

表 題 ヒト血漿中オキシステロール類のエステル化機構の解明
— LCAT 欠損症患者血漿を用いた検討 —

論 文 の 区 分 論文博士

著 者 名 山室 大介

所 属 自治医科大学 医学部
内科学部門 内分泌代謝学部門

2021年 1月25日申請の学位論文

紹 介 教 員 地域医療系 専攻 内分泌代謝疾患 専攻科
職名・氏名 石橋 俊

目次

略語一覧

第1章 背景と目的

第1節 LCAT について

第2節 LCAT 欠損症について

第3節 オキシステロールの生理活性および LCAT 代謝

第2章 実験方法

第1節 血漿検体の採取および保存

第2節 血漿リポタンパクの調製

第3節 血漿脂質および血漿 LCAT 活性の測定

第4節 血漿オキシステロールのピコリン酸誘導体化

第5節 LC-MS/MS 解析

第6節 細胞培養

第7節 LCAT lysate の調製および western blotting

第8節 リポソームの調製

第9節 オキシステロール類の LCAT 活性の測定

第10節 統計学的解析

第3章 結果

第1節 血漿の臨床検査所見

3-1-1. 健常人血漿の臨床検査所見

3-1-2. LCAT 欠損症患者血漿の臨床検査所見

3-1-3. コレステロールの LCAT 活性の評価

第2節 血漿オキシステロールの LC-MS/MS 解析

3-2-1. 健常人の血漿オキシステロール濃度

3-2-2. 健常人における各オキシステロールの ester 比の比較解析

3-2-3. LCAT 欠損症患者の血漿オキシステロール濃度

3-2-4. LCAT 欠損症患者の血漿オキシステロール ester 比の比較解析

第3節 血漿リポタンパク分画におけるオキシステロール類の分布解析

3-3-1. リポタンパク分画の脂質解析

3-3-2. リポタンパク分画のオキシステロール類の LC-MS/MS 解析

第4節 合成基質を用いたオキシステロール類の LCAT 親和性の評価

3-4-1. LCAT OE HEK293 細胞 lysate の LCAT 発現解析

3-4-2. 各オキシステロールの LCAT 酵素に対する親和性

第4章 考察

第5章 結語

謝辞

引用文献

略語一覧

本論文において、以下の略語を用いた。

ABCA1 : ATP-binding cassette transporter A1

ACAT : acyl-CoA:cholesterol acyltransferase

BHT : butylated hydroxytoluene

CE : cholesteryl ester

CETP : cholesteryl ester transfer protein

CH25H : cholesterol 25-hydroxylase

CT : cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol

FBS : fetal bovine serum,

FC : free cholesterol

FED : fish eye disease

FLD : familial LCAT Deficiency

HDL : high Density Lipoprotein

LCAT : lecithin-cholesterol acyltransferase

LC-MS : liquid chromatography mass spectrometry

LPDS : Lipoprotein Deficient Serum

LXR : liver X receptor

OCDO : 6-oxo-cholestan-3 β ,5 α -diol

OSBP : oxysterol binding protein

ORPs : oxysterol binding protein related proteins

PBS : phosphate buffered saline

PC : phosphatidylcholine

ROR : retinoic acid-related orphan receptor

TBS-T : tris buffered saline with 0.05% Tween 20

TC : total cholesterol

TG : triglyceride

4 β HC : 4 β -hydroxycholesterol

5,6 α EC : 5,6 α -epoxycholesterol

5,6 β EC : 5,6 β -epoxycholesterol

7 α HC : 7 α -hydroxycholesterol

7KC : 7-ketocholesterol

24SHC : 24(S)-hydroxycholesterol

25HC : 25-hydroxycholesterol

27HC : 27-hydroxycholesterol

第1章 背景と目的

第1節 LCAT について

血漿コレステロールは主にコレステロールエステル(CE)として存在しており、血漿リポタンパクの構造維持や血中コレステロールの輸送機能を保つのに必要な分子状態である。生体におけるエステル化酵素としては、コレステロールの3位 acyl-CoA からの脂肪酸転移を触媒する細胞内小胞体酵素 acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT)や Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) が知られている。LCAT は、phosphatidylcholine (PC)の sn-2 位のアシル鎖をコレステロールの3位の水酸基への脂肪酸転移を触媒することにより、血漿リポタンパク中に存在する遊離コレステロール(FC)をエステル化する¹⁾。LCAT は血中では HDL に結合して存在し、HDL を反応の場としている。HDL で生成された CE は、一部は Cholesteryl ester transfer protein (CETP) などの CE 輸送タンパクによって VLDL やカイロミクロンなどの TG に富むリポタンパクに輸送され、残りは CE の極性が低いため LCAT によって HDL 内に溜め込まれる。この過程で HDL の表面はコレステロールに乏しくなることで、他のリポタンパクや細胞から FC の引き抜きを促す。結果として、円盤状 HDL のコレステロールは、原始 HDL または pre β 1-HDL と呼ばれ、LCAT によって優先的にエステル化される²⁾。HDL のサブフラクションは主に apoAI で構成され、apoAI が肝細胞やマクロファージなどの細胞から ABCA1 を介してコレステロールが輸送される³⁾。末梢組織の過剰なコレステロールは、LCAT によって CE に変換されるため、末梢組織の過剰なコレステロールを肝臓に移動させて胆汁に排出するコレステロール逆輸送に重要である⁴⁾。(図 1-1)⁵⁾

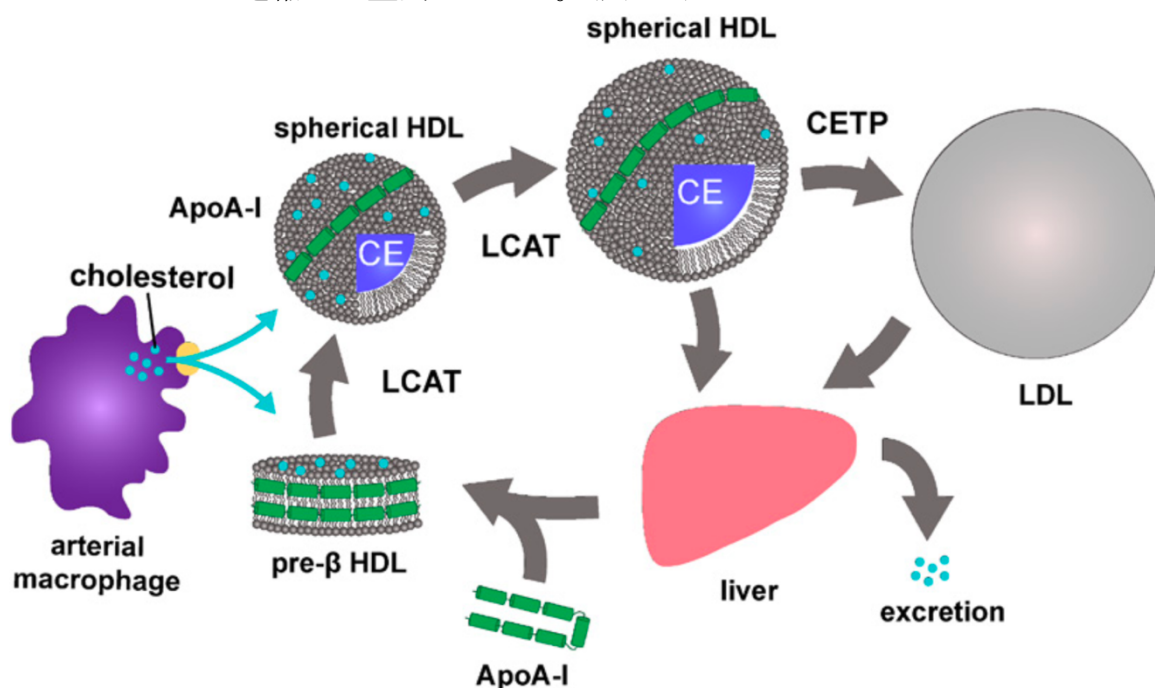


図 1-1 LCAT の役割⁵⁾

第2節 LCAT 欠損症について

LCAT 欠損症は LCAT 遺伝子の変異または LCAT タンパク質に対する抗体中和のいずれかが要因となり引き起こされる稀な疾患である⁶⁾。本欠損症の患者は、しばしばある程度の角膜混濁（図 1-2⁷⁾）、貧血、タンパク尿や糸球体濾過障害を含む腎機能障害を呈する。現在までに、LCAT 遺伝子の 100 を超える変異が同定されており（図 1-3⁸⁾）、本自治医科大学でも角膜混濁、軽度の貧血、軽度のタンパク尿、正常な腎機能を持ち、LCAT 遺伝子の新しい点突然変異（Gly179 を Arg に変換する G から C への置換）を有した日本人女性を報告した。G179 は LCAT 機能に必須であることが *in vitro* 実験によって確認された⁹⁾。

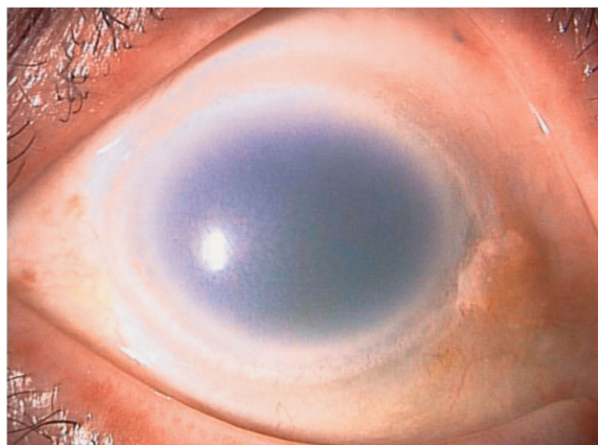


図 1-2 LCAT 欠損症の角膜混濁症状⁷⁾

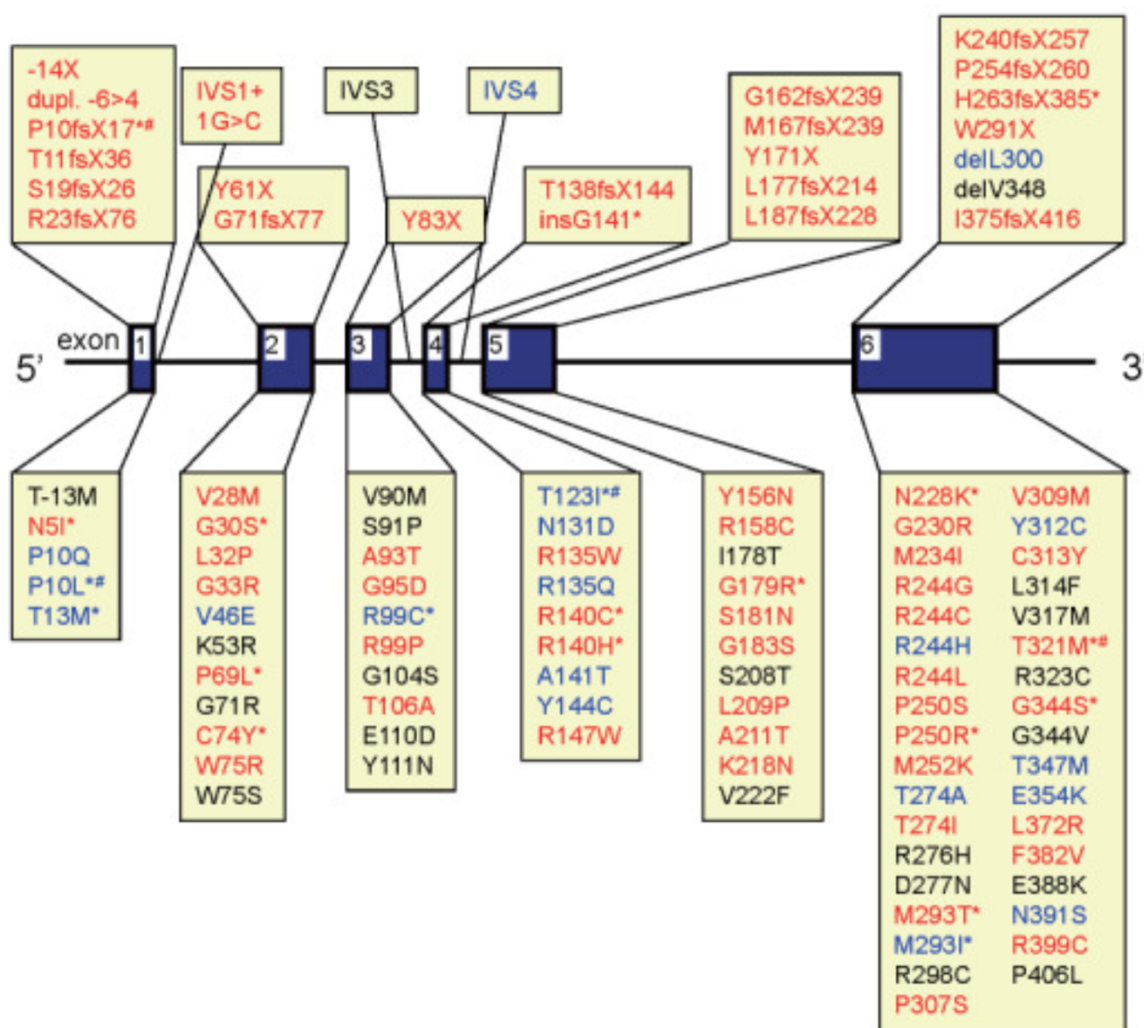


図 1-3 LCAT 欠損症における遺伝子変異⁸⁾

LCAT 遺伝子の変異は、家族性 LCAT 欠損症 (FLD) または魚眼病 (FED) のいずれかを呈し、どちらもまれな常染色体劣性疾患である^{10) 11)}。FLD は重度の臨床症状を呈するが、FED は、生涯にわたって角膜混濁が唯一の臨床症状である。FLD は、1967 年にノルウェーの家族で最初に確認された¹²⁾。LCAT は主に HDL コレステロールで機能し (α 活性)、残り 3 割ほどが LDL コレステロールで機能 (β 活性) しているといわれている。HDL に対する活性である α 活性のみ欠損した場合を FED、 α および β 活性の両方を欠損した場合は FLD になると報告された^{13) 14)}。LCAT 欠損患者に存在する高分子量 LDL¹⁵⁾ またはリポタンパク-X^{16) 17)} が FLD の腎障害に寄与していることが報告された。また、2 つのリポタンパク分画 (Lp8 および Lp12-16) が LCAT 欠損症における腎表現型に特異的であることが報告された¹⁸⁾。

第 3 節 オキシステロールの生理活性および LCAT 代謝

コレステロール酸化代謝物であるオキシステロール類は多彩な生理作用が報告されており、その多くはレチノイン酸関連オーファン受容体 (ROR)、エストロゲン受容体、グルココルチコイド受容体および liver X receptor (LXR) などの核内受容体に基質として結合し、脂質代謝制御や抗炎症作用を発揮する^{19), 20)}。本研究では、cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol (CT)、4 β -hydroxycholesterol (4 β HC)、5,6 α -epoxycholesterol (5,6 α EC)、5,6 β -epoxycholesterol (5,6 β EC)、7 α -hydroxycholesterol (7 α HC)、7-ketcholesterol (7KC)、24(S)-hydroxycholesterol (24SHC)、25-hydroxycholesterol (25HC) および 27-hydroxycholesterol (27HC) の 9 つのオキシステロールを測定した。5,6 α EC および 5,6 β EC のほとんどは非酵素的に生成されるが、一部の 5,6 α EC は酵素的にも生成される²¹⁾。CT、7KC、7 α HC、および 25HC は酵素経路と非酵素経路の両方によって生成されるが、4 β HC、24SHC、および 27HC は酵素経路のみで生成される^{22) 23)}。5,6 α EC は、腫瘍抑制作用を有するであるデンドロゲニン A の前駆体である²⁴⁾。5,6 α EC と 5,6 β EC は乳癌の腫瘍プロモーターである 6-oxo-cholestan-3 β ,5 α -diol (OCDO) の前駆体である CT へと代謝される²⁵⁾。これら 9 つのオキシステロールのうち、バイオマーカーとしての臨床的有用性が報告されているオキシステロールとして 4 β -hydroxycholesterol (4 β HC)、24(S)-hydroxycholesterol (24SHC) と 27-hydroxycholesterol (27HC) が挙げられる。4 β HC は CYP3A4 によって形成され、CYP3A4 活性のバイオマーカーとしての有用性が報告されている²⁶⁾。CYP3A4 を誘導する抗レトロウイルス薬の治療を受けた患者では、4 β HC の血中濃度が高くなり、CYP3A4 阻害剤によって 4 β HC の血中濃度は減少することが報告されている²⁷⁾。24SHC は脳内において 24S-ヒドロキシラーゼ (CYP46A1) によって代謝・産生され、血液脳関門を通過して血中に分泌され、アルツハイマー型認知症や神経変性疾患のバイオマーカーとしても注目されている。AD 患者の血漿中および脳脊髄液内での 24S-HC の上昇^{28), 29)}、老人斑の周囲における CYP46A1 の発現が高い³⁰⁾ といった報告がされている。また、27HC はエストロゲン受容体への結合能を有して

