

学位論文題名

肝疾患における異常酸化リポ蛋白に関する研究

学位論文内容の要旨

[要 旨]

【緒言】 Triglyceride-rich low-density lipoprotein (TG-rich LDL) は肝不全患者血清中に特徴的に出現するリポタンパク質であり、LDL としては高い TG 含量を持ち、酸化リポタンパク質としての性質も持っている。しかし、その合成、分泌、代謝、測定方法については不明の点が多い。本研究では、TG-rich LDL に対する測定系を開発することを目的として、モノクローナル抗体の作製およびそれを用いる酵素免疫学的測定法 (ELISA) を構築した。さらにその ELISA を健常者や肝疾患患者、高 TG 血症患者、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 患者などの臨床検体に応用し、酸化ストレス応答の観点からの病態解析や診断学的意義の検討に用いた。

【対象と方法】 超遠心とゲルろ過で分離された TG-rich LDL を免疫原として、定法に従いモノクローナル抗体を作製した。抗体のスクリーニングでは、酸化 LDL と強く反応し、正常 LDL には反応が小さい抗体を選択し、そのモノクローナル抗体を G11-6 と名付けた。G11-6 の抗体タイピングと超可変領域のアミノ酸配列を定法に従い解析した。また、G11-6 を固相抗体として用い、検出抗体にはビオチン標識ヤギ抗ヒトアポ B 抗体を用いるサンドイッチ ELISA (G11-6 ELISA) を作製した。G11-6 ELISA の反応性とリポタンパク質酸化との関係を明らかにするために、以下の検討を行った。まず、銅酸化により酸化 LDL を作製し、G11-6 ELISA との反応性を経時的に観察した。同時に、従来の酸化リポタンパク質測定法である malondialdehyde (MDA)-LDL ELISA と oxPC-LDL ELISA、チオバルビツール酸反応産物 (TBARS)、共役二重結合などの反応を経時的に観察し、G11-6 ELISA と比較した。また、MDA 修飾 LDL を作製し、G11-6 ELISA との反応性を検討した。次いで、G11-6 のリポタンパク質反応特異性をリポタンパク質粒子径の観点から明らかにするために、ゲルろ過カラムを用いる高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により健常者 (n=12)、高 TG 血症患者 (n=9)、NASH (n=11) および重度肝疾患 (n=3) の血清を分画し、各画分について G11-6 ELISA および MDA-LDL ELISA で測定した。最後に、G11-6 ELISA の臨床的意義を明らかにするために、健常者 (n=24)、高 TG 血症患者 (n=17) および種々の肝疾患の血清を G11-6 ELISA で測定した。種々の肝疾患は、アガロースゲル電気泳動により、HDL が消失した重度群 (n=5)、それ以外を軽中度群 (n=45) として分類した。

【結果】 G11-6 のサブタイプは IgM, κ であった。G11-6-VH および VL のアミノ酸配列と 100% 一致する既知の抗体は BLAST 検索で検出されなかった。G11-6 ELISA の銅酸化 LDL との反応性は、銅酸化開始から急激に直線的に増加して 3 時間でピークに達し、その後、8 時間でベースラインの値に減少した。TBARS は急激に増加して 3 時間後に最大になったが、8 時間でもまだ高値であった。MDA-LDL や共役二重結合では酸化開始後 1 時間まで、反応が緩やかにしか進行しないラグタイムが

