

中高年・高齢者糖尿病患者における 血管合併症の発症進展に対するHDL機能の意義

国立循環器病研究センター研究所 病態代謝部
脂質代謝研究室長 小倉 正恒

(共同研究者)

国立循環器病研究センター病院 動脈硬化・糖尿病内科 医長 榎野 久士
国立循環器病研究センター研究所 病態代謝部 研究補助員 森本 めぐむ

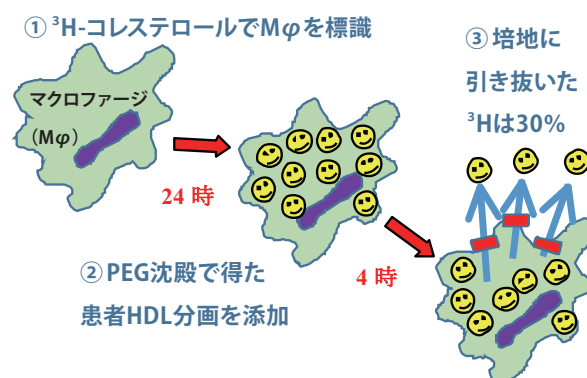
はじめに

2型糖尿病患者は3.5億人存在し、2035年には5.9億人に増加する⁽¹⁾。また、50歳の糖尿病患者の平均余命は6年短く、その原因の58%は血管合併症である⁽²⁾。すなわち、糖尿病の血管合併症すなわち冠動脈疾患、脳卒中、腎不全、網膜症、足病変などは患者の健康寿命を著しく損なう。現在までに糖尿病患者において血糖値を是正する介入により、血管合併症の発症を予防できるというエビデンスも少なく、糖尿病血管合併症と脂質異常症の関連については、高LDL-C血症に加えて高TG血症が大血管症のリスクであることがJapan Diabetes Complications Studyで示された⁽³⁾が、低HDL-C血症は独立したリスク因子ではなかった。また、スタチンを内服する患者にHDL-C濃度(量)を増加させる治療を併用しても、さらなる心血管イベント抑制は達成できない⁽⁴⁾。このことは、糖尿病患者にスタチン投与が強く勧奨される現代においてHDL-C(量)増加療法の限界を示唆している。近年、Mφからのコレステロール引き抜き能(HDLの質)の低下が血清HDL-C値(量)より強力な冠動脈疾患の危険因子であることが明らかにされつつある⁽⁵⁾⁽⁶⁾。しかし、2型糖尿病患者におけるHDL機能の研究はまだ少ない。

本研究はHDL機能の低下(質的異常)が糖尿病血管合併症の発症進展のリスクかどうかを横断研究および前向き観察研究により明らかにする臨床研究である。HDL機能は、マクロファージ(Mφ)からのコレステロール引き抜き能と抗酸化能を測定する。さらに個人個人の糖尿病の病態の違いがHDL機能にどのような影響を及ぼすかについても検討し、HDL機能の改善が糖尿病血管合併症の発症進展を抑制するか否かを検討する介入研究実施への基盤を築くことを目的とするものである。

図1にコレステロール引き抜き能の測定

図1. コレステロール引き抜き能の測定法



方法を示す。放射性コレステロールでマクロファージをラベルし患者血清から分離したHDLを添加することで行う(図2)。HDL分画の単離はポリエチレングリコール(PEG)による沈殿法を用いて行い、培地中の放射活性を、培地および細胞の活性で除した値をコレステロール引き抜き能とする。

また図2に抗酸化能の測定原理について示す。PEG沈殿法により得られた患者HDL分画に含まれる抗酸化物質によるラジカル吸収能を、96ウェルプレートを使用した蛍光検出により測定するOxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)法で評価する。

ORAC法の原理は、活性酸素種により分解する蛍光物質の蛍光強度を測定し、経時的に減少する曲線を描いた場合、抗酸化物質の存在下では、その蛍光強度の減少速度が遅延することを利用するものである。濃度既知の標準物質に対する患者HDL分画の相対値を求め、検体の抗酸化力とする。この方法は比較的簡便に行えるため短時間に多量の検体を処理できる。

