ng/ml であった (Fig. 3-5)。検出限界濃度の各脂質が含まれていると仮定して、アポ A-1 と各脂質とのモル比を求めた結果、何れの脂質もアポ A-1 が 1 モルに対して 1 モル未満であった (Table 3-2)。

### 3. pre $\beta$ 1-HDL と脱脂アポ A-1 の比較

pre $\beta$ 1-HDL と脱脂アポ A-1 を比較するため、非変性 PAGE、非変性二次元電気泳動、ゲルろ過クロマトグラフィー、及び血漿加温実験を行った。非変性 PAGE では、精製 pre $\beta$ 1-HDL と脱脂アポ A-1 の移動度に差は認められず、intact な血漿 pre $\beta$ 1-HDL と pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿に添加した脱脂アポ A-1 の移動度にも差は認められなかった (Fig. 3-6)。非変性 PAGE における pre $\beta$ 1-HDL 及び脱脂アポ A-1 の粒子サイズは、ともに  $6.0 \pm 0.1$  nm (mean  $\pm$  SD, n=3) であった。超遠心分離で得た HDL をアフィニティクロマトグラフィーで分離した画分において、6.0 nm のバンドは検出されなかった (Fig. 3-6, lanes 8, 9)。非変性二次元電気泳動法においては、Intact な血漿 pre $\beta$ 1-HDL と pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿に添加した脱脂アポ A-1 は同じ位置に検出された (Fig. 3-7)。ゲルろ過クロマトグラフィーにおいては、分子量 44,000 付近の pre $\beta$ 1-HDL のピークは、pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿では消失し、pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿に脱脂アポ A-1 を添加したサンプルでは脱脂アポ A-1 と思われるピークが血漿 pre $\beta$ 1-HDL と同じフラクション番号 (Fr. 24) に検出された (Fig. 3-8)。血漿加温実験では、pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿に添加した脱脂アポ A-1 濃度がインキュベーション時間に応じて著しく減少し、その減少は LCAT 阻害剤である DTNB の添加により阻止されることが判明した。ま

た、その濃度変化は、血漿をインキュベートしたときの pre $\beta$ 1-HDL 濃度の変化とほぼ一致することが判明した (Fig. 3-9)。

#### 4. サンドイッチ ELISA によるアポ A-1 分子数の検討

pre $\beta$ 1-HDL 中のアポ A-1 が 1 分子であるのか、あるいは 2 分子以上であるかを調べるため、2 種類の抗 pre $\beta$ 1-HDL モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA で検討した。MAb55201 と MAb55205 を組合せた ELISA では脱脂アポ A-1 及び血漿 pre $\beta$ 1-HDL のどちらに対しても反応が認められたのに対し、MAb55201 同士、及び 55205 同士を組合せた ELISA 系では脱脂アポ A-1 及び血漿 pre $\beta$ 1-HDL のどちらにも反応が認められなかった (Fig. 3-10)。一方、MAb14208 同士の ELISA 系では脱脂アポ A-1 に反応しなかったのに対し血漿アポ A-1 含有リポ蛋白に対し反応が認められた (Fig. 3-11)。本研究では他に 2 名の健常者血漿を用いて同一の検討を実施し、同様の結果となることを確認した (データ未記載)。以上の結果から、血漿 pre $\beta$ 1-HDL の 1 粒子中には各抗体に認識されるエピトープは一つ、即ち、血漿 pre $\beta$ 1-HDL は脱脂アポ A-1 (lipid-free apoA-1) と同様に 1 分子のアポ A-1 で構成されることが示唆された。

#### 第4節 考察

本研究で著者は、分析に十分な量で高純度の pre $\beta$ 1-HDL の精製を試みた。その結果、健常者4名の各新鮮血漿40 ml から、139~169  $\mu$ g の高純度の pre $\beta$ 1-HDL が得られた (Fig. 3-2)。精製 pre $\beta$ 1-HDL の蛋白組成を調べた結果、アポ A-1 のみが検出された (Fig. 3-4, Table 3-1)。Wolfrumらは、アポ M は pre $\beta$ -HDL の形成に必要であり pre $\beta$ -HDL の構成成分であると報告している<sup>94)</sup>。しかし、本研究では精製 pre $\beta$ 1-HDL からアポ M は検出されなかった (Table 3-1)。これまで報告されているアポ M を含む pre $\beta$ -HDL は、アポ M のトランスジェニックマウスの血清やアポ M を高発現させた細胞株の培養上清中の粒子であり、何れもアルブミンよりも粒子サイズが大きいことが示されている。このことから、これらの pre $\beta$ -HDL は本研究で著者が精製した pre $\beta$ 1-HDL とは異なることが考えられる<sup>94-96)</sup>。精製 pre $\beta$ 1-HDL の脂質組成を調べた結果、脂質は全く検出されなかった (Table 3-2)。著者は、各脂質測定系の検出感度が不十分であった可能性を検証するため、各測定系の検出限界を求めた (Fig. 3-5)。この結果から、精製 pre $\beta$ 1-HDL 中に検出限界濃度以下の脂質が含まれると仮定しても、リン脂質、コレステロール、TG の量は1モルのアポ A-1 に対し 0.11、0.23、0.48 モル以下であることが判明した。即ち、pre $\beta$ 1-HDL 中アポ A-1 が1分子とすると、理論上脂質は含まれないことが示唆された。本研究で行った酵素法によるリン脂質測定系では、血中リン脂質の95%を占めるレシチン、リゾレシチン、及びスフィンゴミエリン等のコリン含有リン脂質は測定可能であるのに対し、コリンを含有しないホスファチジルエタノールアミン等のリン脂質は測定できない<sup>97)</sup>。従って、精製 pre $\beta$ 1-HDL 中のリン脂質の含有を完全に否定することはできないが、少なくともこれまで pre $\beta$ 1-HDL 中のリン脂質として報告<sup>10)</sup>があるレシ

チン及びスフィンゴリエリンは含まれていないことが判明した。著者は、精製過程で pre $\beta$ 1-HDL 中のアポ A-1 から脂質が剥がれた可能性を検証するため、精製後の pre $\beta$ 1-HDL と Intact な血漿 pre $\beta$ 1-HDL を非変性 PAGE で比較した。その結果、非変性 PAGE における移動度は、Intact な血漿 pre $\beta$ 1-HDL と精製 pre $\beta$ 1-HDL で違いは見られなかった (Fig. 3-6)。Lipid-free apoA-1 に微量の脂質が結合することにより非変性 PAGE における粒子サイズが著しく増加することが報告されている<sup>74,98)</sup>。逆に本研究では、精製前後で pre $\beta$ 1-HDL の粒子サイズは変化しなかったことから、精製過程で pre $\beta$ 1-HDL 中のアポ A-1 から脂質が剥がれた可能性は極めて低いと思われた。著者は、更にセファロース樹脂に結合した MAb55201 が HDL から Lipid-free apoA-1 又は pre $\beta$ 1-HDL を解離させる可能性を検証するため、超遠心分離で得た HDL を用い同条件のアフィニティクロマトグラフィーを行い、その課程で Lipid-free apoA-1 又は pre $\beta$ 1-HDL が生成されないことを確認した (Fig. 3-6, lanes 8, 9)。以上の結果から、血漿 pre $\beta$ 1-HDL は、Lipid-free apoA-1 であることが示唆された。

pre $\beta$ 1-HDL の構造について、多くの論文では円盤型の粒子であると記述されている<sup>6,11,99,100)</sup>。しかし、血漿 pre $\beta$ 1-HDL が円盤型であることを直接証明した報告は無い<sup>23)</sup>。円盤型の pre $\beta$ -HDL は、血漿 pre $\beta$ -HDL のモデル粒子として試験管内で合成されることが知られている。その粒子はダブルベルトモデルと呼ばれる構造を呈し、2分子のアポ A-1 を含むことが一つの特徴である<sup>99,101)</sup>。本研究で精製 pre $\beta$ 1-HDL を電子顕微鏡で観察した結果、円盤型の粒子は観察されず、球状の粒子のみが観察された (Fig. 3-3)。また、抗 pre $\beta$ 1-HDL モノクローナル抗体を用いた免疫化学的手法により、pre $\beta$ 1-HDL 中のアポ A-1 は1分子であることが判明した (Fig. 3-10)。血漿 pre $\beta$ 1-HDL が円盤型であることの根拠は、



pre $\beta$ 1-HDL がリンパ液中に比較的高濃度で存在することと、リンパ液中に存在する HDL が円盤型を呈することにあると考えられる<sup>102,103)</sup>。しかし、リンパ液中の円盤型 HDL の比重は 1.063 から 1.21 であるのに対し、血漿 pre $\beta$ 1-HDL の比重は 1.21 より高いことが報告されている<sup>104)</sup>。このことから、リンパ液中の円盤型 HDL は血漿 pre $\beta$ 1-HDL とは異なる粒子であると考えられる。pre $\beta$ 1-HDL 中のアポ A-1 分子数については、2 分子の説と 1 分子の説がある<sup>24)</sup>。2 分子の説は、非変性 PAGE 及びゲルろ過クロマトグラフィーで測定される推定分子量からの推察に基づいている<sup>34,90)</sup>。本研究においても pre $\beta$ 1-HDL の分子量は、非変性 PAGE で約 60,000、ゲル濾過クロマトグラフィーで約 50,000 と測定された。しかし、一般に非変性 PAGE で測定される分子量は、粒子の荷電や形状に影響され、ゲル濾過クロマトグラフィーで測定される分子量は、粒子の形状に影響される。Formisano らは、沈降平衡法 (sedimentation equilibrium) で分子量 28,000 に測定されるアポ A-1 の単量体がゲル濾過クロマトグラフィーでは分子量 50,000 に測定されることを示した<sup>91)</sup>。アポ A-1 の摩擦比 (frictional ratio) は、1.4 と報告されている<sup>105)</sup>ことから、非変性 PAGE やゲル濾過でアポ A-1 の単量体や 2 量体の分子量を正確に測定することは困難であると考えられる。一方、1 分子の説は、分子内架橋剤による検討結果に基づいている<sup>74,76,106)</sup>。Nakamura らは血漿から非変性 PAGE で分離した pre $\beta$ 1-HDL を PAG 内で分子内架橋剤と反応後 SDS-PAGE で分析し、アポ A-1 モノマーのみが検出されることを報告した<sup>76)</sup>。本研究における著者らの結果は、この報告と一致した (Fig. 3-10)。

血漿 pre $\beta$ 1-HDL が 1 分子の lipid-free apoA-1 であることが考えられたことから、著者らは血漿 HDL から脱脂して精製した 1 分子の脱脂アポ A-1 と Intact な血漿 pre $\beta$ 1-HDL を比較した。まず、非変性 PAGE 及び非変性二次元電気泳動

法で分析した結果、泳動後の両者の移動度に差は見られなかった (Fig. 3-6, 3-7)。  
また、ゲルろ過クロマトグラフィーで Intact な血漿 pre $\beta$ 1-HDL と pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿に添加した脱脂アポ A-1 を分析した結果、両者は同じフラクション番号に回収され、溶出位置に差は認められなかった (Fig. 3-8)。更に、血漿加温実験でも血漿 pre $\beta$ 1-HDL と脱脂アポ A-1 を比較した。血漿 pre $\beta$ 1-HDL は血漿を 37 °C で加温すると、その濃度が加温時間に応じて著しく減少すること、及びその濃度の減少は LCAT 活性を阻害する DTNB の添加により抑制されることが知られている<sup>28, 41, 76, 107)</sup>。この現象のメカニズムは明らかではないが、DTNB の代わりに抗 LCAT 抗体を用いても同様の効果が見られること<sup>107)</sup>、及びこの加温実験における血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度の減少量と血漿 LCAT 活性は正相関すること<sup>108)</sup>から、この現象は LCAT 依存的な効果であると考えられる。本研究において、pre $\beta$ 1-HDL 除去血漿に添加した脱脂アポ A-1 は血漿 pre $\beta$ 1-HDL と同じ挙動を示すことが判明した (Fig. 3-9)。以上の結果から、血漿 pre $\beta$ 1-HDL は、1 分子の lipid-free apoA-1 であることが示唆された。

