

脂質・リポ蛋白の検査

a) 脂質・リポ蛋白分画の測定法

5) アポ蛋白・Lp(a)

岐阜医療科学大学名誉教授

安部 彰



検査の概略

Lp(a) は、LDL のアポ B100 にアポ(a) が共有結合したリポ蛋白である。アポ(a) のプラスミノゲン (Plg) 相同性による競合反応と、Lp(a) の変性 LDL に相似した特徴から動脈硬化の危険因子と考えられている。血清濃度とアポ(a) の遺伝子 (LPA 遺伝子) の多型性の検査が利用される。個人の血清濃度は遺伝により一定であり、他の脂質と相関性を示さない独立した検査である。

はじめに

Lp(a) は 1963 年ノルウェーの Berg によって発見され、LDL のアポ B100 にアポ(a) が SS 共有結合したリポ蛋白である。分子の大きさは LDL と VLDL の中間、比重は HDL₂ に近似して 1.040~1.125 g/ml である。血清濃度は年齢、食事、運動に影響されず遺伝により 90~95% 決定される。おおむね 0.2~200 mg/dl に分布し 1,000 倍の濃度差があり、その分布は対数正規を示す。合成は主と

して肝臓であり、脳、睾丸からもわずかに合成される。異化については十分解明されていない。

多くの疫学調査と研究から虚血性心疾患の危険因子とされている。なお、Lp(a) にはミステリアスな面が残されているが、本稿では新しい概念を示し動脈硬化のテーマについて解説する。

Lp(a) の分子構造と LPA 遺伝子の多型性 (図 1)

アポ(a) は 400~800 kDa の分子量変化を示し糖鎖に富んでいる。この分子量の変化はクリンゲル 4 型 (K4) の繰り返し数の変化である。分子構造は Plg と相同性を示し競合的に働くと考えられている。Plg は K1~K5 の 5 つのクリンゲルとプロテアーゼ部から構成される。アポ(a) はその K4 の多数の繰り返し、K5 の 1 個および線溶非活性となったプロテアーゼ部から構成される。K4 は 10 のタイプから構成され、タイプ 2 (K4-2) は多数の繰り返しからなるが、他のタイプは 1 個ずつである。

Lp(a) 生成の理論が Koschinsky によって示され

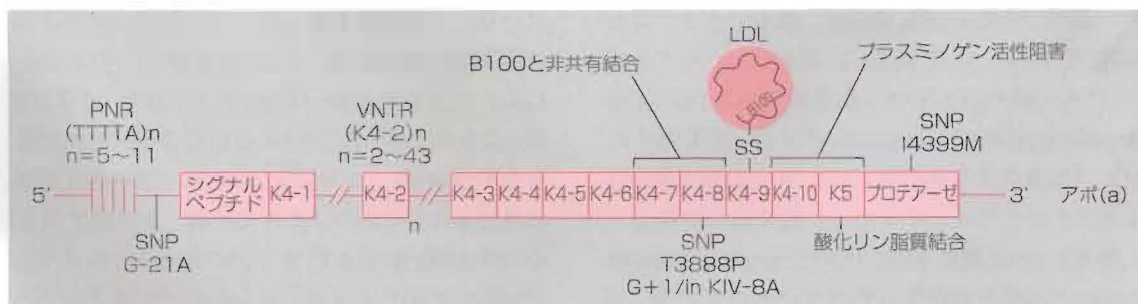


図 1 Lp(a) の分子構造と LPA 遺伝子の多型性

た¹⁾、最初に K4-7 と K4-8 の弱いリシン (Lys) 結合部にアポ B100 の Lys が非共有結合し、次に K4-9 の遊離システインとアポ B100 のシステインが SS 共有結合して Lp(a) が生まれる。Lys と親和性を示す立体構造のひずみがアポ B100 との共有結合の完成までの速度、すなわち Lp(a) の生成速度に影響することを示した。アポ(a) の分子が小さいほど Lp(a) が速く生成され、血清濃度が高値となるとしている。

K4-10 はフィブリンと親和性を示し Plg の働きと競合し、また K5 は Plg 活性を阻害するとされる。Plg は組織に結合して N 端のグルタミン酸 (Glu) が組織表面のプラスミン様プロテアーゼの作用により Lys に変換され、tPA の作用を受けてプラスミンとなり線溶活性因子となるが、Lp(a) は Glu→Lys 変換を阻害し、その阻害はアポ(a) 分子が小さいほど強いとされる²⁾。