おり、エストロゲン受容体に作用して乳癌³¹⁾および炎症性機構を介した動脈硬化症の発症³²⁾に関わる可能性がモデル動物を用いた基礎研究において提唱されている。25-hydroxycholesterol (25HC)は cholesterol 25-hydroxylase (CH25H)によって生成され、insig1 や HMG-CoA 還元酵素への結合を介して、コレステロール合成を強力に抑制する。また、コレステロール輸送蛋白 NPC1、その他オキシステロール結合蛋白 (OSBP)とその類縁蛋白(ORPs)へ結合し、ステロール代謝のみならず広範な細胞機能調節を行う。最近では、25HC はウイルス感染抑制作用³³⁾、IgA 産生抑制作用³⁴⁾が報告された。また、25HC は、neutral cholesterol ester hydrolase 1 (NCEH1) を欠損したマクロファージの ER ストレスを調節する³⁵⁾。これらオキシステロール 類の代謝起源とその生理機能については表 1-1 にまとめた。

表 1-1 オキシステロールの代謝起源と生理作用

Oxysterol	Origin ¹⁾	Enzyme(s)	Specific function(s)
4βHC	E	CYP3A	LXRα/β agonist, LXRα antagonist ^{19), 20) 26)}
5,6αEC	E/NE	CYP	LXRα antagonist, precursor of dendrogenin A (DDA), a tumor suppressant, and CT. ²⁴⁾
5,6βEC	NE	N/A	Precursor of CT. ²⁴⁾
CT	E	ChEH	Precursor of OCDO, a tumor stimulant. ²⁴⁾
7αHC	E/NE	CYP7A1	LXRα/β agonist, inverse agonist of RORα/γ, GPR183 (or EBI2 receptor) agonist, GPR17 agonist, precursor for bile acid synthesis. ^{19), 20)}
7KC	E/NE	CYP7A1, 11β-HSD1	LXRα/β agonist, inverse agonist of RORα/γ, AhR agonist. ^{19), 20)}
24SHC	E	CYP46A1	LXRα/β agonist, inverse agonist of RORα/γ, major way to eliminate excess brain cholesterol, precursor for bile acid synthesis. ^{19), 20) 28), 29)}
25HC	E/NE	CH25H, CYP27A1, CYP46A1, CYP3A4	LXRα/β agonist, RORα/γagonist, GPR183 (or EBI2 receptor) agonist, immune function, precursor for bile acid synthesis, ERα agonist, allosteric modulator of smoothened ^{19), 20)}
27HC	E	CYP27A1	RORγagonist, selective ER modulator, immune function, precursor for bile acid synthesis ^{31), 32)}

E : enzymatic、NE : non-enzymatic

血中において LCAT は HDL に結合して存在し、HDL を反応の場としており、LCAT によって血中コレステロールはエステル化され²⁾、末梢組織の過剰なコレステロールを肝臓に移動させて胆汁に排出するコレステロール逆輸送に重要である⁴⁾。そ

のため HDL に貯蔵されているオキシステロール類がコレステロール同様に LCAT によってエステル化されていた場合、リポタンパク中のオキシステロール類のエステル比が LCAT 活性によって変動することが期待できる。血漿リポタンパク分画のオキシステロール類のエステル比は 24SHC および 27HC のみ報告³⁶⁾されており、LDL と HDL 画分がオキシステロールの主な貯蔵リポタンパクとなっている。しかし、他のオキシステロール類のリポタンパクにおけるエステル比を調べた報告はない。そこで、本研究では 9 種類のオキシステロール類のリポタンパク分画におけるエステル比を測定し、ヒト血漿中オキシステロールのエステル化における LCAT の役割を解明した。

以前の研究では、5,6 α EC、5,6 β EC、7 α HC、7KC、24SHC、25HC および 27HC は細胞実験から LCAT によってエステル化されることが報告された^{37) 38) 39)}。また、Karuna らは、LCAT ヘテロ接合変異患者が、変異を有さない患者家族と比較して、HDL 中の 27HC 濃度が低いことを報告した⁴⁰⁾。しかし、LCAT 欠損が種々のオキシステロールのエステル化に *in vivo* レベルで影響を与えるか、さらには角膜混濁や腎機能障害といった臨床症状に寄与しているかどうかは未解明である。そこで、本研究では各オキシステロールのどれだけの割合が血漿中でエステル化されているか、および LCAT がその産生に関与しているかどうかを検証するために、206 人の健常人と 8 人の LCAT 欠損患者の血漿オキシステロールを測定し、LCAT 欠損症の臨床所見との関連について検討した。

第2章 実験方法

第1節 ヒト血漿の採取および保存

健常人のボランティア(n=206)と LCAT 欠損症患者(n=8)は、10 時間絶食した後、採血した。血液を 1,500 g で 15 分間遠心分離した後、血漿サンプルを-80℃で保存した。大須賀淳一先生にご協力頂き、健常人の血漿は宇都宮東病院 健診センターで採取した。LCAT 欠損症患者検体は自治医科大学が保有していた 1 検体(患者検体 No.9)と、Amsterdam 大学 A.G. Holleboom 先生(患者検体 No.1, 3, 6, 7, 8)、千葉大学医学部付属病院 未来開拓センター 黒田正幸先生(患者検体 No.2, 5)、東邦大学医療センター佐倉病院 武城英明先生(患者検体 No.2, 5)から分与して頂き、本研究に使用した。本実験は、自治医科大学、宇都宮東病院、千葉大学大学院医学研究科の倫理委員会によって承認され、インフォームドコンセントはすべての被験者から得られ、ヘルシンキ宣言の倫理基準に従って実施された。

第2節 血漿リポタンパクの調製

10 時間以上絶食した健常人(n=5)より血液を 20mL 採取し、遠心分離して血漿 5mL を得た。細菌の繁殖やタンパク変性を防ぐため、分離した血漿に 0.05% EDTA・NaN₃(pH7.4)、1mM PMSF(和光純薬社)、Proteinase inhibitor cocktail(Sigma) を加えた。得られた血漿に各リポタンパク分画の比重に合わせて飽和 KBr (調製造時の比重 : 1.368)を添加し、VLDL 分画(比重:0.93~1.006)、IDL 分画(比重 : 1.006~1.019)、LDL 分画(比重 : 1.019~1.063)、HDL 分画(比重 : 1.063~1.210)、LPDS 分画を超高速遠心法(16℃, 100,000×g, 12 時間)にて各リポタンパク分画を分離した。

第3節 血漿脂質および血漿 LCAT 活性の測定

血漿およびリポタンパク分画の TC の測定はデタミナーTC II(協和メデックス社)、FC の測定は DeterminerL FC キット、TG の測定は L タイプワコー TG・M キット(和光純薬社)を用いて測定した。LCAT 活性は、Anasolv LCAT キット (積水メディカル株式会社) を用いて測定した。

第4節 血漿オキシステロールのピコリン酸誘導体化

内部標準として[²H₇]4β HC (5 ng)、[²H₇]5,6α EC (5 ng)、[²H₇]5,6β EC (5 ng)、[²H₇] CT (1 ng)、[²H₇]7α HC (5 ng)、[²H₇] 7KC (5 ng)、[²H₆] 24SHC (2.5 ng)、[²H₃] 25HC (1 ng)、[²H₇] 27HC (5 ng) を、抗酸化剤として 5μg の BHT を各 1.5mL tube に添加後、N₂ ガス下で乾固した。本 tube に血漿 20μL を添加し、0.5mL の 1N KOH(EtOH に溶解)を添加後、37℃ で 1 時間インキュベーションした。また、非け

ん化サンプルとして同量の内部標準、抗酸化剤および血漿を添加後、0.5mL の EtOH を添加し同様に 37°C で 1 時間インキュベーションした。0.25mL の滅菌水、1mL の n-hexane を加えボルテックスで混合後、上清を N₂ ガス下で乾固させ、ステロール抽出物とした。誘導体化反応液(10 サンプル分) として 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物 (100 mg)、4-ジメチルアミノピリジン (30 mg)、ピコリン酸 (80 mg)、ピリジン (1.5 mL)、およびトリエチルアミン (200μL) を混合し、誘導体化反応液 170 μ L (1 サンプル当たり) をステロール抽出物に添加後、80°C で 60 分間インキュベートした。1mL の n-hexane を加え、ボルテックスで混合後、1,500g で 5 分間遠心分離した。透明な上澄みを回収し、N₂ ガス下 80°C で乾固した。残留物を 50 μ L のアセトニトリルに再溶解し、5 μ L を LC-MS/MS システムに注入しオキシステロール 類を測定した。

第 5 節 LC-MS/MS 解析

LC-MS / MS システムは、H-ESI プローブと Ultimate 3000 HPLC システム (Thermo Fisher Scientific) を備えた TSQ Quantum Ultra 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

- ・ HPLC 測定条件は、下記設定で測定した。

Hypersil GOLD カラム (150×2.1 mm、3 μ m; Thermo Fisher Scientific)

カラムオーブ : 40°C

流速 : 300 μ L/min

移動相条件 : 0.1% 酢酸含有 CH₃CN:MeOH:超純水 (40 : 40 : 20 = v / v / v)

から 0.1% 酢酸含有 CH₃CN:MeOH:超純水 (45 : 45 : 10 = v / v / v) に 20 分かけて liner gradient にプログラムし、最終移動相 0.1% 酢酸含有 CH₃CN:MeOH:超純水 (45 : 45 : 10 = v / v / v) 20 分間一定に送液した。

- ・ MS/MS 条件は、下記設定で測定した。

イオン極性 : positive

スプレー電圧 : 1,000 V

バポライザー温度 : 350°C

シースガス圧力 (窒素) : 85 psi

補助ガスフロー (窒素) : 60 psi

イオンキャピラリー温度 : 350°C

コリジョンガス圧力 (アルゴン) : 1.5 m Torr

調製したけん化サンプルからオキシステロール総量を、非けん化サンプルからオキシステロール free 体量を測定し、けん化サンプル(free 体 + ester 体)の測定値から非けん化サンプル(free 体)の測定値を差し引くことで ester 体量を算出した。

第6節 細胞培養

Lipofectamine を用いてヒト由来 LCAT 遺伝子のプラスミド pCGThLCAT-neo を導入した LCAT OE HEK293 細胞を本研究では用いた。本細胞は千葉大学医学部付属病院 未来開拓センター 黒田正幸先生より分与して頂いた。遠心して得た細胞塊を細胞培養液 DMEM 培地(Sigma、10% FBS、100units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin (Gibco)含有)に 1×10^6 cells /dish の細胞数を 10cm dish に播種した。37°C、5%CO₂ 条件下 3 日間培養後、細胞を回収して LCAT lysate の作製実験に使用した。

第7節 LCAT lysate の調製および western blotting

回収した LCAT OE HEK293 細胞は lysis buffer (Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, cComplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche)) を添加し、氷上で 60 分静置した。その後、4°C、12,000 \times g で 20 分間遠心分離し上清を採取し、cell lysate を得た。得られた cell lysate は BCA protein Assays kit (Thermo Fisher Scientific)を用いてタンパク濃度を測定し、オキシステロール類の LCAT assay に用いた。また、cell lysate を western blotting で LCAT 酵素の発現量も評価した。Cell lysate 20 μ g に Laemili sample buffer (Bio-rad)と reducing agent を添加し、98°C、5 分間加熱した。10%SDS-PAGE にて泳動し、メンブレンに転写後、TBS-T で洗浄し、ブロッキングワシ(ナカライテスク)を用いて 1 時間室温で攪拌した。TBS-T にて洗浄後、1 次抗体として anti-LCAT (EPR1384Y) Antibody (ab51060, abcam)を 1:2000 倍希釈してメンブレンに添加し、4°C、16 時間攪拌した。メンブレンを TBS-T で洗浄後、1:10,000 倍希釈した HRP 標識二次抗体 anti-rabbit IgG (NA934, GE healthcare) を添加し、室温、1 時間攪拌した。TBS-T で洗浄後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE healthcare) を使用して化学発光させ、Image Quant LAS 4000 (GE healthcare) により検出した。

第8節 リポソームの調製

LCAT assay を行うにあたり、合成基質となるオキシステロール類のリポソームを作製した。Phosphatidylcholine (PC) 1.18mg (1.5 μ mol) と各オキシステロール 100 μ g (0.25 μ mol)を CHCl₃ 1 mL に溶解後、砲弾型試験管で N₂ガス下 80°Cで回転させながら、ゆっくりと管壁に薄い膜状に乾固させた。EtOH 83 μ L に再溶解し、ボルテックス後、27G 針を装着したツベルクリンシリンジに充填し、リン酸バッファー(0.1M KH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH 7.4)を加えてスターラーで高速攪拌しているバイアル中に急速注入した。室温で 5 分間攪拌後、リン酸 buffer 500mL, 4°C、12 時間で 3 回透析し、脂質二重層膜小胞溶液を得た。脂質二重層膜小胞溶液 180 μ L に 100mM sodium cholate 20 μ L を添加し、室温で 20 分間極めてゆっくりと攪拌し、37°Cで 30 分間イ

ンキュベーション後、Apo A1 60 μ g(Sigma) を添加し、リン酸 buffer 500mL, 室温, 12 時間で 2 回透析し、リン酸 buffer 500mL, 4°C, 12 時間で 3 回透析することでリポソームを調製した。

第 9 節 オキシステロール類の LCAT 活性の測定

1.5mL チューブに方法 3-8 で作製したオキシステロール類のリポソーム 3 μ L(6.125 pmol、12.5 pmol、25pmol、50pmol、100pmol、200pmol および 400pmol)、7mM EDTA 10 μ L、40mM 2-mercaptoethanol 10 μ L、100mg/mL BSA 10 μ L、リン酸バッファー(0.1M KH₂PO₄-Na₂HPO₄ pH 7.4) 56 μ L、方法 3-7 で作製した LCAT OE HEK293 細胞 lysate 10 μ L (3 μ g) を添加し、37°C, 2 時間インキュベーションした。反応前サンプルには反応停止液として EtOH 500 μ L をインキュベーション前に加えた。インキュベーション後、EtOH 500 μ L, 滅菌水 150 μ L および n-hexane 1ml を加えボルテックスで混合し反応を停止後、上清を N₂ ガス下で乾固させ、ステロール抽出物とした。得られたステロール抽出物を方法 3-4 のピコリン酸誘導体化法にて処理後、方法 3-5 LC-MS/MS システムで測定した。反応前後のオキシステロール free 体含有量を比較することで、オキシステロール類のエステル化効率を評価し、下式から LCAT 活性値(pmol/mL/h)を算出した。

$$\text{LCAT 活性値} = ((T_0 - T_1) / (St - Bl)) \times \text{lipo} \times 10^{*1} \times (1/2^{*2})$$

T₀: サンプル反応前の測定値

T₁: サンプル反応後の測定値

St: リポソームのみの測定値

Bl: 反応溶液のみの測定値

Lipo: リポソームのオキシステロール濃度 (pmol)

*1: 希釈係数 *2: 測定時間

第 10 節 統計学的解析

データはすべて平均値 ± 標準偏差で示した。GraphPad Prism version 6.0 (GraphPad Software) を用いて全ての解析を行った。2 群間での比較は Student's t 検定を行った。異なる要因による対応のある反復測定の場合の比較は two-way ANOVA 検定の後、Bonferroni 法により検定を行った。P 値 0.05 未満を統計学的に有意とした。

第3章 結果

第1節 臨床検査所見

3-1-1. 健常人血漿の臨床検査所見

健常人血漿 206 検体の臨床検査値を測定し、下記にまとめた(表 3-1)。男女比(男性 n=132、女性 n=74)は男性の方が多く、平均年齢は 47 歳、平均 BMI は 22.7 kg/m² でした。BMI、ウエスト周囲、収縮期および拡張期血圧、空腹時血糖、HDL-C、非 HDL-C、および TG で有意な性差が見られた。

表 3-1 健常人血漿の臨床検査所見

	All	Males	Females	P
Age (years)	47.0 ± 9.2	46.6 ± 9.3	47.9 ± 9.1	0.231
BMI (kg/m ²)	22.7 ± 3.1	23.1 ± 2.8	21.9 ± 3.3	0.003
Waist circumference (cm)	80.1 ± 8.2	81.8 ± 7.8	77.8 ± 8.5	0.015
Systolic blood pressure (mmHg)	113.1 ± 16.0	116.1 ± 16.1	107.8 ± 14.3	<0.0001
Diastolic blood pressure (mmHg)	70.0 ± 11.7	73.2 ± 11.5	64.4 ± 9.9	<0.0001
Fasting glucose (mg/dl)	92.6 ± 7.0	94.2 ± 6.9	89.6 ± 6.2	<0.0001
HbA1c (%)	5.6 ± 0.3	5.6 ± 0.2	5.6 ± 0.3	0.970
TC (mg/dl)	188.1 ± 29.8	188.2 ± 31.0	188.0 ± 27.5	0.565
HDL-C (mg/dl)	64.3 ± 16.4	59.6 ± 14.1	72.9 ± 16.7	<0.0001
Non-HDL-C (mg/dl)	135.1 ± 41.1	142.0 ± 35.0	131.3 ± 29.1	0.0212
LDL-C (mg/dl)	124.7 ± 30.7	127.4 ± 32.1	119.9 ± 27.2	0.0572
TG (mg/dl)	110.1 ± 73.8	119.4 ± 78.7	93.4 ± 61.8	<0.0001
LCAT activity (nmol/ml/h)	183.1 ± 121.2	185.8 ± 122.2	178.2 ± 119.2	0.6671

The clinical values were compared among males (n = 132) and females (n = 74). Data are presented as mean ± SD.

