



Impaired Cholesterol Uptake Capacity in Patients with Hypertriglyceridemia and Diabetes Mellitus

瀬戸，悠太郎

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8969号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492478>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Impaired Cholesterol Uptake Capacity in Patients with
Hypertriglyceridemia and Diabetes Mellitus

高中性脂肪血症および糖尿病患者における

コレステロール取り込み能の低下

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

循環器内科学分野

(指導教員：平田健一教授)

瀬戸 悠太郎

背景)

高比重リポタンパクコレステロール (HDL-C) が低値であると動脈硬化性心血管疾患 (ASCVD) のリスクが上昇することはよく知られている。しかし一方で HDL-C 値が極端に高い場合、むしろ ASCVD リスクが上昇するということがいくつかの研究で報告されている。そこで近年では HDL の量的評価ではなく、質的評価に注目が集まるようになってきている。いくつかの大規模コホート研究により、コレステロール逆転送系の初期段階を生体外で再現した指標である HDL のコレステロール引き抜き能 (Cholesterol efflux capacity: CEC) が ASCVD の有病率および発症率の両方に関連し、HDL-C 値よりも優れた予測因子であることが示されている。しかし CEC の測定には細胞やアイソトープが必要であり、またその手技が煩雑で時間がかかることから臨床への応用は困難であった。そこで我々は HDL の機能の新たな概念として提唱したコレステロール取り込み能 (Cholesterol uptake capacity: CUC) を評価する無細胞アッセイ系を確立した。我々は本指標が冠動脈疾患の二次予防におけるリスク層別化に有用であることを報告してきたが、一方障害された CUC に対する治療法はまだ確立されていない。そこで動脈硬化に対する予防戦略を探る為、CUC の悪化に関連する病態を明らかにする目的で今回の研究を行なった。これまでにメタボリックシンドロームや糖尿病は、中性脂肪値の上昇と HDL-C 値の低下からなる脂質異常症を特徴とすることも知られている。さらに、インスリン抵抗性の上昇をその病態基礎とするメタボリックシンドロームや糖尿病の患者では、HDL 機能の中でも抗炎症、抗酸化作用やコレステロール引き抜き能が低下していることが報告されている。そこでメタボリックシンドロームの主な合併症である高中性脂肪血症 (高 TG 血症) と糖尿病における CUC の関連を評価することとした。

目的)

CUC と高 TG 血症または糖尿病との関係性を評価するとともに、その機序を明らかにする。

方法)

2015 年 6 月から 2019 年 2 月の間に神戸大学医学部附属病院で経皮的冠動脈形成術 (Percutaneous coronary intervention: PCI) もしくは冠動脈造影検査 (Coronary Angiography: CAG) を施行した患者から採血し、血清を凍結保存した。登録患者を高 TG 血症と糖尿病の有無により 2 群に分け、初回採血時の血清 CUC 値を 2 群間で比較した。なお高 TG 血症は初回採血時の TG 値が 150mg/dL を超えるか、TG 低下薬を内服している患者、糖尿病は HbA1c>6.5%、

または糖尿病治療薬を使用している患者と定義した。

結果)

305 例の連続した患者のうち、CUC が測定可能でかつ、高 TG 血症または糖尿病の罹患状況が分かっている 285 例が登録された。登録された患者のうち、94 例は高 TG 血症であり、126 例は糖尿病であった。また高 TG 血症と糖尿病の両方に罹患している患者は 45 例であり、110 例はどちらにも罹患していなかった。患者背景の特徴として、高 TG 血症の患者はそうでない患者と比較して肥満度 (Body mass index: BMI)、総コレステロール値、LDL-C 値、スタチン処方率が高く、一方 HDL-C 値は低かった。さらにインスリン抵抗性の指標である HOMA-IR は高 TG 血症の患者で高かったものの、糖尿病の罹患率に関しては高 TG 血症の患者とそうでない患者との間に有意差は認めなかった。糖尿病患者では、総コレステロール値と HDL-C 値が健常群と比較して低かったが、LDL-C 値や TG 値には糖尿病の有無による有意差は認めなかった。また、当然ながら HbA1c と HOMA-IR は糖尿病に罹患している患者群で有意に高かった。

