

血漿リポ蛋白の物理的および化学的特性に関する研究

お茶の水女子大学大学院

人間文化創成科学研究科

貴堂としみ

動脈硬化の発症進展には酸化 low density lipoprotein (LDL) が直接的間接的に深く関与しており、また high density lipoprotein (HDL) は、その防御において極めて重要な役割を担っている。LDL、HDL の動脈硬化に対する生理的作用については、多面的に非常に多くの研究が行われてきたが、物理的、化学的性質と生理的機能との関連性については、未だ議論の余地が残されている。酸化変性により LDL の比重やサイズや形状がどの程度変化すれば LDL レセプターへの親和性を失い、Scavenger レセプターを介したマクロファージへの無制限な取込みが始まるのかは未だ解明されていない。HDL については多くの疫学調査や *in vitro* の実験結果から抗動脈硬化性が示されてきたが、HDL-コレステロールを上昇させることで、動脈硬化性疾患を防御する試みは、未だ成功してはいない。この事実は、より強い抗動脈硬化性亜分画を選択的に上昇させることや臨床データの解析による実験結果の検証の必要性を示唆しているものと考えられる。

本研究では 1) LDL の浮上比重と粒子サイズの変化に着目しつつ、酸化過程における LDL の物理的および化学的特性の経時的変化に関し体系的かつ詳細な解析を行うこと、2) HDL の生理的機能を規定する因子として構成アポリポ蛋白に着目し、apolipoprotein A-I (apoA-I) を含むが apolipoprotein A-II (apoA-II) を含まない HDL 粒子 Lipoprotein AI (LpAI) とそれら両方のアポリポ蛋白を含む HDL 粒子 Lipoprotein AI:II (LpAI:II) に関し、アポリポ蛋白構成比率及びコレステロール逆転送系における生理的意義の相違について検討し、LpAI のより高い抗動脈硬化性を検証することを目的として、以下 2 つの検討を行った。

まず、酸化変性過程における LDL の物理的および化学的特性の経時的変化に関する検討を以下の方法により実施した。

ヒト空腹時血漿から分取した LDL (100 $\mu\text{g protein/ml}$) に対し HUVECs を介した酸化 (Ham's F10 培地中 37°C、20 時間処理) あるいは、銅イオンを用い (LDL 200 $\mu\text{g protein/ml}$, CuSO_4 2.5 μM in PBS 37°C) 経時的な酸化を行った。酸化後、各サンプルの脂質、蛋白量の測定、電気泳動法および超遠心法による解析を行った。更に、銅酸化サンプルのより詳細な組成解析と透過型電子顕微鏡による画像解析を行った。

その結果、いずれの酸化法においても、陰性荷電の増加、apolipoprotein B (apoB) の劣化、サイズの減少、比重の上昇が認められた。銅酸化では酸化 2 時間で $d > 1.044$ 分画は全体の $63.8 \pm 8.1\%$ を占め、酸化 10 時間ですべての LDL は、 $d > 1.044$ 分画へ移行した。総蛋白量、総コレステロール量に有意な変動は認められず、酸化 20 時間でトリグリセリドの約 24% の減少およびリゾホスファチジルコリンの著しい増加が認められ、コリン骨格を有するリン脂質の約 44% をリゾホスファチジルコリンが占めた。

また、銅酸化 LDL の平均直径は変形粒子の増加を伴いつつ変化し、銅酸化 5 時間で 28.1 nm から 25.6 nm に減少したが、銅酸化 20 時間では 27.2 nm となり、サイズ形状共に回復傾向にあった。酸化に伴う比重の増加、サイズ形状の変化の原因として脂質アシル基の消失とリゾリン脂質の増加、加えて後者では粒子の融合が考えられた。

次に HDL の亜分画 LpAI、LpAI:AI^{II} についてアポ蛋白構成比率および生理的意義の相違に関する検討を以下の方法により実施した。

1994 年～1995 年に実施された 314 名の CETP 遺伝子多型 (1452G→A 及び D442G 変異)、脂質及びアポ蛋白の測定データについて新たに解析を試み、LpAI、LpAI:AI^{II} 中のアポ蛋白構成比率、コレステロールの逆転送と apoB 含有リポ蛋白の代謝における生理的意義の相違に関し検証を行った。

その結果以下のことが明らかとなった。1) 性別や CETP 遺伝子変異の有無に関わらず、HDL-コレステロール濃度の増加は主に LpAI 濃度の増加に依存することが示唆された。2) 性別、CETP 遺伝子変異の有無、HDL-コレステロール濃度に関わらず、ヒト血漿中の LpAI:AI^{II} の apoA-I 濃度は一定量以上の値を示し、LpAI:AI^{II} の apoA-I と apoA^{II} のモル比は 2:1 であった。3) LpAI 中の apoA-I はすべての apoB 含有リポ蛋白の指標と負の相関を示すが、LpAI:AI^{II} 中の apoA-I はすべての apoB 含有リポ蛋白の指標と僅かながら正の相関を示した。4) HDL パラメーターと apoB の相関においては、apoA-I を除き、性差は認められなかったが、CETP 遺伝子変異群において僅かながら相関の有意性の低下が認められた。

これらの結果は、これら二つの亜分画がコレステロール逆転送に関し本質的に機能が異なり、LpAI がより抗動脈硬化性であることを示唆するものである。

本研究で得られた知見は動脈硬化の発症進展におけるリポ蛋白の生理的役割を理解する上で、またリポ蛋白の新規測定法の開発や動脈硬化予防の新しい戦略の構築に対し、貴重な情報を提供するものと期待される。