3-1-2. LCAT 欠損症患者血漿の臨床検査所見

LCAT 欠損症患者(n=8)血漿の臨床検査値¹⁸⁾は、以前の論文報告^{41) 42)}からまとめた(表 3-2)。すべての患者は角膜混濁を呈しており、8 検体のうち FLD5 例、FED3 例であった。LCAT 欠損患者血漿の TC および HDL-C は健常者と比較して有意に低かった。

表 3-2 LCAT 欠損症患者血漿の臨床検査所見¹⁸⁾

Patient No.	Sex	Age	Race	Renal Failure/P rotein uria	Corneal Opacity	Anemia	Pheno type	AA Substitution	TC	CE/ TC	TG	HDL- C	LDL- C
No. 1	Female	17	Morocco	6g/24h	+	11.4 g/dL	FLD	C337Y	109	0	179	5.8	67
No. 2	Female	61	Japanese	2g/24h	+	9.5 g/dL	FLD	C98Y	123	0.13	307	9.3	52
No. 3	Female	12	Morocco	0.45g/L	+	9.2 g/dL	FLD	C337Y	47	0	56	10.1	26
No. 4	Female	63	Japanese	0.23g/24h	+	10.3 g/dL	FLD	G203R	47	0.13	89	6.3	23
No. 5	Male	68	Japanese	0.5g/L	+	6.6 g/dL	FLD	G54S	56	0	59	2.0	42
No. 6	Male	58	Dutch	-	+	-	FED	T147I	133	0.54	120	4.7	104
No. 7	Male	36	Dutch	-	+	-	FED	W99S/T147I	144	0.57	205	3.9	99
No. 8	Female	30	Dutch	-	+	-	FED	T147I/V333M	98	0.39	118	4.9	70

3-1-3. コレステロールの LCAT 活性の評価

健常人および LCAT 欠損症患者血漿の LCAT 活性(コレステロールのエステル化反応)を Anasolv LCAT キット (積水メディカル株式会社) を用いて測定した。LCAT 欠損症では既報通り LCAT 活性は認められなかった(図 3-1)。健常人には血漿 LCAT 活性が非常に低値な検体(<100 nmol/ml/hr)が含まれていた。血漿 LCAT 活性は血漿サンプルの保存期間が長いほど失活してしまうことが測定 kit メーカーによって指摘されていた。LCAT 活性を測定した健常者の血清は、-80 度で 2 年間保存した検体であったため、保存期間が長期間に及んだことにより LCAT 活性が失活してしまったことが原因として考えられた。

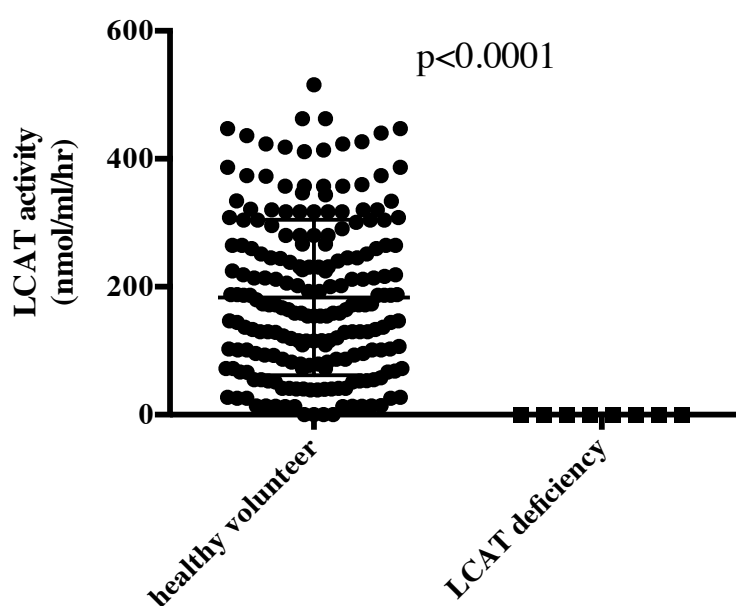


図 3-1 血漿におけるコレステロール LCAT 活性の評価

健常人(n=206)および LCAT 欠損患者(n=8)の血漿 LCAT 活性を測定した。データは平均値±標準偏差で示した。****p<0.001。

第2節 血漿オキシステロールの LC-MS/MS 解析

3-2-1. 健常人の血漿オキシステロール濃度

コレステロールおよびオキシステロールの total (free 体+ester 体)、free 体、および ester 体の血漿濃度および ester 比(ester/total 値)を LC-MS/MS 解析を用いて測定した(表 3-3)。以前に報告されたように、血漿 4BHC total 値は男性よりも女性の方が高く^{43) 44)}、7KC と 27HC の血漿レベルは女性よりも男性の方が高かった⁴⁵⁾。しかし、ester 比については、7KC (0.76 対 0.75) と 27HC (0.86 対 0.85) の男性と女性の値は同等であり、他のオキシステロール同様に ester 比に性差は見られなかった。

表 3-3 健常人の血漿オキシステロール濃度

	All	Males	Females	<i>P</i>
Cholesterol				
Total	188.1 ± 29.8	188.2 ± 31.0	188.0 ± 27.5	0.9076
Free	57.1 ± 12.3	57.2 ± 12.8	56.8 ± 11.4	0.8235
Ester	131.0 ± 23.4	131.0 ± 25.0	131.2 ± 20.2	0.6264
Ratio	0.70 ± 0.06	0.69 ± 0.07	0.70 ± 0.04	0.7684
4βHC				
Total	21.9 ± 12.2	20.1 ± 8.9	25.1 ± 15.9	0.0278
Free	13.0 ± 6.3	12.0 ± 5.8	14.7 ± 6.9	0.0083
Ester	9.0 ± 8.5	8.1 ± 6.0	10.5 ± 11.6	0.4319
Ratio	0.38 ± 0.18	0.39 ± 0.19	0.4 ± 0.16	0.4564
5,6αEC				
Total	31.8 ± 17.4	32.2 ± 18.6	31.2 ± 14.9	0.8000
Free	15.8 ± 7.6	15.9 ± 8.1	15.6 ± 6.5	0.6551
Ester	16.0 ± 12.4	16.3 ± 12.9	15.5 ± 11.4	0.9375
Ratio	0.46 ± 0.15	0.46 ± 0.22	0.47 ± 0.19	0.9317
5,6βEC				
Total	179.7 ± 58.2	176.6 ± 59.5	185.2 ± 55.4	0.3322
Free	87.1 ± 37.3	88.8 ± 40.9	84.0 ± 29.7	0.7757
Ester	92.6 ± 44.2	87.8 ± 40.7	101.2 ± 48.7	0.1575
Ratio	0.51 ± 0.17	0.50 ± 0.20	0.53 ± 0.10	0.1741
CT				
Total	102.8 ± 26.6	100.7 ± 26.8	106.5 ± 25.8	0.1511
Free	30.9 ± 10.1	30.2 ± 9.9	32.2 ± 10.3	0.1466
Ester	71.9 ± 20.7	70.5 ± 20.9	74.3 ± 20.0	0.3352
Ratio	0.70 ± 0.16	0.70 ± 0.13	0.70 ± 0.10	0.9908
7αHC				
Total	153.4 ± 181.3	170.6 ± 166.3	122.6 ± 201.7	0.983
Free	13.2 ± 8.9	13.8 ± 9.6	12.1 ± 7.4	0.3803
Ester	140.1 ± 177.1	156.8 ± 161.6	110.5 ± 198.5	0.8085
Ratio	0.89 ± 0.06	0.90 ± 0.06	0.87 ± 0.07	0.0821
7KC				
Total	180.6 ± 65.2	181.5 ± 68.9	179.0 ± 58.0	<0.0001
Free	43.0 ± 14.9	42.2 ± 14.5	44.6 ± 15.4	0.3957
Ester	137.6 ± 54.2	139.3 ± 58.1	134.5 ± 46.2	<0.0001
Ratio	0.75 ± 0.06	0.76 ± 0.06	0.75 ± 0.05	0.0002
24SHC				
Total	49.1 ± 12.2	48.0 ± 12.1	51.2 ± 12.3	0.0561
Free	9.7 ± 3.2	9.3 ± 3.3	10.4 ± 3.0	0.0143
Ester	39.4 ± 11.4	38.7 ± 11.5	40.8 ± 11.0	0.1789
Ratio	0.80 ± 0.07	0.80 ± 0.08	0.79 ± 0.06	0.1036
25HC				
Total	12.7 ± 5.5	13.0 ± 5.8	12.2 ± 4.9	0.2039
Free	2.2 ± 0.9	2.3 ± 0.9	2.2 ± 0.8	0.7988
Ester	10.5 ± 5.2	10.7 ± 5.5	10.0 ± 4.5	0.2110
Ratio	0.81 ± 0.07	0.81 ± 0.07	0.81 ± 0.06	0.7121
27HC				
Total	123.5 ± 33.1	133.3 ± 32.2	106.1 ± 27.0	<0.0001
Free	16.7 ± 4.2	17.6 ± 4.4	15.1 ± 3.4	<0.0001
Ester	106.8 ± 30.8	115.6 ± 30.0	91.0 ± 25.4	<0.0001
Ratio	0.86 ± 0.03	0.86 ± 0.03	0.85 ± 0.04	0.0198

cholesterol 単位 : mg/dL、 oxysterol 単位 : ng/mL

3-2-2. 健常人における各オキシステロールの ester 比の比較解析

健常人(n=206)におけるコレステロールとオキシステロールの ester 比(ester/total 値)を比較した(図 3-2)。CT、7 α HC、7KC、24SHC、25HC、および 27HC の ester 比は、平均値がそれぞれ 0.70、0.89、0.75、0.80、0.81、および 0.86 と比較的狭い範囲で分布しており、cholesterol の ester 比の平均 0.70 と近似していた。一方、4 β HC (0.01~0.91)、5,6 α EC (0.04~0.88)および 5,6 β EC (0.08~0.82) の ester 比は、より広範囲に分布していた。4 β HC、5,6 α EC および 5,6 β EC の ester 比平均値は 0.38、0.46、および 0.51 であり、他のオキシステロールおよびコレステロールの値よりも有意に低かった。

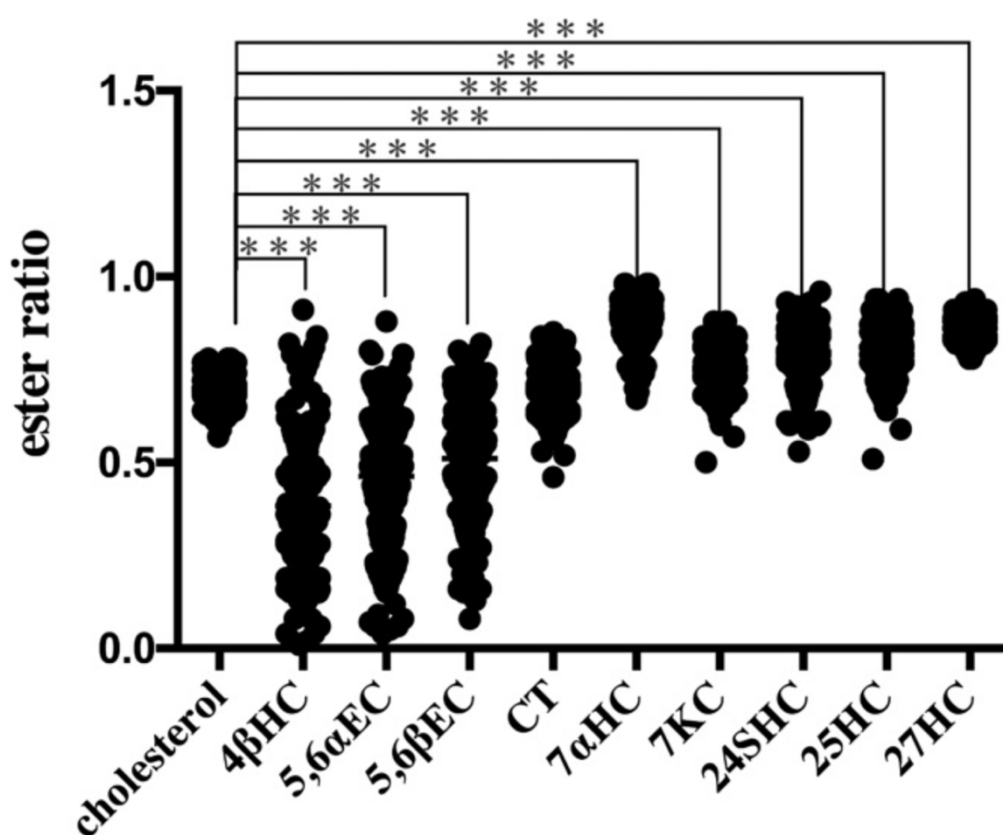


図 3-2 各オキシステロールのエステル比の比較解析

健常人(n=206)におけるコレステロールとオキシステロールの血漿エステル比を比較解析した。健常人の血漿エステル比は、4 β HC と 5,6 α EC 間、4 β HC と 5,6 β EC 間、コレステロールと CT 間、7 α HC と 27HC 間、24SHC と 25HC 間以外は相互に有意差があった。データは平均値±標準偏差で示した。***p<0.001。

3-2-3. LCAT 欠損症患者の血漿オキシステロール濃度

LCAT 欠損症患者(FLD : n=5、FED : n=3) のコレステロールおよびオキシステロールの total (free 体+ester 体)、free 体、および ester 体の血漿濃度および ester 比 (ester/total 値)を LC-MS/MS 解析を用いて測定した(表 3-4)。

