

奨励金No.1544

赤血球関連脂質代謝異常の解明と評価法の開発

大川 龍之介

東京科学大学 大学院医歯学総合研究科 臨床分析・分子生物学分野（受領時 東京医科歯科大学） 教授

Investigation of erythrocyte-related lipid metabolic disorder and its evaluation method

Ryunosuke Ohkawa

Clinical Bioanalysis and Molecular Biology, Graduate School for Medical and Dental Sciences,
Institute of Science Tokyo, Professor



粥状動脈硬化のリスク評価として赤血球を対象とした評価法の確立を目指し、赤血球関連脂質代謝の機序の解明を目的とした赤芽球様細胞の分化条件の検討ならびに脂質トランスポーターの解析、末梢赤血球コレステロール放出能の開発、末梢赤血球コレステロール含有量の簡便な測定法の開発を試みた。結果、最適な分化条件を定め、その条件下、脂質トランスポーターの発現を増加させることに成功した。また、臨床応用可能な高性能の赤血球コレステロール含有量測定法を開発した。

We aimed to establish an evaluation method using erythrocytes for assessing atherosclerosis risk and to elucidate the mechanisms of erythrocyte-related lipid metabolism. To achieve this, we investigated differentiation conditions for erythroid progenitor cells, analyzed lipid transporters, developed a method for measuring cholesterol efflux from peripheral erythrocytes, and created a simplified method for quantifying cholesterol content in peripheral erythrocytes. As a result, we successfully determined optimal differentiation conditions and, under these conditions, increased the expression of lipid transporters. Furthermore, we developed a high-performance method for measuring erythrocyte cholesterol content that is suitable for clinical application.

1. 研究内容

1.1 目的

粥状動脈硬化は世界の死因の約4分の1を占める虚血性心疾患および脳卒中に深く関連し、そのリスク評価には血清低比重リポタンパクコレステロール（LDL-C）や高比重リポタンパクコレステロール（HDL-C）濃度の測定が広く行われている。しかしながら、LDL-CやHDL-Cの測定で予測できるものは発症した心血管疾患イベント総数の30%にも満たず、さらなるバイオマーカーの発見が急務である。一方、血液の体積にして約半分を占める赤血球の膜にも多量のコレステロールが含まれており、さらに脂質代謝に深く関わっていることが報告されているが、その機序や脂質代謝に

関連した赤血球を対象とした検査は皆無である。

また、赤血球関連脂質代謝の評価として赤血球コレステロール含有量の測定が過去に報告されているが、測定操作に脂質抽出が必要であり、煩雑で臨床応用は困難である。

よって本研究では、赤血球による脂質代謝の機序の解明および臨床応用可能な評価法の開発を目的とする。

1.2 方法と結果

1.2.1 赤血球関連脂質代謝の機序の解明、関連分子の同定

赤血球は無核の細胞であるため、タンパク発現の減弱あるいはノックダウンが困難である。そこ

で、白血病細胞株 K562 から赤芽球系細胞への分化し、候補タンパクの脂質代謝への関与を模索する。先行研究において、K562 から赤芽球様細胞への分化には成功したが、分化後の細胞培養や遺伝子発現操作を考慮するとさらに分化条件の最適化が必要であった。そのため、まず初めに、分化後の脂質代謝解析に最適な分化条件の検討を行った。各種濃度の酪酸ナトリウム (NaB) を 2~4 日間培養し、赤芽球様細胞への分化の確認を CD235a の mRNA およびタンパク発現の増加、CD45 の mRNA およびタンパク発現の減少、ベンチジン染色において、また細胞の viability は XTT assay にて評価した。結果、2 mmol/L NaB 添加培地における 3 日間培養を最適条件とした。

次に、末梢血赤血球に発現する脂質トランスポーターである ABCA1 が、上記の条件で分化した赤芽球様細胞にも発現しているかどうかについて確認した。上記の分化条件下で培養し、ABCA1

の mRNA およびタンパクの発現を解析したところ、未分化条件と比較して分化した細胞では ABCA1 の mRNA の発現の増加が認められた (図 1)。さらに、ABCA1 の発現を増加させることで知られる LXR agonist を培地に加えたところ、LXR agonist 0.2 $\mu\text{mol/L}$ の添加で ABCA1 タンパクの発現の促進が確認された (図 2)。

現在、分化後の細胞の脂質代謝 (コレステロール取り込み能、放出能の評価法) を評価する方法を検討している。蛍光コレステロールをコレステロールキャリアーである MbCD (トランスポーター非特異的)、アポリポタンパク A-I (ABCA1 トランスポーター依存性)、HDL (ABCG1 や SR-B1 経由) などに取り込ませた後、分化誘導した K562 に作用させ、蛍光コレステロールの移動を追跡する条件を検討中である。検討後、ABCA1 を含め、各種トランスポーターの発現前後の脂質代謝の変化を確認し、このトランスポーターの赤血球脂質

