

氏 名	やまむろ だいすけ 山室 大介
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	乙第 826 号
学位授与年月日	令和 4 年 6 月 22 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 3 項該当
学 位 論 文 名	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 審 査 委 員	(委員長) 教授 原 一 雄 (委 員) 教授 岩 本 禎 彦 教授 遠 藤 仁 司

論文内容の要旨

1 研究目的

LCAT は、HDL に結合して存在し、血漿リポタンパク中に存在するコレステロールをエステル化する酵素として知られている。コレステロールの酸化代謝物であるオキシステロールは生体内では微量ながらも様々な生理活性が報告されており、LCAT によってエステル化されることが *in vitro* レベルで報告されているが、*in vivo* レベルでの報告はない。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、本研究ではオキシステロールのリポタンパクにおける存在比を明らかとした。また、健常人と LCAT 欠損患者のオキシステロール値を LCAT 欠損症の臨床所見と比較解析し、オキシステロールが *in vivo* レベルで LCAT によってエステル化されているか、さらには LCAT 欠損症の臨床症状の発症の一因になり得るかを検証した。また、*in vitro* 実験から、オキシステロールの LCAT 酵素に対する親和性を明らかとし、*in vivo* 結果との関連も検証した。

2 研究方法

<血漿オキシステロールの測定>

10 時間絶食した健常人 (n=206)および LCAT 欠損症患者(n=8)を採血し、血液を遠心分離した後、得られた血漿サンプルを-80℃で保存した。血漿中オキシステロールをピコリン酸誘導体化した後、LC-MS/MS でオキシステロール(total 値、free 値および ester 値)を測定した。

<血漿リポタンパクの分離およびオキシステロールの測定>

10 時間以上絶食した健常人(n=5)より血液を採取し、遠心分離して血漿を得た。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。リポタンパク分画中オキシステロールをピコリン酸誘導体化した後、LC-MS/MS

でオキシステロール(total 値、free 値および ester 値)を測定した。

<オキシステロール類の LCAT 活性の測定>

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) ($1.5 \mu\text{mol}$) と各オキシステロール ($0.25 \mu\text{mol}$) を CHCl_3 に溶解後、 N_2 ガス下 80°C で砲弾型試験管に薄い膜状に乾固させた。EtOH に再溶解し、27G 針を装着したツベルクリンシリンジに充填し、スターラーで高速攪拌しているリン酸バッファー中に急速注入した。室温で5分間攪拌後、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に 100mM sodium cholate を添加し、室温でゆっくりと攪拌し、 37°C で30分間インキュベーション後、Apo A1 を添加し、5回透析することでリポソームを調製した。調製したリポソーム (6.125 pmol , 12.5 pmol , 25 pmol , 50 pmol , 100 pmol , 200 pmol および 400 pmol)、 7mM EDTA、 40mM 2-mercaptoethanol、 100mg/mL BSA、リン酸バッファーおよび LCAT OE HEK293 細胞 lysate ($3 \mu\text{g}$) を添加し、 37°C で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 を加えた。インキュベーション後、hexane 抽出し、 N_2 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ピコリン酸誘導体化法にて処理後、LC-MS/M でオキシステロールを測定した。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、LCAT 活性値(pmol/mL/h)を算出した。

3 研究成果

<血漿オキシステロールの測定>

LCAT 欠損患者における $4\beta\text{HC}$ を除いたコレステロール、 $5,6\alpha\text{EC}$ 、 $5,6\beta\text{EC}$ 、CT、 $7\alpha\text{HC}$ 、 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。FLD 患者における 24SHC および 27HC の血漿 ester 値は、FED 患者よりも有意に低かった。また、健常人における CT、 $7\alpha\text{HC}$ 、 7KC 、 24SHC 、 25HC 、および 27HC の血漿 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 の血漿 ester 比の平均 0.70 と近似していた。一方、 $4\beta\text{HC}$ ($0.01\sim 0.91$)、 $5,6\alpha\text{EC}$ ($0.04\sim 0.88$) および $5,6\beta\text{EC}$ ($0.08\sim 0.82$) の血漿 ester 比は、より広範囲に分布していた。 $4\beta\text{HC}$ 、 $5,6\alpha\text{EC}$ および $5,6\beta\text{EC}$ 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。また、オキシステロールの ester 比と CE/TC 比の相関関係を調べた結果、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。

