
原 著

高リポ蛋白(a)血症に及ぼす aspirin の影響：アポリポ蛋白(a)アイソフォームとの関連

赤池 雅史, 東 博之, 香川 礼香, 金川 泰彦, 粟飯原 賢一,
松山 まどか, 井内 貴彦, 高森 信行, 吉田 智則, 松本 俊夫
徳島大学医学部第一内科学教室 (主任: 松本俊夫教授)

松本 和也

国立療養所徳島病院内科

林 郁郎

徳島県立中央病院循環器科

田村 克也

健康保険鳴門病院循環器科

西内 健

川島循環器クリニック

(平成11年3月10日受付)

我々は aspirin がアポリポ蛋白(a) [apo (a)] の転写活性を抑制することにより血中リポ蛋白(a) [Lp (a)] 濃度を低下させることを報告してきたが, 本研究では aspirin による血中 Lp (a) 濃度の低下効果と apo (a) アイソフォームとの関連を検討した。虚血性心疾患あるいは脳血管障害患者57例に aspirin 81mg/day を投与し, 免疫比濁法により血中 Lp (a) 濃度を測定し, イムノブロット法により apo (a) アイソフォームを判定した。血中 Lp (a) 濃度が30 mg/dl 以上の群では aspirin 投与後1カ月で血中濃度が約80%に低下し, この効果は6カ月後も持続していた。小分子量型やダブルバンド型の apo (a) アイソフォームを有する例では血中 Lp (a) 濃度が高値で, aspirin による血中濃度の低下が顕著である傾向がみられた。これらの apo (a) アイソフォームを有する例では apo (a) の転写効率が低いと考えられており, aspirin による apo (a) の転写抑制効果は apo (a) の転写効率が低い場合ほど顕著となる可能性が示された。

高リポ蛋白(a) [Lp (a)] 血症は冠動脈硬化症や脳梗塞などの動脈硬化性疾患における独立した危険因子の

一つである^{1,2)}。Lp (a) は高分子糖蛋白であるアポリポ蛋白(a) [apo (a)] が低比重リポ蛋白(LDL)類似粒子上に存在する apoB-100と S-S 結合した構造をしたリポ蛋白である³⁾。apo (a) はクリングル構造を最高37個まで多数繰り返して有しており, この繰り返しの数により分子量の異なるいくつかのアイソフォームが存在している⁴⁾。また, このクリングル構造はプラスミノゲンのクリングル4に75~85%の相同性を有しているため⁵⁾, Lp (a) はプラスミノゲンと競合することにより, プラスミノゲンの受容体への結合を抑制し, その結果, プラスミン産生を阻害すると考えられている⁶⁾。Lp (a) はこのような線溶系の活性化の抑制に加え, プラスミンの低下による transforming growth factor- β (TGF- β) の活性化の抑制や直接作用による血管平滑筋の増殖・遊走の促進, および動脈壁への沈着などによって, 動脈硬化症の発症・進展に重要な役割を果たしていると考えられている⁷⁻⁸⁾。

血中 Lp (a) 濃度は食事, 栄養, 薬剤などの環境因子の影響を受けにくく, コレスチラミン, プロブコール, HMG-CoA reductase 阻害薬, ベサフィブレートなどの高脂血症治療薬には反応しないことが示されている¹⁾。

ニコチン酸製剤は血中濃度を約30%低下させることが報告されているが¹⁾、副作用もあり長期投与が困難であることが多い。このような理由から高Lp(a)血症の治療は困難なことが多く、臨床上的大きな問題とされてきた。

我々はこれまでに高Lp(a)血症を伴う冠動脈疾患や糖尿病患者において aspirin が血中Lp(a)濃度を低下させることを見だし、apo(a)の転写活性の抑制がその機序であることを報告してきた⁹⁾。本研究の目的は aspirin が血中Lp(a)濃度に及ぼす影響を多数例で検討するとともに、aspirin 投与による血中Lp(a)濃度の変動と apo(a)アイソフォームとの関連性を明らかにすることである。