あり、oxPC-LDL では 2 時間までラグタイムがあった。MDA-LDL は 3 時間で最大に達して 4 時間後から減少したが、8 時間でもまだ高値を保っていた。また、共役二重結合 と oxPC-LDL は増加後の減少は認めなかった。アポ B ELISA は 8 時間の間で値は一定であったことから、これらの反応はアポ B の酸化による反応性の低下ではなかった。また、G11-6 ELISA は MDA 修飾 LDL とは反応しなかった。さらに、ゲルろ過 HPLC による検討では、G11-6 反応性リポタンパク質は重度肝疾患患者では TG-rich LDL の溶出位置と同じ Fraction 13-14 に溶出し、健常者では正常 LDL の溶出位置よりも遅かった。また、高 TG 血症患者では正常 LDL の溶出位置よりも速く、NASH 患者では正常 LDL の溶出位置と同じ位置であった。Fraction 11-12, Fraction 13-14, Fraction 15-16 をそれぞれ Fraction I, Fraction II, Fraction III と名付けたが、それぞれ large TG-rich lipoproteins, large buoyant LDL, small dense LDL (sd LDL) と一致する。健常者の G11-6 反応性リポタンパク質の溶出パターンと比較して、高 TG 血症、重度肝疾患および NASH 患者のパターン全てで交互作用に有意な差が認められたことから ($P < 0.0001$, Split plot ANOVA), G11-6 反応性リポタンパク質の溶出パターンが各疾患群と健常者と異なることが示された。また、健常者、高 TG 血症患者、軽中度肝疾患および重度肝疾患患者で、G11-6 反応性リポタンパク質の血清レベルは、肝疾患の重症度に応じて高値を示し、健常者と重度肝疾患、高 TG 血症と重度肝疾患、軽中度肝疾患と重度肝疾患において有意差が認められた ($P < 0.01$)。

【考察】 酸化 LDL に対するモノクローナル抗体の抗原として、ヒトの動脈硬化巣のホモジナイズや試験管内の MDA 付加反応、金属酸化によって得られた LDL が用いられてきた。本研究では、重度肝疾患患者の血清中に存在する TG-rich LDL を免疫原として使用した。我々の知る限り、G11-6 は循環血漿中に存在する酸化 LDL を抗原として得られた唯一のモノクローナル抗体である。LDL の金属酸化の実験から、G11-6 が酸化の早期段階を特異的に検出する性質をもち、穏やかに酸化された LDL (Mildly oxidized LDL) を検出するユニークな抗体であることが予測された。Mildly oxidized LDL は、中等度に酸化された LDL よりも、細胞毒性や炎症促進性の作用をもつと報告されている。よって、G11-6 と反応する穏やかに酸化された LDL は、MDA-LDL ELISA や oxPC-LDL ELISA が認識する、より高度に酸化された LDL よりも臨床的意義が大きい可能性が示唆された。さらに、ゲルろ過 HPLC の実験では、健常者では G11-6 が小型の LDL に結合した。Sd LDL は大型で比重の小さな LDL よりも酸化されやすいことやマクロファージの泡沫化を促進することが報告されている。従って、G11-6 が動脈硬化惹起性リポタンパク質の一つである sd LDL に反応したことは合理的である。一方、高 TG 血症患者で検出された G11-6 反応性の大型リポタンパク質は酸化レムナントであると推測した。レムナントリポタンパク質も、sd LDL と同様に酸化を受けやすいことやマクロファージを泡沫化する性質が報告されている。従来の酸化 LDL 測定法では酸化レムナントは検出されなかったことから、G11-6 ELISA は、未だ不明の点が多い酸化レムナントの役割を解明する上で有用なツールである可能性が示された。さらに、本研究では、肝疾患では重症化に従い G11-6 反応性の早期酸化リポタンパク質が増加することが明らかとなった。NASH 患者でも、また、G11-6 が単純性脂肪肝との鑑別に有力なツールとなり得ることが推測された。近年の報告では、C 型肝炎や NASH などの慢性肝炎をもつ患者に対しても抗酸化療法が行われ、それにより肝機能の改善が観察されている。G11-6 は肝における酸化や炎症の評価、治療のモニタリングのためのツールとして有用性が期待される。