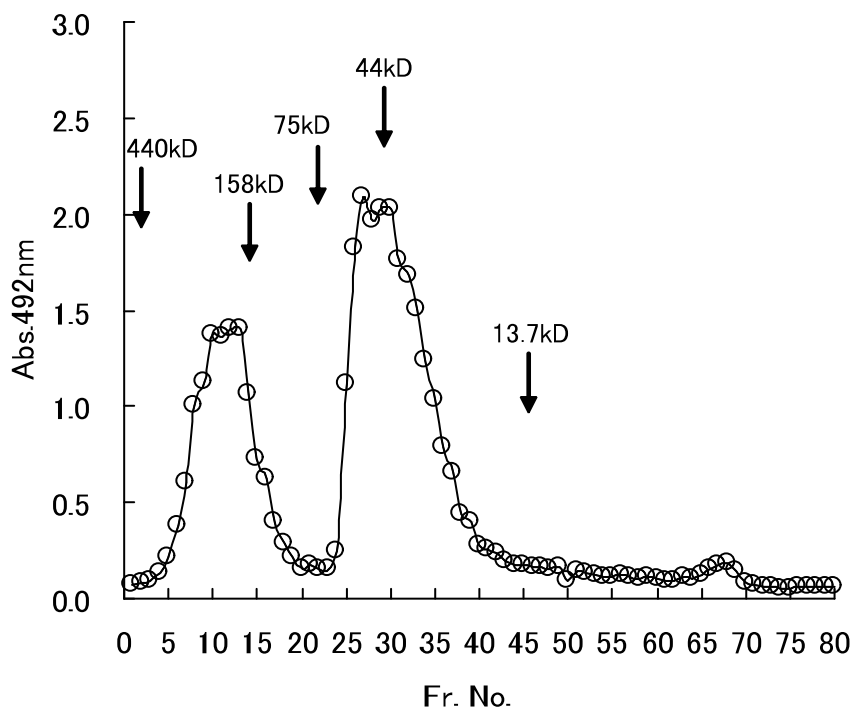


Fig. 3-1 Separation of the MAbs55201-bound column-adsorbed fraction by gel filtration chromatography. Molecular weight markers used were ferritin (440 kD), Aldorase (158 kD), conalbumin (75 kD), ovalbumin (44 kD) and ribonuclease A (13.7 kD) from Gel Filtration Calibration Kits (GE Healthcare).

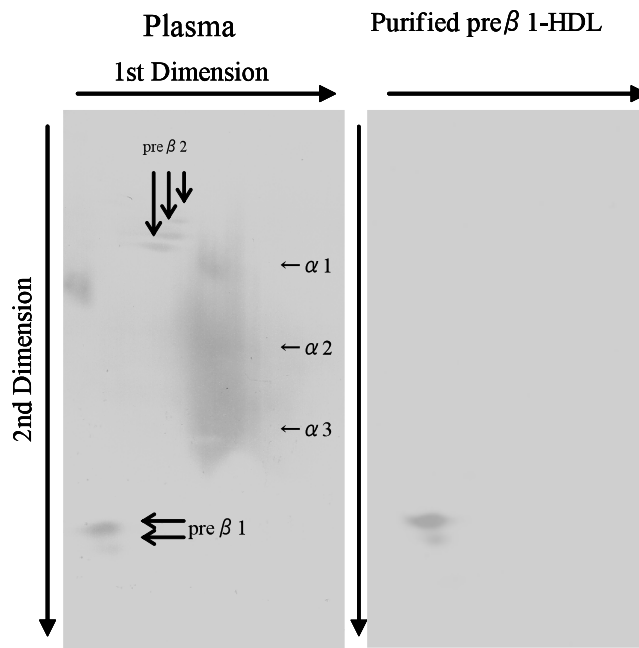


Fig. 3-2 Analysis of purified preβ1-HDL by non-denaturing 2D electrophoresis to demonstrate its purity.  
 Left panel: plasma, Right panel: purified preβ1-HDL.

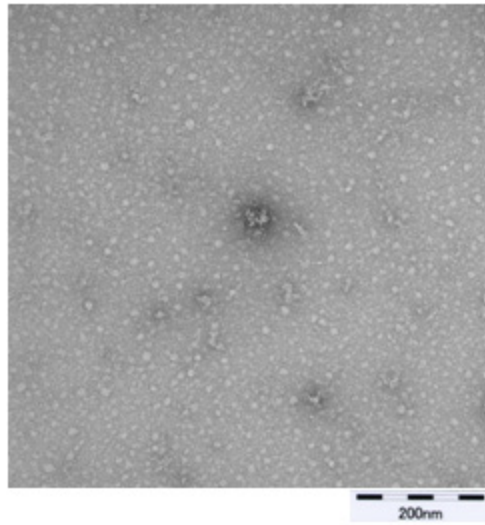


Fig. 3-3 Electron microscopy of purified pre $\beta$ 1-HDL.

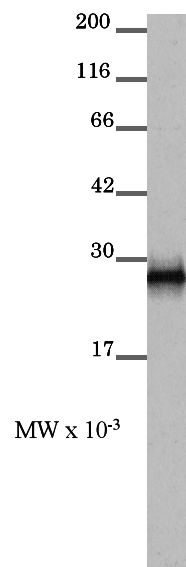


Fig. 3-4 SDS-PAGE analysis of purified pre $\beta$ 1-HDL.

Table 3-1 Proteins identified in pre $\beta$ 1-HDL purified from human plasma.

Reference	P (pro)	Sf	Score	Coverage	MW	Accession	Peptide (Hits)
A Chain A, Crystal Structure Of Lipid-Free Human Apolipoprotein A-I	1.45E-08	15.72	190.3	71.6	28078	90108664	20 (20 0 0 0 0)
	1.45E-08	15.72	190.3	71.6	28078	90108665	20 (20 0 0 0 0)
B Chain B, Crystal Structure Of Lipid-Free Human Apolipoprotein A-I	1.45E-08	15.72	190.3	71.6	28078	90108666	20 (20 0 0 0 0)
C Chain C, Crystal Structure Of Lipid-Free Human Apolipoprotein A-I							
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	15.72	190.3	72.2	27796	215415640	20 (20 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	15.72	190.3	71.6	27972	215415648	20 (20 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	15.72	190.3	71.6	27972	215415656	20 (20 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	15.72	190.3	71.6	27972	215415644	20 (20 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	15.72	190.3	71.6	28078	215415678	20 (20 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	15.72	190.3	71.6	28025	215415636	20 (20 0 0 0 0)
apolipoprotein A-I preproprotein [Homo sapiens]	1.45E-08	15.72	190.3	65.2	30778	4557321	20 (20 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	15.72	190.3	71.6	28025	215415624	20 (20 0 0 0 0)
APOA1_HUMAN RecName: Full=Apolipoprotein A-I; Short=Apo-A-I; Alt	1.45E-08	15.72	190.3	65.2	30778	113992	20 (20 0 0 0 0)
preproapolipoprotein A-I [Homo sapiens]	1.45E-08	15.72	190.3	65.2	30778	178768	20 (20 0 0 0 0)
proapolipoprotein [Homo sapiens] (Recombinant apoA-1)	1.45E-08	15.72	190.3	65.2	30778	178773	20 (20 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	15.72	190.3	65.2	30778	158257894	20 (20 0 0 0 0)
Apolipoprotein A-I [Homo sapiens]	1.45E-08	15.72	190.3	65.2	30778	13529242	20 (20 0 0 0 0)
apolipoprotein A-I precursor variant 5 [Homo sapiens]	1.45E-08	15.72	190.3	65.2	30778	167887486	20 (20 0 0 0 0)
apolipoprotein A-I precursor variant 4 [Homo sapiens]	1.45E-08	15.72	190.3	65.2	30778	167887485	20 (20 0 0 0 0)
apolipoprotein A-I precursor variant 3 [Homo sapiens]	1.45E-08	15.72	190.3	65.2	30778	167887484	20 (20 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	14.86	180.3	66.3	28025	215415626	19 (19 0 0 0 0)
apolipoprotein A-I precursor variant 2 [Homo sapiens]	1.45E-08	14.78	180.3	61.0	30778	167887483	19 (19 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	14.12	170.3	63.4	27972	215415630	18 (18 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	14.12	170.3	63.4	27972	215415658	18 (18 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	14.12	170.3	63.4	27972	215415646	18 (18 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	14.12	170.3	63.4	28025	215415628	18 (18 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.35E-08	13.95	170.3	64.6	27972	215415652	18 (18 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.35E-08	13.95	170.3	64.6	27972	215415650	18 (18 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.35E-08	13.95	170.3	64.6	28025	215415638	18 (18 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	13.94	170.3	66.3	28025	215415634	17 (17 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	13.94	170.3	66.3	27972	215415660	17 (17 0 0 0 0)
apolipoprotein A-I precursor variant 1 [Homo sapiens]	1.45E-08	13.81	170.3	55.8	30778	167887482	18 (18 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	13.26	160.3	58.0	27972	215415632	17 (17 0 0 0 0)
B Chain B, Crystal Structure Of Human Apolipoprotein A-I	9.58E-09	12.73	150.2	69.2	23403	2914176	15 (15 0 0 0 0)
A Chain A, Crystal Structure Of Human Apolipoprotein A-I	9.58E-09	12.73	150.2	69.2	23403	2914175	15 (15 0 0 0 0)
D Chain D, Crystal Structure Of Human Apolipoprotein A-I	9.58E-09	12.73	150.2	69.2	23403	2914178	15 (15 0 0 0 0)
0 Chain 0, Structure Of The Ribosome-SecyE Complex In The Membrane Environmen (Human apoA-1 fragment)	9.58E-09	12.73	150.2	69.5	23272	329665991	15 (15 0 0 0 0)
1 Chain 1, Structure Of The Ribosome-SecyE Complex In The Membrane Environmen (Human apoA-1 fragment)	9.58E-09	12.73	150.2	69.5	23272	329665992	15 (15 0 0 0 0)
C Chain C, Crystal Structure Of Human Apolipoprotein A-I	9.58E-09	12.73	150.2	69.2	23403	2914177	15 (15 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.35E-08	12.35	150.3	56.4	27972	215415654	16 (16 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	1.45E-08	12.33	150.3	58.0	27972	215415642	15 (15 0 0 0 0)
proapolipoprotein [Homo sapiens] (Recombinant apoA-1)	9.93E-09	10.84	130.3	48.2	28961	178775	14 (14 0 0 0 0)
A Chain A, 2.2 Angstrom Crystal Structure Of C Terminal Truncated Human Apolipoprotein A-1	4.64E-08	10.49	130.3	64.3	21624	347447518	14 (14 0 0 0 0)
Apolipoprotein A-I [Homo sapiens]	3.08E-08	6.96	80.3	30.0	30778	82571472	9 (9 0 0 0 0)
apolipoprotein A-I, isoform CRA_a [Homo sapiens]	3.08E-08	6.10	70.3	25.1	30778	119587680	8 (8 0 0 0 0)
apolipoprotein A-I, isoform CRA_b [Homo sapiens]	3.08E-08	4.50	50.3	23.4	23468	119587681	6 (6 0 0 0 0)
apolipoprotein A-I, isoform CRA_a [Homo sapiens]	3.08E-08	4.33	50.3	18.7	30778	119587678	6 (6 0 0 0 0)
apolipoprotein A-I, isoform CRA_a [Homo sapiens]	3.08E-08	4.33	50.3	18.7	30778	119587679	6 (6 0 0 0 0)
unnamed protein product [Homo sapiens] (Human apoA-1 mutein)	3.08E-08	3.38	40.2	13.9	30778	732753	5 (5 0 0 0 0)
apolipoprotein AI, apo AI [human, spleen, Peptide Mutant, 88 aa]	3.08E-08	3.00	40.2	40.9	10161	253362	5 (5 0 0 0 0)
preproapolipoprotein AI [Homo sapiens]	3.08E-08	2.53	30.2	13.9	30778	28772	3 (3 0 0 0 0)
750843A protein,lipid binding AI (Human apoA-1)	1.35E-08	1.92	20.2	6.9	28346	229513	2 (2 0 0 0 0)
apoAI [Homo sapiens]	6.35E-05	1.60	20.1	8.2	28078	490098	2 (2 0 0 0 0)
A Chain A, The Helix-Hinge-Helix Structural Motif In Human Apolipoprotein A-I	6.27E-08	0.94	10.1	23.9	5142	157831263	1 (1 0 0 0 0)
A Chain A, The Helix-Hinge-Helix Structural Motif In Human Apolipoprotein A-I	6.27E-08	0.94	10.1	23.9	5142	157831262	1 (1 0 0 0 0)
sperm activating protein subunit I, apolipoprotein AI, SPAP subunit I (Human apoA-1 fragment)	1.88E-03	0.85	10.2	50.0	2930	235865	2 (2 0 0 0 0)