LPA 遺伝子はきわめて多型性に富むが、ここでは血清濃度や動脈硬化に影響する多型性について述べる。コード領域である K4-2 の繰り返し多型性 (VNTR: variable number of transcribed kringle 4 repeats) は 1987 年に Utermann³⁾ が報告し、アイソフォームとして検査される。すなわち、フェノタイプ (F, B, S1~S4)、または K4 数のジェノタイプとして表現される (K4 数 12~52, K4-2 数として 3~43 個)。K4 数が 22 以下 (フェノタイプ F, B, S1, S2 に相当) の小分子アポ(a) は血清濃度が高く危険因子性が強いとされている。分子サイズは血清濃度と負相関関係にあって、血清濃度の約 45% を規定するとされる。

5'側非コード領域は 5'フランキンク領域または非翻訳領域といわれ、転写活性を規制するプロモーター領域である。LPA 遺伝子、最初のエクソンから上流 1.3 kb の位置に 5 個のヌクレオチド TTTTA の繰り返し配列の多型性 (PNR: pentanucleotide repeat polymorphism) がある。PNR 数 (5~11) は血清濃度と負相関を示し 10~14% を規定するとされる⁴⁾。

最近、一塩基多型性 (SNP: single nucleotide polymorphism) の解析に興味がひかれている。プロテアーゼ部に血清濃度および虚血性心疾患と強

く関与する SNP (I4399M)⁵⁾、5'側非コード領域に血清濃度を増加させる SNP (G-21 A)、K4-8 域に Lp(a) 濃度を低下させる SNP (T3888P, G+1/in KIV-8 A) などが報告された⁶⁾。

Lp(a) の動脈硬化促進作用

1) 血栓形成とアテローム形成作用 (図 2)

動脈硬化形成の Ross の仮説がある。血管内皮細胞が傷害されると、血小板が凝集して組織を修復する。血小板が分泌する成長因子 (PDGF) が血管平滑筋細胞に働き、細胞は中膜から内膜へ遊走して脂肪を貪食し、泡沫細胞となり粥状動脈硬化巣 (アテローム) の形成に発展する。炎症反応として血管透過性の亢進が起き、単球は内皮細胞下に浸潤してマクロファージ化する。変性 LDL を取り込んで泡沫細胞化してアテロームを形成し、血管内膜は肥厚するというものである。

一方、内皮細胞や血小板からは潜在性トランスフォーミング・グロースファクター β (LTGF- β) が放出される。プラスミンにより活性化されて aTGF β となって平滑筋細胞の増殖を抑制する作用がある。

Lp(a) は PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) の産生を亢進する作用があり、プラスミン生成を抑制する⁷⁾。また Plg 活性を抑制する働きにより平滑筋細胞が増殖する。変性 LDL や酸化 Lp(a) はマクロファージに取り込まれ平滑筋細胞の泡沫化を亢進する。IL8 は遊走因子とされ動脈硬化亢進に向かうが、Lp(a) は IL8 の産生を亢進すると推測される⁸⁾。

2) Lp(a) 中の酸化リン脂質

Tsimikas らは酸化 LDL を測定する目的からモノクローナル抗体 E06 を用いて OxPL/apoB (LDL アポ B100 中の酸化リン脂質) を測定したところ、Lp(a) ときわめて高い相関性 ($r=0.85$) の成績を得た。さらに小分子アポ(a) とは強く相関 ($r=0.93$) した⁹⁾。E06 は、マロンジアルデヒド法の酸化 LDL に反応しないことが示されている。これはアポ(a) の K5 に結合する酸化ホスファチジルコリン (OxPC) であるとされ¹⁰⁾、Lp(a) そのものが酸化 LDL 様の危険性を有す驚くべき成績が提示された。