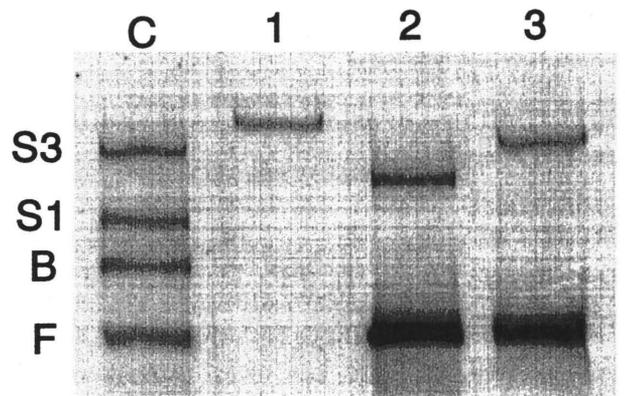
方 法

対象は虚血性心疾患患者および脳血管障害患者の計57例で、男性35例、女性22例、年齢は 64.1 ± 11.2 歳(mean \pm SD)である。不安定狭心症、急性心筋梗塞、発症1ヶ月以内の脳血管障害、血清CRP1.0mg/dl以上、血清クレアチニン2.0mg/dl以上の例は対象から除外した。また、対象例を血中Lp(a)濃度30 mg/dl未満の正常値群25例(男性15例、女性10例、年齢 63.8 ± 11.4 歳)と30 mg/dl以上の高Lp(a)血症群32例(男性20例、女性12例、年齢 66.6 ± 12.6 歳)の2群に分け比較検討した。

Aspirin は81mgを1日1回、朝食後に連日経口投与した。血中Lp(a)濃度は投与開始前、投与開始1カ月後、3カ月後および6カ月後に早朝空腹時に採血し血清を分離後、免疫比濁法により測定した。血中Lp(a)濃度の変化については aspirin 投与開始前の値を100%とし、これに対する比率で示した。また、apo(a)アイソフォームについては、血清を還元処理した後に5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写後、抗 apo(a)抗体(三和化学研究所)を用いたイムノプロット法で検出し判定した。apo(a)アイソフォームの分類は Utermann ら⁴⁾の方法に従い、アポB-100よりも早く泳動されるものをF、同じ泳動度のものをB、さらに早いものから順にS1、S2、S3およびS4とし、感度以下でバンドが検出できないものを null 型とした。また、これらのバンドを2本有するものをダブルバンド型、バンドを1本のみ認めるものをシングルバンド型とした(図1)。

血中Lp(a)濃度は mean \pm SD で表した。また、血中Lp(a)濃度の変化については paired t-test, シング

図1. Apo(a)アイソフォーム



C:標準血清. レーン1:S4型のシングルバンド型. レーン2:F型およびS2型のダブルバンド型, レーン3:F型およびS3型のダブルバンド型

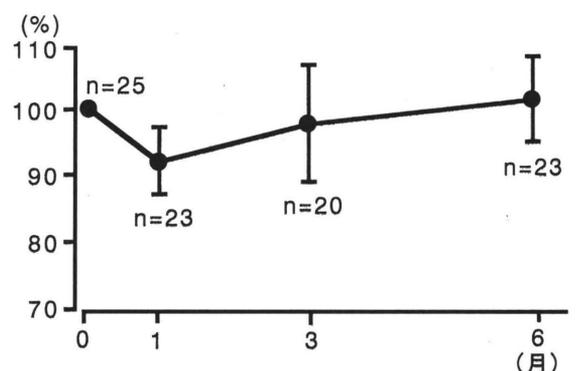
ルバンド型とダブルバンド型の血中Lp(a)濃度の比較については unpaired t-test を用い検定を行い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