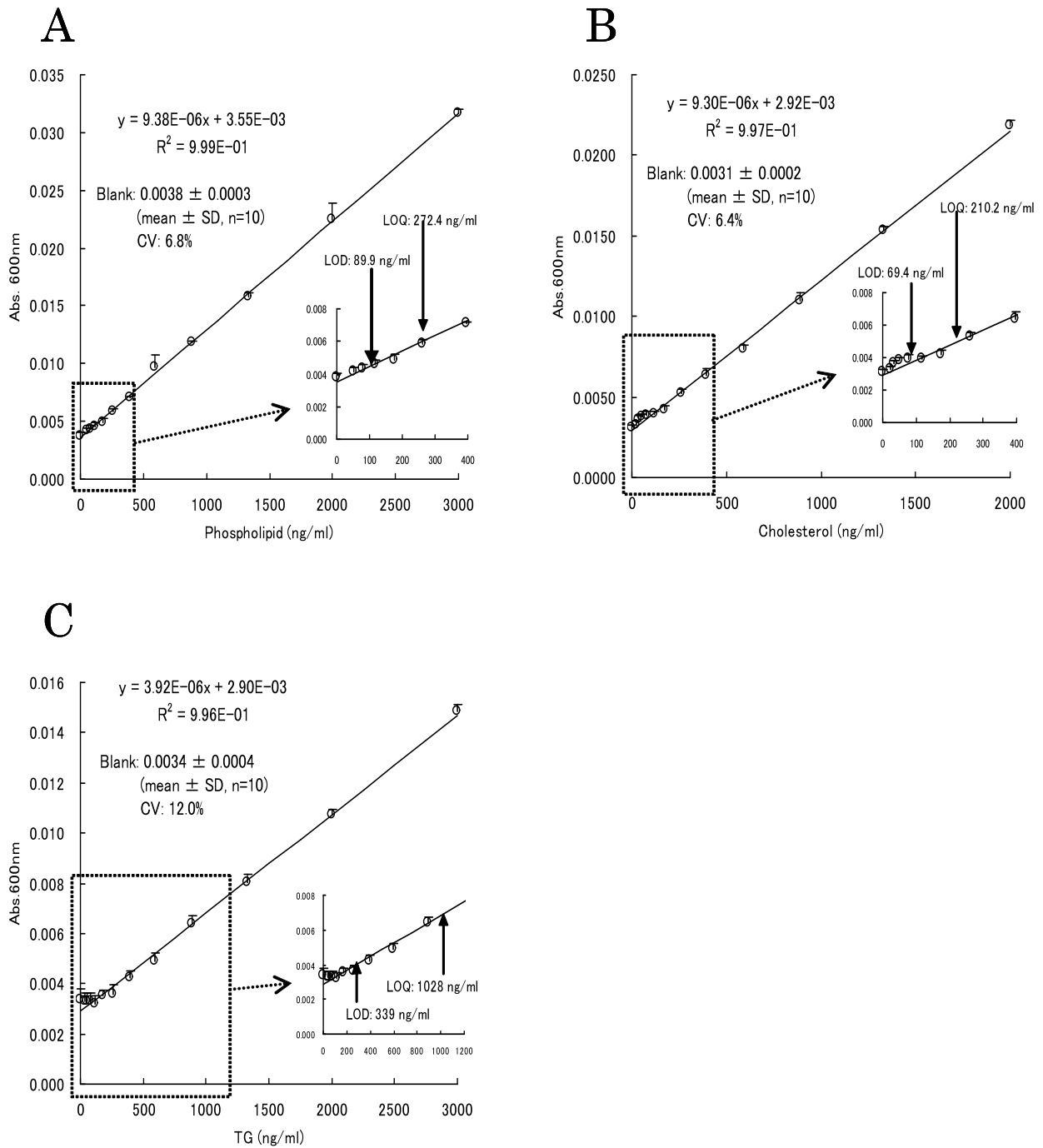


Fig. 3-5 Calibration curves of lipid assays for phospholipid (A), cholesterol (B) and triglyceride (C). The error bars represent one standard deviation of absorbance (n=10).

Table 3-2 Composition of pre $\beta$ 1-HDL purified from human plasma.

	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Mass ratio (protein:lipid)	Molar ratio (apoA-1:lipid) <sup>e</sup>
Protein	$22.5 \pm 3.5^a$	-	-
Phospholipid	$<0.0899^b$	100 : $<0.40$	1 : $<0.11$
Cholesterol	$<0.0694^c$	100 : $<0.31$	1 : $<0.23$
Triglyceride	$<0.339^d$	100 : $<1.5$	1 : $<0.48$

*a*: mean  $\pm$  SD (n=4)

*b*: The absorbance of each sample was 0.0031, 0.0033, 0.0043 and 0.0033, respectively (mean of duplicates). All values were less than LOD (0.0899  $\mu\text{g/ml}$ ).

*c*: The absorbance of each sample was 0.0022, 0.0020, 0.0024 and 0.0023, respectively (mean of duplicates). All values were less than LOD (0.0694  $\mu\text{g/ml}$ ).

*d*: The absorbance of each sample was 0.0023, 0.0044, 0.0022 and 0.0036, respectively (mean of duplicates). All values were less than LOD (0.339  $\mu\text{g/ml}$ ).

*e*: Values are calculated on the basis of the following molecularweights: apoA-1, 28331; phospholipid, 774; cholesterol, 387; triglyceride, 886.



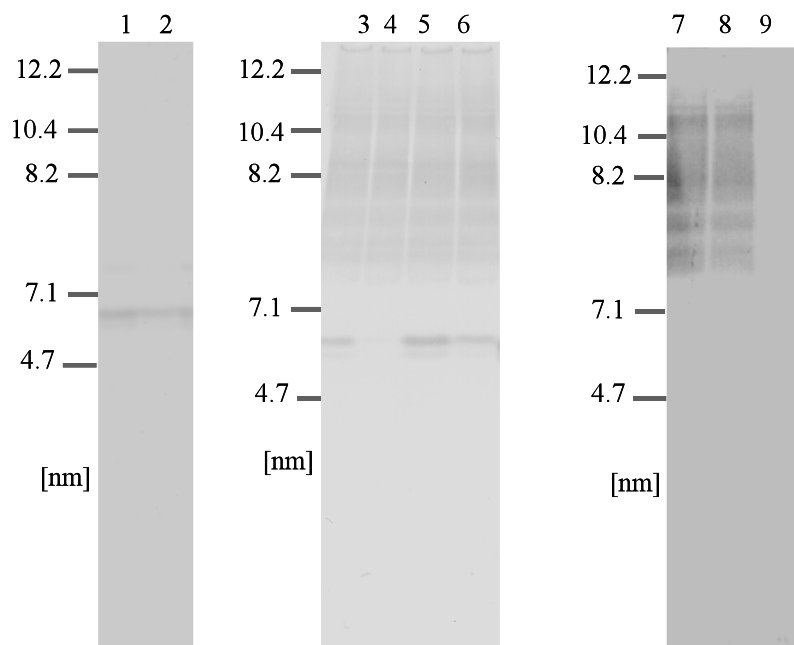


Fig. 3-6 Comparison of pre $\beta$ 1-HDL with lipid-free apoA-1 in Non-denaturing PAGE.

1: Purified pre $\beta$ 1-HDL, 2: Lipid-free apoA-1, 3: Plasma, 4: pre $\beta$ 1-HDL-depleted plasma, 5: pre $\beta$ 1-HDL-depleted plasma + purified pre $\beta$ 1-HDL, 6: pre $\beta$ 1-HDL-depleted plasma + lipid-free apoA-1, 7: HDL prepared by ultracentrifugation, 8: Unbound fraction of affinity chromatography using HDL, 9: Fraction eluted with glycine-HCl buffer (pH 2.0) in affinity chromatography using HDL

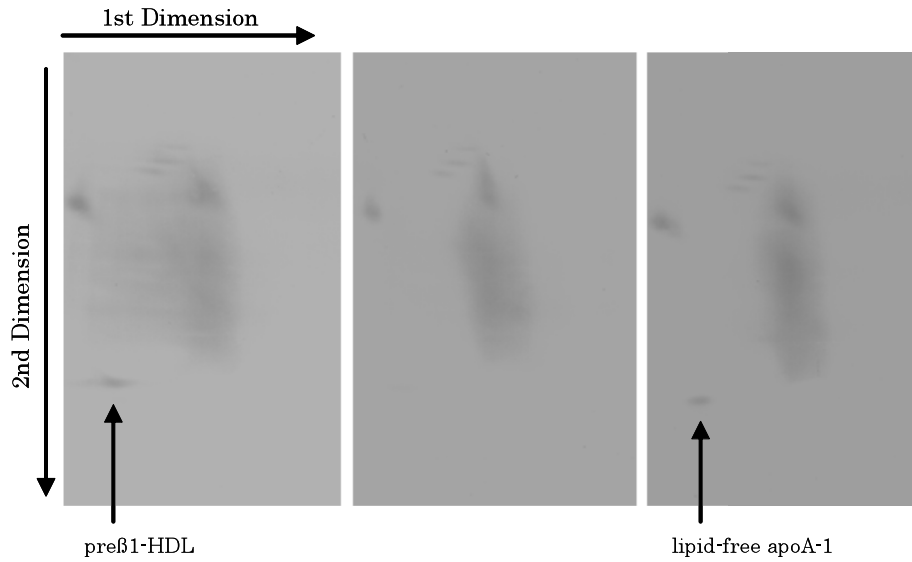


Fig. 3-7 Comparison of pre $\beta$ 1-HDL with lipid-free apoA-1 in Non-denaturing 2D electrophoresis.

Left panel: plasma, middle panel: pre $\beta$ 1-HDL-depleted plasma, right panel: pre $\beta$ 1-HDL-depleted plasma + lipid-free apoA-1.

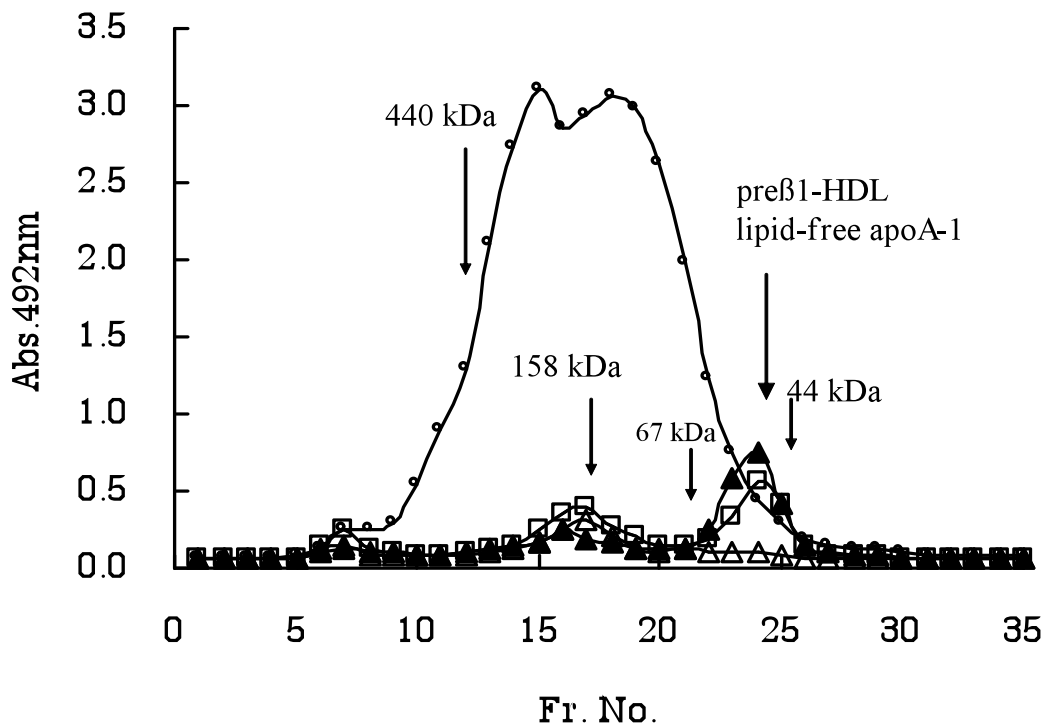


Fig. 3-8 Comparison of pre $\beta$ 1-HDL with lipid-free apoA-1 in size-exclusion chromatography. The Y-axis represents apoA-1 or pre $\beta$ 1-HDL absorbance levels at 492nm measured by apoA-1-ELISA using goat anti-apoA-1 PAb or pre $\beta$ 1-HDL-ELISA. Unfilled circles represent apoA-1 levels of each fraction separated from plasma. Unfilled squares, unfilled triangles and filled triangles represent pre $\beta$ 1-HDL levels of each fraction separated from plasma, pre $\beta$ 1-HDL-depleted plasma and pre $\beta$ 1-HDL-depleted plasma + lipid-free apoA-1, respectively. Molecular markers, ferritin (440 kD), aldorase (158 kD), albumin (67kD) and ovalbumin (44kD) were eluted in fraction numbers 12, 17, 22 and 25, respectively.