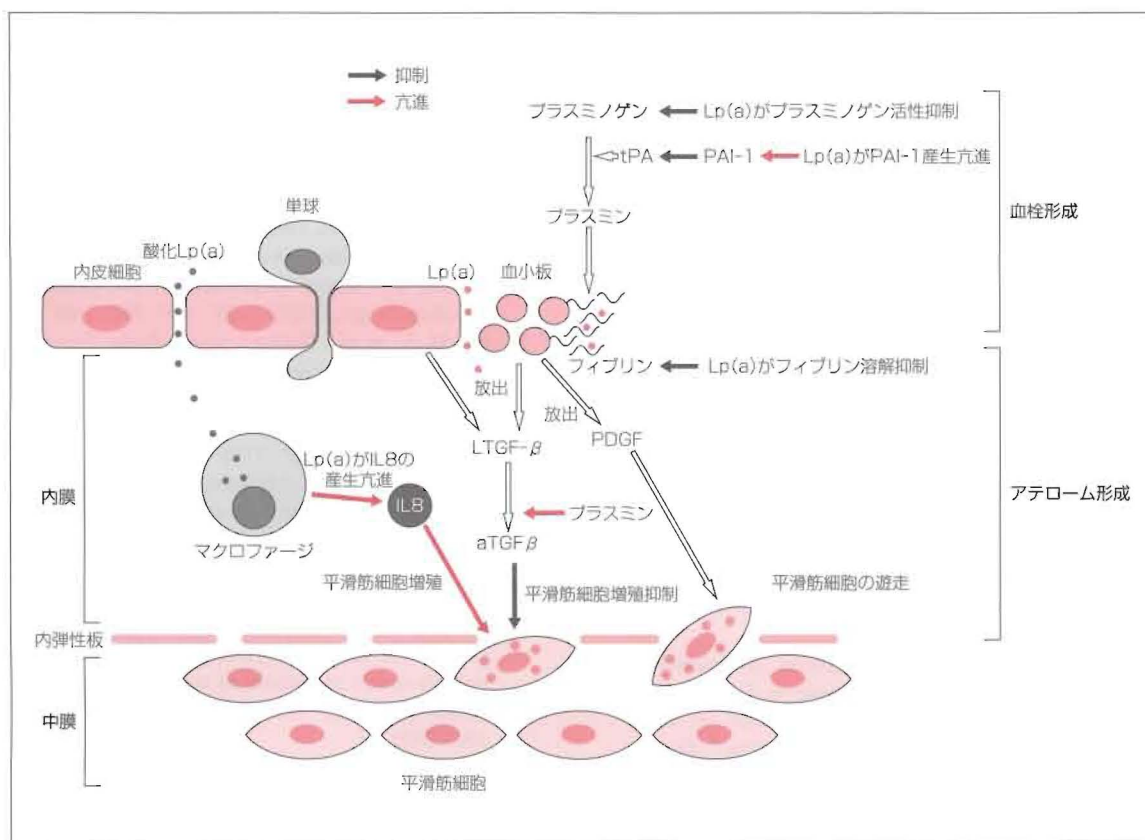


図 2 血管壁構造における Lp(a) の動脈硬化促進作用

炎症誘発性酵素とされるリボ蛋白質関連ホスホリパーゼ A₂ (Lp-PLA₂) の活性値は、前述の OxPL/apoB および Lp(a) と相関して虚血性心疾患のリスクマーカーとなることが示された¹¹⁾。Lp-PLA₂ は OxPC を酸化脂肪酸とリゾホスファチジルコリンに分解するが、リゾホスファチジルコリンは平滑筋細胞の遊走化を促進するとされる¹²⁾。

Lp(a) 測定法

血清 Lp(a) の定量はアポ(a) 抗体法が利用される。1995 年 IFCC の Lp(a) 測定標準化ワーキンググループの報告がある¹³⁾。16 社 22 の測定法を評価した結果、免疫比濁法「10」、免疫比ろ過法「8」、DELFI, ELISA 法など「4」である。わが国からは 3 社が参加し、すべて免疫比濁法であるが、うちラテックス・モノクローナル抗体法が 1 社である。全調査の CV 値は 6~31%と比べて

大きかったが、この原因は抗体エпитープに起因する誤差であると指摘された。モル表示の標準血清を用いて、K4-2 をエピトープにしないモノクローナル抗体法が推奨されている。

測定結果の判定

免疫比濁法による基準値は 14.1±16.0 mg/dl (中央値 11.5 mg/dl) である¹⁴⁾。臨床的にディシジョンレベル 30 mg/dl (72 mmol/l) が利用される。アポ(a) のフェノタイプあるいはジェノタイプ検査は臨床的意義を高めるので、定量リアルタイム PCR によるジェノタイプ迅速検査法¹⁵⁾の実用化に期待したい。

大規模な疫学調査にブルネック¹⁶⁾、コペンハーゲン¹⁷⁾、ボストン女性¹⁸⁾の調査がある。血清濃度 30 mg/dl 以上と小分子アポ(a) は虚血性心疾患の危険性が強く、LDL コレステロールの異常値と併せ

ると危険性がさらに増すとされる。

おわりに

Lp(a) はヒトと旧世界の霊長類に存在するリポ蛋白であり、虚血性心疾患の独立した危険因子であると認識される。その病因にアテローム形成と血栓形成の両面が考えられる。結果の判定にはホルモン分泌、糖尿病、腎疾患についても考慮しなければならない。Lp(a) 高脂血症の治療法は LDL アフェレーシスやニコチン酸（ナイアシン）投与の効果が認められている。