CUC 値との関連について解析したところ、高 TG 血症患者群ではそうでない群と比較して血清 CUC 値が有意に低く、更に糖尿病患者群の CUC 値も非糖尿病患者群と比較して有意に低かった。続いて従来の ASCVD リスクを用いた多変量解析の結果、CUC 値の低下は高 TG 血症および糖尿病と関連していることが明らかになった。さらに HDL 粒子径の代用指標として HDL-C/ApoA1 比を算出したところ、CUC 値は HDL-C/ApoA1 比と有意な正の相関を示したが、一方 TG 値は HDL-C/ApoA1 比と逆相関を示したことから、TG 値上昇に伴う HDL 粒子径の減少が CUC 値の低下に関与していることが示唆された。

続いて高 TG 血症患者の CUC 値を糖尿病の有無で比較したところ糖尿病の合併は CUC 値低下と関連していたものの、TG 値および HDL-C/ApoA1 比には糖尿病の有無による有意差を認めず、CUC 値低下の背景には HDL 粒子径の変化以外の機序も存在することが示唆された。これらの原因を探る為に、我々は HDL のリン脂質を加水分解する内皮リパーゼ (Endothelial lipase; EL)、HDL の主要なアポタンパクである ApoA1 の酸化を引き起こすことで HDL を機能不全にすることが知られているミエロペルオキシダーゼ (Myeloperoxidase; MPO)、および HDL を酸化ストレスから保護する作用が知られているパラオキシナーゼ (Paraoxonase; PON-1) 活性を測定した。しかし PON-1 活性は CUC 値と弱い正相関を示したものの、その他は高 TG 血症患者群と糖尿病患者群との間に有意差は認めなかった。

考察)

本研究は HDL 機能評価の新規指標である CUC が、インスリン抵抗性の上昇を病態基礎とする高 TG 血症および糖尿病でどのような影響を受けるかを説明することを目的としたものであり、その結果高 TG 血症および糖尿病患者群では CUC 値が低下していることを示した。インスリン抵抗性を基盤とする病態である肥満、メタボリックシンドローム、2 型糖尿病などに認められる脂質異常症は、TG 値の上昇と HDL-C 値の低下が特徴であるがこのような状態では HDL 量の減少に加えて HDL 粒子の組成および機能が変化することが知られている。HDL の抗動脈硬化作用は、主として末梢組織のマクロファージから肝臓へのコレステロール逆転送に起因するが、本研究においては高 TG 血症および糖尿病を合併した状態では HDL が末梢組織からコレステロールをさらに取り込む能力が低下することを証明した。さらに CUC 値と TG 値、HbA1c、HOMA-IR、BMI との間に逆相関を認めたことから CUC の障害がインスリン抵抗性の上昇と密接に関連していることも示唆された。

HDL の合成および成熟は、マクロファージおよび肝臓表面に発現する ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) と G1 (ABCG1) およびスカベンジャー受容体 BI (SR-BI) によって制御されている。ABCA1 は HDL 合成の初期段階において HDL の主な構成タンパク質である ApoA1 との相互作用により、末梢のマクロファージから遊離コレステロールとリン脂質を引き抜き円盤状の原始 HDL を合成する。ABCG1 と SR-BI はその後、細胞表面の遊離コレステロールを取り込ませることでさらにコレステロールを供給し、HDL の大型化および成熟に寄与している。CUC は無細胞アッセイ系であることから、細胞を用いたアッセイ系である CEC と異なり、HDL の新生に重要である ABCA1 を介したコレステロールの能動的な引き抜き能を反映していない。一方で、HDL の成熟過程で生じる ABCG1 や SR-BI を介したコレステロール取り込みは濃度勾配による受動拡散であることから、CUC アッセイは主に成熟した HDL が受動拡散により受け渡されるコレステロールを取り込む能力を反映していると我々は考えている。また、HDL 粒子径に関して我々の先行研究から、サイズが大きい HDL 粒子数と CUC とより強い相関を示すことが分かっており、CUC は成熟 HDL 粒子の濃度に主に影響をうけることが示唆される。本研究では、HDL 粒子径の代用マーカーとして HDL-C/ApoA1 比を用いて解析することで、HDL 粒子径が CUC を規定する因子であり、TG 値とは逆相関することを発見した。