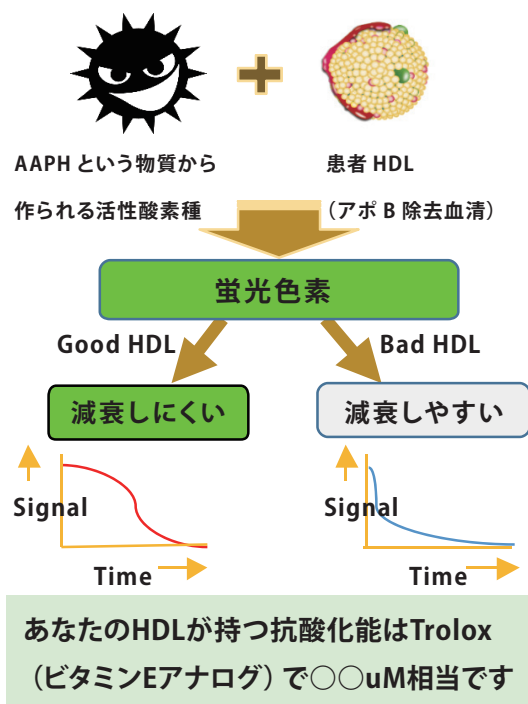
本研究は平成26年10月20日に当センター倫理委員会で承認され(課題番号:M26-082)、平成27年4月から症例のエントリーを開始し、現在までに118名が登録された。そのうち58名のHDL機能測定が終了しており、本報告書では中間解析結果(横断研究)を報告する。

結 果

表1に研究参加者の臨床的特徴をまとめた。平均年齢68歳で約70%が男性であった。高血圧症の合併は約80%、脂質異常症の合併は95%、喫煙歴のあるものが73%と非常に高く、BMIおよび腹囲も平均値が正常上限を超えており、中高年における糖尿病患者は糖尿病以外に多重リスクを抱えている症例が教育入院の対象となることが明らかになった。また当センターの特徴かもしれないが、大血管障害である冠動脈疾患をすでに発症している患者が約半数という高い頻度で認められた。また糖尿病罹患歴は平均14年であり、神経障害の発症や網膜症の進行も多くの患者で認められた。

次に糖尿病関連パラメータとHDL機能の関連について示す。コレステロール引き抜き能と関連を示した指標はHbA1c値のみでHbA1c値が高いほどコレステロール引き抜き能は低かった($P = 0.0074$)。空腹時および朝食2時間後の血糖値、インスリン値、Cペプチド値との関連は認めなかった。また、インスリン抵抗性の指標であるHOMA-IR値やインスリン分泌能の

図2. 抗酸化能の測定法 (ORACアッセイ)



指標であるHOMA- β 値との関連も認めなかった。HDLの抗酸化能の指標であるORAC値との関連では、HbA1c値を含むすべての指標と関連を認めなかった。

表1. 本研究参加者の臨床的特徴（数値は平均値±標準偏差（SD））

項目	数値等
年齢(歳)	68±10
性別	男性40名(69%)、女性18名(31%)
糖尿病罹患歴(年)	14±10
高血圧症の合併	46名(79%)
脂質異常症の合併	55名(95%)
喫煙歴	現在喫煙12名(21%)、過去喫煙30名(52%)、非喫煙16名(27%)
BMI(kg/m ²)	25.3±3.2
腹囲(cm)	91.9±11.2
網膜症	正常31名(53%)、単純性17名(29%)、増殖性10名(18%)
神経症	末梢神経障害34名(59%)、自立神経障害22名(38%)、両方18名
腎症	1期33名(57%)、2期14名(24%)、3期6名(10%)、4期4名(9%)
冠動脈疾患の既往	27名(47%)
脳梗塞の既往	10名(17%)

HDL機能と糖尿病性血管合併症との関連について表2に示す。冠動脈疾患の既往を有する患者においてはコレステロール引き抜き能が低い傾向にあり（ $P = 0.0876$ ）、抗酸化能の指標であるORAC値は有意に低値を示した（ $P = 0.0065$ ）。脳梗塞の既往とHDL機能の間に関連は認めなかった。閉塞性動脈硬化症の指標であるAnkle-Brachial Index (ABI)については、異常値を有する患者において抗酸化能のみ有意に低値であった。網膜症や腎症の程度とHDL機能の間に関連は認めなかったが、神経障害を有する患者において有意に抗酸化能が低いという新しい知見が得られた。特に末梢神経障害との関連が示唆された。