【結論】 ヒト血液中に存在する TG-rich LDL を認識するモノクローナル抗体 G11-6 を得て、穏やかに酸化されたりポタンパク質を簡便に測定する ELISA を構築することができた。G11-6 ELISA は、健常者の sd LDL や高 TG 血症患者の酸化レムナントの検出、さらには、肝疾患患者の重症度評価や、NASH 患者の異常リポタンパク質の検出に貢献できる可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 齋 藤 健
副 査 教 授 千 葉 仁 志
副 査 教 授 森 山 隆 則

学 位 論 文 題 名

肝疾患における異常酸化リポ蛋白に関する研究

Triglyceride-rich low-density lipoprotein (TG-rich LDL) は重篤な肝疾患患者の血清中に出現するリポタンパク質であり、それは酸化リポタンパク質としての性質も持っている。しかし、その合成、分泌、代謝については不明の点が多く、これは TG-rich LDL の測定法が無いという事も一つの要因である。この TG-rich LDL 自身は酸化されている事が証明されており、TG-rich LDL が酸化ストレス代謝を解明する上で重要なマーカーになり得ると考えられる。また、著者は、脂肪肝に更に酸化ストレスなどの要因が加わって発症すると言われている非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) に注目し、単純性脂肪肝と NASH の鑑別の可能性を検討する事も視野に入れて研究を実施した。本論文では、TG-rich LDL に対する測定系を開発することを目的として、モノクローナル抗体 (G11-6 と呼ぶ) の作製およびそれを用いる酵素免疫学的測定法 (ELISA) (G11-6 ELISA と呼ぶ) を構築し、様々な臨床検体に応用した。著者は、未酸化 LDL、軽度に酸化した LDL および中等度に酸化した LDL を調製し、それらを G11-6 ELISA により測定した結果、G11-6 ELISA が穏やかに酸化された LDL のみを検出することを見出した。一方、他の既存の酸化ストレスマーカーはいずれも軽度および中等度に酸化した LDL に反応を示し、G11-6 ELISA がユニークな抗体である事を示した。臨床検体の測定において、希釈血清を G11-6 ELISA にて測定した結果、重度の肝疾患では高値を示し、高 TG 血症患者や健常者では低値であった。この結果から、G11-6 ELISA で検出されるリポタンパク質が、単に脂質異常で上昇するものではなく、肝疾患が関与して上昇するものであると考えられた。また、ゲルろ過によりリポタンパク質を分画し、LDL の粒子サイズ別にみた G11-6 ELISA の反応性を確認したところ、健常者では小型の LDL の位置に、高 TG 血症患者では大型の LDL の位置に、それぞれ反応性のピークが観察された。著者はその反応したリポタンパク質が、それぞれ LDL の亜分画である sd LDL、レムナントリポタンパク質、と文献的な考察から推測した。また、重度肝疾患患者および NASH 患者では LDL と同じ位置にピークを持った。それらの分布パターンが統計学的に有意差 ($P < 0.05$) を持って健常者と異なる事も実証された。少数例の検討であったが、単純性脂肪肝の分布パターンは高 TG 血症患者のそれと同じであり、NASH と単純性脂肪肝の鑑別に有用である可能性が示された。以上の成果で国内特許及び国際特許を取得した。

口頭試問では、主査である齋藤からの電気泳動で得られたデータに関する質問に的確に答えた。また、発表用スライドの表現方法、記述方法に関する指摘内容は公開発表時には改善されていた。副査の森山教授からの酸化ストレスマーカーの原理の説明に関する指摘に対して、公開発表時には的確に改善されていた。また副査の千葉教授からの新知見が伝わりやすい発表方法への改善についての指摘にも的確に対応した。

総括すると、本研究では、TG-rich LDL を認識するモノクローナル抗体、G11-6、を得て、穏やかに酸化されたりポタンパク質を簡便に測定する新規の ELISA を構築した。また、G11-6 ELISA

は、粒子サイズ別にみた酸化リポタンパク質の解析のツールとして有用性があると思われる。
よって著者は、北海道大学博士(保健科学)の学位を授与される資格あるものと認める。