またインスリン抵抗性が上昇している状態では、コレステリルエステル転移タンパク (Cholesteryl ester transfer protein; CETP) 活性の上昇により HDL 粒子中の中性脂肪が濃縮されることが知られている。中性脂肪が豊富となった HDL 粒子は、HDL 中のリン脂質と中性脂肪をそれぞれ加水分解する肝性リパーゼ (Hepatic lipase; HL) と EL に作用されやすいことから、HDL

がより小さな粒子にシフトすると推測される。これらのメカニズムより、インスリン抵抗性状態における HDL の成熟障害が CUC 値の低下を引き起こすと考えられた。

本研究では、高 TG 血症患者群で糖尿病の合併の有無に関わらず HDL-C/ApoA1 比や TG 値に有意差を認めなかった。これは糖尿病における CUC 値の悪化には、HDL の成熟障害以外にも他の因子が関与している可能性があることを示唆している。今回は MPO、PON1 活性および EL に関して有意差を認めずその根本的なメカニズムを解明することには至らなかったが、糖尿病における CUC の障害にはその他の翻訳後修飾が関与している可能性があり、それらを明らかにするためにさらなる研究が必要である。

結語)

CUC 値は高 TG 血症患者と糖尿病患者で低下していた。また、HDL のコレステロール取り込み能の低下はインスリン抵抗性が上昇した状態において、HDL がより小さな粒子にシフトすることが機序のひとつであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 3396 号	氏 名	瀬戸 悠太郎
論 文 題 目 Title of Dissertation	Impaired Cholesterol Uptake Capacity in Patients with Hypertriglyceridemia and Diabetes Mellitus 高中性脂肪血症および糖尿病患者における コレステロール取り込み能の低下		
審 査 委 員 Examiner	主 査 河野 誠司 Chief Examiner 副 査 小川 莎 Vice-examiner 副 査 坂口 一彦 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

【背景と目的】HDL-Cが低値であると動脈硬化性心血管疾患（ASCVD）のリスクが上昇することはよく知られている。しかし一方でHDL-C値が極端に高い場合、むしろASCVDリスクが上昇するということが報告されていることから近年ではHDLの質的評価に注目が集まっている。先行研究により、コレステロール逆転送系の初期段階を生体外で再現した指標であるHDLのコレステロール引き抜き能（Cholesterol efflux capacity: CEC）がASCVDの有病率および発症率の両方に関連し、HDL-C値よりも優れた予測因子であることが示されている。しかしCECの測定は煩雑で時間がかかる。そこで本研究ではHDLの機能の新たな概念として提唱したコレステロール取り込み能（Cholesterol uptake capacity: CUC）を評価する無細胞アッセイ系を確立した。本研究では本指標が冠動脈疾患の二次予防におけるリスク層別化に有用であることを報告してきた。

メタボリックシンドロームや糖尿病（DM）は、中性脂肪値の上昇とHDL-C値の低下からなる脂質異常症（DL）を特徴とすることも知られている。さらに、メタボリックシンドロームやDMでは、HDL機能の中でも抗炎症、抗酸化作用やコレステロール引き抜き能が低下していることが報告されている。そこで、本研究ではメタボリックシンドロームの主な合併症である高中性脂肪血症（高TG血症）とDMにおけるCUCとの関連を評価することを目的とした。

【方法】2015年6月から2019年2月の間に神戸大学医学部附属病院で経皮的冠動脈形成術もしくは冠動脈造影検査を施行した患者から採血し、血清を凍結保存した。登録患者を高TG血症とDMの有無により、初回採血時の血清CUC値を比較した。高TG血症はTG値が150mg/dLを超えるか、TG低下薬を内服している患者、DMはHbA1c>6.5%またはDM治療薬を使用している患者と定義した。