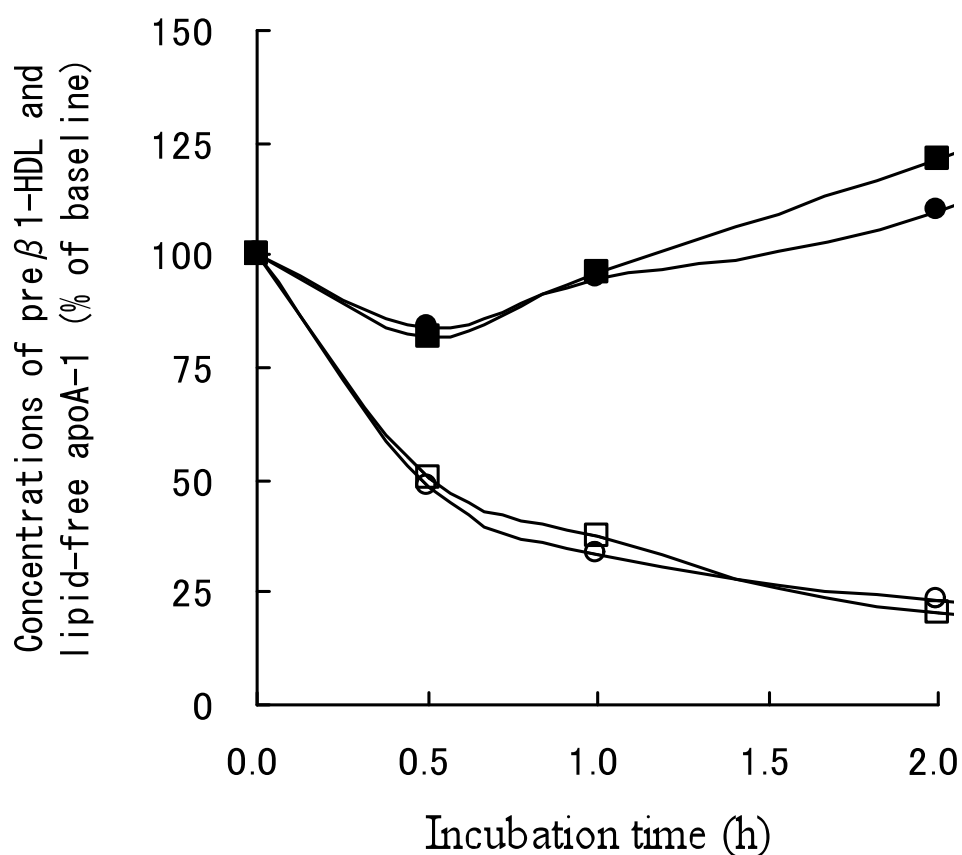
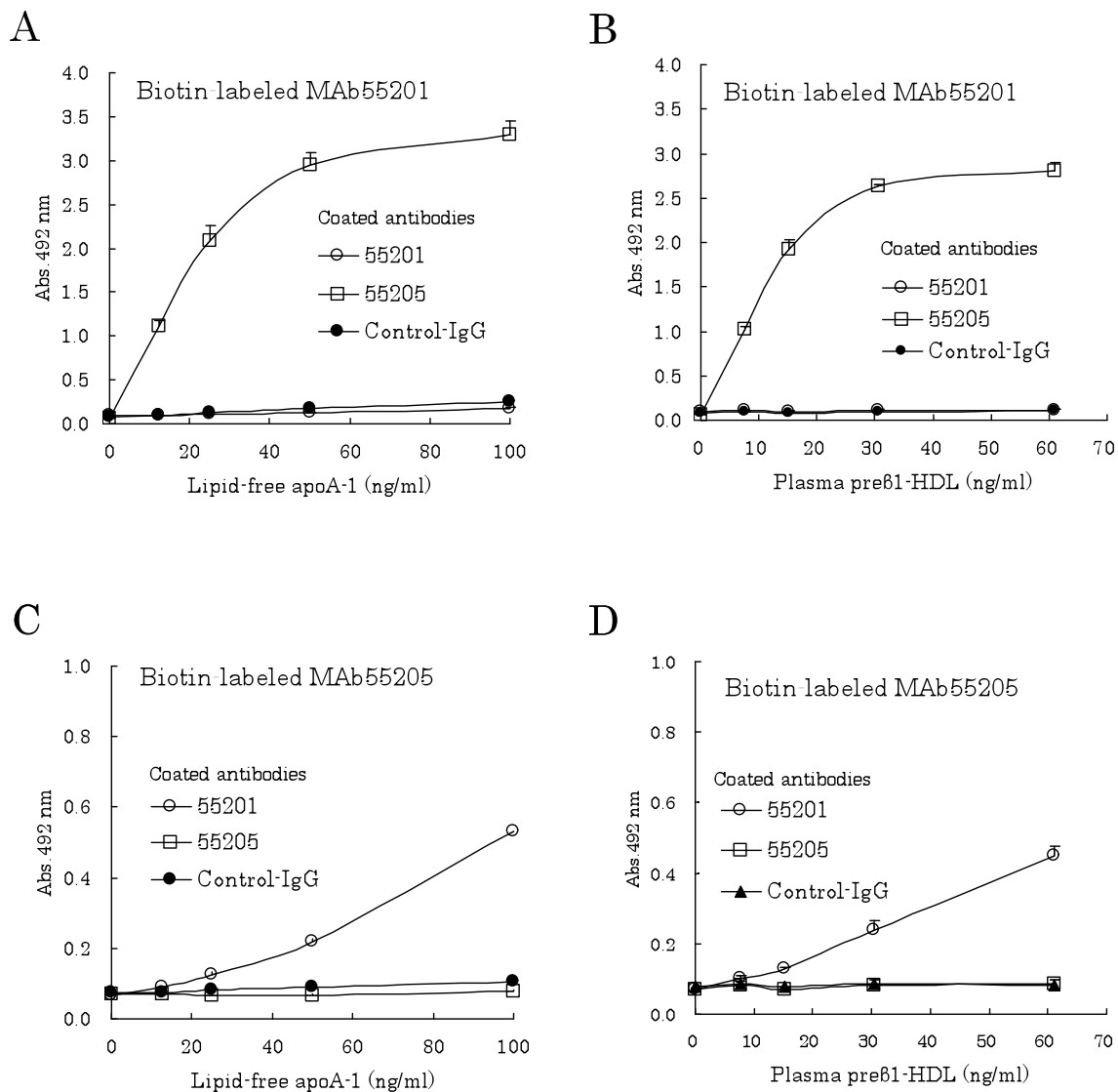


Fig. 3-9 Variations in preβ1-HDL and lipid-free apoA-1 levels in plasma during incubation at 37°C.

○: Plasma (plasma 0.4 ml, phosphate buffer 0.05 ml, PBS 0.05 ml), ●: Plasma +DTNB (plasma 0.4 ml, DTNB solution 0.05 ml, PBS 0.05 ml), □: preβ1-HDL-depleted plasma + lipid-free apoA-1 (preβ1-HDL-depleted plasma 0.4 ml, phosphate buffer 0.05 ml, lipid-free apoA-1 (0.1 mg/ml) 0.05 ml), ■: preβ1-HDL-depleted plasma + lipid-free apoA-1 + DTNB (preβ1-HDL-depleted plasma 0.4 ml, DTNB solution 0.05 ml, lipid-free apoA-1 (0.1 mg/ml) 0.05 ml). Values are expressed as % of the baseline value (before incubation). Each point represents the average of duplicate measurements.



**Fig. 3-10 Sandwich ELISA using anti-preβ1-HDL monoclonal antibodies.**  
 A, C: Reactivity with lipid-free apoA-1 in each sandwich ELISA using biotin-labeled MAb55201 (A) and biotin-labeled MAb55205 (C). B, D: Reactivity with plasma preβ1-HDL in each sandwich ELISA using biotin-labeled MAb55201 (B) and biotin-labeled MAb55205 (D). Plasma with a preβ1-HDL concentration of 26.9  $\mu$ g/ml was used after diluting 441 to 3,580-fold. The horizontal axis indicates the plasma preβ1-HDL concentration. Values are presented as the mean value  $\pm$  SD of triplicate measurements.

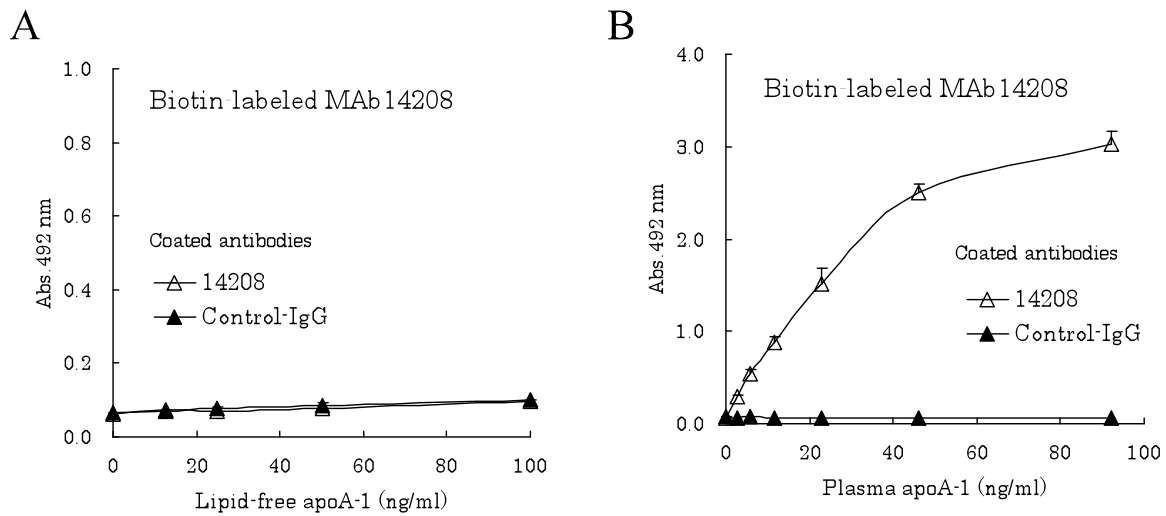


Fig. 3-11 Sandwich ELISA using anti-apoA-1 monoclonal antibody (MAb14208) and biotin-labeled MAb14208.

A: Reactivity with lipid-free apoA-1. B: Reactivity with plasma HDL. Plasma with an apoA-1 concentration of 1.3 mg/ml was used after diluting 14,112 to 451,584-fold. The horizontal axis indicates the plasma apoA-1 concentration. Values are presented as the mean value  $\pm$  SD of triplicate measurements.