<血漿リポタンパクの分離およびオキシステロールの存在比の評価>

リポタンパクを含まない LPDS 分画においても $7\alpha\text{HC}$ 、 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 体の分布比はその $6\sim 8$ 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。ester 比は、各オキシステロールの LDL 分画と HDL 分画の間でほぼ同程度だった。

<オキシステロール類の LCAT 活性の測定>

7 α HC、7KC、24SHC、25HC および 27HC リポソームの Michaelis-Menten 式 Km 値は 24SHC<27HC<7KC<<25HC<7 α HC だった。また、4 β HC のリポソームは Michaelis-Menten 式にあてはまらず、4 β HC ester 値は検出感度限界に近い値だった。

4 考察

LCAT 欠損患者では、4 β HC を除いたオキシステロールの ester 値が健常人よりも有意に低かった。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証明できたことを示唆する。また、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、4 β HC、5,6 α EC、および 5,6 β EC 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。これらの結果から、4 β HC が 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。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。CT、5,6 α EC、5,6 β EC 7 α HC、7KC、および 25HC ester の血漿 ester 値は、健常人よりも FLD と FED の両方で常に低かったため、これら血漿 ester 値の低下が、角膜混濁の決定要因である可能性が考えられた。さらに、24SHC および 27HC の血漿 ester 値は、FED よりも FLD の方が低く、CE/TC とも有意な正の相関を示したことから、24SHC および 27HC の血漿 ester 値の低下が腎機能障害の決定要因である可能性が考えられた。

血漿リポタンパクにおけるオキシステロールの分布結果では、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。これらの結果は、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示唆された。

7 α HC、7KC、24SHC、25HC および 27H の Michaelis - Menten 式 Km 値は 24SHC<27HC<7KC<<25HC<7 α HC であり、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とも一致しており、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。この結果は、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 LCAT 欠損症の血漿 4 β HC ester 値の結果とも一致する。4 β HC の LCAT によるエステル化は、本研究の *in vitro* 実験でも確認できなかった。以上の結果から、4 β HC の LCAT 親和性は極めて低いと考えられる。この原因として、4 β -位が 3 β -位に非常に近いため、4 β -位の水酸基が立体障害を介して LCAT の基質結合部位への 4 β HC の結合を妨げている可能性が考えられた。

5 結果

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、 $5,6\alpha$ EC、 $5,6\beta$ EC 7α 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。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。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、 4β HC の LCAT 親和性は極めて低く、 4β 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。

論文審査の結果の要旨

- 本学位論文は、家族性 LCAT 欠損症の多数のアッセイと実験による豊富なデータに基づき、生体内でのコレステロール代謝における LCAT の機能と LCAT 欠損症の病態モデルを提唱している。peer review のある専門誌にもアクセプトされていることから学位論文として適格であると判断した。
- 但し、以下の様に誤字脱字や表現が分かりにくい点もあり、以下の指摘について可能な限り修正が望まれる。
- 本領域に特に詳しくなくとも理解できるように、最初に Research question と Clinical question を明確に記載した方が良いと思われる。更に研究プロジェクト全体の目標や将来の展望などがあると、なお良いと思われる。
- それぞれの図に Figure legend をつけてください。特に図 3-3～3-8 の open square と closed square, open circle が何を意味しているのか分かりません。
- p.10, line16: 「in-vitro レベル」 → 「in vitro レベル」(ハイフンとる)
- p.12, line 3 以降複数箇所において: ml, μl , など → mL, μL など、L に統一
- p13, line 3: 「LCAT Tg HEK293 細胞」 → 「LCAT OE HEK293 細胞」など、細胞には Tg (transgenic) は一般に用いず、過剰発現として OE (over expression) を用いることが多い。
- p.14, lane 5 以降複数箇所において: 方法や図表を引用する際に、例えば「方法 3-8.」の場合のピリオドは必要ないと思われる。
- p.14 下から 4 行目: 「Softwa re」の間を詰める。
- p.16 の図 3-1 の図の上にあるタイトル: 患者の場合は LCAT KO ではなく LCAT deficiency が適切です。
- p.24, lane 2: 「ester 比 (ester/total 比) の幅は健常人と同等だった」とあるが、明らかに違うと思うのですが、意図がわかりません。
- p.25, lane 2-3: (図 3-7.) と引用されているが、(表 3-4) と思われる。図からは 0.2 未満な