【結果】計285例（高TG血症94例、DM126例、高TG血症とDMの両方に罹患45例、どちらにも罹患なし110例）を対象とした。高TG血症群では、非TG血症群と比較してCUC値が有意に低く、更にDM群のCUC値も非DM群と比較して有意に低かった。多変量解析の結果でも、CUC値の低下は高TG血症およびDMに関連していた。さらにHDL粒子径の代用指標としてHDL-C/ApoA1比を算出したところ、CUC値はHDL-C/ApoA1比と有意な正の相関を示したが、一方TG値はHDL-C/ApoA1比と逆相関を示したことから、TG値上昇に伴うHDL粒子径の減少がCUC値の低下に関与していることが示唆された。高TG血症患者のCUC値をDMの有無で比較したところDMの合併はCUC値低下と関連していたものの、TG値およびHDL-C/ApoA1比にはDMの有無による差を認めず、CUC値低下の背景にはHDL粒子径の変化以外の機序も存在することが示唆された。DM群では、CUC値とTG値、HbA1c、HOMA-IR、BMIとの間に逆相関を認めたことからCUCの障害がインスリン抵抗性の上昇と密接に関連していることも示唆された。これらの原因を探る為に、HDLのリン脂質を加水分解するEndothelial lipase (EL)、HDLの主要なアポタンパクであるApoAIの酸化を引き起こすことでHDLを機能不全にすることが知られるMyeloperoxidase (MPO)、およびHDLを酸化ストレスから保護する作用が知られるParaoxonase (PON-1) 活性を測定した。しかしPON-1活性はCUC値と弱い正相関を示したものの、その他は高TG血症群とDM群との間に有意差は認めなかった。

【考察】本研究では、高 TG 血症および DM 群では CUC 値が低下していることが示された。DL は TG 値の上昇と HDL-C 値の低下が特徴であるが、加えて HDL 粒子の組成および機能の変化が知られている。HDL の抗動脈硬化作用は、主として末梢組織のマクロファージ (M ϕ) から肝臓へのコレステロール逆転送に起因するが、本研究において高 TG 血症および DM を合併した状態では HDL が末梢組織からコレステロールを取り込む能力がさらに低下することを示した。

HDL の合成・成熟は、M ϕ および肝臓表面に発現する ABCA1 と ABCG1 および SR-BI によって制御されている。ABCA1 は HDL 合成の初期段階において HDL の主な構成タンパク質である ApoA1 との相互作用により、末梢の M ϕ から遊離コレステロールとリン脂質を引き抜き円盤状の原始 HDL を合成する。ABCG1 と SR-BI はその後、細胞表面の遊離コレステロールを取り込ませることでさらにコレステロールを供給し、HDL の大型化および成熟に寄与している。CUC は無細胞アッセイ系であることから、細胞を用いたアッセイ系である CEC と異なり、HDL の新生に重要である ABCA1 を介したコレステロールの能動的な引き抜き能を反映していない。一方で、HDL の成熟過程で生じる ABCG1 や SR-BI を介したコレステロール取り込みは濃度勾配による受動拡散であることから、CUC アッセイは主に成熟した HDL が受動拡散により受け渡されるコレステロールを取り込む能力を反映していると考えられる。また、本研究者の先行研究から、サイズが大きい HDL 粒子数と CUC とより強い相関を示すことが分かっており、CUC は成熟 HDL 粒子の濃度に主に影響をうけると推察される。本研究では、HDL 粒子径の代用マーカーとして HDL-C/ApoA1 比を用いて解析することで、HDL 粒子径が CUC を規定する因子であり、TG 値とは逆相関することを発見した。

またインスリン抵抗性が上昇している状態では、CETP 活性の上昇により HDL 粒子中の中性脂肪が濃縮されることが知られている。中性脂肪が豊富となった HDL 粒子は、HDL 中のリン脂質と TG をそれぞれ加水分解する Hepatic lipase と EL に作用されやすいことから、HDL がより小さな粒子にシフトすると推測される。これらのメカニズムより、インスリン抵抗性状態における HDL の成熟障害が CUC 値の低下を引き起こすと考えられた。

本研究では、高 TG 血症群で DM の合併の有無に関わらず HDL-C/ApoA1 比や TG 値に有意差を認めなかった。これは DM における CUC 値の悪化には、HDL の成熟障害以外にも他の因子が関与している可能性があることを示唆している。今回は MPO、PON1 活性および EL に関して有意差を認めずその根本的なメカニズムを解明することには至らなかったが、DM における CUC の障害にはその他の翻訳後修飾が関与している可能性があり、それらを明らかにするためにさらなる研究が必要である。

【結語】本研究は、抗 TG 血症や DM のある患者における CUC の低下を示した意義のある業績と考えられる。よって、本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。