## 総合考察

血漿 pre $\beta$ 1-HDL はコレステロール引き抜きに重要な役割を果たすと言われて  
いるが、pre $\beta$ 1-HDL が ABCA1 を介するコレステロール引き抜き反応の基質であ  
るのか、最初の生成物であるのかこれまで議論が分かれていた<sup>10, 11, 23, 24, 34)</sup>。  
Castro と Fielding は、<sup>3</sup>H 標識したコレステロールを含有させた繊維芽細胞と  
血漿をインキュベートすると細胞由来コレステロールは最初に pre $\beta$ 1-HDL の位  
置に検出されることを報告した<sup>25)</sup>。このことは、pre $\beta$ 1-HDL が細胞由来コレス  
テロールの引き抜きを伴う HDL 新生反応の最初の生成物であることを示す結果  
である。近年様々な培養細胞を用いた実験において、lipid-free apoA-1 が ABCA1  
を介して細胞からリン脂質及びコレステロールを引き抜くと、pre $\beta$ 1-HDL 様の  
lipid-poor apoA-1、あるいは nascent HDL が生成することが報告されている  
<sup>98, 106, 109, 110)</sup>。しかし、これらの pre $\beta$ 1-HDL 様粒子の非変性 PAGE での粒子サイズ  
は直径 7.1 nm のアルブミンよりも大きく、アルブミンよりも小粒子側に検出さ  
れる血漿 pre $\beta$ 1-HDL のサイズとは明確に異なっている。一方、繊維芽細胞から  
血漿へのコレステロール引き抜き反応は、pre $\beta$ 1-HDL を特異的に認識する抗体  
を添加すると著しく阻害されること、及び血漿から pre $\beta$ 1-HDL を除去すると著  
しく低下することが知られている<sup>27, 28)</sup>。このことは、pre $\beta$ 1-HDL 自体がコレス  
テロールを引き抜くこと、即ち pre $\beta$ 1-HDL は引き抜き反応の基質であることを  
示す結果である。また、この pre $\beta$ 1-HDL 特異的なコレステロール引き抜き反応  
は、繊維芽細胞を予めプロテアーゼで処理すると著しく低下するのに対し、ABCA  
1 を発現しない赤血球ではプロテアーゼ処理の影響は受けないことが報告され  
ている<sup>28)</sup>。このことは、pre $\beta$ 1-HDL が細胞膜上の蛋白質、おそらく ABCA1 を介  
して細胞コレステロールを引き抜くことを推察させる結果である。また、

pre $\beta$ 1-HDL は、ABCA1 を介するコレステロール引き抜きが起こらないタンジール病患者の血漿中に存在することが知られている<sup>42,43)</sup>。このことは、pre $\beta$ 1-HDL が ABCA1 を介するコレステロール引き抜き反応の生成物でなく、基質であることを強く示唆する結果である。本研究の結果から、血漿 pre $\beta$ 1-HDL は lipid-free apoA-1 であることが示され、このことがより明確になったと思われる。

Lipid-free apoA-1 は、多くの総説で ABCA1 を介するコレステロール引き抜き反応の基質であることが示されている<sup>6,11,13,14,19)</sup>。しかし、実際の血漿中に lipid-free apoA-1 が存在することについては、これまで明確な証拠は無かった<sup>34)</sup>。今回著者らは、血漿から精製した pre $\beta$ 1-HDL 及び Intact な血漿 pre $\beta$ 1-HDL を分析し、血漿 pre $\beta$ 1-HDL が 1 分子の lipid-free apoA-1 であることをはじめて明らかにすることができた。これにより、ABCA1 を介して細胞コレステロールを引き抜く lipid-free apoA-1 が血中を循環し、コレステロール逆転送系に関わっていることが示唆された。

pre $\beta$ 1-HDL の血中濃度は、その機能に反し、動脈硬化性疾患、及び動脈硬化を惹起する疾患で高値化することが報告されている (Table 4)。高値化は冠動脈疾患<sup>31, 111-113)</sup>、脂質異常症<sup>32, 41, 62, 114)</sup>、及び人口透析を要する腎疾患<sup>115)</sup>で顕著である。冠動脈疾患における高値化機序としては、異化の遅延と生成の亢進が考えられる。Miida ら<sup>111)</sup>は LCAT 活性が低い冠動脈疾患で、Asztalos ら<sup>31)</sup>は HDL-C が低い冠動脈疾患で pre $\beta$ 1-HDL 濃度が有意に高いこと、また、Sethi ら<sup>113)</sup>は虚血性心疾患における血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度と LCAT 活性は逆相関することを報告している。これらのことから、冠動脈疾患では何らかの理由で LCAT による pre $\beta$ 1-HDL の  $\alpha$ -HDL への移行が遅延していることが考えられる。一方、Tashiro らは著者との共同研究により、冠動脈疾患、特に急性冠症候群の一つ



である不安定狭心症で血漿 pre $\beta$ 1-HDL が高いこと、及び冠動脈疾患及び不安定狭心症での pre $\beta$ 1-HDL の高値化は脂質異常症及び腎疾患との合併を除いた群でも顕著であることを報告した<sup>112)</sup>。その検討結果では pre $\beta$ 1-HDL 濃度と LCAT 活性に有意な逆相関は認められず、pre $\beta$ 1-HDL 濃度は安定期の冠動脈疾患よりも不安定狭心症で高値にも関わらず、LCAT 活性及び HDL-C は両群で差は認められなかった。即ち、LCAT 依存性の pre $\beta$ 1-HDL の異化遅延のみでは冠動脈疾患における pre $\beta$ 1-HDL の高値化を説明できなかった。不安定狭心症における pre $\beta$ 1-HDL の高値化機序は不明であるが、可能性として、 $\alpha$ -HDL のリモデリングによる pre $\beta$ 1-HDL の生成亢進が考えられる。血中の SAA 濃度、sPLA2 活性及び濃度、及び PLTP 活性は、冠動脈疾患で上昇することが報告されている<sup>116-119)</sup>。特に血中 SAA 濃度及び PLTP 活性は、不安定狭心症などの急性冠症候群で増加する<sup>120, 121)</sup>。これらのことから、冠動脈疾患、特に急性冠症候群では、SAA、sPLA2、PLTP のような急性期蛋白が増加し、 $\alpha$ -HDL のリモデリングが亢進することにより血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度が上昇することが推察される。脂質異常症における pre $\beta$ 1-HDL の高値化機序についても、可能性としては、生成亢進と異化遅延が考えられる。今後検討を要するが、高コレステロール血症及び高 TG 血症ともに高値であること<sup>32, 41, 62, 114)</sup>から、コレステロールと TG の両方を多く含む VLDL の分泌量と関係することが考えられる。また、本論文では示さないが、著者らの予備的なデータでは血漿加温実験における pre $\beta$ 1-HDL の減少率は健常群に比べ脂質異常症で低い傾向があることから、異化遅延の可能性も考えられ、今後検討を要する。透析患者における pre $\beta$ 1-HDL の高値化機序としては、主に異化の遅延が考えられる。透析患者では、腎臓の濾過機能低下により pre $\beta$ 1-HDL (lipid-free apoA-1) の尿への排泄が低下していることが推察される。また、

Miida らは著者との共同研究で、透析患者では血漿加温実験における LCAT 依存性の pre $\beta$ 1-HDL 異化速度が著しく低下していることを明らかにした<sup>115)</sup>。血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は、2 型糖尿病及び肥満でも高いことが報告されている<sup>122-124)</sup>。しかし、2 型糖尿病患者の血漿 pre  $\beta$  1-HDL 濃度の高値化は脂質異常症や冠動脈疾患ほど顕著ではない。また、肥満については、著者らの検討では少なくとも冠動脈疾患や脂質異常症、及び正脂血症者で Body mass index (BMI) と血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度が相関するデータは得られていない<sup>112)</sup>。

血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は、薬剤投与により影響を受ける<sup>11, 108, 125-127)</sup> (Table 4)。プロブコールは、血中コレステロール値を低下させ、家族性高コレステロール血症患者の黄色腫を退縮させる<sup>18)</sup>。しかし、その退縮は血中 HDL-C 濃度の低下を伴う。プロブコールは lipid-free apoA-1 と細胞膜上の ABCA1 との結合を阻害し HDL の新生を抑制することが報告されている<sup>128-130)</sup>。このことは、家族性高コレステロール血症患者の黄色腫が退縮する結果と矛盾するが、プロブコール投与により CETP 活性が上昇し HDL が小型化することで ABCA1 を介さない非特異的なコレステロール引き抜きが亢進した結果と推測できる<sup>21)</sup>。プロブコール投与により血漿 pre $\beta$ 1-HDL 値は上昇することが知られている<sup>125)</sup>。その機序としては、pre $\beta$ 1-HDL (lipid-free apoA-1) と ABCA1 との結合が阻害されること、及び CETP 活性の上昇により  $\alpha$ -HDL のリモデリングが上昇することが考えられる。また、Miida らはプロブコール投与により HDL 中のリン脂質を加水分解する Endothelial lipase の抑制因子である Angiopoietin-like protein 3 の血漿濃度が減少し、それにより  $\alpha$ -HDL のリモデリングが亢進して pre $\beta$ 1-HDL 濃度が上昇する可能性を報告している<sup>125)</sup>。フィブラートは、血中の TG やコレステロールを低下させる脂質異常症治療薬である<sup>131, 132)</sup>。フィブラートは Peroxisome

proliferator-activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) のリガンドであり、リパーゼの発現を誘導することや脂肪酸の  $\beta$  酸化を亢進することにより血中の TG を減少させる<sup>133-135)</sup>。フィブラートの投与により血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は上昇することが報告されている<sup>126)</sup>。その機序としては、リパーゼ活性の上昇により  $\alpha$ -HDL や VLDL からの pre $\beta$ 1-HDL の生成が亢進すること<sup>126)</sup>、及び PPAR $\alpha$  が肝臓でのアポ A-1 合成を亢進すること<sup>133, 136)</sup>が考えられる。スタチンは、HMG-CoA 還元酵素を阻害し血中 LDL-C 値を下げる薬剤である<sup>3)</sup>。スタチンの投与により血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は減少することが報告されている<sup>11, 108, 137)</sup>。その機序としては、詳細は不明であるが、LCAT 依存性の pre $\beta$ 1-HDL 異化速度の亢進が報告されている<sup>108)</sup>。

血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は、運動などの生活習慣や性差でも影響を受ける (Table 4)。血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は、長期間、短期間、及び一回の運動でも上昇し、運動の量と相関する<sup>138-141)</sup>。運動による血漿 pre $\beta$ 1-HDL 値上昇の機序としては、運動により LPL 活性が上昇し TG-rich リポ蛋白からの pre $\beta$ 1-HDL の生成が亢進することが考えられる<sup>142)</sup>。血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は、健常群において年齢とは相関しないが、性差によって影響を受ける<sup>143, 144)</sup>。50 歳以下では女性の方が男性より有意に低い。一方、女性が閉経後となる 50 歳以上では男女差がないことから、閉経によるエストロゲン濃度の減少が血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度の上昇に影響を与えていることが考えられる<sup>143)</sup>。

以上のように血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度は、生成や異化に関与する様々な因子の活性や濃度によって影響される。従って、pre $\beta$ 1-HDL が疾患の早期発見や治療効果の指標となるには、そのような因子と pre $\beta$ 1-HDL との関係を更に明らかにすることが必要である。冠動脈疾患における血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度の高値化は、従

来の脂質代謝マーカーが正常な患者でも顕著であることから、従来のマーカーでは検知できなかった何らかの脂質代謝異常を反映する可能性がある。著者らが開発した pre $\beta$ 1-HDL 測定系により、血中 pre $\beta$ 1-HDL 濃度を簡便に測定することが可能となった。今後、多くの研究者がこの測定系を用いることにより関連する分野の研究が発展することを期待する。特に冠動脈疾患や脂質異常症における血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度の高値化機序が明確となり、血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度測定の臨床的意義が確立されること、様々な遺伝的疾患における病態と血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度との関係、また、今後開発されるコレステロール逆転送系の活性化を目的とした薬剤の効果と血漿 pre $\beta$ 1-HDL 濃度との関係が明らかになることを期待する。

Table 4 Effects of various conditions on plasma pre $\beta$ 1-HDL level.