表 3-4 LCAT 欠損症患者の血漿オキシステロール濃度

	No	C	4βHC	5,6αEC	5,6βEC	CT	7αHC	7KC	24SHC	25HC	27HC
		(mg/dl)	(ng/ml)								
Total	1	109	84.4	9.8	19.3	39.4	25.3	173.6	20.4	27.1	20.8
	2	123	20.9	7.9	13.7	38.6	23.8	92.2	19.1	8.4	39.1
	3	47	24	5.1	21.9	38.7	15.2	53.2	42.6	4.3	18.5
	4	47	29.8	4.8	35.3	38	22	62.1	16.6	6.4	30.4
	5	56	13.6	5.7	16.2	32.1	13.9	64.4	22.7	6.3	45.5
	6	133	15.5	5	13.3	22	49.2	148	44.8	5.9	74.8
	7	144	18.5	4.9	22.8	33.1	37.7	137.4	55.1	16.9	88.7
	8	98	20.1	3.4	12.6	29.6	31.3	98.2	52.2	0.6	48.4
Free	1	109	73.3	7.2	18.9	35.9	9.4	106.7	20.3	26.8	7.3
	2	107	17.8	3.6	13.2	32	15.8	63.1	14.3	6.4	25.3
	3	47	20.4	3.4	21.8	34.3	4.9	50.8	36.7	4.2	18.3
	4	40.9	12.1	4.4	32.8	36.2	11.1	29.2	10.1	5.1	17.2
	5	56	9.4	5.4	14.6	30.5	7.2	44.4	18.9	5.4	35.3
	6	61.2	11.8	4.8	12	19.9	6.9	60.6	13.6	5.7	11.1
	7	61.9	17.1	3.6	20.3	29.3	10	55.8	9.6	16	18.5
	8	59.8	15.4	3	9	24.1	11.4	53.4	21.6	0	14.1
Ester	1	0	11.1	2.6	0.4	3.5	15.9	66.9	0.1	0.3	13.5
	2	16	3.1	4.3	0.5	6.6	8	29.1	4.8	2	13.8
	3	0	3.6	1.7	0.1	4.4	10.3	2.4	5.9	0.1	0.2
	4	6.1	17.7	0.4	2.5	1.8	10.9	32.9	6.5	1.3	13.2
	5	0	4.2	0.3	1.6	1.6	6.7	20	3.8	0.9	10.2
	6	71.8	3.7	0.2	1.3	2.1	42.3	87.4	31.2	0.2	63.7
	7	82.1	1.4	1.3	2.5	3.8	27.7	81.6	45.5	0.9	70.2
	8	38.2	4.7	0.4	3.6	5.5	19.9	44.8	30.6	0.6	34.3
Ester ratio	1	0.00	0.13	0.27	0.02	0.09	0.63	0.39	0.00	0.01	0.65
	2	0.13	0.15	0.54	0.04	0.17	0.34	0.32	0.25	0.24	0.35
	3	0.00	0.15	0.33	0.00	0.11	0.68	0.05	0.14	0.02	0.01
	4	0.13	0.59	0.08	0.07	0.05	0.50	0.53	0.39	0.20	0.43
	5	0.00	0.31	0.05	0.10	0.05	0.48	0.31	0.17	0.14	0.22
	6	0.54	0.24	0.04	0.10	0.10	0.86	0.59	0.70	0.03	0.85
	7	0.57	0.08	0.27	0.11	0.11	0.73	0.59	0.83	0.05	0.79
	8	0.39	0.23	0.12	0.29	0.19	0.64	0.46	0.59	1.00	0.71

3-2-4. LCAT 欠損症患者の血漿オキシステロール ester 比の比較解析

4 β HC を除いたコレステロール、5,6 α EC、5,6 β EC、CT、7 α HC、7KC、24SHC、25HC および 27HC の血漿 total 値(free 体+ester 体)は、健常人に比べて LCAT 欠損症 (FLD : n=5、FED : n=3) で有意に低かった。また、7 α HC、24SHC および 27HC の血漿 total 値は、FED 患者よりも FLD 患者の方が有意に低かった(図 3-3)。

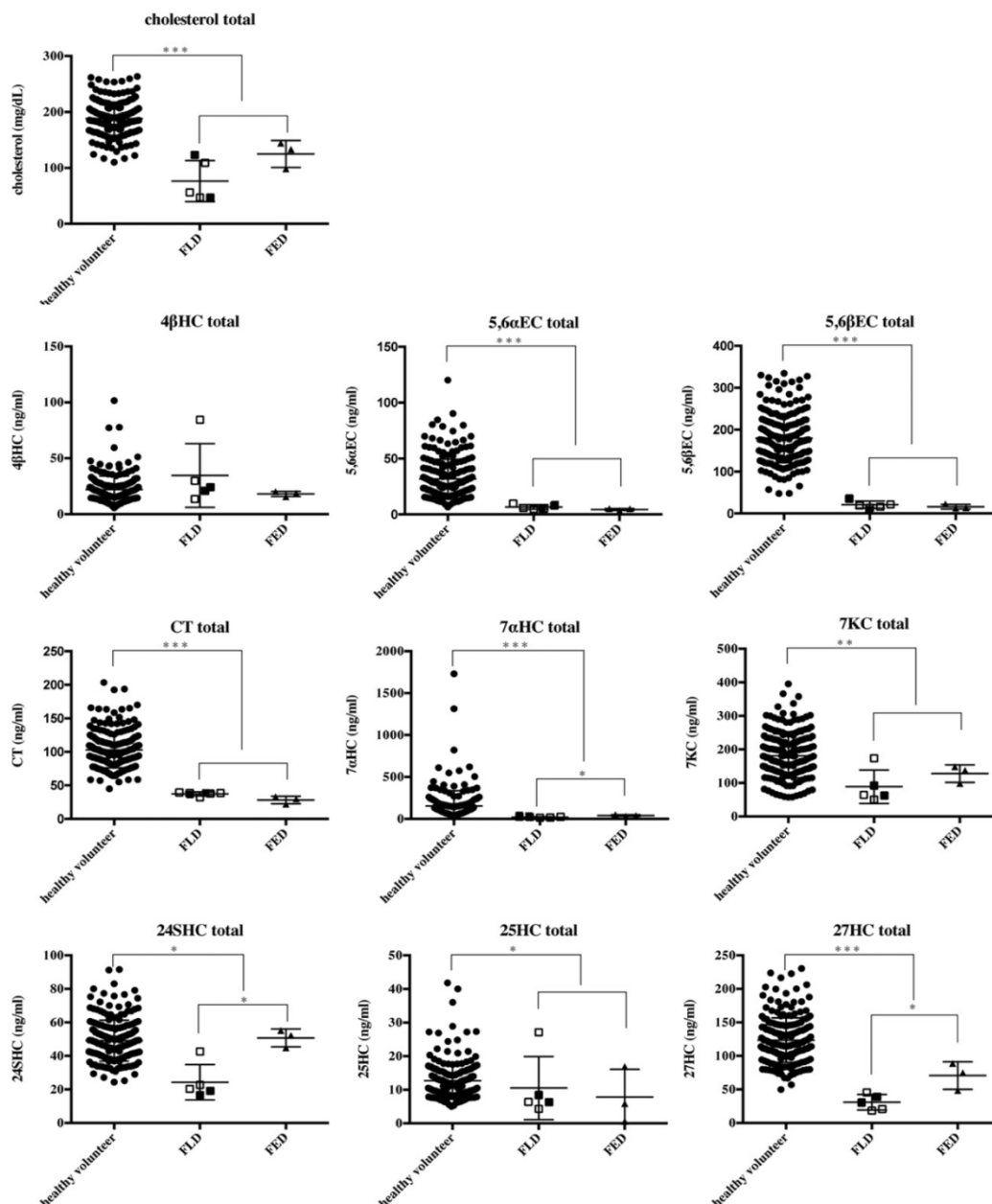


図 3-3 血漿オキシステロールの total 量 (free 体+ester 体)の比較
健常者と LCAT 欠損患者における血漿オキシステロール total 値(free 体+ester 体)を比較解析した。血漿オキシステロール total 値は、健常者 (●、n=206) 対 FLD +FED (n=8)、CE/TC=0 の FLD (□、n=3) および CE/TC=0.13 の FLD (■、n=2) 対 FED (▲、n=3) で比較した。データは平均値±標準偏差で示した。

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

7KC、24SHC および 25HC の血漿 free 値は、健常人よりも LCAT 欠損患者で有意に高かったが、5,6 α EC および 5,6 β EC の血漿 free 値は、健常人よりも LCAT 欠損患者で有意に低かった（図 3-4）。いずれのオキシステロール free 体は、FLD 患者と FED 患者間で有意な差は認められなかった。

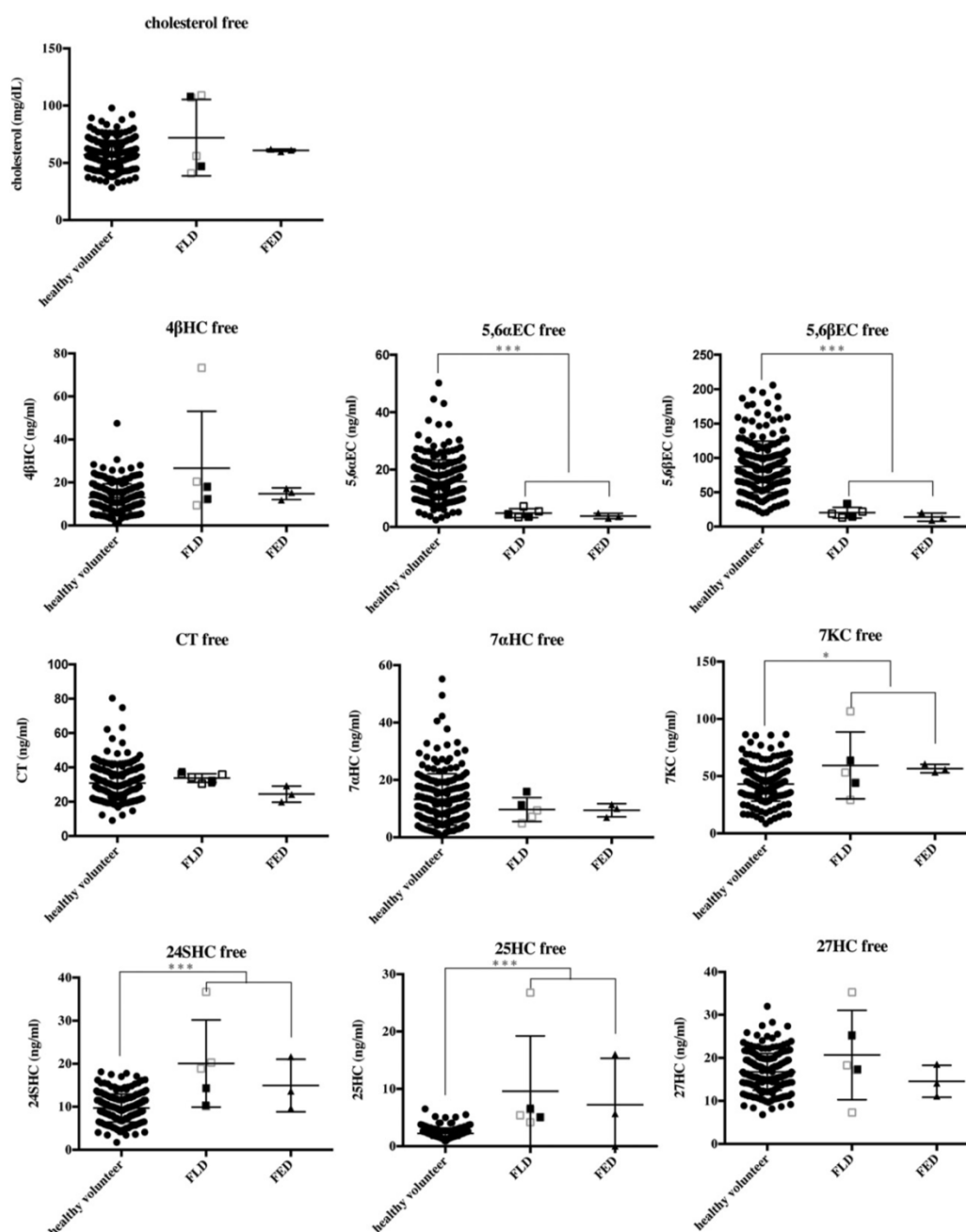


図 3-4 血漿オキシステロールの free 体量の比較

健常者と LCAT 欠損患者における血漿オキシステロール free 値を比較解析した。血漿オキシステロール free 値は、健常人（●、n=206）対 FLD+FED（n=8）、CE/TC=0 の FLD（□、n=3）および CE/TC=0.13 の FLD（■、n=2）対 FED（▲、n=3）で比較した。データは平均値±標準偏差で示した。* $p < 0.05$ および *** $p < 0.001$ 。

LCAT 欠損患者における 4 β HC を除いたコレステロール、5,6 α EC、5,6 β EC、CT、7 α HC、7KC、24SHC、25HC および 27HC の血漿 ester 値は、健常人よりも有意に低かった。血漿 total 値の傾向と同様に、FLD 患者における 7 α HC、24SHC および 27HC の血漿 ester 値は、FED 患者よりも有意に低かった(図 3-5)。

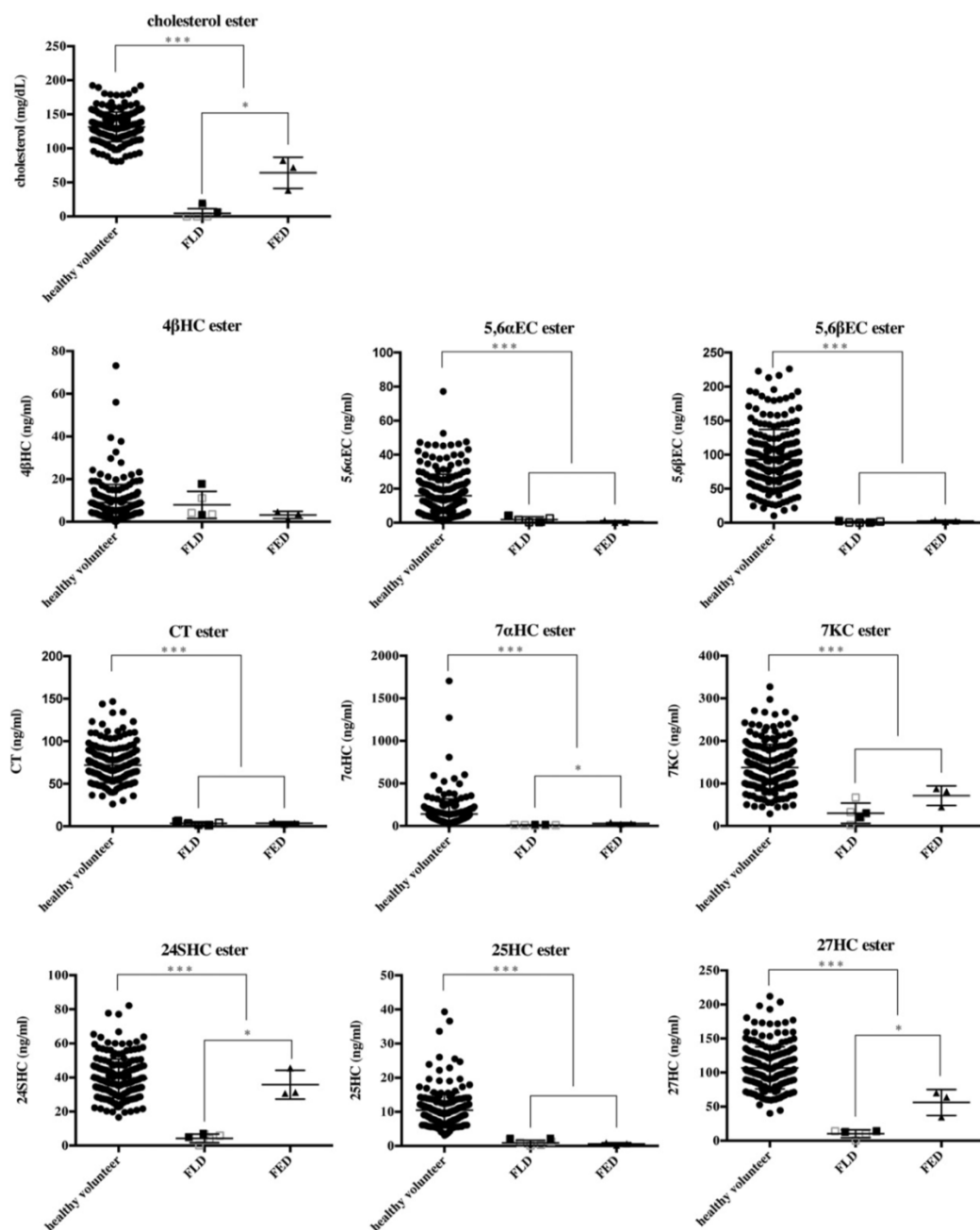


図 3-5 血漿オキシステロールの ester 体量の比較

健常者と LCAT 欠損患者における血漿オキシステロール ester 値を比較解析した。血漿オキシステロール ester 値は、健常者 (●、n=206) 対 FLD+FED (n=8)、CE/TC=0 の FLD (□、n=3) および CE/TC=0.13 の FLD (■、n=2) 対 FED (▲、n=3) で比較した。データは平均値±標準偏差で示した。*p < 0.05 および ***p < 0.001。

FLD 患者のコレステロール、CT、24SHC、25HC および 27HC の free 比(free/total 比)は、健常人よりも有意に高かった。また、FLD 患者のコレステロール、24SHC、および 27HC の free 比は、FED 患者よりも有意に高かった (図 3-6)。

