



Title	脳梗塞発症リスク評価に有用な変性LDL測定法の開発
Author(s)	岩元, 真
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59428
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	岩 元 真
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学 位 記 番 号	第 25169 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	脳梗塞発症リスク評価に有用な変性 LDL 測定法の開発
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 沢村 達也 (副査) 教授 土井 健史 教授 藤尾 慶 教授 橋本 均

論文内容の要旨

脳卒中は日本人の死因の第3位であり、寝たきりの原因となる疾患の第1位でもある。脳卒中には脳出血と脳梗塞があり、その7割が脳梗塞である。脳梗塞は発症後の治療法が限られていることや、後遺症の原因となりやすいことからも、発症予知や早期診断が重要である。しかし、同症の発症予知・生化学的診断マーカーは現在のところ確立されていない。悪玉コレステロールであるLDLが酸化修飾された酸化LDLは、脳梗塞や心筋梗塞等の主要な発症原因である動脈硬化症の原因因子と考えられている。酸化LDLの受容体として、レクチン様酸化LDL受容体 (LOX-1) が我々の研究室で同定された。LOX-1は酸化LDLと協調して内皮機能障害を惹起するとともに、動脈硬化性疾患の発症と進展過程の様々な局面においても憎悪因子として機能することが示されている。また、酸化LDLを含む変性LDLであるapoB含有LOX-1リガンド (LAB) は動脈硬化症の病態を反映することが動物レベルで明らかになってきた。さらに、細胞外ドメインが血中に放出された可溶型LOX-1 (sLOX-1) は、急性冠症候群や糖尿病等の患者で高値であることも報告されている。

以上のことから、LABおよびsLOX-1は、脳梗塞をはじめとする動脈硬化性疾患の発症リスク評価や診断マーカーとして利用できる可能性がある。しかし現在まで、ヒトでのLABの病態生理学的意義はまだ検証されていない。また、LABおよびsLOX-1の血中濃度を同時に測定し、病態との関係を解析した報告もない。そこで本研究では、LABおよびsLOX-1の血中濃度と、動脈硬化性疾患の発症との関連を検討した。

まず、LAB測定法の改良を行った。LAB測定の標準品として使用される酸化LDLは、ヒトの血漿から回収したLDLを硫酸銅により人工的に酸化修飾したものである。この酸化LDLは長期間保存ができる、ロット間でLOX-1への結合能が異なるという問題を抱えている。これらはLDL中の脂質成分が原因であると考え、酸化LDLに代わる脂質成分を含まないLAB標準品の作製を試みた。LAB測定法はLOX-1の変性LDL結合能を利用した方法であり、固相化されたLOX-1蛋白質に結合したLABを抗apoB抗体で検出すサンディッシュELISAである。したがって、標準蛋白質はLOX-1と抗apoB抗体に同時に認識されるという条件を満たす必要がある。そこで、LOX-1結合蛋白質として抗LOX-1抗体断片と、抗apoB抗体結合蛋白質としてapoBペプチドを作製し、次に両者を融合させた組換え蛋白質の作製を試みた。まず、LOX-1結合蛋白質として抗LOX-1抗体の抗原結合領域からなる一本鎖型抗体 (Fv型抗体) を作製した。LOX-1への反応性をELISAで検討した結果、Fv型抗体はLOX-1と結合することを認めた。次に、抗apoB抗体結合蛋白質としてapoB蛋白質の部分ペプチドを4種類 (B1-B4) 作製した。抗apoB抗体への反応性をELISAで検討した結果、B1が抗apoB抗体と結合することが分かった。最後に、Fv型抗体とapoBペプチドB1の融合蛋白質を作製し、LOX-1および抗apoB抗体に同時に結合できるかをELISAで検討した。その結果、LOX-1に結合した融合蛋白質が抗apoB抗体で濃度依存的に検出された。さらに、融合蛋白質のロット間の反応性の差は、従来の酸化LDLと比較して1/10以下であった。以上のこ

とから、作製した融合蛋白質は酸化LDLより優れた標準品として利用可能であることが分かった。本研究で作製した標準蛋白質を用いることでLABの測定値が安定し、測定機関や場所による制限がなくなり、バイオマーカーとしてのLABの有用性をより詳しく追及できるようになると考えられる。

次に、sLOX-1測定法の作成を試みた。まず、ニワトリを免疫動物に用いてsLOX-1検出抗体の作製を行った。その結果、LOX-1のリガンド結合領域であるC型レクチンドメインを認識する抗体を49クローニ、ネックドメインを認識する抗体を4クローン得た。ネックドメインを認識するニワトリ抗体と、研究室で樹立されていたC型レクチンドメインを認識するヒト抗体を用いたサンドイッチELISAの結果、ヒトLOX-1蛋白質が濃度依存的に検出された。