Condition	pre $\beta$ 1-HDL level	References
<b>Diseases</b>		
Coronary artery disease	↑ ↑	[31, 111, 112, 113]
Unstable angina pectoris	↑ ↑	[112]
Dyslipidemia	↑ ↑	[32, 41, 62, 114]
Hypercholesterolemia	↑ ↑	[32, 41, 62, 114]
Hypertriglyceridemia	↑ ↑	[32, 41]
Hemodialysis	↑ ↑	[115]
Type 2 diabetes	↑	[122, 123]
Obesity	↑	[124]
<b>Drugs</b>		
Probucol	↑	[125]
Fibrate	↑	[126]
Statin	↓	[11, 108, 137]
Insulin	↑	[127]
<b>Others</b>		
Physical exercise	↑ ↑	[138, 139, 140, 141]
Low-cholesterol diet	↓	[62]
Female (<50 years)	↓	[143, 144]

## 要約

pre $\beta$ 1-HDL 中のアポ A-1 を特異的に認識する抗 pre $\beta$ 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 pre $\beta$ 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 $\beta$ 1-HDL 濃度の簡便、迅速、且つ正確な測定が可能となった。

LPL の作用により VLDL から pre $\beta$ 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 $\beta$ 1-HDL の生成経路の一つであることが証明された。

ヒト血漿から精製した pre $\beta$ 1-HDL と Intact なヒト血漿 pre $\beta$ 1-HDL を分析した結果、pre $\beta$ 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 のリガンドである lipid-free apoA-1 が血中を循環していることが証明された。

## 引用文献

1. Mahley R.W., T.L. Innerarity, S.C. Rall Jr, and K.H. Weisgraber. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* **25**: 1277-1294.
2. Kannel W. B. 1988. Cholesterol and risk of coronary heart disease and mortality in men. *Clin. Chem.* **34**: B53-59.
3. Karalis D. G. 2004. Intensive lowering of low-density lipoprotein cholesterol levels for primary prevention of coronary artery disease. *Mayo Clin. Proc.* **84**: 345-352.
4. Assmann G., and A. M. Gotto Jr. 2004. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation.* **109**: 8-14.
5. Brewer H. B. Jr, A. T. Remaley, E. B. Neufeld, F. Basso, and C. Joyce. 2004. Regulation of plasma high-density lipoprotein levels by the ABCA1 transporter and the emerging role of high-density lipoprotein in the treatment of cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**: 1755-1760.
6. von Eckardstein A., J. R. Nofer, and G. Assmann. 2001. High density lipoproteins and arteriosclerosis: Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**: 13-27.
7. Troutt J. S., W. E. Alborn, M. K. Mosior, J. Dai, A. T. Murphy, T. P. Beyer, Y. Zhang, G. Cao, and R. J. Konrad. 2008. An apolipoprotein A-I mimetic dose-dependently increases the formation of prebeta1 HDL in human plasma. *J. Lipid Res.* **49**: 581-587.
8. Zhang L. H., V. S. Kamanna, S. H. Ganji, X. M. Xiong, and M. L. Kashyap. 2012. Niacin increase HDL biogenesis by enhancing DR4-dependent transcription of

- ABCA1 and lipidation of apolipoprotein A-1 in HepG2 cells. *J Lipid Res.* **53**: 941-950.
9. Hoang A, B. G. Drew, H. Low, A. T. Remaley, P. Nestel, B. A. Kingwell, and D. Sviridov. 2012. Mechanism of cholesterol efflux in humans after infusion of reconstituted high-density lipoprotein. *Eur Heart J.* **33**: 657-665.
  10. Fielding C. J., and P. E. Fielding. 1995. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J. Lipid Res.* **36**: 211-228.
  11. Sviridov D., and P. Nestel. 2002. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis.* **161**: 245-254.
  12. Phillips M. C. 2013. New insights into the determination of HDL structure by apolipoproteins. *J. Lipid Res.* **54**: 2034-2048.
  13. Yokoyama S. 2006. Assembly of high-density lipoprotein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**: 20-27.
  14. Oram J. F., and R. M. Lawn. 2001. ABCA1: The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J. Lipid Res.* **42**: 1173-1179.
  15. Yokoyama S., S. Yamashita, S. Ishibashi S, H. Sone, S. Oikawa, K. Shirai, T. Ohta, H. Bujo, J. Kobayashi, H. Arai, et al. 2012. Background to discuss guidelines for control of plasma HDL-cholesterol in Japan. *J. Atheroscler. Thromb.* **19**: 207-212.
  16. Nagano M., S. Yamashita, K. Hirano, M. Takano, T. Maruyama, M. Ishihara, Y. Sagehashi, T. Kujiraoka, K. Tanaka, H. Hattori, et al. 2004. Molecular mechanism of cholesterol ester transfer protein deficiency in Japanese. *J. Atheroscler. Thromb.* **11**: 110-121.
  17. Zhong S., D. S. Sharp, J. S. Grove, C. Bruce, K. Yano, J. D. Curb, and A. R. Tall.



1996. Increased coronary heart disease in Japanese-American men with mutation in the cholesteryl ester transfer protein gene despite increased HDL levels. *J. Clin. Invest.* **97**: 2917-2923.
18. Yamashita S., and Y. Matsuzawa. 2009. Where are we with probucol: a new life for an old drug? *Atherosclerosis.* **207**: 16-23.
19. Fisher E. A., J. E. Feig, B. Hewing, S. L. Hazen, and J. D. Smith. 2012. High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**: 2813-2820.
20. Rosenson R. S., H. B. Brewer, Jr, M. J. Chapman, S. Fazio, M. M. Hussain, A. Kontush, R. M. Krauss, J. D. Otvos, A. T. Remaley, and E. J. Schaefer. 2011. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin. Chem.* **57**: 392-410.
21. Ishigami M., S. Yamashita, N. Sakai, K. Hirano, T. Arai, T. Maruyama, S. Takami, M. Koyama, K. Kameda-Takemura, and Y. Matsuzawa. 1997. High-density lipoproteins from probucol-treated patients have increased capacity to promote cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages loaded with acetylated low-density lipoproteins. *Eur. J. Clin. Invest.* **27**: 285-292.
22. Kunitake S. T., K. J. La Sala, and J. P. Kane. 1985. Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility. *J. Lipid Res.* **26**: 549-555.
23. Barrans A., B. Jaspard, R. Barbaras, H. Chap, B. Perret, and X. Collet. 1996. Pre- $\beta$  HDL: structure and metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1300: 73-85.
24. Wróblewska M. 2011. The origin and metabolism of a nascent pre- $\beta$  high density lipoprotein involved in cellular cholesterol efflux. *Acta Biochim. Pol.* **58**:

275-285.

25. Castro G. R., and C. J. Fielding. 1988. Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high density lipoprotein. *Biochemistry*. **27**: 25-29.
26. Kane J. P., and M. J. Malloy. 2012. Prebeta-1 HDL and coronary heart disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **23**: 367-371.
27. Fielding P. E., M. Kawano, A. L. Catapano, A. Zoppo, S. Marcovina, and C. J. Fielding. 1994. Unique epitope of apolipoprotein A-I expressed in pre-beta-1 high-density lipoprotein and its role in the catalyzed efflux of cellular cholesterol. *Biochemistry*. **33**: 6981-6985.
28. Kawano M., T. Miida, C. J. Fielding, and P. E. Fielding. 1993. Quantitation of pre beta-HDL-dependent and nonspecific components of the total efflux of cellular cholesterol and phospholipid. *Biochemistry*. **32**: 5025-5028.
29. Gillotte K. L., W. S. Davidson, S. Lund-Katz, G. H. Rothblat, and M. C. Phillips. 1998. Removal of cellular cholesterol by pre- $\beta$ -HDL involves plasma membrane microsolubilization. *J. Lipid Res.* **39**: 1918-1928.
30. Miyazaki O., and I. Fukamachi. 2010. Pre $\beta$ 1-HDL, a key element of reverse cholesterol transport: its potential as a biomarker. *Clin. Lipidol.* **5**: 355-365.
31. Asztalos B. F., P. S. Roheim, R. L. Milani, M. Lefevre, J. R. McNamara, K. V. Horvath, and E. J. Schaefer. 2000. Distribution of apoA-I-containing HDL subpopulations in patients with coronary heart disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 2670-2676.
32. Miida T, K. Inano, T. Yamaguchi, T. Tsuda, and M. Okada. 1997. LpA-I levels do

- not reflect pre beta1-HDL levels in human plasma. *Atherosclerosis*. **133**: 221-226.
33. O'Connor P. M., J. M. Naya-Vigne, P. N. Duchateau, B. Y. Ishida, M. Mazur, S. A. Schoenhaus, B. R. Zysow, M. J. Malloy, S. T. Kunitake, and J. P. Kane. 1997. Measurement of pre beta-1 HDL in human plasma by ultrafiltration-isotope dilution technique. *Anal. Biochem*. **251**: 234-240.
34. Rye K. A., and P. J. Barter. 2004. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. **24**: 421-428.
35. Neary R., D. Bhatnagar, P. Durrington, M. Ishola, S. Arrol, and M. Mackness. 1991. An investigation of the role of lecithin:cholesterol acyltransferase and triglyceride-rich lipoproteins in the metabolism of pre-beta high density lipoproteins. *Atherosclerosis*. **89**: 8935-8948.
36. Glickman R. M., P. H. Green, R. S. Lees, and A. Tall. 1978. Apoprotein A-I synthesis in normal intestinal mucosa and in Tangier disease. *N. Engl. J. Med*. **299**: 1424-1427.
37. Castle C. K., M. E. Pape, K. R. Marotti, and G. W. Melchior. 1991. Secretion of pre-beta-migrating apoA-I by cynomolgus monkey hepatocytes in culture. *J. Lipid Res*. **32**: 439-447.
38. Jones L. A., T. Teramoto, D. J. John, R. B. Goldberg, A. H. Rubenstein, and G. S. Getz. 1984. Characterization of lipoproteins produced by the perfused rhesus monkey liver. *J. Lipid Res*. **25**: 319-335.
39. Tall A. R., P. H. Green, R. M. Glickman, J. W. Riley. 1979. Metabolic fate of chylomicron phospholipids and apoproteins in the rat. *J. Clin. Invest*. **64**: 977-989.
40. Schaefer E. J., L. L. Jenkins, and H. B. Brewer, Jr. 1978. Human chylomicron

- apolipoprotein metabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**: 405-412.
41. Miyazaki O., J. Kobayashi, I. Fukamachi, T. Miida, H. Bujo, and Y. Saito. 2000. A new sandwich enzyme immunoassay for measurement of plasma pre $\beta$ 1-HDL levels. *J. Lipid Res.* **41**: 2083-2088.
42. Huang Y., A. von Eckardstein, W. Shili, C. Langer, and G. Assmann. 1995. Generation of pre- $\beta$ 1-HDL and conversion into  $\alpha$ -HDL. Evidence for disturbed HDL conversion in Tangier disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 1746-1754.
43. Asztalos B. F., M. E. Brousseau, J. R. McNamara, K. V. Horvath, P. S. Roheim, and E. J. Schaefer. 2001. Subpopulations of high density lipoproteins in homozygous and heterozygous Tangier disease. *Atherosclerosis.* **156**: 217-225.
44. Brooks-Wilson A., M. Marcil, S. M. Clee, L. H. Zhang, K. Roomp, M. van Dam, L. Yu, C. Brewer, J.A. Collins, H.O. Molhuizen, et al. 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* **22**: 336-345.
45. Bodzioch M., E. Orsó, J. Klucken, T. Langmann, A. Böttcher, W. Diederich, W. Drobnik, S. Barlage, C. Büchler, M. Porsch-Ozcürümez, et al. 1999. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat. Genet.* **22**: 347-351.
46. Rust S., M. Rosier, H. Funke, J. Real, Z. Amoura, J. C. Piette, J. F. Deleuze, H. B. Brewer, N. Duverger, P. Denèfle, et al. 1999. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* **22**: 352-355.

47. Francis G. A., R. H. Knopp, and J. F. Oram. 1995. Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J. Clin. Invest.* **96**: 78-87.
48. Guendouzi K., B. Jaspard, R. Barbaras, C. Motta, C. Vieu, Y. Marcel, H. Chap, B. Perret, and X. Collet. 1999. Biochemical and physical properties of remnant-HDL2 and of pre $\beta$ 1-HDL produced by hepatic lipase. *Biochemistry.* **38**: 2762-2768.
49. Jaspard B., X. Collet, R. Barbaras, J. Manent, C. Vieu, J. Parinaud, H. Chap, and B. Perret. 1996. Biochemical characterization of pre- $\beta$ 1 high-density lipoprotein from human ovarian follicular fluid: Evidence for the presence of a lipid core. *Biochemistry.* **35**: 1352-1357.
50. Miyazaki O., I. Fukamachi, A. Mori, H. Hashimoto, M. Kawashiri, A. Nohara, T. Noguchi, A. Inazu, M. Yamagishi, H. Mabuchi, et al. 2009. Formation of pre $\beta$ 1-HDL during lipolysis of triglyceride-rich lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**: 55-59.
51. Miyazaki O., J. Ogihara, I. Fukamachi, and T. Kasumi. Evidence for the presence of lipid-free monomolecular apolipoprotein A-1 in plasma. *J. Lipid Res.* **55**: 214-225.
52. 石川栄治, 河合忠, 宮井潔, 1987. 酵素免疫測定法, 第3版, 医学書院, 東京.
53. Petit E., M. Ayrault-Jarrier, D. Pastier, H. Robin, J. Polonovski, I. Aragon, E. Hervaude, and B. Pau. 1987. Monoclonal antibodies to human apolipoprotein A-I: characterization and application as structural probes for apolipoprotein A-I and high density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* **919**: 287-296.