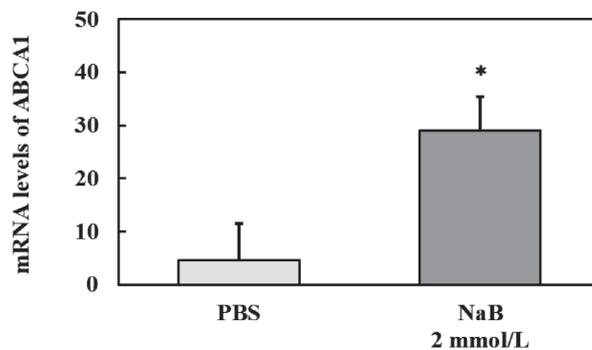


図 1. K562 分化誘導後の ABCA1 mRNA の発現

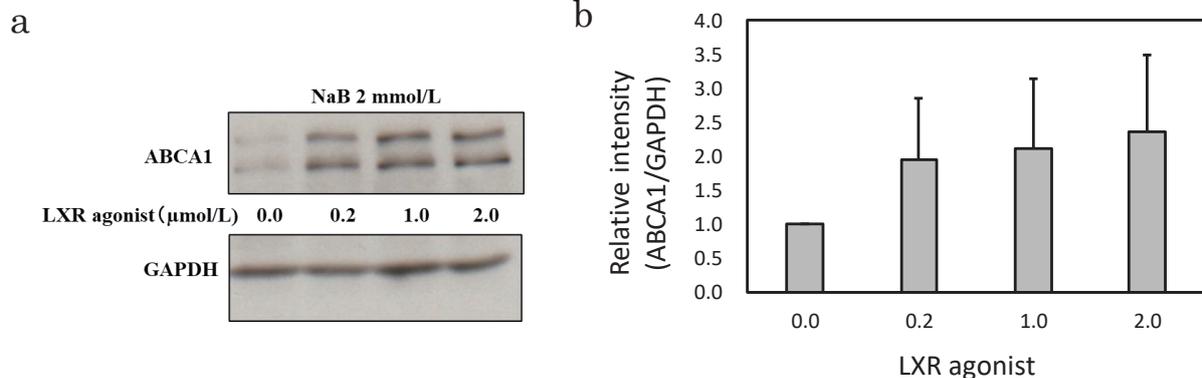


図 2. LXR agonist による ABCA1 発現の変化

代謝への関与を確認していく予定である。

1.2.2 赤血球のコレステロール取り込み能、放出能の評価法の開発

赤血球によるコレステロールの取り込み・放出に関して、放射性標識コレステロールを用いて定性的な評価は既に先行研究にて報告している。一方、健常者・患者を区別できるほどの分析分解能を有する精度の良い評価法の確立には至っていない。また、放射性物質を使用することから、前述の機能解明のような基礎研究には有用であるが、日常診療には不向きである。したがって、1.2.1の関連分子の検討実験と並行して、蛍光コレステロールを用いて、末梢赤血球コレステロール取り込み・放出能を開発する。初めに、蛍光コレステロール標識赤血球を作製するための標識条件などを検討した。赤血球の溶血を最低限に抑える最適な赤血球標識液を作製した後、赤血球に作用させ、蛍光標識赤血球を作製した（評価は蛍光顕微鏡、フローサイトメーターにて行った）。その後、HDLをコレステロールアクセプターとして、赤血球からHDLへのコレステロール放出能の定量化を試みた。結果、HDLの濃度および反応時間依存的なコレステロールの放出が確認できた。今後、各種赤血球（修飾赤血球、患者赤血球）やHDLを用いた評価を行う。また、取り込み能の方法についても検討する。

1.2.3 赤血球膜コレステロール含有量評価法の開発

赤血球からの脂質抽出操作を省略するために、赤血球コレステロールを直接酵素法により測定する方法を検討した。赤血球内には高濃度のヘモグロビンが含まれているため、酵素反応後の比色定量を干渉する。そこで、前処理として、SDSおよび亜硝酸ナトリウムを添加し、ヘモグロビンによるキノン色素の吸収スペクトルの歪みが解消されることを見出した（図3）。