どの数値が読み取れないため。

- p.26, lane 7: 「検出できませんでした」ここだけですます調です。
- p.10, lane 5-6 に、「非常に弱い LCAT 親和性または LCAT 親和性がないこと」とあるが、文の意味から「非常に弱い LCAT 親和性があるか、または LCAT 親和性がないこと」が適切と思われる。
- p.34, 下から 9 行目: 「エステル化されていると仮定する」は、「エステル化されていると推定される」などの文言が適切ではないでしょうか。
- 図 3-1 で健常者でも LCAT 活性が非常に低い人がいる理由として血清の保存状態により失活した可能性がある」と説明されていましたが、そのことも本文に記載してください。
- P25:46HC が 5,6aEC, 7aHC, 7KC, 27HC と同じ第 2 グループではなく第 3 グループになる理由として、□と■のばらつきに差がないからだ」と説明されていたように思いますが、本文にも分かりやすく記載してください。
- オキシステロールの測定値の差が認められる分子から、FLD と FED における障害の決定要因としたい気持ちはわかりますが、考察 36 ページの表現はやや断定的すぎ、補強するエビデンスもないのかなと思います。表現を弱めた方が良いのではないかと思います。
- P14 第 9 節 1 行目 方法 3-8 → 方法 2-8 4 行目 方法 3-7 → 方法 2-7
- 9 行目 方法 3-4 → 方法 2-4 10 行目 方法 3-5 → 方法 2-5
- P15 第 1 節 3-1-1. 2 行目 22.7 kg/m2 → 22.7 kg/m2
- 表 3-2. Reference の番号が J Lipid Res の Table 3 の文献番号のままになっていますので、本学位論文に合わせて文献番号を変更してください。
- P27 3 行目 LPDS を略語一覧に入れてください。
- P31 3-4-1. 2 行目の右端 「をお」 → 「を」
- 最下行 「27H」 → 「27HC」
- P38 下から 6 行目 「オキシステロールル」 → 「オキシステロール」
- P43 Ref. #39 と #40 途中に不要なスペースあり。

試問の結果の要旨

- 試問は家族性 LCAT 欠損症の多数のアッセイと実験データを提示しながら、生体内でのコレステロール代謝における LCAT の機能と LCAT 欠損症の病態モデルについてプレゼンされた。
- 審査委員との質疑応答は以下の通りである。
- 家族性 LCAT 欠損症 (FLD) では、腎機能障害があるが、その原因は 24SHC および 27HC のエステル化が障害されているからではないかとの仮説が示されている。LCAT 欠損マウスなどのモデルマウスがあれば、これを証明できると思うが如何か。
- (回答) LCAT KO マウスは存在するが、腎機能障害は来した報告がない。オキシコレステロールの分布はヒトと異なっており、症状が再現できないのは種差のためと思われる。
- 学位論文の図 3-1 で、正常人の血漿 LCAT 活性にかなりバラツキがあるのはなぜか。LCAT 欠損症の患者と区別する際のカットオフ値はどの程度か。

- (回答) 血漿は凍結すると LCAT 活性が失活して低下する。そのため活性にバラツキがあると思われる。
- LCAT 活性に α 活性と β 活性があるとしているが、in vitro アッセイ系でこれを区別できるか。すなわち、FLD と FED を in vitro アッセイ系で区別できるか。
- (回答) できない。 α 活性と β 活性が酵素のどこに依存しているか不明である。
- アッセイ系で合成リポソームに基質としてオキシコレステロールを取り込ませ、活性を測定しているが、オキシコレステロール類はどの程度リポソームに取り込まれているのか。アッセイ系として正しいか。
- (回答) どれほどリポソームに取り込まれているか分からないが、少なくとも取り込まれた基質に対しての活性は、測定されていると考える。
-
- 審査委員の質問に対して適切な応答をしていると思われ、合格に相当すると判断される。