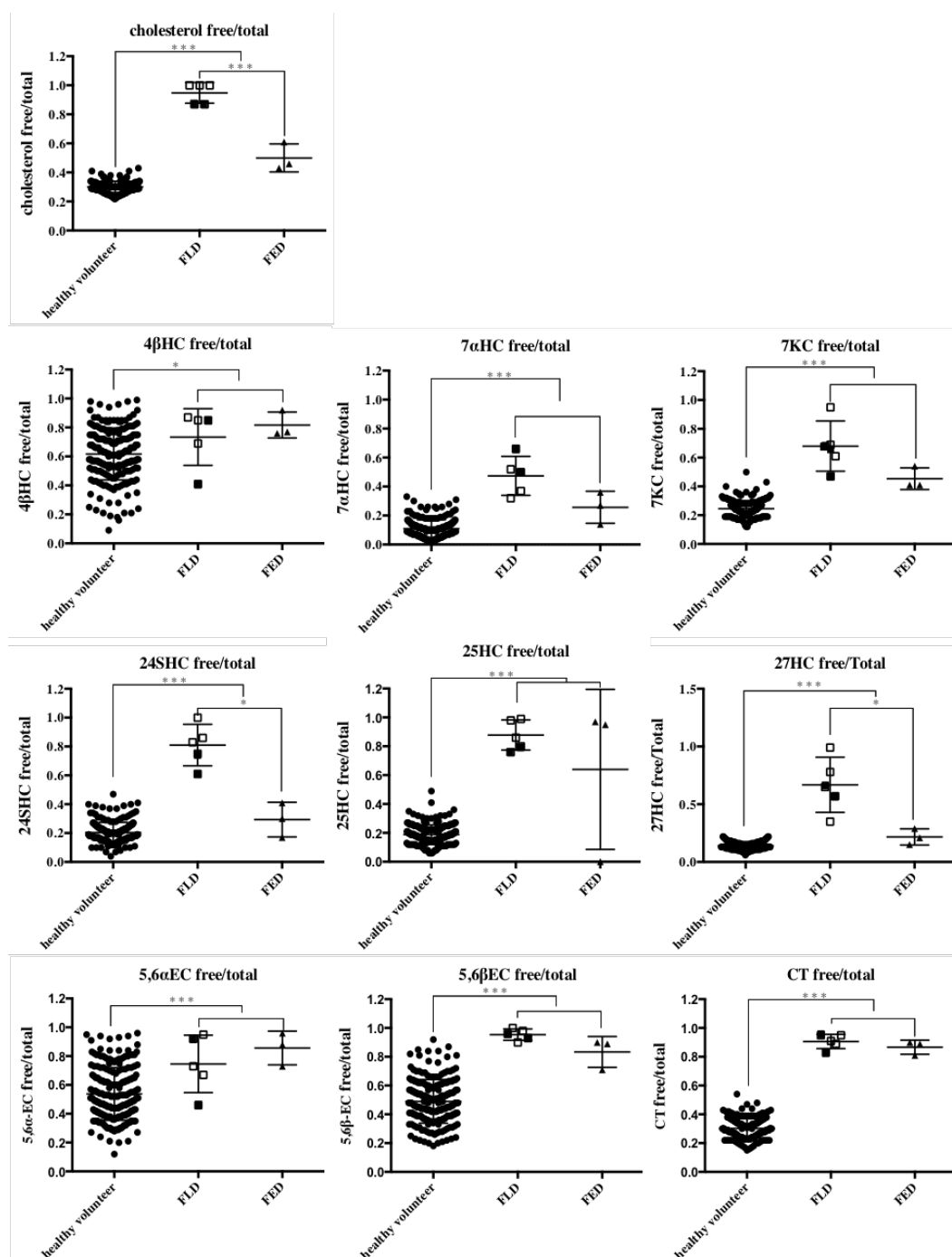


図 3-6 血漿オキシステロールの free 比の比較

健常者と LCAT 欠損患者における血漿オキシステロール free 比を比較解析した。血漿オキシステロール free 比は、健常人 (●、n=206) 対 FLD+FED (n=8)、CE/TC=0 の FLD (□、n=3) および CE/TC=0.13 の FLD (■、n=2) 対 FED (▲、n=3) で比較した。データは平均値±標準偏差で示した。*p < 0.05 および ***p < 0.001。

LCAT 欠損患者の ester 比(ester/total 比)は全てのオキシステロール類で有意に低かった。また、FLD 患者のコレステロール、24SHC および 27HC の ester 比は、FED 患者よりも有意に低かった(図 3-7)。

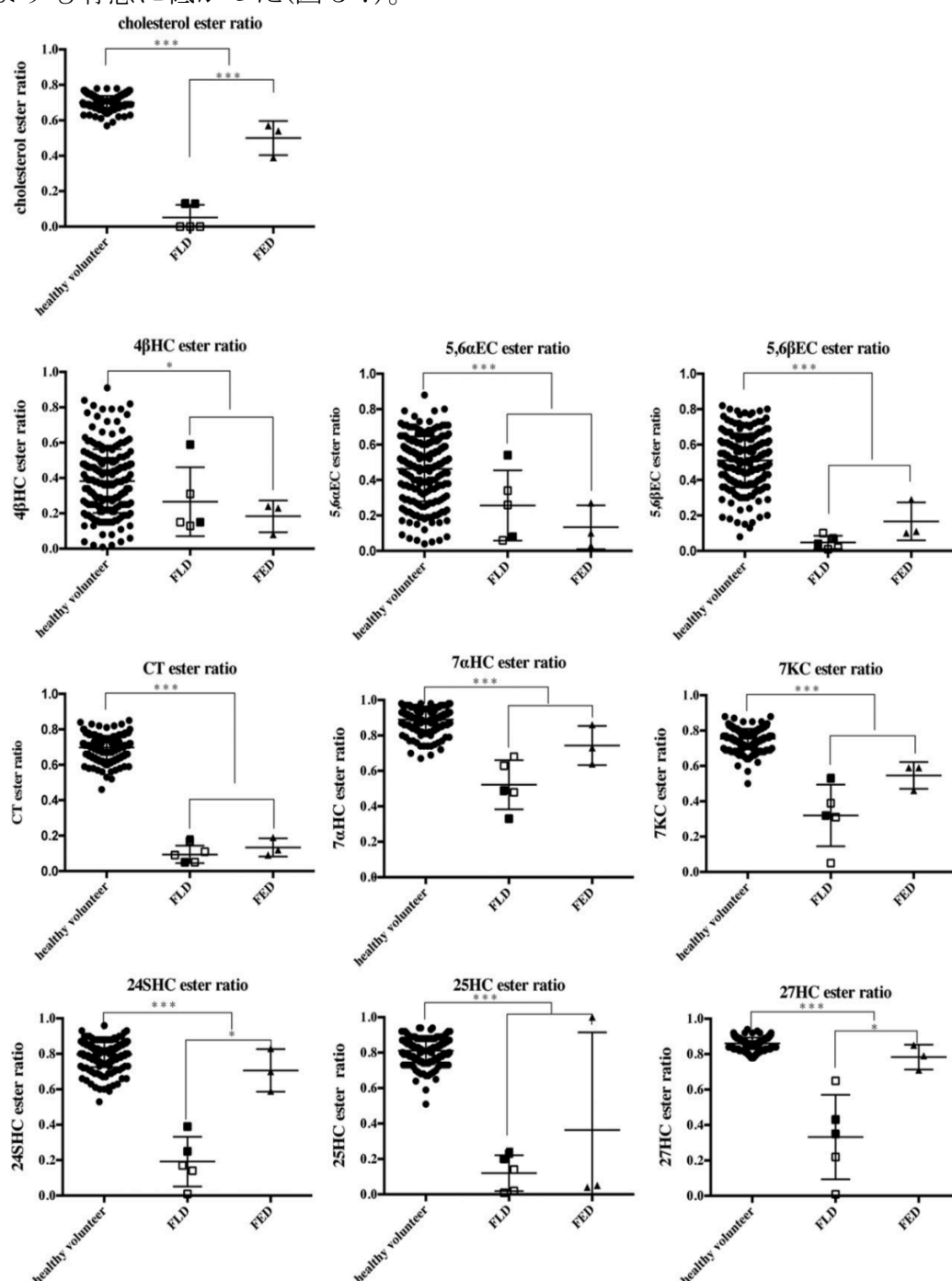


図 3-7 血漿オキシステロールの ester 比の比較

健常者と LCAT 欠損患者における血漿オキシステロール ester 比を比較解析した。血漿オキシステロール ester 比は、健常者 (●、n=206) 対 FLD+FED (n=8)、CE/TC=0 の FLD (□、n=3) および CE/TC=0.13 の FLD (■、n=2) 対 FED (▲、n=3) で比較した。データは平均値±標準偏差で示した。*p < 0.05 および ***p < 0.001。

血漿 CE が $CE/TC=0$ であった 3 人の FLD 患者(No.1, 3, 5、図の open square)は、5,68EC、CT、24SHC および 25HC の ester 比が 0.2 未満だった(表 3-4)。一方、これらの FLD 患者(No.1, 3, 5、open square)では 48HC、5,6aEC、7aHC、7KC および 27HC の ester 比(0.05~0.68)はコレステロールのエステル比(0~0.13)と比べて非常に高く(図 3-7、表 3-4)、これらオキシステロール類においては相当量のエステル化活性が残存していることになる。さらに、LCAT 欠損患者の血漿オキシステロール ester 値は、48HC のみ顕著な低下が見られなかった(図 3-5)。これらの結果から、血漿のエステル化機構に LCAT 非依存的経路が存在する可能性が考えられた。オキシステロールの ester 化に対する LCAT 依存および非依存経路の寄与に基づいて (図 3-6、3-7)、LCAT によるオキシステロールの ester 化は次の 3 つのグループに分類できた。

- 1) LCAT によって主にエステル化される
→コレステロール、5,68EC、CT、24SHC および 25HC
- 2) LCAT 依存性経路と非依存性経路の両方によってエステル化される
→5,6aEC、7aHC、7KC および 27HC
- 3) LCAT 非依存性経路によって主にエステル化される
→48HC

3-2-4. LCAT 欠損症患者における血漿オキシステロール ester 比の相関解析

コレステロール、24SHC、および 27HC の ester 比が FED 患者よりも FLD 患者で有意に低かった結果は、これら ester 比が LCAT 活性に関連している可能性が考えられる。LCAT 欠損患者の CE/TC 比は 0~0.57 であり、この残留したコレステロールの LCAT 活性 (CE/TC 比) にオキシステロールの ester 比が相関することが期待できる。興味深いことに、酵素アッセイによって測定された LCAT 活性は、LCAT 欠損患者では検出できなかった (表 3-2、図 3-2)。この原因として血漿サンプルが保存中に LCAT 活性を失ってしまった可能性を排除しきれないが、CE/TC 比は酵素アッセイよりもはるかに感度良く検証できる可能性がある。この仮説を検証するために、オキシステロールの ester 比と CE/TC 比の相関関係を調べた。CE/TC 比は、7KC、24SHC、および 27HC の ester 比と有意な正の相関を示した (図 3-8)。これらオキシステロールの中で、24SHC が最も顕著な正の相関関係を示した。対照的に、CE/TC 比は、4 β HC、5,6 α EC、5,6 β EC、CT、7 α HC、または 25HC の ester 比と有意な相関関係は見られなかった。

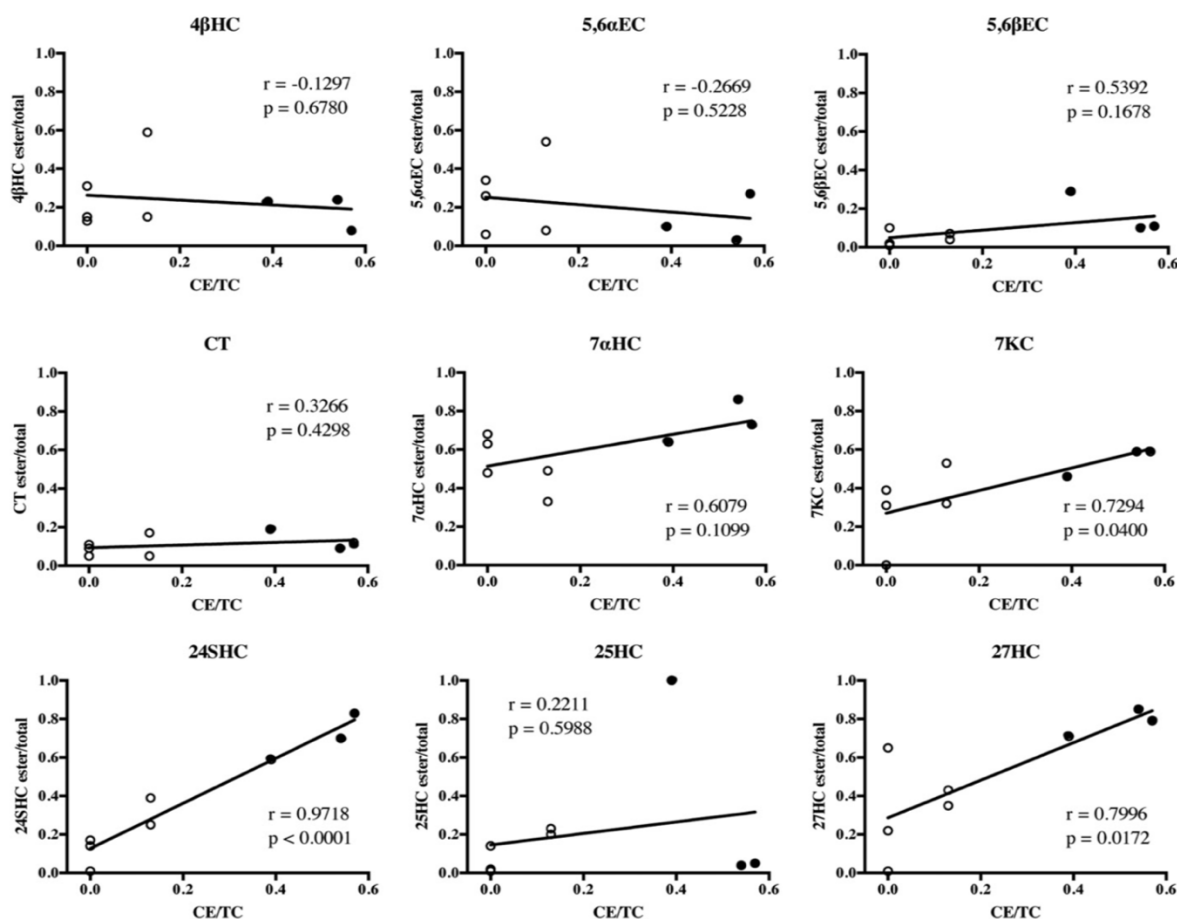


図 3-8 LCAT 欠損症患者における血漿オキシステロール ester 比の相関解析
LCAT 欠損患者におけるオキシステロールのエステル比と CE/TC 比の相関解析を行った。LCAT 欠損患者 [FLD (○、n=5) および FED (●、n=3)] において、7KC、24SHC、27HC のエステル比は CE/TC 比と正の相関があった。

第3節 血漿リポタンパク分画におけるオキシステロール類の分布解析

健康人(n=5)から得た血漿から超高速遠心法を用いて VLDL、IDL、LDL、HDL および LPDS 分画を分離した。各分画は測定キットを用いて脂質濃度を、LC-MS/MS 解析法を用いてオキシステロール類を測定した。

3-3-1. リポタンパク分画の脂質解析

各リポタンパク分画の脂質(TC、FC、CE、TG、PL)の濃度 (表 3-5)とその存在比 (表 3-6.)を下記にまとめた。

表 3-5 リポタンパク分画の脂質濃度 (実測値)

	TC	(mg/dL)	FC	(mg/dL)	CE	(mg/dL)
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
Plasma	154.6	30.7	70.1	15.6	84.5	15.8
VLDL	4.9	1.7	3.8	1.5	1.0	0.5
IDL	4.9	0.4	3.0	0.3	1.9	0.2
LDL	56.5	19.1	28.9	9.0	27.6	10.3
HDL	52.9	19.1	21.3	11.4	31.6	7.9
LPDS	—	—	—	—	—	—
Total	119.2		57.0		62.1	

	TG	(mg/dL)	PL	(mg/dL)	protein	(mg/mL)
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
Plasma	54.4	27.2	154.7	30.3	53.9	14.8
VLDL	24.3	15.8	7.0	3.2	0.7	0.3
IDL	4.7	2.0	3.7	0.3	0.2	0.0
LDL	8.1	1.9	33.6	10.9	1.3	0.3
HDL	5.9	1.9	69.2	21.6	1.9	0.6
LPDS	0.0	0.0	18.6	1.4	61.8	3.3
Total	42.9		132.1		5.7	