結 果

1. 血中Lp(a)濃度に及ぼす aspirin の影響

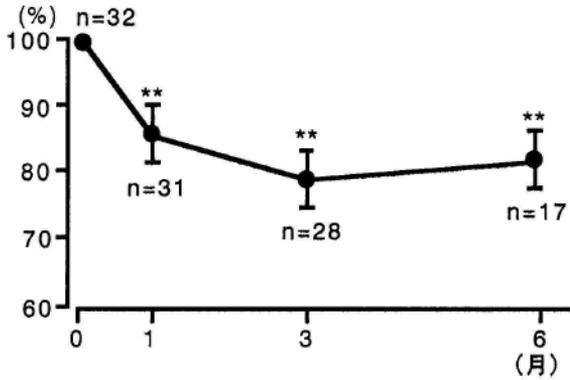
Aspirin 投与開始前の血中Lp(a)濃度は、正常値群では 13.2 ± 7.8 mg/dl ($n=25$)、高Lp(a)血症群では 64.0 ± 29.5 mg/dl ($n=32$)であった。Aspirin 投与開始後の血中Lp(a)濃度は正常値群では1カ月後 $91.3 \pm 24.3\%$ ($n=23$)、3カ月後 $97.5 \pm 42.6\%$ ($n=20$)、6カ月後 $104.1 \pm 33.8\%$ ($n=23$)と有意な変化が見られなかったのに対し(図2)、高Lp(a)血症群では1カ月後 86.1

図2. Aspirin 投与による血中Lp(a)濃度の変化(血中Lp(a)濃度正常値群)



aspirin 投与による血中Lp(a)濃度の変化は認められなかった。mean \pm SEM。

図3. Aspirin 投与による血中 Lp (a) 濃度の変化 (高 Lp (a) 血症群)



Aspirin 投与開始後1カ月で投与前の約80%に低下し、6か月後においてもこの効果が持続していた。mean±SEM。**P<0.01

±16.8% (n=31), 3か月後78.8±21.4% (n=28), 6か月後83.8±19.5% (n=17) といずれも有意 (p<0.01) に低下していた (図3)。

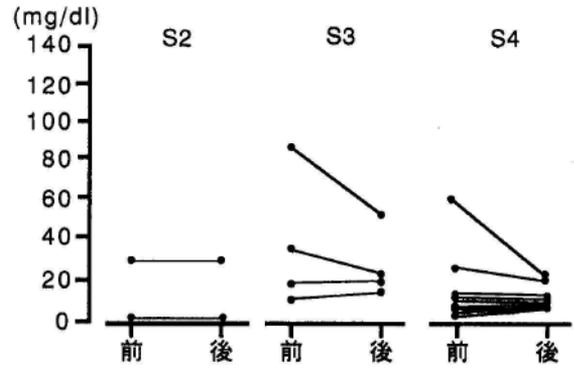
2. aspirin による血中 Lp(a)濃度の低下効果と apo(a) アイソフォームとの関係

シングルバンド型の血中 Lp (a) 濃度は22.3±24.0mg/dl (n=15) であったのに対し、ダブルバンド型では57.6±36.7mg/dl (n=23) と有意に高値であった (p<0.01)。Aspirin 投与開始後の血中 Lp (a) 濃度についてはシングルバンド型は98.3±41.2%と変化は見られなかったが、ダブルバンド型では89.0±19.2%と有意に低下していた (p<0.05)。

シングルバンド型では15例全例が分子量の大きい apo (a) アイソフォーム (S2型, S3型, S4型) を有していた。シングルバンド型では aspirin 投与により血中 Lp (a) 濃度が低下しない例が多かったが、一部の例 (15例中4例, 26.7%) では10 mg/dl 以上の低下を示し、これらの4例全例が高 Lp (a) 血症群であった (図4)。

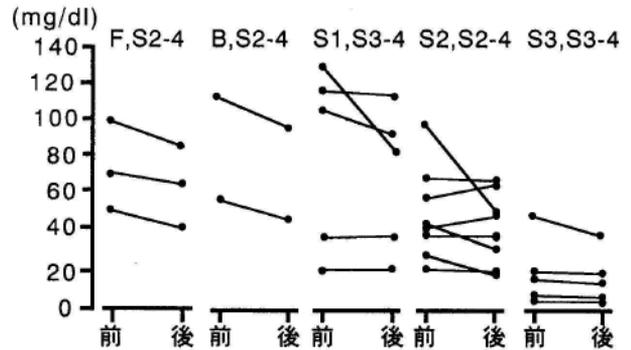
ダブルバンド型では分子量の小さい apo (a) アイソフォームを有する例が多く (23例中10例, 43.5%), これらのアイソフォームを有する10例中9例 (90.0%) が高 Lp (a) 血症群であった。また、ダブルバンド型の中で aspirin により10 mg/dl 以上の血中濃度の低下を示した例は、分子量の小さい apo (a) アイソフォームを有する群では10例中5例 (50.0%) であったのに対し、これらのアイソフォームを有さない群では13例中4例 (30.8%) であり、分子量の小さいアイソフォームを有