54. Pio F., H. De Loof, N. Vu Dac, V. Clavey, J. C. Fruchart, and M. Rosseneu. 1988. Immunochemical characterization of two antigenic sites on human apolipoprotein A-I; localization and lipid modulation of these epitopes. *Biochim. Biophys. Acta.* **959**: 160-168.
55. Fidge N., J. Morrison, T. Nugent, and M. Tozuka. 1989. Monoclonal antibodies to human A-I apolipoprotein and characterisation of cyanogen bromide fragments of apoA-I. *Biochim. Biophys. Acta.* **1003**: 84-90.
56. Dubois D. Y., and C. L. Malmendier. 1989. Characterization of anti-apolipoprotein A-I monoclonal antibodies and their use in the measurement of apolipoprotein A-I by a two-site enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods.* **125**: 215-223.
57. Marcovina S., S. Fantappie, A. Zoppo, G. Franceschini, and A. L. Catapano. 1990. Immunochemical characterization of six monoclonal antibodies to human apolipoprotein A-I: epitope mapping and expression. *J. Lipid Res.* **31**: 375-384.
58. Allan C. M., N. H. Fidge, and J. Kanellos. 1992. Antibodies to the carboxyl terminus of human apolipoprotein A-I. The putative cellular binding domain of high density lipoprotein 3 and carboxyl-terminal structural homology between apolipoproteins A-I and A-II. *J. Biol. Chem.* **267**: 13257-13261.
59. Nakane K. P., and A. Kawaoi. 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* **22**: 1084-1091.
60. Havel R. J., H. A. Eder, and J. H. Brangdon. 1955. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**: 1345-1353.

61. Köhler G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **256**: 495-497.
62. Miida T, T. Yamaguchi, T. Tsuda, and M. Okada. 1988. High prebeta1-HDL levels in hypercholesterolemia are maintained by probucol but reduced by a low-cholesterol diet. *Atherosclerosis*. **138**: 129-134.
63. Morrison J., N. H. Fidge, and M. Tozuka. 1991. Determination of the structural domain of apoA1 recognized by high density lipoprotein receptors. *J. Biol. Chem.* **266**: 18780-18785.
64. Miida T, K. Obayashi, U. Seino, Y. Zhu, T. Ito, K. Kosuge, S. Hirayama, O. Hanyu, Y. Nakamura, T. Yamaguchi, et al. 2004. LCAT-dependent conversion rate is a determinant of plasma prebeta1-HDL concentration in healthy Japanese. *Clin. Chim. Acta*. **350**: 107-114.
65. Sviridov D, O. Miyazaki, K. Theodore, A. Hoang, I. Fukamachi, and P. Nestel. 2002. Delineation of the role of pre-beta 1-HDL in cholesterol efflux using isolated pre-beta 1-HDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**: 1482-1488.
66. Okuhira K., M. Tsujita, Y. Yamauchi, S. Abe-Dohmae, K. Kato, T. Handa, and S. Yokoyama. 2004. Potential involvement of dissociated apoA-1 in the ABCA1-dependent cellular lipid release by HDL. *J. Lipid Res.* **45**: 645-652.
67. Tsujita M., C. A. Wu, S. Abe-Dohmae, S. Usui, M. Okazaki, and S. Yokoyama. 2005. On the hepatic mechanism of HDL assembly by the ABCA1/apoA-I pathway. *J. Lipid Res.* **46**: 154-162.
68. Yokoyama S. 2006. ABCA1 and biogenesis of HDL. *J. Atheroscler. Thromb.* **13**: 1-15.

69. Miida T., O. Miyazaki, Y. Nakamura, S. Hirayama, O. Hanyu, I. Fukamachi, and M. Okada. 2003. Analytical performance of a sandwich enzyme immunoassay for pre $\beta$ 1-HDL in stabilized plasma. *J. Lipid Res.* **44**: 645-650.
70. Tornvall P., G. Olivecrona, F. Karpe, A. Hamsten, and T. Olivecrona. 1995. Lipoprotein lipase mass and activity in plasma and their increase after heparin are separate parameters with different relations to plasma lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**: 1086-1093.
71. LaRosa J. C., R. I. Levy, H. G. Windmueller, and D. S. Fredrickson. 1972. Comparison of the triglyceride lipase of liver, adipose tissue, and postheparin plasma. *J. Lipid Res.* **13**: 356-363.
72. Kobayashi J. 2004. Pre-heparin lipoprotein lipase mass. *J. Atheroscler. Thromb.* **11**: 1-5.
73. Barrans A., X. Collet, R. Barbaras, B. Jaspard, J. Manent, C. Vieu, H. Chap, and B. Perre. 1994. Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J. Biol. Chem.* **269**: 11572-11577.
74. Chau P., Y. Nakamura, C. J. Fielding, and P. E. Fielding. 2006. Mechanism of prebeta-HDL formation and activation. *Biochemistry.* **45**: 3981-3987.
75. von Eckardstein A., M. Jauhiainen, Y. Huang, J. Metso, C. Langer, P. Pussinen, S. Wu, C. Ehnholm, and G. Assmann. 1996. Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL. *Biochim. Biophys. Acta.* **1301**: 255-262.



76. Nakamura Y., L. Kotite, Y. Gan, T.A. Spencer, C. J. Fielding, and P. E. Fielding. 2004. Molecular mechanism of reverse cholesterol transport: Reaction of pre- $\beta$ -migrating high-density lipoprotein with plasma lecithin/cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*. **43**: 14811-14820.
77. Lie J, R. de Crom, M. Jauhiainen, T. van Gent, R. van Haperen, L. Scheek, H. Jansen, C. Ehnholm, and A. van Tol. 2001. Evaluation of phospholipid transfer protein and cholesteryl ester transfer protein as contributors to the generation of pre beta-high-density lipoproteins. *Biochem. J*. **360**: 379-385.
78. de Grooth G. J., A. H. Klerkx, E. S. Stroes, A. F. Stalenhoef, J. J. Kastelein, and J. A. Kuivenhoven. 2004. A review of CETP and its relation to atherosclerosis. *J. Lipid Res*. **45**: 1967-1974.
79. Francone O. L., L. Royer, and M. Haghpassand. 1996. Increased prebeta-HDL levels, cholesterol efflux, and LCAT-mediated esterification in mice expressing the human cholesteryl ester transfer protein (CETP) and human apolipoprotein A-I (apoA-I) transgenes. *J. Lipid Res*. **37**: 1268-1277.
80. Liang H. Q., K. A. Rye, and P. J. Barter. 1994. Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins. *J. Lipid Res*. **35**: 1187-1199.
81. Tietge U. J., C. Maugeais, W. Cain, D. Grass, J. M. Glick, F. C. de Beer, and D. J. Rader. 2000. Overexpression of secretory phospholipase A(2) causes rapid catabolism and altered tissue uptake of high density lipoprotein cholesteryl ester and apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem*. **275**: 10077-10084.
82. van der Westhuyzen D. R., F. C. de Beer, and N. R. Webb. 2007. HDL cholesterol

- transport during inflammation. *Curr. Opin. Lipidol.* **18**: 147-151.
83. Jahangiri A., M. C. de Beer, V. Noffsinger, L. R. Tannock, C. Ramaiah, N. R. Webb, D. R. van der Westhuyzen, and F. C. de Beer. 2009. HDL remodeling during the acute phase response. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**: 261-267.
84. Coetzee G. A., A. F. Strachan, D. R. van der Westhuyzen, H. C. Hoppe, M. S. Jeenah, and F. C. de Beer. 1986. Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. *J. Biol. Chem.* **261**: 9644-9651.
85. Malle E., A. Steinmetz, and J. G. Raynes. 1993. Serum amyloid A (SAA): an acute phase protein and apolipoprotein. *Atherosclerosis.* **102**: 131-146.
86. Miida T., T. Yamada, T. Yamadera, K. Ozaki, K. Inano, and M. Okada. 1999. Serum amyloid A protein generates pre $\beta$ 1 high-density lipoprotein from  $\alpha$ -migrating high density lipoprotein. *Biochemistry.* **38**: 16958-16962.
87. Rye K. A., K. Wee, L. K. Curtiss, D. J. Bonnet, and P. J. Barter. 2003. Apolipoprotein A-II inhibits high density lipoprotein remodeling and lipid-poor apolipoprotein A-I formation. *J. Biol. Chem.* **278**: 22530-22536.
88. Labeur C., G. Lambert, T. Van Cauteren, N. Duverger, B. Vanloo, J. Chambaz, J. Vandekerckhove, G. Castro, and M. Rosseneu. 1998. Displacement of apo A-I from HDL by apo A-II or its C-terminal helix promotes the formation of pre-beta1 migrating particles and decreases LCAT activation. *Atherosclerosis.* **139**: 351-362.
89. Abe-Dohmae S., S. Suzuki, Y. Wada, H. Aburatani, D. E. Vance, and S. Yokoyama. 2000. Characterization of apolipoprotein-mediated HDL generation

- induced by cAMP in a murine macrophage cell line. *Biochemistry*. **39**: 11092-11099.
90. Nanjee M.N., and E.A. Brinton. 2000. Very small apolipoprotein A-I-containing particles from human plasma: isolation and quantification by high-performance size-exclusion chromatography. *Clin. Chem.* **46**: 207-223.
91. Formisano S., H.B. Brewer Jr., and J.C. Osborne Jr. 1978. Effect of pressure and ionic strength on the self-association of apo-A-I from the human high density lipoprotein complex. *J. Biol. Chem.* **253**: 354-359.
92. Mori T., Y. Kitani, J. Ogihara, M. Sugiyama, G. Yamamoto, O. Kishida, and K. Nishimura. 2012. Histological and MS spectrometric analyses of the modified tissue of bulgy form tadpoles induced by salamander predation. *Biology Open*. **1**: 308-317.
93. ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Proceedings of the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use in London, UK.
94. Wolfrum C., M.N. Poy, and M. Stoffel. 2005. Apolipoprotein M is required for pre $\beta$ -HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. *Nature Medicine*. **11**: 418-422.
95. Mulya A., J. Seo, A. L. Brown, A. K. Gebre, E. Boudyguina, G. S. Shelness, and J. S. Parks. 2010. Apolipoprotein M expression increases the size of nascent pre $\beta$ -HDL formed by ATP binding cassette transporter A1. *J. Lipid Res.* **51**: 514-524.

96. Christoffersen C., M. Jaujiainen, M. Moser, B. Porse, C. Ehnholm, M. Boesl, B. Dahlback, and L. B. Nielsen. 2008. Effect of apolipoprotein M on high density lipoprotein metabolism and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knock-out mice. *J. Biol. Chem.* **283**: 1839-1847.
97. Takayama M., S. Itoh, T. Nagasaki, and I. Tanimizu. 1977. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin. Chim. Acta.* **79**: 93-98.
98. Ji A., J. M. Wroblewski, L. Cai, M. C. de Beer, N. R. Webb, and D. R. van der Westhuyzen. 2012. Nascent HDL formation in hepatocytes and role of ABCA1, ABCG1, and SR-BI. *J. Lipid Res.* **53**: 446-455.
99. Favari E., L. Calabresi, M. P. Adorni, W. Jessup, S. Simonelli, G. Franceschini, and F. Bernini. 2009. Small discoidal pre- $\beta$ 1 HDL particles are efficient acceptors of cell cholesterol via ABCA1 and ABCG1. *Biochemistry.* **48**: 11067-11074.
100. Asztalos B. F., E. J. Schaefer, K. V. Horvath, S. Yamashita, M. Miller, G. Franceschini, and L. Calabresi. 2007. Role of LCAT in HDL remodeling: investigation of LCAT deficiency states. *J. Lipid Res.* **48**: 592-599.
101. Davidson W. S., and T. B. Thompson. 2007. The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* **282**: 22249-22253.
102. Asztalos B. F., C. H. Sloop, L. Wong, and P. S. Roheim. 1993. Comparison of apo A-I-containing subpopulations of dog plasma and prenodal peripheral lymph: evidence for alteration in subpopulations in the interstitial space. *Biochim. Biophys. Acta.* **1169**: 301-304.
103. Sloop C. H., L. Dory, R. Hamilton, B. R. Krause, and P. S. Roheim. 1983.