表 3-6 リポタンパク分画の脂質存在比 (分布比)

	TC	(%)	FC	(%)	CE	(%)
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
VLDL	3.1	0.8	5.5	1.6	1.2	0.5
IDL	3.3	0.7	4.4	0.8	2.4	0.6
LDL	36.3	7.0	41.4	7.9	32.1	6.8
HDL	34.5	10.0	29.9	11.6	38.1	9.1
LPDS	—	—	—	—	—	—
Total	77.2	5.3	81.2	7.1	73.8	4.0

	TG	(%)	PL	(%)	protein	(%)
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
VLDL	40.8	14.7	4.6	1.9	1.2	0.5
IDL	9.0	1.5	2.5	0.4	0.4	0.1
LDL	17.4	7.0	22.0	6.2	2.6	0.7
HDL	14.4	9.4	44.3	6.8	4.1	2.7
LPDS	—	—	12.4	1.8	125.2	40.0
Total	81.6	7.1	85.8	5.8	133.6	43.0

各リポタンパク分画における脂質存在比は、既報の存在比と同様の結果だった。TGの分布比はVLDL分画で高く、PLの分布比はHDL分画で高かった。TC、FCおよびCEの分布比はLDL分画とHDL分画が主だった。この結果から、超高速遠心法によるリポタンパク分画は問題なく調製できたことが示された。

3-3-2. リポタンパク分画のオキシステロール類のLC-MS/MS解析

リポタンパク分画のオキシステロール濃度（表 3-7）とその存在比（表 3-8）を下記にまとめた。リポタンパクを含まないLPDS分画においても7αHC、7KC、24SHCおよび27HCが存在していた。オキシステロールのtotal、freeおよびester体は、全てLDL分画とHDL分画に主に存在していたが、その分布比は各オキシステロール間で異なっていました。LDL分画とHDL分画に焦点を当てると、total値とester値で2つのパターンが識別できた。（表 3-8）

i) LDL分画に有意に分布していた

→ CT、48HC、5,6αEC、5,6βEC、7αHC、7KCおよび25HC

ii) HDL分画に有意に分布していた → 24SHCおよび27HC

また、free値では3つのパターンが識別できた。（表 3-8）

i) LDL分画とHDL分画で均等に分布していた → 48HC、7αHCおよび7KC

ii) LDL分画に有意に分布していた → CT、5,6αEC、5,6βECおよび25HC

iii) HDL分画に有意に分布していた → 24SHCおよび27HC

24SHCおよび27HCに関するこれらの結果は、以前に報告された値と分布比ともほとんど一致していた³⁶⁾。ester比は、各オキシステロールのLDL分画とHDL分画の間ではほぼ同程度だった（表 3-8）。

表 3-7. リポタンパク分画のオキシステロール濃度 (実測値)

	4βHC total		5,6αEC total		5,6βEC total		CT total		7αHC total		7KC total		24sHC total		25HC total		27HC total	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
Plasma	28.3	10.3	10.7	3.8	64.3	16.3	34.5	6.9	262.9	92.2	296.1	54.7	56.8	11.6	41.5	15.2	74.8	14.2
VLDL	2.4	1.0	0.9	0.6	3.5	1.7	1.8	1.0	49.5	35.3	37.8	18.0	3.8	1.3	4.8	3.7	2.9	0.9
IDL	1.9	0.4	0.4	0.1	3.3	1.0	1.1	0.6	6.9	2.6	14.4	2.3	1.2	0.3	3.1	3.5	1.6	0.2
LDL	11.8	4.2	5.3	2.1	31.9	5.4	17.6	5.8	116.6	32.5	87.2	10.7	16.3	6.1	24.4	12.2	20.7	8.9
HDL	10.7	5.2	3.5	1.1	15.7	6.6	12.1	7.7	45.0	37.3	65.6	18.2	16.5	5.7	9.8	6.4	33.2	9.9
LPDS	—	—	—	—	—	—	—	—	36.3	7.8	72.6	8.4	9.0	3.7	—	—	13.9	3.4
total	26.8	—	10.0	—	54.5	—	32.6	—	254.3	—	277.6	—	46.9	—	42.1	—	72.3	—

	4βHC free		5,6αEC free		5,6βEC free		CT free		7αHC free		7KC free		24sHC free		25HC free		27HC free	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
Plasma	12.2	7.3	4.4	1.2	24.4	4.5	3.5	1.6	23.9	5.6	65.0	8.8	14.7	3.5	4.9	2.2	16.8	4.4
VLDL	1.1	0.7	0.2	0.1	1.4	0.7	0.3	0.2	2.0	1.1	5.2	3.0	0.7	0.4	0.3	0.2	0.6	0.3
IDL	0.5	0.2	0.2	0.0	1.5	1.0	0.3	0.1	1.4	0.3	3.7	0.8	0.4	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1
LDL	5.6	3.4	2.7	1.3	12.5	4.4	2.2	1.2	8.7	5.5	19.3	4.6	3.4	1.5	1.0	0.5	3.0	2.1
HDL	6.2	7.0	1.0	0.6	6.0	1.7	0.8	0.4	8.3	3.0	19.3	3.8	4.1	2.1	0.9	0.6	4.0	1.7
LPDS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.0	0.0	6.0	1.8	—	—	8.8	1.4
total	13.5	—	4.1	—	21.3	—	3.5	—	20.5	—	47.5	—	14.6	—	2.4	—	16.6	—

	4βHC ester		5,6αEC ester		5,6βEC ester		CT ester		7αHC ester		7KC ester		24sHC ester		25HC ester		27HC ester	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
Plasma	16.2	3.3	6.3	3.3	40.0	17.7	31.0	6.4	239.0	87.5	231.0	49.0	42.2	8.6	36.7	14.2	58.0	10.5
VLDL	1.3	0.7	0.7	0.5	2.1	1.8	1.5	0.8	47.5	34.9	32.6	17.1	3.1	1.2	4.5	3.8	2.3	0.8
IDL	1.3	0.4	0.2	0.1	1.8	1.5	0.9	0.6	5.6	2.6	10.7	3.0	0.9	0.3	2.9	3.6	1.4	0.2
LDL	6.2	2.6	2.5	1.5	19.4	7.6	15.5	5.0	107.8	27.5	67.9	8.8	12.9	4.8	23.4	12.5	17.6	7.0
HDL	4.4	3.0	2.4	0.7	9.7	7.2	11.2	7.6	36.7	35.4	46.3	15.6	12.4	3.8	8.9	6.6	29.2	8.3
LPDS	—	—	—	—	—	—	—	—	36.3	7.8	72.6	8.4	3.0	2.2	—	—	5.1	3.2
total	13.3	—	5.8	—	33.1	—	29.1	—	233.9	—	230.1	—	32.3	—	39.7	—	55.6	—

単位 : ng/mL

表 3-8. リポタンパク分画のオキシステロール存在比 (分布比)

	4βHC total		5.6αEC total		5.6βEC total		CT total		7αHC total		7KC total		24SHC total		25HC total		27HC total	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
VLDL	10.4	7.3	7.2	4.3	6.1	3.5	5.7	3.5	18.3	10.1	12.6	4.9	6.8	2.0	12.7	9.0	3.9	0.0
IDL	8.4	9.2	4.1	0.9	5.7	3.3	3.3	1.4	3.1	1.7	5.2	1.9	2.2	0.6	7.8	9.2	2.2	1.2
LDL	42.1	9.7	50.4	12.8	51.7	10.9	50.5	9.0	46.2	6.5	30.8	7.7	27.9	5.4	60.7	25.3	27.6	0.3
HDL	36.5	6.1	34.5	12.4	23.7	5.3	33.3	16.5	16.8	9.1	22.9	7.0	30.8	12.8	25.1	13.6	44.4	9.1
LPDS	—	—	—	—	—	—	—	—	15.4	5.5	25.5	5.7	16.4	6.1	—	—	18.4	8.7
total %	97.5	11.8	96.2	11.2	87.3	13.0	92.7	13.6	99.8	16.2	96.9	19.0	84.0	12.4	106.3	26.6	96.6	1.6

	4βHC free		5.6αEC free		5.6βEC free		CT free		7αHC free		7KC free		24SHC free		25HC free		27HC free	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
VLDL	10.8	5.1	4.1	1.1	5.5	1.6	10.0	8.2	8.3	3.5	8.1	5.3	4.3	2.0	8.2	5.9	3.4	0.0
IDL	5.2	1.6	4.8	2.4	5.7	2.4	9.0	5.8	5.7	0.6	5.8	1.5	2.9	1.9	4.7	2.2	1.7	1.0
LDL	47.1	9.4	62.5	17.5	52.6	19.3	58.9	15.7	34.0	14.8	29.6	4.9	23.0	6.3	24.4	14.0	17.3	0.4
HDL	45.6	21.3	23.6	10.7	24.5	5.7	23.7	8.4	34.1	5.9	29.5	3.0	29.3	13.4	18.8	9.9	23.6	8.0
LPDS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	42.0	9.8	—	—	55.0	6.3
total %	108.6	14.7	95.0	12.2	88.3	14.6	101.7	10.1	82.1	20.4	73.0	7.0	101.4	15.0	56.1	18.5	100.9	11.1

	4βHC ester		5.6αEC ester		5.6βEC ester		CT ester		7αHC ester		7KC ester		24SHC ester		25HC ester		27HC ester	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
VLDL	9.4	9.4	10.1	6.9	7.2	6.6	5.3	3.3	19.5	11.1	14.0	6.1	7.5	2.5	13.5	10.4	4.1	0.0
IDL	9.6	13.1	3.6	2.0	6.8	8.9	2.9	1.6	2.8	1.9	5.1	2.5	2.1	0.5	9.0	12.0	2.4	1.5
LDL	38.6	14.9	39.3	8.5	51.3	13.2	49.5	9.5	48.1	9.3	31.7	11.0	29.7	6.3	67.0	31.9	30.5	0.3
HDL	28.1	13.9	45.4	18.3	22.3	9.5	34.1	17.1	15.2	9.8	21.1	8.0	31.3	12.8	26.1	16.4	50.4	9.8
LPDS	—	—	—	—	—	—	—	—	17.3	6.9	33.2	8.7	7.6	5.2	—	—	8.2	9.7
total %	85.8	28.6	98.3	14.4	87.5	13.4	91.8	16.1	102.9	21.5	105.1	27.2	78.1	11.6	115.6	35.8	95.6	4.4

単位 : %

	4βHC ester比		5.6αEC ester比		5.6βEC ester比		CT ester比		7αHC ester比		7KC ester比		24SHC ester比		25HC ester比		27HC ester比	
	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差	平均	標準偏差
Plasma	0.60	0.09	0.56	0.15	0.59	0.13	0.90	0.03	0.90	0.03	0.79	0.03	0.74	0.03	0.88	0.05	0.78	0.03
VLDL	0.46	0.29	0.68	0.16	0.50	0.29	0.82	0.05	0.93	0.06	0.82	0.09	0.81	0.10	0.88	0.10	0.80	0.06
IDL	0.52	0.29	0.51	0.25	0.51	0.30	0.67	0.23	0.78	0.10	0.71	0.11	0.70	0.11	0.84	0.10	0.84	0.01
LDL	0.55	0.14	0.46	0.17	0.59	0.16	0.89	0.05	0.93	0.03	0.76	0.04	0.79	0.04	0.93	0.06	0.86	0.04
HDL	0.52	0.25	0.70	0.11	0.55	0.20	0.93	0.04	0.76	0.10	0.70	0.05	0.76	0.05	0.86	0.12	0.88	0.01
LPDS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.28	0.16	—	—	0.33	0.16

単位 : %

第4節 合成基質を用いたオキシステロール類の LCAT 親和性の評価

LCAT OE HEK293 細胞を 37°C、5%CO₂ 条件下 3 日間培養後、細胞を回収して lysis buffer を添加し、氷上で 60 分静置し、遠心分離した上清から cell lysate を得た。得られた cell lysate はタンパク濃度を測定し、オキシステロール 類の LCAT assay に用いた。

3-4-1. LCAT OE HEK293 細胞 lysate の LCAT 発現解析

LCAT OE HEK293 細胞から得た cell lysate を western blotting 法を用いて LCAT 酵素の発現量を評価した。LCAT 遺伝子のプラスミド pCGT-hLCAT-neo を導入していない通常の HEK293 細胞 lysate (lane1)と比較して LCAT OE HEK293 細胞 lysate (lane2, 3)では顕著に LCAT の発現量が増加していた。コントロールとしてヒト血漿も(lane4, 5) 評価したが、バンドの位置が数 kDa ほど異なっていた。(図 3-9) LCAT は分子量 65,000~69,000 であり、糖鎖を含有した糖タンパクであることが報告されており⁴⁶⁾、ヒト血漿と cell lysate 間における分子量の差は糖鎖の含有量の違いに起因すると考えられた。

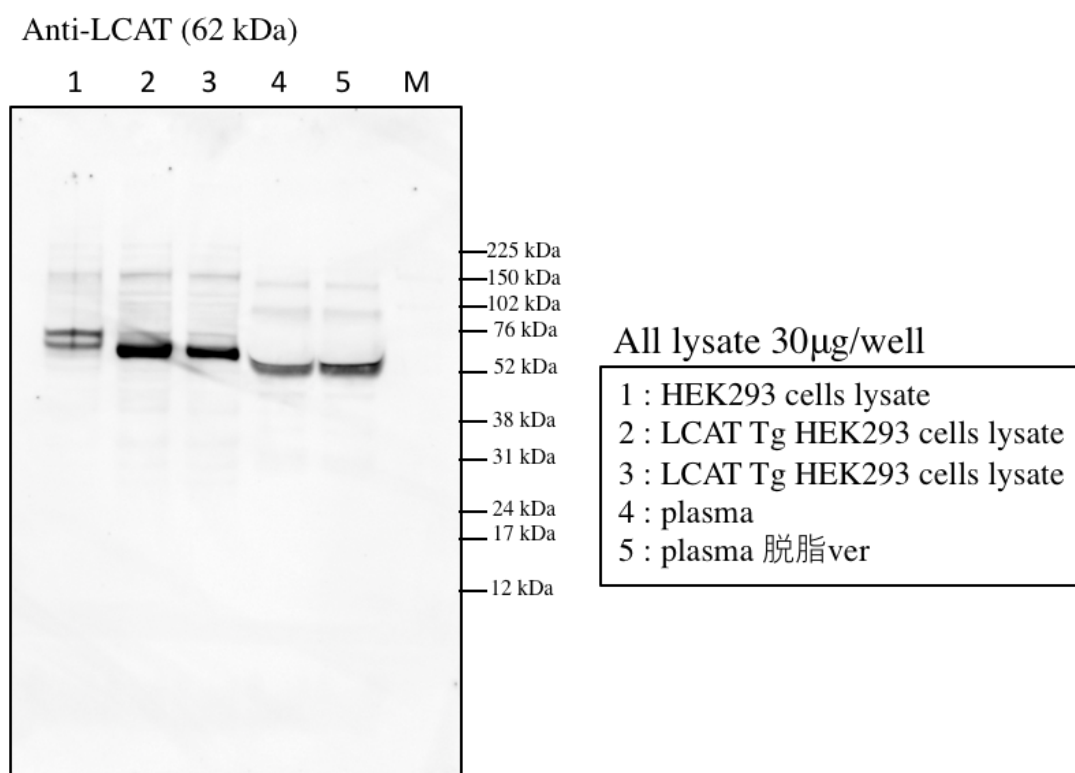


図 3-9 LCAT 発現解析

LCAT OE HEK293 細胞における LCAT のタンパク発現を western blotting 法を用いて評価した。LCAT OE HEK293 細胞 lysate (lane2, 3)では顕著に LCAT 発現量が増加していた。

3-4-2. 各オキシステロールの LCAT 酵素に対する親和性

LCAT assay を行うにあたり、合成基質となるオキシステロール類(4BHC、7 α HC、7KC、24SHC、25HC、27HC)のリポソームに反応液と LCAT OE HEK293 細胞 lysate を添加し、37°C、2 時間インキュベーションした。反応液を hexane 抽出し、得られたステロール抽出物を LC-MS/MS システムで測定し、反応前後のオキシステロール free 体含有量を比較することで、エステル化効率を評価し、LCAT 活性値 (pmol/ml/h) を算出した。基質であるリポソーム添加量を 6.125、12.5、25、50、100、200、400 pmol と振り、LCAT 活性を評価して Michaelis–Menten 式にて酵素反応速度を評価した。(図 3-10)