表2. 糖尿病血管合併症とHDL機能の関連（数値は平均値±標準偏差（SD））

	コレステロール引き抜き能			抗酸化能		
	なし	あり	P値	なし	あり	P値
冠動脈疾患の既往	0.89±0.10	0.84±0.14	0.0876	0.89±0.05	0.84±0.06	0.0065
脳梗塞の既往	0.88±0.10	0.82±0.12	0.1541	0.88±0.05	0.86±0.08	0.3592
ABI<0.9	0.87±0.12	0.80±0.13	0.3177	0.88±0.06	0.79±0.05	0.0365
網膜症	0.86±0.13	0.87±0.12	0.6228	0.88±0.05	0.86±0.06	0.3697
神経障害	0.89±0.12	0.86±0.14	0.3678	0.91±0.04	0.86±0.06	0.0068
末梢神経障害	0.90±0.12	0.84±0.12	0.1035	0.90±0.05	0.86±0.06	0.0541
自律神経障害	0.86±0.13	0.88±0.12	0.497	0.88±0.07	0.86±0.05	0.3698
腎症2期以上	0.86±0.13	0.89±0.10	0.3508	0.88±0.06	0.87±0.05	0.7249

考 察

本研究は現在進行中であり、本報告書では横断研究の中間解析結果のみを記載した。今までに得られた知見として、まずHDL機能のうち動脈硬化プラークと直結するコレステロール引き抜き能は糖尿病の重症度を示すHbA1c値と負の関連があったが、HDL-C値とは負の傾向を認めるのみであった ($P = 0.0771$, data not shown)。このことは、HDL-C値(量)よりもHDL機能(質)の方が糖尿病患者の病態を反映しやすいことを示唆するデータである。コレステロール引き抜き能は、HDL粒子上のアポリポタンパクA-Iのアミノ酸残基がミエロペルオキシダーゼという酵素により酸化修飾やニトロ化修飾を受けた場合に低下することが報告されているが、糖尿病患者においてアポリポタンパクA-Iが何らかの修飾(糖化など)を受けていることも想定され、今後検討したいと考える。

また、コレステロール引き抜き能は冠動脈疾患の既往を有する患者において低い傾向にあったことが挙げられる。我々は、すでにスタチンにより治療を受けている家族性高コレステロール血症 (familial hypercholesterolemia: FH) 患者227名を対象にコレステロール引き抜き能を測定し、古典的冠危険因子で調整した多変量解析により、血清HDL-C値よりも強い負のリスクマーカーであることを報告した⁽⁷⁾。FH患者において頸動脈エコー検査における内膜中膜複合体厚 (intima-media thickness: IMT) とコレステロール引き抜き能が負の関連を示すことも報告しているが、糖尿病患者においてもIMTとコレステロール引き抜き能は負の関連にあった ($P = 0.0455$, data not shown)。細小血管合併症とコレステロール引き抜き能との関連を現在までは認めていないことから、N数が不足している可能性と引き抜き能自体は大血管障害における有用なマーカーである可能性の2点を考える必要がある。

さらに抗酸化能は、糖尿病の重症度を示す血液検査上の指標とは関連がなかったが、冠動脈疾患の既往やABI値、糖尿病性神経障害と負に関連することがわかった。糖尿病患者におけるHDLの質的变化として炎症に関与する血清アミロイドAの増加⁽⁸⁾や抗酸化マーカーであるParaoxonase 1の低下⁽⁹⁾が報告されているが、ORAC法による抗酸化能の検討はまだ報告されていないため、今回得られた知見は糖尿病血管合併症の病態理解につながる可能性を秘めている。