最後に、LABとsLOX-1の測定がヒトの動脈硬化性疾患の発症リスク評価に有用であるかを、吹田研究を利用して検証した。吹田研究は都市部住民を対象とした心血管病の発症と生命予後を調査しているコホート研究である。本研究では、1994年に吹田住民健診を受診した2295人の血清からLABとsLOX-1の血中濃度を測定し、心血管病の発症をエンドポイントとした平均11年間の追跡調査を行った(前向き研究)。この期間中に、冠動脈疾患68人、脳卒中91人(うち脳梗塞60人)の発症が確認された。LABとsLOX-1の測定値ごとに四分位に分け、第1四分位と比較した各四分位の相対危険度を比例ハザードモデルにより算出した。LABの血中濃度が最も高い第4四分位の相対危険度は、脳梗塞3.11倍、脳卒中2.09倍と有意に高かった。次に、sLOX-1ではいずれの疾患においても有意な変化はなかった。また、LOX-1とリガンドの相互作用を反映する指標として、sLOX-1とLABの測定値の積をLOX indexと定義した。LOX indexを指標に評価すると、脳梗塞の相対危険度は第2から第4四分位のいずれにおいても3倍以上と有意に高かった(3.39, 3.15, 3.23)。加えて、LOX indexの第4四分位では、冠動脈疾患においても2.09倍と有意な相対危険度の上昇が認められた。以上の結果から、LABおよびLOX index高値は動脈硬化性疾患、特に脳梗塞の発症リスクであることが明らかになった。

これまで健常人における酸化LDLと疾患の関係を検討したコホート研究は酸化LDL高値でメタボリックシンドローム発症リスクが2倍以上高くなるという米国の報告のみであった。本研究では、世界に先駆けて、酸化LDL関連の指標による動脈硬化性疾患の発症リスク評価を行い、健常人でのLABおよびLOX indexが動脈硬化性疾患、特に脳梗塞のリスク評価に有用であることを証明した。今後、脳梗塞の発症リスクが高い40歳以上の健常人の健康診断にLOX indexが活用され、早期の生活指導や治療の実現を通じて心血管病の予防に繋がることが期待される。

論文審査の結果の要旨

脳卒中は日本人の死因の第3位であり、寝たきりの原因となる疾患の第1位でもある。そして、発症後の治療法が限られ、後遺症の原因となって、長期療養へと結びつきやすいことからも、発症予知や早期診断が重要である。申請者は本博士論文「脳梗塞発症リスク評価に有用な変性LDL測定法の開発」で、脳卒中、特にそのうちの脳梗塞の発症リスク評価に資する方法論の開発を行い、実際にそれが有用であることを疫学研究により明らかにした。

まず申請者は、動脈硬化の病態に深く関与していると考えられている酸化LDLの定量法の改良を行った。これまで酸化LDLの定量が臨床上重要と考えられながらも、普及しなかったのには、①抗酸化LDL抗体による測定では、抗体によりそれぞれ異なる酸化LDL上の特定のエピトープを測定することになるという問題点、②定量のための標準品になる酸化LDLが長期保存に向かず、調整するごとに性質が異なるという問題点があったことが影響していると考えられる。これらの問題を申請者は、酸化LDL受容体であるLOX-1への結合活性をLOX-1 ligand containing apoB (LAB)として測定すること、および、化学的に不安定な脂質を含まず、LOX-1と抗apoB抗体に同時に結合しうる疑似リガンドを開発することにより解決した。

さらに、ニワトリを免疫動物として、新しい抗LOX-1モノクローナル抗体を取得した上で、可溶型LOX-1(sLOX-1)のサンドイッチELISA系を作製した。これらLABおよびsLOX-1の測定系を用いて、健常者約2300名、平均11年のコホート研究を行い、LAB高値が心血管病、特に脳梗塞の発症リスクを増大させること、sLOX-1とLABの測定値の積、LOX indexの高値は、脳梗塞発症リスクを3倍以上増大させるとともに、冠動脈疾患の発症リスクも2倍以上増大させることを明らかにしている。

以上の成果は、臨床応用可能な基盤技術として今後広く用いられる可能性が期待できる重要なものである。また既に研究内容は、主著として2報、共著として1報の論文にまとめられ、英文学術雑誌に発表されている。

これらの点に鑑み、本論文の内容は博士(薬学)の学位を授与するに相応しいと考えられる。