図4. Aspirin 投与前後の血中 Lp (a) 濃度の変化と apo (a) アイソフォームとの関係 (シングルバンド型)



血中 Lp (a) 濃度が低値で, aspirin 投与により血中濃度が変化しない例が多かった。

図5. Aspirin 投与前後の血中 Lp (a) 濃度の変化と apo (a) アイソフォームとの関係 (ダブルバンド型)



F型, B型, S1型などの分子量が比較的小さい apo (a) アイソフォームを有する例では血中 Lp (a) 濃度が高く, aspirin による血中濃度の低下が顕著である傾向がみられた。

する場合に aspirin による血中濃度の低下が顕著である傾向がみられた (図5)。

考 察

本研究では冠動脈疾患や脳梗塞を有する高 Lp (a) 血症患者において, 少量の aspirin 投与により血中 Lp (a) 濃度が前値の約80%に低下することが示された。この低下効果は投与開始1か月後で見られ, 6か月後においても持続していた。血中 Lp (a) 濃度の大部分は遺伝的に規定され¹⁰⁾, その血中濃度は主として肝臓での apo (a) の mRNA の発現量に依存しているとされている^{11,12)}。我々はヒト培養肝細胞を用いた検討により, aspirin が培養液中の apo (a) 濃度や肝細胞での apo (a) の mRNA

の発現を減少させることを報告している⁹⁾。さらに HepG2 hepatoma cell に apo (a) 遺伝子のプロモーターを導入した luciferase reporter assay¹⁴⁾により, aspirin が濃度依存的に apo (a) 遺伝子の転写活性を抑制することを見いだした⁹⁾。このような基礎的検討の結果から, aspirin による血中 Lp (a) 濃度の低下効果は主として apo (a) の転写活性の抑制によるものであると考えられる。

今回の検討では F 型, B 型, S1 型など分子量の小さい apo (a) アイソフォームを有する例やダブルバンド型の例において血中 Lp (a) 濃度が高値の例が多かった。Boerwinkle によると血中 Lp (a) 濃度を決定する因子のうち約90%は apo (a) の遺伝的因子であり, その中でクリングル4をコードするエクソンの数, すなわちクリングル4の繰り返し数によって規定される部分が78%を占めるとされる¹⁰⁾。従来報告においても我々の成績と同様に, クリングル4の繰り返し数, すなわち apo(a) の分子量と血中 Lp (a) 濃度が負の相関関係にあることが示されている^{4, 15)}。また, ダブルバンド型では Lp(a) の血中濃度が高値で, 虚血性心疾患の重症度と関係が深いことが報告されている¹⁶⁾。このような apo (a) アイソフォームと aspirin による血中 Lp (a) 濃度の低下効果との関連を検討すると, 分子量の小さいアイソフォームやダブルバンド型のアイソフォームを有する例では aspirin による血中 Lp (a) 濃度の低下効果が顕著となる傾向が見られた。このような apo (a) アイソフォームを有する例では一般に apo (a) の転写効率が高く mRNA 量が多いと考えられる。すなわち, aspirin による apo (a) の転写活性の抑制効果は apo (a) の転写効率と関連しており, apo (a) の転写効率が高い場合ほどその抑制効果が大きくなり, 血中 Lp (a) 濃度の低下が顕著となる可能性がある。

一方, 今回の研究では, 分子量の大きい apo (a) アイソフォームを有しているにもかかわらず血中 Lp (a) 濃度が高く, aspirin により血中 Lp (a) 濃度が低下した例が一部にみられた。血中 Lp (a) 濃度の規定因子としては, 上述の apo (a) のクリングル構造の繰り返し数の他に, apo (a) 遺伝子プロモーターの多型が一部関与していることが報告されている^{17, 18)}。例えば, apo (a) 遺伝子プロモーター領域の-1373塩基の5塩基 (TTTA) 繰り返し数は apo (a) の転写活性に影響し, 繰り返し数と血中 Lp (a) 濃度の間には負の相関関係がある¹⁷⁾。また, apo (a) 遺伝子プロモーター領域の

