

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590863
 研究課題名 (和文) 血管内皮リパーゼを標的としたメタボリックシンドロームの病態解明
 と新規治療法の開発
 研究課題名 (英文) Role of endothelial lipase in metabolic syndrome

研究代表者

平田 健一 (HIRATA KEN-ICHI)
 神戸大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：20283880

研究成果の概要：

本研究では、血管内皮リパーゼ (EL) がメタボリックシンドロームにおける低 HDL 血症にはたす役割を検討した。インスリン抵抗性のモデルである db/db マウスでは肝臓における EL 発現が増加しており低 HDL-C 値と脂肪肝の原因となることが示された。また、ヒト血中 EL 濃度は血清 HDL-C 値と有意に逆相関したが、LDL-C、中性脂肪値とは相関関係はなかった。ヒトで EL を不活性化すると HDL のみが選択的に上昇することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床系・血管病態学

キーワード：(1)脂質 (2)糖尿病 (3)蛋白質 (4)循環器・高血圧 (5)臨床

1. 研究開始当初の背景

生活習慣の欧米化に伴いメタボリックシンドロームが増加し、急性心筋梗塞や脳卒中などアテローム血栓症の危険因子として注目されている。メタボリックシンドロームの脂質代謝異常として、低 HDL コレステロール (HDL-C) 血症がアテローム血栓症の発症に重要であるが、その成因は不明である。また、現在 HDL-C を増加させる有効な治療法がなく、解決すべき重要な研究課題である。

申請者のグループが同定した血管内皮リパーゼ (endothelial lipase; EL) は生体内に

における HDL-C の重要な規定因子である。私達の研究結果から、EL は HDL を低下させ、炎症反応を増強することで動脈硬化性血管病変を促進すると考えられる。

以上の点から、メタボリックシンドロームで生じる内臓脂肪の蓄積やインスリン抵抗性の成因として EL が関与している可能性が考えられる。また、メタボリックシンドロームの血管病変や脂肪蓄積における EL の意義を明らかにすることは虚血性心疾患、脳卒中の治療概念を構築する上で重要な位置付けにあると思われる。

2. 研究の目的

本研究では、EL がメタボリックシンドロームにおける低 HDL 血症を中心とした脂質代謝異常および虚血性心疾患や脳卒中などのアテローム硬化症の発症にはたす役割を明らかにし、急性心筋梗塞や脳卒中の新しい予防法、治療法の手がかりを得ることを目的にする。また、メタボリックシンドロームの基本病態に重要な内臓脂肪の蓄積やそれに伴う脂肪肝の成因にはたす役割を明らかにする。本研究が達成されることにより、EL がメタボリックシンドロームを基盤とするアテローム硬化症の成因に果たす役割を解明し、EL をターゲットとする高脂血症、動脈硬化の予防法、治療法の手がかりを見つける。

3. 研究の方法

(1) メタボリックシンドロームの脂質代謝異常への EL の関与の検討

メタボリックシンドロームでは内臓脂肪満に基づき、高血圧や糖代謝異常に加えて、低 HDL、高 TG 血症など脂質代謝異常を合併し、動脈硬化の原因として重要であると考えられている。そこで、インスリン抵抗性を生じるモデルマウスである db/db マウスや ob/ob マウスの各臓器、脂肪組織、血管における EL の発現を検討する。そして、これらのマウスと EL ノックアウトマウスを交配し、普通食または高脂肪食で飼育する。これらのモデルにおけるリポタンパク質を生化学的に解析し、これらの病態における EL の役割を検討する。さらに、肝臓における TG の蓄積および脂肪肝を組織学的に検討する。

(2) ウサギを用いた EL の脂質代謝への影響の検討

ヒトとマウスでは脂質代謝が大きく異なることから、ヒトに比較的近いモデルであるウサギをもちいて EL の機能を検討する。EL をアデノウイルスを用いてウサギに遺伝子導入し、過剰発現させる。EL の発現亢進が血清 HDL や他のリポ蛋白に及ぼす影響を解析する。