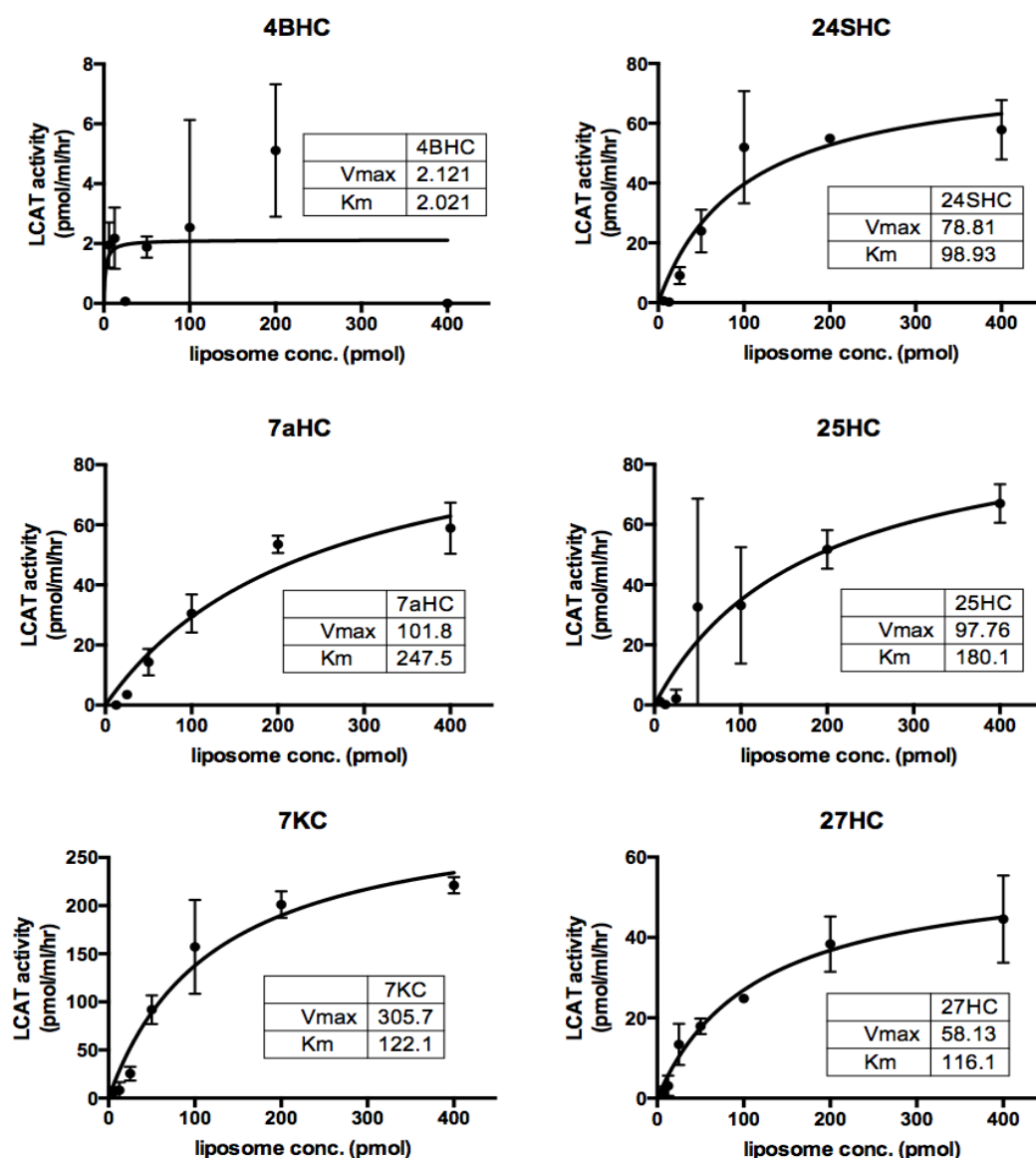


図 3-10 オキシステロールの LCAT 活性基質としての評価

4BHC、7 α HC、7KC、24SHC、25HC および 27HC のリポソームに対する LCAT OE HEK293 細胞 lysate による LCAT 活性を測定し、Michaelis–Menten 式にて LCAT に対する酵素反応速度を評価した。

7 α HC、7KC、24SHC、25HC、27HC のリポソームでは Michaelis–Menten 式に当てはまり、その K_m 値は $24SHC < 27HC < 7KC < 25HC < 7\alpha HC$ だった。24SHC、27HC と 7KC は 25HC や 7 α HC よりも LCAT に対して酵素親和性が高いことが示唆された。また、4 β HC のリポソームは Michaelis–Menten 式にあてはまらなかったが、4 β HC ester 値は検出感度限界に近かったことから、常に弱い LCAT 親和性があるか、または LCAT 親和性がないことが示唆された。

第4章 考察

本研究では、健常人の血漿 CT、7 α HC、7KC、24SHC、25HC および 27HC の ester 比が狭く分布(0.55~0.98)し、血漿 CE / TC 比に近かった。一方、48HC、5,6 α EC、および 5,6BEC の血漿 ester 比は、血漿 CE / TC 比よりも広く分布(0.05~0.98)しており、有意に低かった (図 3-2)。LCAT 欠損患者は、健常人よりも 7KC、24SHC および 25HC の free 体濃度が高かった (図 3-4)。LCAT 欠損患者では、48HC を除いたオキシステロールの ester 体濃度が健常人よりも有意に低かった (図 3-5)。また、LCAT 欠損患者では、FLD の患者は、FED の患者よりも 24SHC および 27HC の ester 比が有意に低かった (図 3-7)。これら結果は、血漿中のオキシステロール類が LCAT によってエステル化されることをヒト生体レベルで確認したが、特に 48HC が LCAT 非依存性経路によってエステル化されることも示唆している。

以前の研究では、5,6 α EC、5,6BEC、7 α HC、7KC、24SHC、25HC および 27HC は *in vitro* 実験で LCAT によってエステル化されることが報告された^{37) 38) 39)}。エステル化されたこれらオキシステロール類の血漿レベルが LCAT 欠損患者で著しく低下した本研究結果(図 3-5)は、LCAT が血漿オキシステロールをエステル化することをヒト生体レベルで証明した。これらのオキシステロールの ester 比は CE / TC 比と同様だったが、実測値は同等ではなかった。健常人の 7 α HC と 27HC の ester 比は CE / TC 比よりも大きく(図 3-2)、7 α HC と 27HC はコレステロールよりも LCAT によって効率的にエステル化されることが示唆できる。以前の報告によると *in vitro* 実験では、反応 15 分間では LCAT は 27HC よりも速くコレステロールをエステル化するが、反応 15 分以降 27HC の速度が有意に高くなることが報告されている³⁷⁾ことから、27HC がコレステロールよりも長く血漿中に存在する場合、その ester 体は CE よりも豊富に蓄積されることが考えられる。一方、27HC の血漿半減期 (0.75 時間) はコレステロールの血漿半減期 (65 日) よりもはるかに短い^{47) 48)}ことが報告されており、反応速度の差ではないことが考えられた。同様に、他のオキシステロールの血漿半減期はコレステロールよりも短く(7 α HC : 0.5 時間、24SHC : 14 時間⁴⁹⁾、48HC : 60 時間⁵⁰⁾、オキシステロールの ester 比の違いは、LCAT によるエステル化の効率の違いに起因しないことが考えられた。代わりに、ほとんどのオキシステロールは、LCAT 経路と LCAT 非依存性経路の複数経路によってエステル化されていると推定される。実際、48HC、5,6 α EC、7 α HC、7KC、および 27HC の ester 比は、血漿 CE がごくわずかな FLD 患者の一部でも 0.2 を超えていた。一方、5,6BEC、CT、24SHC および 25HC の ester 比は、すべての患者で 0.2 未満だった (図 3-7)。健常人における 7 α HC、7KC および 27HC の ester 比は、健常人 CE / TC モル比よりも高かった (図 3-2)。この結果から、5,6 α EC、7 α HC、7KC および 27HC は LCAT 経路または LCAT 非依存性経路の複数経路によってエステル化されている可能性が考えられた。また、48HC の ester 比は CE / TC 比よりも低かったことから、48HC が主に LCAT 非依存性経路によってエステル化される可能性が考えられた。

LCAT 欠損症の血漿オキシステロール ester 値は、48HC のみ差が見られなかった (図 3-5)。オキシステロール(7αHC、24SHC、25HC および 27HC)の赤血球から血漿への輸送はコレステロールよりも 30～50 倍速い速度で起こるが、48HC だけはコレステロールの輸送速度よりも有意に遅い(コレステロールの 60%程度)ことが報告された⁵¹⁾。この報告のように、48HC は他のオキシステロールよりも赤血球から血漿への輸送速度がコレステロールに類似しているにも関わらず、他のオキシステロールほど LCAT の基質としては適していないことが考えられた。この原因として、48-位が 3β-位に非常に近いため、48-位の水酸基が立体障害を介して LCAT の基質結合部位への 48HC の結合を妨げている可能性が考えられた。

血漿エステル化酵素は主にリポタンパクと関連してその活性を示す。HDL のプロテオーム解析では、HDL の主要な酵素として LCAT、paraoxonase-1 (PON1)、Lipoprotein associated phospholipase A2 (LpPLA2) としても知られる Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) および glutathione peroxidase-3 (GSPx-3) であることが報告された⁵²⁾。LCAT 以外の 3 つの酵素はアシルトランスフェラーゼとしての活性報告はないことから、48HC がリポタンパクに関連する酵素によってエステル化される可能性は低いと考えられた。一部のオキシステロールは、肝臓でエステル化され、VLDL として循環系に直接分泌されるか、腸でエステル化されたカイロミクロンとして分泌される可能性もある。実際、7αHC、7KC、24SHC、25HC および 27HC は、ACAT-1 および ACAT-2 によってエステル化されることが示された⁵³⁾。また、一部のオキシステロールは、steroid/sterol sulfotransferase (SLUT2B1b) によってスルホン化され、オキシステロール硫酸塩に変換される⁵⁴⁾。今後、ACAT-1 および ACAT-2 による血漿オキシステロールのエステル化への関連についても検討する必要がある。

健常人と LCAT 欠損患者の間で、血漿コレステロール、48HC、CT、7αHC および 27HC の free 体濃度に有意な差は見られなかった。一方、7KC、24SHC および 25HC の血漿 free 体濃度は、健常人よりも LCAT 欠損患者で有意に高かった (図 3-4)。HDL には抗酸化特性があるため、LCAT 欠損患者に HDL がないと、自己酸化が刺激され、コレステロールが 7αHC、7KC、25HC などの自己酸化されたオキシステロールに変換されてしまう可能性が考えられた。しかし、アラキドン酸とリノール酸由来の酸化代謝物や酸化リン脂質の血漿値は、HDL が低い LCAT 欠損患者で差がなかったことが報告された⁵⁵⁾。この報告から、自動酸化によってオキシステロール free 体が増加したという可能性は低いことが示唆された。実際、24SHC は自動酸化によって生成されなく、7αHC と 27HC の free 体は、肝臓で胆汁酸に分解される⁵⁶⁾ため、増加しないと考えられる。これらのオキシステロールの free 体は、特定のオキシステロールの異化において律速となりうる LCAT が欠損する結果、異化が遅延し、血漿中に蓄積する可能性が考えられた。オキシステロールは細胞毒性が報告されており⁵⁷⁾、LCAT 欠損患者における遊離 7KC、24HC、および 25HC の血漿レベルの増加 (図 3-4) が角膜病変の発症に関与していることも考えられた。しかし、LCAT 欠損患者の

これらのオキシステロールの血漿値は健常人と同等な値であったため、その寄与度は非常に低いと考えられる。一方、本研究で見られた LCAT 欠損症における血漿オキシステロール値の低下が、角膜混濁や腎機能障害などの臨床症状の原因である可能性があることを示唆する。オキシステロールは、生体内では非常に微量ながら多彩な生理作用が報告されており、その多くは ROR、エストロゲン受容体、グルコシルコイド受容体および LXR などの核内受容体に作用し、脂質代謝制御や抗炎症作用などを発揮する^{19), 20)}。また、LDL 中の酸化レシチンが腎機能障害を引き起こすことも報告される⁵⁸⁾。角膜や腎臓の正常機能が、オキシステロール ester 体による核内受容体に対するリガンドとしての供給に依存していた場合、オキシステロール ester 体の欠乏が病状の一因となり得ることを証明できる可能性がある。血漿 CT、5,6aEC、5,6bEC、7aHC、7KC、および 25HC ester 値は、健常人よりも FLD と FED の両方で常に低かったため、血漿 ester 値の低下（図 3-5）が、FLD と FED の両方の角膜混濁病状の一因となり得ることが考えられた。さらに、24SHC および 27HC の血漿 ester 値は、FED よりも FLD の方が低く（図 3-5）、CE/TC とも有意な正の相関を示した（図 3-8）ことから、24SHC および 27HC の血漿 ester 値の低下が腎機能障害の一因となり得ることが考えられた。今後、LCAT 欠損症における角膜や腎臓における組織中オキシステロール含量を測定し、細胞レベルでの機能障害等の評価ができれば、これらオキシステロール類が臨床所見の原因となる可能性が証明できるかもしれない。

健常者のリポタンパク分画におけるオキシステロールの分布を調べた結果、リポタンパクを含まない LPDS 分画においても 7aHC、7KC、24SHC および 27HC の存在が確認できた（表 3-8）。その含有率は 15~25%と高く、特に 7KC は血漿オキシステロールの 1/4 の割合が LPDS 分画に存在していることになる。ただ、オキシステロールの中でも 7KC は非常に空気酸化によって生成されやすいことが知られている⁵⁹⁾ため、空気酸化などの自動酸化経路で生成されることで LPDS 画分に豊富に存在していることが考えられた。また、オキシステロールの total、free および ester 体は、その 6~8 割近くが LDL 分画と HDL 分画に主に存在していたが、24SHC および 27HC の分布比は HDL 分画で有意に高い分布比を示した（表 3-8）。これらの結果は、以前に報告された値と分布比ともほとんど一致しており³⁶⁾、24SHC および 27HC が LCAT によって他のオキシステロールよりもよりエステル化される比率が多いことが考えられた。また、24SHC および 27HC の血漿 ester 値が、FED よりも FLD の方が低く（図 3-5）、CE/TC とも有意な正の相関を示した（図 3-8）ことから、24SHC および 27HC は LCAT 活性との関連が顕著に現れやすいオキシステロール種であることが示唆された。今回の研究では血漿量が多め（5mL 以上）に必要なためリポタンパクでの測定はできていないが、今後、LCAT 欠損症患者でも血漿リポタンパクにおけるオキシステロールの存在比を測定し、コレステロール同様に HDL 分画中のオキシステロールが顕著に低下している仮説を検証する必要がある。

以前の研究から、5,6aEC、5,6bEC、7aHC、7KC、24SHC、25HC および 27HC は LCAT によってエステル化されることが報告された^{37) 38) 39)}。本研究でも同様にオ

キシステロールのリポソームを作製し、LCAT 活性を評価して Michaelis–Menten 式にて酵素反応速度を評価した。7 α HC、7KC、24SHC、25HC および 27HC の Michaelis–Menten 式 K_m 値は 24SHC<27HC<7KC<<25HC<7 α HC であり(図 3-10)、24SHC および 27HC は他のオキシステロールよりも LCAT に対する親和性が高いことが示唆された。この結果は、他のオキシステロールに比べて 24SHC および 27HC の分布比が HDL 分画で有意に高い分布比を示した結果(表 3-8) と一致しており、24SHC および 27HC は LCAT 活性との関連が顕著に現れやすいオキシステロール種であることが *in vitro* 実験結果からも示唆された。また、4 β HC は Michaelis–Menten 式にあてはまらなかった(図 3-10)。この *in vitro* 結果は、4 β HC の血漿 ester 値のみが LCAT 欠損症と健常人の間で有意な差が見られなかった *in vivo* 結果(図 3-5)とも一致する。4 β HC が LCAT によってエステル化されるとの報告は未だなく、本研究における *in vitro* 実験でも確認できなかった。以上の結果から、4 β HC は非常に弱い LCAT 親和性があるか、または LCAT 親和性が無いことが示唆された。LCAT 非依存的なオキシステロールのエステル化機構の解明が今後の課題である。コレステロールをはじめとした血漿中ステロールのエステル化酵素は LCAT 以外報告されていない。LCAT 非依存的なエステル化機構を解明することができれば、血漿オキシステロール ester 体の蓄積を起因とする細胞機能や疾患における新たな分子機序の提示に発展することが期待できる。