-914, -49, および-21塩基における点変異が血中 Lp (a) 濃度と関係していることが最近明らかとなった¹⁸⁾。aspirin による血中 Lp (a) 濃度の低下効果にはこのような apo (a) 遺伝子プロモーターの多型も関係している可能性があり, 今後検討が必要である。

Aspirin は狭心症, 心筋梗塞, 脳梗塞などの動脈硬化性疾患の発症, 再発の予防に幅広く使用されてきたが, その効果は主として血小板凝集阻害作用によるものと考えられてきた¹⁹⁾。しかしながら, 最近, aspirin は nuclear factor-kB や activator protein 1 などの転写因子活性を阻害することが明らかとなり^{20, 21)}, 血小板凝集阻害作用とは全く異なるこれらの作用が動脈硬化性疾患における aspirin の治療効果をもたらしている可能性が指摘されている。今回の研究において認められた血中 Lp (a) 濃度の低下効果も aspirin が持つ多彩な作用のひとつであり, 抗動脈硬化作用を示す上で重要な因子となっていると考えられる。

謝 辞

症例のフォローアップにご協力をいただきました, 徳島県立中央病院循環器科の山口普史先生, 健康保険鳴門病院循環器科の松本直也先生, 岡崎誠司先生, 橋詰俊二先生, 川島循環器クリニックの木村建彦先生, 加藤みどり先生に深謝致します。

文 献

- Stein, J. H., Rosenson, R. S.: Lipoprotein Lp(a) excess and coronary heart disease. Arch. Intern. Med., 157: 1170-1176, 1997
- Djurovic, S., Berg, K.: Epidemiology of Lp(a) lipoprotein: its role in atherosclerotic/thrombotic disease. Clin. Genet., 52: 281-292, 1997
- Utermann, G.: The mysteries of lipoprotein(a) Science, 246: 904-910, 1989
- Utermann, G., Menzel, H. J., Kraft, H. G., Duba, H. C., et al.: Lp(a) glycoprotein phenotypes. Inheritance and relation to Lp(a)-lipoprotein concentration in plasma. J. Clin. Invest., 80: 458-465, 1987
- McLean, J. W., Tomlinson, J. E., Kuang, W. J., Eaton, D. L., et al.: cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. Nature, 330:

- 132-137, 1987
6. Miles, L. A., Fless, G. M., Levin, E. G., Scanu, A. M., et al.: A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein(a). *Nature*, **339** : 301-303, 1989
 7. Grainger, D. J., Kemp, P. R., Liu, A. C., Lawn, R. M., et al.: Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature*, **370** : 460-462, 1994
 8. Grainger, D. J., and Metcalfe, J. C.: Transforming growth factor-beta: the key to understanding lipoprotein (a)? *Curr. Opin. Lipidol.*, **6** : 81-85, 1995
 9. 渡辺礼香, 東 博之, 赤池雅史, 重清俊雄 他: Apo (a) 遺伝子の転写活性に及ぼすアスピリンの影響に関する検討. *日本臨床代謝学会記録*, **35** : 37, 1998
 10. Boerwinkle, E.: Genetics of plasma lipoprotein(a) concentrations. *Curr. Opinion. Lipidol.*, **3** : 128-136, 1992
 11. Rader, D. J., Cain, W., Ikewaki, K., Talley, G., et al: The inverse association of plasma lipoprotein(a) concentrations with apolipoprotein(a) isoform size is not due to differences in Lp(a) catabolism but to differences in production rate. *J. Clin. Invest.*, **93** : 2758-2763, 1994
 12. Rader, D. J., Cain, W., Zech, L. A., Usher, D., et al: Variation in lipoprotein(a) concentrations among individuals with the same apolipoprotein(a) isoform is determined by the rate of lipoprotein(a) production. *J. Clin. Invest.*, **91** : 443-447, 1993
 13. Wade, D. P., Knight, B. L., Harders-Spengel, K., and Soutar, A. K. : Detection and quantitation of apolipoprotein(a) mRNA in human liver and its relationship with plasma lipoprotein(a) concentration. *Atherosclerosis*, **91** : 63-72, 1991
 14. Azuma, H., Yamaguchi, H., Mima, N., Shirakawa, M., et al: An in vitro system for identifying agents capable of changing serum lipoprotein(a) concentration by regulating the transcriptional activity of the apolipoprotein(a) gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **227** : 570-575, 1996
 15. Menzel, H. J., et al.: Genetic polymorphism of lipoprotein(a). In: *Cholesterol transport systems and their relation to atherosclerosis* (Steinmetz, A., eds), Springer-Verlag, Berlin, 1989, pp. 64
 16. Abe, A., Noma, A., Lee, Y. J., and Yamaguchi, H.: Studies on apolipoprotein(a) phenotypes: Part 2 : Phenotypes frequencies and Lp(a) concentrations in different phenotypes in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Atherosclerosis*, **96** : 9-15, 1992
 17. Wade, D. P., Clark, J. G., Lindahl, G. E., Liu, A. C., et al.: 5' control regions of the apolipoprotein(a) gene and members of the related plasminogen family.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **90** : 1369-1373, 1993
 18. Ichinose, A., and Kuriyama, M.: Detection of polymorphisms in the 5'-flanking region of the gene for apolipoprotein(a). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **209** : 372-378, 1995
 19. Patrono, C.: Aspirin as an antiplatelet drug. *N. Eng. J. Med.*, **330** : 1287-1294, 1994
 20. Kopp, E., and Ghosh, S.: Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*, **265** : 956-959, 1994
 21. Dong, Z., Huang, C., Brown, R. E., and Ma, W. Y.: Inhibition of activator protein 1 activity and neoplastic transformation by aspirin. *J. Biol. Chem.*, **272** : 9962-9970, 1997

Effect of aspirin treatment on serum levels of lipoprotein (a) : analysis from the apolipoprotein (a) isoforms

Masashi Akaïke, Hiroyuki Azuma, Ayako Kagawa, Yasuhiko Kanagawa, Kenichi Aihara, Madoka Matsuyama, Takahiko Iuchi, Nobuyuki Takamori, Tomonori Yoshida, and Toshio Matsumoto

*First Department of Internal Medicine, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima
(Director : Prof. Toshio Matsumoto)*

Kazuya Matsumoto

Department of Internal Medicine, National Sanatorium Tokushima Hospital, Tokushima

Ikuro Hayashi

Department of Cardiology, Tokushima Prefectural Central Hospital, Tokushima

Katsuya Tamura

Department of Cardiology, Health Insurance Naruto Hospital, Tokushima

Takeshi Nishiuchi

Kawashima Cardiovascular Clinic, Tokushima

SUMMARY

We have found that aspirin lowers elevated serum lipoprotein(a) [Lp(a)] levels via reduction of the transcriptional activity of apolipoprotein(a) [apo(a)] gene with suppression of apo(a) mRNA expression. In the present study, we evaluated the effect of aspirin treatment on serum Lp(a) level and analyzed its relation to type of apo(a) isoform. Serum levels of Lp(a) were measured by turbidimetric immunoassay before and after the oral administration of aspirin therapy (81 mg/day) in 57 patients with coronary artery disease or cerebral infarction. Apo(a) isoforms were determined by immunoblotting method. In patients with high serum Lp(a) levels (more than 30 mg/dl), aspirin reduced serum Lp(a) levels to approximately 80 % of the baseline after one month. Their levels sustained significantly low even after six months. The effect of aspirin in reducing elevated serum Lp(a) levels were stronger in patients with smaller-sized type or double-band type of apo(a) isoforms. The transcriptional efficiency of apo(a) gene is thought to be increased in patients with these apo(a) isoforms. Therefore, these findings suggest that aspirin reduces apo(a) gene transcription preferentially in patients with high transcriptional efficiency of this gene.

Key words : lipoprotein (a), apolipoprotein (a), aspirin, apo(a) isoform, Lp(a) phenotype