文献

- 1) Backer, L., Koschinsky, M. L., et al. : Identification of sequences in apolipoprotein (a) that maintain its closed conformation : a novel role for apo (a) isoform size in determining the efficiency of covalent Lp (a) formation. *Biochemistry*, **43** : 9978~9988, 2004.
- 2) Feric, N. T., et al. : Apolipoprotein (a) inhibits the conversion of Glu-plasminogen to Lys-plasminogen : a novel mechanism for lipoprotein (a)-mediated inhibition of plasminogen activation. *J. Thromb. Haemost.*, **6** : 2113~2120, 2008.
- 3) Utermann, G., et al. : Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp (a)-lipoprotein concentrations in plasma. *J. Clin. Invest.*, **80** : 458~465, 1987.
- 4) Trommsdorff, M., et al. : A pentanucleotide repeat polymorphism in the 5' control region of the apolipoprotein (a) gene is associated with lipoprotein (a) plasma concentrations in Caucasians. *J. Clin. Invest.*, **96** : 150~157, 1995.
- 5) Luke, M. M., et al. : A polymorphism in the protease-like domain of apolipoprotein (a) is associated with severe coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27** : 2030~2036, 2007.
- 6) Chretien, J. P., et al. : Three single-nucleotide polymorphisms in LPA account for most of the increase in lipoprotein (a) level elevation in African Americans compared with European Americans. *J. Med. Genet.*, **43** : 917~923, 2006.
- 7) Etingin, O. R., et al. : Lipoprotein (a) regulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. A potential mechanism in thrombogenesis. *J. Biol. Chem.*, **266** : 2459~2465, 1991.
- 8) Klezovitch, O., et al. : Stimulation of interleukin-8 production in human THP-1 macrophages by apolipoprotein (a). Evidence for a critical involvement of

elements in its C-terminal domain. *J. Biol. Chem.*, **276** : 46864~46869, 2001.

- 9) Tsimikas, S., et al. : Percutaneous coronary intervention results in acute increases in oxidized phospholipids and lipoprotein (a) : short-term and long-term immunologic responses to oxidized low-density lipoprotein. *Circulation*, **109** : 3164~3170, 2004.
- 10) Edelstein, C., et al. : The oxidized phospholipids linked to human apolipoprotein (a) do not derive from circulating low-density lipoproteins and are probably of cellular origin. *FASEB J.*, **23** : 950~956, 2009.
- 11) Kiechl, S., et al. : Oxidized phospholipids, lipoprotein (a), lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and 10-year cardiovascular outcomes : prospective results from the Bruneck study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **27** : 1788~1795, 2007.
- 12) Vickers, K. C., et al. : Relationship of lipoprotein-associated phospholipase A2 and oxidized low density lipoprotein in carotid atherosclerosis. *J. Lipid Res.*, **50** : 1735~1743, 2009.
- 13) Marcovina, S. M., et al. : Use of a reference material proposed by the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine to evaluate analytical methods for the determination of plasma lipoprotein (a). *Clin. Chem.*, **46** : 1956~1967, 2000.
- 14) Sakurabayashi, I., et al. : Reference intervals for serum apolipoproteins A-I, A-II, B, C-II, C-III, and E in healthy Japanese determined with a commercial immunoturbidimetric assay and effects of sex, age, smoking, drinking, and Lp (a) level. *Clin. Chim. Acta.*, **312** : 87~95, 2001.
- 15) Lanktree, M. B., et al. : Determination of lipoprotein (a) kringle repeat number from genomic DNA : copy number variation genotyping using qPCR. *J. Lipid Res.*, **50** : 768~772, 2008.
- 16) Tsimikas, S., et al. : Oxidized phospholipids predict the presence and progression of carotid and femoral atherosclerosis and symptomatic cardiovascular disease : five-year prospective results from the Bruneck study. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **47** : 2219~2228, 2006.
- 17) Kamstrup, P. R., et al. : Extreme lipoprotein (a) levels and risk of myocardial infarction in the general population : the Copenhagen City Heart Study. *Circulation*, **117** : 176~184, 2007.
- 18) Suk Danik, J., et al. : Lipoprotein (a), measured with an assay independent of apolipoprotein (a) isoform size, and risk of future cardiovascular events among initially healthy women. *JAMA*, **296** : 1363~1370, 2006.