2型糖尿病患者から単離されたHDLにおいてコレステロール引き抜き能が増加しているという報告⁽¹⁰⁾もあるが、低下しているという報告が多い⁽¹¹⁾⁽¹²⁾ (Kubotaら, 2014, Saleheenら, 2015)。我々のデータは後者を支持するものである。糖尿病血管合併症とHDL機能の関連についてはさらに報告は少なく、糖尿病性腎症患者で引き抜き能が低いこと⁽¹³⁾ (Zhouら, 2008)、血管内皮機能と引き抜き能が関連すること⁽¹⁴⁾ (Zhouら, 2009)のみである。現在までに糖尿病血管合併症とHDL機能に関する前向き観察研究が皆無であることから、本研究が世界初の試みとなり得る。本研究を完結させ、わが国における中高年糖尿病患者の血管合併症発症予防につながるような成果を報告したい。また、糖尿病患者におけるHDL機能低下を規定する因子を探索することで、新しい臨床指標 (リスクマーカー) や阻害薬の開発などにもつなげていきたいと考える。

要 約

本研究において、コレステロール引き抜き能は糖尿病の重症度であるHbA1c値と負の関連を示したが、HDL-C値はHbA1c値との関連を示さなかったことからHDL-C値（量）よりもHDL機能（質）の方が糖尿病患者の病態を反映しやすいことが示唆された。また抗酸化能を示すORAC値の低下は糖尿病の大血管合併症である冠動脈疾患の既往およびABIの低下と関連し、また糖尿病性神経障害とも関連していた。症例収集と予後調査は現在も継続しており、前向き観察研究の結果、糖尿病患者におけるHDL機能低下を規定する因子が明らかになれば、新しい臨床指標（リスクマーカー）や阻害薬の開発などにもつながると考えられる。

文 献

1. Zimmet P, Alberti KG, Magliano DJ, Bennett PH. Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *Nat Rev Endocrinol*;12:616-22, 2015.
2. Seshasai SR, Kaptoge S, Thompson A, et al. Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death. *N Engl J Med*;364:829-41, 2015.
3. Sone H, Tanaka S, Iimuro S, et al. Serum level of triglycerides is a potent risk factor comparable to LDL cholesterol for coronary heart disease in Japanese patients with type 2 diabetes: subanalysis of the Japan Diabetes Complications Study (JDACS) . *J Clin Endocrinol Metab*;96:3448-56, 2011.
4. Keene D, Price C, Shun-Shin MJ, Francis DP. Effect on cardiovascular risk of high density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP inhibitors: meta-analysis of randomised controlled trials including 117,411 patients. *BMJ*;349:g4379, 2014.
5. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, et al. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*;364:127-35, 2011.
6. Rohatgi A, Khera A, Berry JD, et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med*;371:2383-93, 2014.
7. Ogura M, Hori M, Harada-Shiba M. Association Between Cholesterol Efflux Capacity and Atherosclerotic Cardiovascular Disease in Patients With Familial Hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;36:181-8, 2016.
8. Tsun JG, Shiu SW, Wong Y, Yung S, Chan TM, Tan KC. Impact of serum amyloid A on cellular cholesterol efflux to serum in type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*;231:405-10, 2013.
9. Murakami H, Tanabe J, Tamasawa N, et al. Reduction of paraoxonase-1 activity may contribute the qualitative impairment of HDL particles in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*;99:30-8, 2013.
10. Low H, Hoang A, Forbes J, et al. Advanced glycation end-products (AGEs) and functionality of reverse cholesterol transport in patients with type 2 diabetes and in mouse models. *Diabetologia*;55:2513-21, 2013.

11. Kubota M, Nakanishi S, Hirano M, et al. Relationship between serum cholesterol efflux capacity and glucose intolerance in Japanese-Americans. *J Atheroscler Thromb*;21:1087-97, 2014.
12. Saleheen D, Scott R, Javad S, et al. Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol*;3:507-13, 2015.
13. Zhou H, Tan KC, Shiu SW, Wong Y. Increased serum advanced glycation end products are associated with impairment in HDL antioxidative capacity in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:927-33, 2008.
14. Zhou H, Shiu SW, Wong Y, Tan KC. Impaired serum capacity to induce cholesterol efflux is associated with endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 2009;6:238-43, 2009.