第5章 結語

本研究により、ヒト血漿オキシステロールが LCAT によってエステル化されることが確認され、健常者の血漿リポタンパク分画におけるオキシステロールのエステル比をヒト生体レベルで初めて明らかとした。LCAT 欠損患者血漿を用いた解析結果から、CT、5,6 α EC、5,6 β EC 7 α HC、7KC、および 25HC ester の血漿 ester 値の低下が角膜混濁、24SHC および 27HC の血漿 ester 値の低下が腎機能障害の発症の一因である可能性が示唆された。また、24SHC および 27HC は HDL 分画で有意に高く分布し、*in vitro* 実験では 24SHC および 27HC は他のオキシステロールよりも LCAT に対する親和性が高かったことから、24SHC および 27HC は LCAT 活性との関連が顕著に現れやすいオキシステロール種であることが示唆された。また、*in vivo* および *in vitro* 実験の結果から、4 β HC の LCAT 親和性は極めて低く、4 β HC が主に LCAT 非依存性経路によってエステル化される可能性が考えられた。LCAT 非依存的なオキシステロールのエステル化機構の解明が今後の課題である。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導頂きました自治医科大学内科学講座内 内分泌代謝学部門教授 石橋俊先生、ならびにサンプルをご提供頂きました Amsterdam 大学 A.G. Holleboom 先生、千葉大学医学部付属病院 未来開拓センター 黒田正幸先生、東邦大学医療センター佐倉病院 武城英明先生、宇都宮東病院 大須賀淳一先生に深く感謝致します。また本研究を行うにあたり、多大なご協力を頂きました当研究室の皆様方に深く感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Glomset JA : The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction., *J. Lipid Res.*, 9: 155-167. 1968
- 2) Hamilton, RL, MC Williams, CJ Fielding, RJ Havel : Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver., *J. Clin. Invest.*, 58: 667-680. 1976
- 3) Attie, AD., JP Kastelein, MR Hayden : Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis., *J. Lipid Res.*, 42: 1717-1726. 2001
- 4) Tall, AR. : Plasma high density lipoproteins: therapeutic targeting and links to atherogenic inflammation., *Atherosclerosis*, 276: 39-43. 2018
- 5) Kaare RN, AT Remaley, HE Miettinen, EH Strøm BEP Balbo, CA Sampaio, I Wiig, JA Kuivenhoven, L Calabresi, JJ Tesmer, M Zhou, Dominic SN, B Skei, Sotirios K, Kelly A M, Kjetil R : Lecithin:cholesterol acyltransferase: symposium on 50 years of biomedical research from its discovery to latest findings., *J. Lipid Res.*, 61(8):1142-1149. 2020
- 6) Santamarina FS, JM Hoeg, G Assmann, HB Brewer : Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.*, New York., 2817-2833. 2001
- 7) 石崎 こずえ, 竹澤 美貴子, 牧野 伸二, 小幡 博人, 茨木 信博 : LCAT 欠損症に伴った角膜混濁の 1 例. *臨床眼科*, 65:1,12-15.2011
- 8) The Human Gene Mutation Database. Accessed July 11, 2020, at <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>.
- 9) Wang, XL, J Osuga, F Tazoe, K Okada, S Nagashima, M Takahashi, T Ohshiro, T Bayasgalan, H Yagyu, K Okada, S ishibashi : Molecular analysis of a novel LCAT mutation (Gly179 → Arg) found in a patient with complete LCAT deficiency., *J. Atheroscler. Thromb.*, 18: 713-719. 2011
- 10) Kuivenhoven JA, Pritchard H, Hill J, Frohlich J, Assmann G, Kastelein J : The molecular pathology of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes., *J. Lipid Res.*, 38:191-205. 1997
- 11) Santamarina-Fojo S, Hoeg JM, Assmann G, Brewer JHB : Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease, In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D: *The metabolic and molecular bases of inherited disease.*, New York, 2817-2833. 2001
- 12) Norum KR, Gjone E : Familial serum-cholesterol esterification failure. A new inborn error of metabolism., *Biochim. Biophys. Acta.*, 144: 698-700. 1967

- 13) Carlson, LA., and L Holmquist, Evidence for deficiency of high density lipoprotein lecithin: cholesterol acyltransferase activity (alpha-LCAT) in fish eye disease., *Acta Med. Scand.*, 218: 189–196. 1985
- 14) Klein, HG, S Santamarina Fojo, N Duverger, M Clerc, MF Dumon, JJ Albers, S Marcovina, and HB Brewer : Fish eye syndrome: a molecular defect in the lecithin-cholesterol acyl- transferase (LCAT) gene associated with normal alpha-LCAT-spe- cific activity., Implications for classification and prognosis. *J. Clin. Invest.*, 92: 479–485. 1993
- 15) Gjone, E, JP Blomhoff, AJ Skarbovik : Possible associa- tion between an abnormal low density lipoprotein and nephropathy in lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency., *Clin. Chim. Acta.*, 54: 11–18. 1974
- 16) Glomset, JA, G Assmann, E Gjone, KR Norum : Lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and fish eye disease. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.*, New York., 1933–1951. 1995
- 17) Ossoli, A, EB Neufeld, SG Thacker, B Vaisman, M Pryor, LA Freeman, CA Brantner, I Baranova, NO Francone, SJ Demosky : Lipoprotein X causes renal disease in LCAT deficiency., *PLoS One.*, 11: e0150083. 2016
- 18) Kuroda, M, AG Holleboom, ES Stroes, S Asada, Y Aoyagi, K Kamata, S Yamashita, S Ishibashi, Y Saito, H. Bujo : Lipoprotein subfractions highly associated with renal damage in familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 34: 1756–1762. 2014
- 19) Ma L., and ER Nelson : Oxysterols and nuclear receptors., *Mol. Cell. Endocrinol.*, 484: 42–51. 2019
- 20) Savouret, JF, M Antenos, M Quesne, J Xu, E Milgrom : 7-Ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor., *J. Biol. Chem.*, 276: 3054–3059. 2001
- 21) Poirot M, Poirot SS : Cholesterol-5,6-epoxides: chemistry, biochemistry, metabolic fate and cancer., *Biochimie.*, 95: 622–631. 2013
- 22) Luu W. Sharpe LJ, Capell-Hattam I, Gelissen IC, Brown AJ : Oxysterols: old tale, new twists., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 56: 447–467. 2016
- 23) Griffiths WJ, Wang Y : An update on oxysterol biochemistry: New discoveries in lipidomics., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 504: 617–622. 2018
- 24) Medina P, Paillasse MR, Segala G, Voisin M, Mhamdi L, Dalenc F, Lacroix-Triki M, Filleron T, Pont F, Saati TA, Morisseau C, Hammock BD, Silvente-Poirot, Poirot M : Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differentiation and anti-tumour properties., *Nat. Commun.*, 4: 1840. 2013
- 25) Voisin M, Medina P, Mallinger A, Dalenc F, Huc-Claustre E, Leignadier J,

- Serhan N, Soules R, Segala G, Mougél A, Noguer E, Mhamdi L, Bacquié E, Iuliano L, Zerbinati C, Lacroix-Triki M, Chaltiel L, Filleron T, Cavaillès V, Saati TA, Rochaix P, Duprez-Paumier R, Franchet C, Ligat L, Lopez F, Record M, Poirot M, Silvente-Poirot S : Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 114: 9346–9355. 2017
- 26) Bodin K, Bretillon L, Aden Y, Bertilsson L, Broomé U, Einarsson C, Diczfalusy U : Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4 β -hydroxycholesterol in humans. Evidence for involvement of cytochrome P450 3A4., *J. Biol. Chem.*, 276:38685–38689. 2001
- 27) Josephson F, Bertilsson L, Böttiger Y, Flamholz L, Gisslén M, Ormaasen V, Sönnernborg A, Diczfalusy U : CYP3A induction and inhibition by different antiretroviral regimens reflected by changes in plasma 4 β -hydroxycholesterol., *Eur J Clin Pharmacol.*, 64:775–781. 2008
- 28) Lütjohann D, Papassotiropoulos A, Björkhem I, Locatelli S, Bagli M, Oehring RD, Schlegel U, Jessen F, Rao ML, Bergmann K, Heun R : Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients., *J. Lipid Res.*, 41:195-198. 2000
- 29) Jeitner TM, Voloshyna I, Reiss AB : Oxysterol derivatives of cholesterol in neurodegenerative disorders., *Curr. Med. Chem.*, 18: 1515-1525. 2011
- 30) Shafaati M, Solomon A, Kivipelto M, Björkhem I, Leoni V : Levels of ApoE in cerebrospinal fluid are correlated with Tau and 24S-hydroxycholesterol in patients with cognitive disorders., *Neurosci. Lett.*, 425:78-82. 2007
- 31) Nelson ER, Wardell SE, Jasper JS, Park S, Suchindran S, Howe MK, Carver NJ, Pillai RV, Sullivan PM, Sondhi V, Umetani M, Geradts J, McDonnell DP : 27-Hydroxycholesterol links hypercholesterolemia and breast cancer pathophysiology., *Science*, 9:342(6162):1094-1098. 2013
- 32) Umetani M, Ghosh P, Ishikawa T, Umetani J, Ahmed M, Mineo C, Shaul PW : The cholesterol metabolite 27-hydroxycholesterol promotes atherosclerosis via proinflammatory processes mediated by estrogen receptor α ., *Cell Metab.*, 20:172-182. 2014
- 33) Liu SY, Aliyari R, Chikere K, Li G, Marsden MD, Smith JK, Pernet O, Guo H, Nusbaum R, Zack JA, Freiberg AN, Su L, Lee B, Cheng G : Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol., *Immunity.*, 38:92-105. 2013
- 34) Bauman DR, Bitmansour AD, McDonald JG, Thompson BM, Liang G, Russell DW : 25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production., *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA, 106:16764-16769. 2009

- 35) Sekiya M, Yamamuro D, Oshiro T, Honda A, Takahashi M, Kumagai M, Sakai K, Nagashima S, Tomoda H, Igarashi M, Okazaki H, Yagyu H, Osuga J, Ishibashi S : Absence of Nceh1 augments 25-hydroxycholesterol-induced ER stress and apoptosis in macrophages., *J. Lipid Res.*, 55: 2082–2092. 2014
- 36) Burkard I, von Eckardstein A, Waeber G, Vollenweider P, and Rentsch KM : Lipoprotein distribution and biological variation of 24S- and 27-hydroxycholesterol in healthy volunteers., *Atherosclerosis*, 194(1):71-78. 2007
- 37) Szedlacsek SE, Wasowicz E, Hulea SA, Nishida HI, Kummerow FA, Nishida T : Esterification of oxysterols by human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase., *J. Biol. Chem.*, 270: 11812–11819. 1995
- 38) Lin CY, Morel DW : Esterification of oxysterols in human serum: effects on distribution and cellular uptake., *J. Lipid Res.*, 37: 168–178. 1996
- 39) Marca LV, Spagnuolo MS, Cigliano L, Marasco D, Abrescia P : The enzyme lecithin-cholesterol acyltransferase esterifies cerebrosterol and limits the toxic effect of this oxysterol on SH-SY5Y cells., *J. Neurochem.*, 130: 97–108. 2014
- 40) Karuna R, Holleboom AG, Motazacker MM, Kuivenhoven JA, Frikke-Schmidt R, Tybjaerg-Hansen A, Georgopoulos S, Van Eck M, van Berkel TJ, Von Eckardstein A : Plasma levels of 27-hydroxycholesterol in humans and mice with monogenic disturbances of high density lipoprotein metabolism., *Atherosclerosis*, 214: 448–455. 2011
- 41) Kuroda M, Holleboom AG, Stroes ES, Asada S, Aoyagi Y, Kamata K, Yamashita S, Ishibashi S, Saito Y, Bujo H : Lipoprotein subfractions highly associated with renal damage in familial lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 34: 1756–1762. 2014
- 42) Gjone E, Blomhoff JP, Skarbovik AJ : Possible association between an abnormal low density lipoprotein and nephropathy in lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency., *Clin. Chim. Acta.*, 54: 11–18. 1974
- 43) Hole K, Gjestad C, Heitmann KM, Haslemo T, Molden E, Bremer S : Impact of genetic and nongenetic factors on interindividual variability in 48-hydroxy cholesterol concentration., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 73: 317–324. 2017
- 44) Diczfalussy U, Miura J, Roh HK, Mirghani RA, Sayi J, Larsson H, Bodin KG, Allqvist A, Jande M, Kim JW, Aklillu E, Gustafsson LL, Bertilsson L : 48-hydroxycholesterol is a new endogenous CYP3A marker: relationship to CYP3A5 genotype, quinine 3-hydroxylation and sex in Koreans, Swedes and Tanzanians. *Pharmacogenet. Genomics*. 18: 201–208. 2008
- 45) Nunes VS., Panzoldo NB, Leanca CC, Parra ES, Zago VS, Silva EJ, Cazita PM, Nakandakare ER, Faria EC, Quintao EC : Increased 27-

- hydroxycholesterol plasma level in men with low high density lipoprotein-cholesterol may circumvent their reduced cell cholesterol efflux rate., *Clin. Chim. Acta.*, 433: 169–173. 2014
- 46) Doi Y, Nishida T : Microheterogeneity and Physical Properties of Human Lecithin-cholesterol acyltransferase., *J. Biol. Chem.*, 10:5840-5846.1983
- 47) Chobanian AV, Burrows BA, Hollander W. : Body cholesterol metabolism in man. II. Measurement of the body cholesterol miscible pool and turnover rate., *J. Clin. Invest.*, 41: 1738–1744. 1962
- 48) Meaney S, Hassan M, Sakinis A, Lutjohann D, Bergmann K, Wennmalm A, Diczfalussy U, Björkhem I : Evidence that the major oxysterols in human circulation originate from distinct pools of cholesterol: a stable isotope study., *J. Lipid Res.*, 42: 70–78. 2001
- 49) Björkhem I, Lutjohann D, Diczfalussy U, Stahle L, Ahlborg G, Wahren J : Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation., *J. Lipid Res.*, 39: 1594–1600. 1998
- 50) Bodin K, Andersson U, Rystedt E, Ellis E, Norlin M, Pikuleva I, Eggertsen G, Björkhem I, Diczfalussy U : Metabolism of 4 beta -hydroxycholesterol in humans., *J. Biol. Chem.*, 277: 31534–31540. 2002
- 51) Meaney S, Bodin K, Diczfalussy U, Björkhem I. : On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation: critical importance of the position of the oxygen function., *J. Lipid Res.*, 43: 2130–2135. 2002
- 52) Kontush A, Lindahl M, Lhomme M, Calabresi L, Chapman J, Davidson S : Structure of HDL: particle subclasses and molecular components. In High Density Lipoproteins: From Biological Understanding to Clinical Exploitation., *Springer, Heidelberg, Germany.*, 3–52. 2015
- 53) Cases S, Novak S, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Welch CB, Lusis AJ, Spencer TA, Krause BR, Erickson SK, Farese RV : ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization., *J. Biol. Chem.*, 273: 26755–26764. 1998
- 54) Fuda H, Javitt NB, Mitamura K, Ikegawa S, Strott CA : Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase., *J. Lipid Res.*, 48: 1343–1352. 2007
- 55) Holleboom AG, Daniil G, Fu X, Zhang R, Hovingh GK, Schimmel AW, Kastelein JJ, Stroes ES, Witztum JL, Hutten BA, Tsimikas S, Hazen SL, Chroni A, Kuivenhoven JA : Lipid oxidation in carriers of lecithin:cholesterol acyltransferase gene mutations., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 32: 3066–3075. 2012

- 56) Russell DW : Oxysterol biosynthetic enzymes., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1529: 126–135. 2000
- 57) Brown AJ, Jessup W : Oxysterols and atherosclerosis., *Atherosclerosis.*, 142: 1–28. 1999
- 58) Jimi S, Uesugi N, Saku K, Itabe H, Zhang B, Arakawa K, Takebayashi S : Possible induction of renal dysfunction in patients with lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency by oxidized phosphatidylcholine in glomeruli., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19: 794-801, 1999
- 59) Helmschrodt C, Becker S, Thiery J, Ceglarek U : Preanalytical standardization for reactive oxygen species derived oxysterol analysis in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 11;446:726-30. 2014