(3) メタボリックシンドロームの脂質代謝異常への EL の関与の検討

メタボリックシンドロームでは内臓脂肪満に基づき、高血圧や糖代謝異常に加えて、低 HDL、高 TG 血症など脂質代謝異常を合併し、動脈硬化の原因として重要であると考えられている。そこで、ヒト血清中の EL 濃度を測定し、メタボリックシンドロームの脂質代謝異常（低 HDL、高 TG 血症）との相関関係を解析する。すなわち、メタ

ボリックシンドロームにみられる低 HDL 血症と血清 EL 濃度とが直接関連しているかを明らかにする。

(4) マクロファージに対する炎症性刺激における EL の役割の解明

メタボリックシンドロームは脂肪組織におけるマクロファージ浸潤がみられ一種の炎症性疾患であるという一面をもつ。そこで、EL 欠損マウスおよび野生型マウスより腹腔マクロファージを培養しリポポリサッカライド (LPS) で刺激し、EL 発現や LDL の取込みを評価した。

4. 研究成果

(1) メタボリックシンドロームに合併する脂質代謝異常における EL の役割

メタボリックシンドロームでは内臓脂肪満に基づき、低 HDL、高 TG 血症などの脂質代謝異常を合併し、動脈硬化を促進する。そこで、インスリン抵抗性のモデルである db/db マウスにおいて EL の発現を real-time PCR で検討した。db/db マウスでは肝臓における EL 発現が野生型マウスに比べて増加していた。肝臓における EL 発現増加の意義を明らかにするために、アデノウイルスベクターに組込んだヒト EL を db/db および野生型マウスに遺伝子導入し、肝臓に EL を強発現させた。肝臓における EL を強発現は、血清 HDL-C 値と血清中性脂肪値を低下させるとともに、肝臓の重量と中性脂肪含量を増加させた。とくに、db/db マウスでは肝臓に EL を強発現は、脂肪酸合成酵素の発現を亢進し、脂肪肝を増悪させた。以上のことから、メタボリックシンドロームやインスリン抵抗性の状態では肝臓における EL 発現が亢進しており、肝臓への脂肪の取込みを促進し脂肪肝の原因と成ることが示唆された。この作用はとくに db/db マウスにおいて著しいことから、EL はメタボリックシンドロームにおける低 HDL 血症と脂肪肝の原因分子として機能していることが明らかとなった。

(2) ウサギを用いた EL の脂質代謝への影響の検討

ヒトに比較的近い脂質代謝機構をもつウサギをもちいて EL の機能を検討した。EL をアデノウイルスを用いてウサギの肝臓に遺伝子導入し過剰発現させたところ、血清 HDL-C が有意に 20% 低下した。EL 過剰発現は、LDL-C や中性脂肪には影響を及ぼさなかった。マウスでの EL の不活性化は HDL のみならず LDL も上昇させたが、ウサ

ギで EL を過剰発現させると HDL-C 値のみが影響をうけた。マウス、ヒト、ウサギより、HDL と LDL を単離し、EL の酵素作用を調べたところ、ヒト EL はヒトとウサギの HDL のみに作用したが、ヒトとウサギの LDL には作用しなかった。一方、ヒト EL はマウス HDL とマウス LDL 両方に作用した。すなわち、ヒトで EL を不活性化/発現亢進すると HDL のみが選択的に上昇/低下することが示唆された。

(3) メタボリックシンドロームの脂質代謝異常への EL の関与の検討

ヒト血中 EL 濃度は血清 HDL-C 値と有意に逆相関したが、総コレステロール、LDL コレステロール、中性脂肪値とは相関関係はなかった。血清 EL 濃度は年齢や性別による差は認めなかった。高脂血症患者におけるビタバスタチン投与後の血中 EL 濃度は、投与前に比べて 15%低下すると同時に、血清 HDL-C 値は 12%上昇した。