- Characterization of dog peripheral lymph lipoproteins: the presence of a disc-shaped "nascent" high density lipoprotein. *J. Lipid Res.* **24**: 1429-1440.
104. Asztalos B. F., C. H. Sloop, L. Wong, and P. S. Roheim. 1993. Two-dimensional electrophoresis of plasma lipoproteins: recognition of new apo A-I-containing subpopulations. *Biochim. Biophys. Acta.* **1169**: 291-300.
105. Gwynne J., B. Brewer Jr., and H. Edelhoch. 1974. The molecular properties of apoA-1 from human high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **249**: 2411-2416.
106. Duong P. T., G. L. Weibel, S. Lund-Katz, G. H. Rothblat, and M. C. Phillips. 2008. Characterization and properties of pre beta-HDL particles formed by ABCA1-mediated cellular lipid efflux to apoA-I. *J. Lipid Res.* **49**: 1006-1014.
107. Miida T., M. Kawano, C. J. Fielding, and P. E. Fielding. 1992. Regulation of the concentration of pre $\beta$  high-density lipoprotein in normal plasma by cell membranes and lecithin-cholesterol acyltransferase activity. *Biochemistry.* **31**: 11112-11117.
108. Kawano M., S. Nagasaka, H. Yagyu, and S. Ishibashi. 2008. Pitavastatin decreases plasma prebeta1-HDL concentration and might promote its disappearance rate in hypercholesterolemic patients. *J. Atheroscler. Thromb.* **15**: 41-46.
109. Duong P. T., H. L. Collins, M. Nichel, S. Lund-Katz, G. H. Rothblat, and M. C. Phillips. 2006. Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-1. *J. Lipid Res.* **47**: 822-843.
110. Vedhachalam C., P. T. Duong, M. Nickel, D. Nguyen, P. Dhanasekaran, H. Saito,

- G. H. Rothblat, S. Lund-Katz, and M. C. Philips. 2007. Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-1 and formation of high density lipoprotein particles. *J. Biol. Chem.* **24**: 25123-25130.
111. Miida T., Y. Nakamura, K. Inano, T. Matsuto, T. Yamaguchi, T. Tsuda, and M. Okada. 1996. Pre $\beta$ 1-high density lipoprotein increases in coronary artery disease. *Clin. Chem.* **42**: 1992-1995.
112. Tashiro J., O. Miyazaki, Y. Nakamura, A. Miyazaki, I. Fukamachi, H. Bujo, and Y. Saito. 2009. Plasma pre $\beta$ 1-HDL level is elevated in unstable angina pectoris. *Atherosclerosis.* **204**: 595-600.
113. Sethi A. A., M. Sampson, R. Warnick, N. Muniz, B. Vaisman, B. G. Nordestgaard, A. Tybjaerg-Hansen, and A. T. Remaley. 2010. High pre- $\beta$ 1 HDL concentrations and low lecithin: cholesterol acyltransferase activities are strong positive risk markers for ischemic heart disease and independent of HDL-cholesterol. *Clin. Chem.* **56**: 1128-1137.
114. Miida T., K. Ozaki, T. Murakami, T. Kashiwa, T. Yamadera, T. Tsuda, K. Inano, and M. Okada. 2000. Prebeta1-high-density lipoprotein (prebeta1-HDL) concentration can change with low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) concentration independent of cholesteryl ester transfer protein (CETP). *Clin. Chim. Acta* **292**: 69-80.
115. Miida T., O. Miyazaki, O. Hanyu, Y. Nakamura, S. Hirayama, I. Narita, F. Gejyo, I. Ei, K. Tasaki, Y. Kohda, T. Ohta, et al. 2003. LCAT-dependent conversion of

- pre $\beta$ 1-HDL into  $\alpha$ -migrating HDL is severely delayed in hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**: 732-738.
116. Kosuge M., T. Ebina, T. Ishikawa, K. Hibi, K. Tsukahara, J. Okuda, N. Iwahashi, H. Ozaki, H. Yano, I. Kusama, et al. 2007. Serum amyloid A is a better predictor of clinical outcomes than C-reactive protein in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Circ. J.* **71**: 186-190.
117. Lima L. M., M. das Graças Carvalho, C. P. da Fonseca Neto, J. C. Garcia, M. O. Sousa. 2010. Secretory phospholipase A2 in patients with coronary artery disease. *J. Thromb. Thrombolysis.* **29**: 276-281.
118. Kugiyama K., Y. Ota, K. Takazoe, Y. Moriyama, H. Kawano, Y. Miyao, T. Sakamoto, H. Soejima, H. Ogawa, H. Doi, et al. 1999. Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation.* **100**: 1280-1284.
119. Schlitt A., C. Bickel, P. Thumma, S. Blankenberg, H. J. Rupprecht, J. Meyer, and X. C. Jiang. 2003. High plasma phospholipid transfer protein levels as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**: 1857-1862.
120. Filep J. G., and D. El Kebir. 2008. Serum amyloid A as a marker and mediator of acute coronary syndromes. *Future Cardiol.* **4**: 495-504.
121. Schlitt A., S. Blankenberg, C. Bickel, K. J. Lackner, G. H. Heine, M. Buerke, K. Werdan, L. Maegdefessel, U. Raaz, H. J. Rupprecht, et al. 2009. PLTP activity is a risk factor for subsequent cardiovascular events in CAD patients under statin therapy: the AtheroGene study. *J. Lipid Res.* **50**: 723-729.

122. Hirayama S., T. Ito, O. Miyazaki, T. Kamimura, O. Hanyu, U. Seino, S. Ito, Y. Aizawa, and T. Miida. 2009. Prebeta1-HDL is elevated in the fasting state, but markedly reduced postprandially in poorly controlled type 2 diabetic patients. *Clin. Chim. Acta.* **401**: 57-62.
123. Hirayama S., T. Miida, O. Miyazaki, and Y. Aizawa. 2007. Pre beta1-HDL concentration is a predictor of carotid atherosclerosis in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* **30**: 1289-1291.
124. Sasahara T., T. Yamashita, D. Sviridov, N. Fidge, and P. Nestel. 1997. Altered properties of high density lipoprotein subfractions in obese subjects. *J. Lipid Res.* **38**: 600-611.
125. Miida T, U. Seino, O. Miyazaki, O. Hanyu, S. Hirayama, T. Saito, Y. Ishikawa, S. Akamatsu, T. Nakano, K. Nakajima, et al. 2008. Probucol markedly reduces HDL phospholipids and elevated prebeta1-HDL without delayed conversion into alpha-migrating HDL: putative role of angiopoietin-like protein 3 in probucol-induced HDL remodeling. *Atherosclerosis.* **200**: 329-335.
126. Miida T., K. Sakai, K. Ozaki, Y. Nakamura, T. Yamaguchi, T. Tsuda, T. Kashiwa, T. Murakami, K. Inano, and M. Okada. 2000. Bezafibrate increases prebeta 1-HDL at the expense of HDL2b in hypertriglyceridemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**: 2428-2433.
127. Sasahara T., G. Jerums, and P. Nestel. 1999. Effects of insulin therapy and glycemic control on distribution of HDL alpha and pre-beta subfractions in non insulin-dependent diabetic subjects. *Nutr. Metab. Cardiovasc.* **9**: 19-24.



128. Tsujita M., and S. Yokoyama. 1996. Selective inhibition of free apolipoprotein-mediated cellular lipid efflux by probucol. *Biochemistry*. **35**: 13011-13020.
129. Wu C. A., M. Tsujita, M. Hayashi, and S. Yokoyama. 2004. Probucol inactivates ABCA1 in the plasma membrane with respect to its mediation of apolipoprotein binding and high density lipoprotein assembly and to its proteolytic degradation. *J. Biol. Chem.* **279**: 30168-30174.
130. Tomimoto S., M. Tsujita, M. Okazaki, S. Usui, T. Tada, T. Fukutomi, S. Ito, M. Itoh, and S. Yokoyama. 2001. Effect of probucol in lecithin-cholesterol acyltransferase-deficient mice: inhibition of 2 independent cellular cholesterol-releasing pathways in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**: 394-400.
131. Goldenberg I., M. Benderly, and U. Goldbourt. 2008. Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate. *Vasc. Health Risk Manag.* **4**: 131-141.
132. Duez H., B. Lefebvre, P. Poulain, I. P. Torra, F. Percevault, G. Luc, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, R. Gineste, S. Helleboid, et al. 2005. Regulation of human apoA-I by gemfibrozil and fenofibrate through selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**: 585-591.
133. Fruchart J. C. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha): at the crossroads of obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*. **205**: 1-8.

134. Schoonjans K., J. Peinado-Onsurbe, A. M. Lefebvre, R. A. Heyman, M. Briggs, S. Deeb, B. Staels, and J. Auwerx. 1996. PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *EMBO J.* **15**: 5336-5348.
135. Aoyama T., J. M. Peters, N. Iritani, T. Nakajima, K. Furihata, T. Hashimoto, and F. J. Gonzalez. 1998. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J. Biol. Chem.* **273**: 5678-5684.
136. Staels B., and J. Auwerx. 1998. Regulation of apo A-I gene expression by fibrates. *Atherosclerosis.* **137**: S19-S23.
137. Asztalos B. F., F. Le Maulf, G. E. Dallal, E. Stein, P. H. Jones, K. V. Horvath, F. McTaggart, and E. J. Schaefer. 2007. Comparison of the effects of high doses of rosuvastatin versus atorvastatin on the subpopulations of high-density lipoproteins. *Am. J. Cardiol.* **99**: 681-689.
138. Olchawa B., B. A. Kingwell, A. Hoang, L. Schneider, O. Miyazaki, P. Nestel, and D. Sviridov. 2004. Physical fitness and reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**: 1087-1091.
139. Jafari M., D. A. Leaf, H. Macrae, J. Kasem, P. O'conner, C. Pullinger, M. Malloy, and J. P. Kane. 2003. The effects of physical exercise on plasma prebeta-1 high-density lipoprotein. *Metabolism.* **52**: 437-442.
140. Hoang A., C. Tefft, S. J. Duffy, M. Formosa, D. C. Henstridge, B. A. Kingwell, and D. Sviridov. 2008. ABCA1 expression in humans is associated with physical

- activity and alcohol consumption. *Atherosclerosis*. **197**: 197-203.
141. Sviridov D., B. Kingwell, A. Hoang, A. Dart, and P. Nestel. 2003. Single session exercise stimulates formation of pre beta 1-HDL in leg muscle. *J. Lipid Res.* **44**: 522-526.
142. Grandjean P. W., S. F. Crouse, and J. J. Rohack. 2000. Influence of cholesterol status on blood lipid and lipoprotein enzyme responses to aerobic exercise. *J. Appl. Physiol.* **89**: 472-480.
143. Miida T., K. Obayashi, U. Seino, Y. Zhu, T. Ito, K. Kosuge, S. Hirayama, O. Hanyu, Y. Nakamura, T. Yamaguchi, et al. 2004. LCAT-dependent conversion rate is a determinant of plasma prebeta1-HDL concentration in healthy Japanese. *Clin. Chim. Acta.* **350**: 107-114.
144. O'Connor P. M., B. R. Zysow, S. A. Schoenhaus, B. Y. Ishida, S. T. Kunitake, J. M. Naya-Vigne, P. N. Duchateau, R. F. Redberg, S. J. Spencer, S. Mark, et al. 1998. Prebeta-1 HDL in plasma of normolipidemic individuals: influences of plasma lipoproteins, age, and gender. *J. Lipid Res.* **39**: 670-678.

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり適切なご指導ご助言を賜りました、日本大学生物資源科学部生命化学科 春見 隆文教授に深く感謝いたします。

本研究テーマを与えてくださり、長年に亘る研究の遂行にあたり、並々ならぬお力添え、ご指導をいただきました積水メディカル株式会社つくば研究所の深町 勇氏に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、貴重なご助言、お力添えをいただきました千葉大学学長 齋藤 康先生に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行、及び投稿論文の執筆にあたりお力添え、ご指導をいただきました金沢医科大学 小林 淳二教授に厚く御礼申し上げます。

本研究における抗体の特異性確認、及び測定系の確立に多大なお力添え、ご指導をいただきました順天堂大学医学部 三井田 孝教授に心より感謝いたします。

本研究の遂行に当たり、ご助言、お力添えをいただきました東邦大学医学部

武城 英明教授に深く感謝いたします。

本研究における質量分析、及び本論文の執筆にあたり並々ならぬお力添え、ご指導をいただきました日本大学生物資源科学部生命化学科 荻原 淳准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究で構築した測定系の製品化にあたり、お力添えをいただきました積水メディカル株式会社中村 靖氏に深く感謝いたします。

本研究の質量分析における技術的なお力添えをいただきました日本大学生物資源科学部生命化学科酵素化学研究室の大学院生、卒業研究生の皆様に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、良好な研究環境を与えてくださり、多大なご支援、ご協力をいただきました積水メディカル株式会社研究開発統括部の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究を陰で支えてくれました家族に感謝いたします。