また測定前の血液検体の前処理条件（洗浄、温

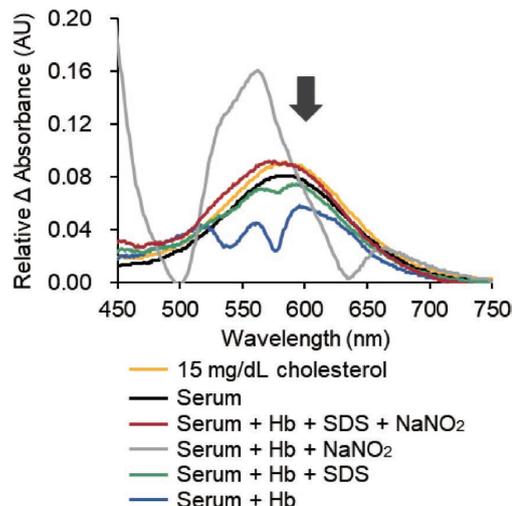


図3. 様々な条件で測定した酵素法によるコレステロール測定のために生成するキノン色素の差スペクトル
矢印：測定波長

度）を検討した。赤血球膜コレステロールを測定するためには、血漿コレステロールを赤血球から取り除くために洗浄操作が必要である。検討により、高ヘマトクリット検体では予想通り洗浄効率が低下するが、60%ヘマトクリットにおいても4回の洗浄操作で生理食塩水と有意差が生じない程度まで血漿コレステロールを除去可能であることを確認した。また、採血後の温度条件では、4℃保存では赤血球は安定であり、コレステロール濃度に変化は認められず安定な保存が可能であった。25℃においては赤血球の膨化が確認されたが、赤血球一個あたりのコレステロール含有量は変わらないことが明らかになった。多くの患者検体を取り扱う日常検査を考えると、採血後のすぐに冷蔵に保存することは困難であるが、常温下においても赤血球一個あたりのコレステロールを算出することで評価は可能であると考えられる。

上記の測定法の妥当性試験（正確性、併行精度、直線性など）を実施し、良好な性能を有することを確認した後、健常者を対象に各脂質プロファイル、血液検査項目との相関性を調べた。結果、赤血球コレステロール含有量は、血清脂質（総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレス

テロール、中性脂肪)と相関性を示さないことを見出した。一方、体積当たりのコレステロール含有量はMCVと正の細胞当たりのコレステロール含有量は赤血球数と負の相関性を示した。さらに、赤血球を比重によって10分画に分け、各分画のHbA1cおよび網赤血球割合を調べ、比重の軽い、つまり赤血球が幼若な分画ではHbA1cの%は低く、網赤血球の割合は高く、比重の高い分画ではその反対であることが観察され、赤血球を成熟度で分画できていることを確認した。これらの分画中の赤血球のコレステロール含有量を調べたところ、幼若な赤血球はコレステロール含有量が高く、古い赤血球は含有量が少ないことが明らかになった。これらの赤血球コレステロール含有量の測定に関しての成果をBioscience Reportsに報告した(in press)。今後、上記の条件も踏まえ、健常者、患者赤血球中のコレステロール含有量を評価する。また、末梢赤血球トランスポーター発現量についても検討しており、引き続き解析を進めていく。

2. 発表(研究成果の発表)

2.1 又吉 琴子、清水 梨帆、川口 莉奈、吉本明、鈴木 喜晴、大川 龍之介. 赤血球の脂質代謝解析モデル細胞の構築を目的としたヒト白血病細胞株を用いた赤芽球系細胞への分化条件の検討. 第17回日本臨床検査学教育学会学術大会. 2023.08.23-08.24. 天理

2.2 山崎 あずさ、市村 直也、東田 修二、大川 龍之介. 赤血球コレステロール含有量を測定するための試料の前処理および安定性に関する検討. 日本医療検査科学会第55回大会. 2023.10.06-10.08. 横浜

2.3 山崎 あずさ、渡部 芽以、市村 直也、東田 修二、大川 龍之介. 赤血球コレステロール含有量直接測定法の評価およびヘモグロビン濃度による補正の検討. 第63回日本臨床化学会年次学術集会. 2023.10.27-10.29. 東京

2.4 山崎 あずさ、市村 直也、東田 修二、大川

龍之介. 新たな測定法による赤血球コレステロール含有量と他の検査項目との関連. 第70回日本臨床検査医学会学術集会. 2023.11.16-11.19. 長崎
2.5 清水 梨帆、山崎 あずさ、川口 莉奈、鈴木 喜晴、大川 龍之介. 赤血球コレステロール代謝の解析モデルとして使用する赤芽球系細胞の脂質輸送タンパク解析. 第63回日本臨床化学会年次学術集会. 学生シンポジウム1. 2023.10.27-10.29. 東京

*JSCC Student Award 受賞

2.6 山崎 あずさ、亀田 貴寛、渡部 芽以、吉本明、東田 修二、大川 龍之介. 血漿体積の変化を考慮した赤血球-血漿間脂質転送の解析. 第64回日本臨床化学会年次学術集会. 2024.08.30-09.01. 宇都宮(8/31)

2.7 Yamazaki A., Hakii Y., Yoshimoto A., Kameda T., Ichimura N., Tohda S., and Ohkawa R. Development and validation of direct assay for cholesterol content of erythrocytes. Bioscience Reports. 45(7):BSR20253335, 2025.