

氏名・（本籍） 中村高秋（山口県）
学位の種類 博士（医学）
学位記番号 博士 第110号
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日 平成4年3月23日
学位論文題目 糖化HDLのコレステロール逆転送活性

審査委員 主査 教授 大久保 岩 男
副査 教授 野崎 光 洋
副査 教授 繁田 幸 男

論文内容要旨

〔目的〕

動脈硬化性疾患は糖尿病患者の死因の第一位とされ、糖尿病患者の予後を左右する重要な疾患である。糖尿病患者では持続する高血糖のため糖化ヘモグロビンに代表されるように生体内の各蛋白は非酵素的に糖化されるが、リポ蛋白であるLDL、HDLも糖化され血中に存在することが知られている。我々は糖化LDLがヒト肝癌細胞（HepG2細胞）においてLDLレセプターに認識され難いことを報告した。本研究では抗動脈硬化作用を有するとされるHDLの機能であるコレステロール逆転送活性に関して、糖化変性が及ぼす代謝的特性の変化を検討した。

〔方法〕

①細胞：ヒト線維芽細胞は健常人の前腕より、マウス腹腔内マクロファージ細胞はDDYマウスより採取培養し、5%リポ蛋白欠如血清にて前処置して用いた。②リポ蛋白：超遠心法にて血清よりHDL（比重1.063-1.210）、HDL₂（1.063-1.125）、HDL₃（1.125-1.210）を分離した。糖化HDLは120mg/mlのNaBH₃CN（cyanoborohydride）存在下にHDL、HDL₂、HDL₃にブドウ糖150mMを加えて37℃で7日間孵置し、対照は生理食塩水で孵置して作製した。③コレステロール逆転送活性の測定：¹⁴Cコレステロールにて標識したLDL、アセチルLDLを用いて細胞を標識後、糖化HDLまたは対照HDL存在下に20時間反応孵置し、細胞を生理食塩水にて洗浄後、細胞内脂質を抽出し放射活性を測定した。コレステロールエステル分画の放射活性は薄層クロマトグラフィーにて分画して測定した。細胞内総コレステロール、遊離コレステロール量は酵素法により測定した。④HDLアポ蛋白の解析：HDLアポ蛋白の解析はSDS-ポリアクリ

ルアミドゲル電気泳動にて行った。

〔結果〕

①ヒト培養線維芽細胞における糖化HDLのコレステロール逆転送活性：HDLの半最大効果濃度は約100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で認められた。HDL非存在下の細胞内コレステロール放射活性は 1.82 ± 0.12 ($\mu\text{gLDL}/\text{mg prot}$ 、mean \pm SD) であり対照HDL 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下で 1.06 ± 0.05 、糖化HDLでは 1.28 ± 0.10 と糖化HDL孵置による細胞内残存放射活性は有意に高値を示した。細胞内コレステロールエステル分画の放射活性は、有意に糖化HDL孵置時で多かった。②マウス腹腔内マクロファージにおける糖化HDLのコレステロール逆転送活性：HDLの濃度依存性に放射活性は減少し、HDL非存在下に 1.90 ± 0.17 (μg アセチルLDL/ mg prot) であり、対照HDL 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では 0.70 ± 0.01 と減少、糖化HDLでは 1.66 ± 0.08 と細胞内残存放射活性は有意に高値を示した。コレステロールエステル分画でも有意に糖化HDL孵置時の細胞内放射性コレステロールエステルの残存は多く、細胞内 ^{14}C コレステロールの減少はコレステロールエステルによるものであった。細胞内コレステロール含量を酵素法にて測定すると総コレステロールは対照HDLとの孵置により低下し、高濃度のグルコースで変性させた糖化HDLほどその低下は少なかった。分画して測定すると細胞内コレステロールの変化はエステル型の減少によるものであり、遊離コレステロールは変化しなかった。③糖化HDLアポ蛋白の分析：糖化HDLのアポ蛋白を、4%–20% SDSグラジエントゲルを用いて解析すると、対照HDLでは28 KにアポA-Iのバンドを認めたが、糖化HDLでは30 Kに相当する部分にバンドを認め、糖化アポA-Iと考えられた。グルコース濃度を変えて検討すると、グルコース濃度依存性に分子量が増大していた。

〔考察〕

ヒト線維芽細胞、マウス腹腔内マクロファージ細胞を用いて逆転送活性を観察し、糖化HDLで活性が低下していることを示した。この時、糖化HDLのアポ蛋白分子量は増大していた。使用した細胞にはコレステロールの分解系がないことから、放射活性はそのまま細胞内の放射性コレステロールを示すと考えられ、HDLの孵置により変化した放射活性はHDLによるコレステロールの変化、すなわちコレステロールの逆転送活性を示すものと推測される。糖化HDLの逆転送活性の低下の機序としては、細胞からの遊離コレステロールのHDL粒子への移動の段階の異常が考えられ糖化に伴うHDL粒子の脂質を含む膜構造に変化が生じ、このことが糖化HDLの逆転送活性低下を招いた一因と推測できる。また、HDLのアポ蛋白A-Iによる特異的逆転送活性が存在すると報告されている。従って、本実験の糖化アポA-Iの分子量の増大は、糖化によるアポA-Iの構造変化を示し、糖化HDLの細胞膜に存在するアポA-I結合蛋白との反応を含む過程の異常によりコレステロール逆転送活性低下が生じたと考えられる。これらのことは過血糖に伴うHDLの糖化は糖尿病患者における末梢組織よりのコレステロールの逆転送活性を低

下させ、血管壁へのコレステロールエステルの蓄積をもたらしうることを示唆する。

〔結果〕

糖尿病のリポ蛋白異常において、コレステロール逆転送という視点からみると、HDL 粒子数の低下のみでなく、この実験で示された糖化変性という過血糖に伴う HDL のアポ蛋白の糖化変性も糖尿病患者の動脈硬化症の発症進展に役割を演ずると考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

本研究は糖尿病患者の血中に認められる非酵素的に糖化された高比重リポ蛋白 (HDL) のコレステロール逆転送活性をヒト線維芽細胞及びマウス腹腔内マクロファージを用いて測定し、この糖化 HDL の抗動脈硬化作用を *in vitro* にて検討したものである。得られた結果は次の通りである。1) ヒト線維芽細胞では糖化 HDL のコレステロール逆転送活性は低下していた。2) 泡沫細胞化させたマウス腹腔内マクロファージにおいても糖化 HDL のコレステロール逆転送活性は減少していた。さらに高濃度のグルコースで変性させた糖化 HDL ほど逆転送活性の低下は著しかった。3) HDL 孵置による細胞内コレステロールの変化はコレステロールエステル分画によるものであった。4) HDL のアポ蛋白の解析を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて行くと、対照 HDL では 28 K のアポ A-I のバンドを認めたが、糖化 HDL では 31 K に相当する部分にバンドを認め、糖化アポ A-I と考えられた。糖化する条件を変えて検討すると、グルコース濃度依存性に 31 K バンドの増加が認められた。

この研究結果は糖尿病患者に認められるリポ蛋白代謝異常のうち、コレステロール逆転送という視点からみると、HDL 粒子数の低下のみでなく、過血糖にともなう HDL のアポ蛋白の糖化変性もマクロファージの泡沫化を助長し、糖尿病患者の動脈硬化症の発症進展に関与する可能性を初めて明らかにしたものである。本研究は博士 (医学) を授与するに値するものである。