すなわち、EL はヒトにおいても血清 HDL-C 値の制御因子であり、低 HDL-C 血症の原因であることが示唆された。また、EL 発現を低下させると血清 HDL-C 値が上昇することが示された。

(4) マクロファージに対する炎症性刺激における EL の役割の解明

LPS はマクロファージにおける EL 発現と NADPH oxidase の発現を亢進させ、native LDL の取込みを促進した。LPS による EL と NADPH oxidase の発現亢進は TLR4 欠損マクロファージでは認められず、ラジカルスカベンジャーである N-acetylcystein などによって抑制されることから、TLR4 と酸化ストレスを介するものであった。また、EL 欠損マクロファージでは native LDL の取込みが減弱していた。さらに、LPS による EL 発現と native LDL の取込みはシンバスタチンにより抑制された。以上より、マクロファージにおける EL は炎症刺激によって発現が増加し、酸化ストレスを介してコレステロールの取込みを促進することが明らかとなった

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Hara T, Ishida T, Cangara HM, Hirata K. Endothelial cell-selective adhesion molecule regulates albuminuria in

- diabetic nephropathy. *Microvasc Res.* In press. 査読あり
2. Tanaka H, Ishida T, Johnston TP, Kojima Y, Yasuda T, Kundu RK, Quertermous T, Hirata K. Role of endothelial lipase in low HDL levels in a murine model of hypertriglyceridemia. *J Atheroscler Thromb.* In press. 査読あり
3. Sun L, Ishida T, Yasuda T, Kuriyama M, Kojima Y, Yamamoto Y, Yamamoto H, Ishibashi S, Hirata K, Hayashi K. RAGE mediates oxidized LDL-induced pro-inflammatory actions and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 2009 May 1;82(2):371-81. 査読あり
4. Otera H, Ishida T, Nishiuma T, Kobayashi K, Kotani K, Yasuda T, Kundu RK, Quertermous T, Hirata K, Nishimura Y. Targeted inactivation of endothelial lipase attenuates lung allergic inflammation through raising plasma HDL level and inhibiting eosinophil infiltration. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2009 Apr;296(4):L594-602.. 査読あり
5. Fujii H, Fukuda A, Tanaka M, Kojima Y, Ishida T, Hirata K, Fukagawa M. Putative role of endothelial lipase in dialysis patients with hypoalbuminemia and inflammation. *Am J Nephrol.* 2008;28(6):974-81. 査読あり
6. Yasuda T, Hirata K, Ishida T, Kojima Y, Tanaka H, Okada T, Quertermous T, Yokoyama M. Endothelial lipase is increased by inflammation and promotes LDL uptake in macrophages. *J*

Atheroscler Thromb. 2007 14(4):192-201,
査読あり

7. Shimizu M, Kanazawa K, Hirata K, Ishida T, Hiraoka E, Matsuda Y, Iwai C, Miyamoto Y, Hashimoto M, Kajiya T, Akita H, Yokoyama M. Endothelial lipase gene polymorphism is associated with acute myocardial infarction, independently of high-density lipoprotein-cholesterol levels. *Circ J*. 2007 Jun;71(6):842-6. 査読あり
8. Shimamura M, Matsuda M, Yasumo H, Okazaki M, Fujimoto K, Kono K, Shimizugawa T, Ando Y, Koishi R, Kohama T, Sakai N, Kotani K, Komuro R, Ishida T, Hirata K, Yamashita S, Furukawa H, Shimomura I. Angiotensin-like protein3 regulates plasma HDL cholesterol through suppression of endothelial lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 27(2):366-72. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

1. Sun L, Ishida T, Kuriyama M, Yasuda T, Hara T, Hirata K, Hayashi Y. Targeted inactivation of receptor for advanced glycation products reduced oxidative LDL-induced inflammation and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor^{-/-} mice. American Heart Association Scientific Sessions 2008. 2008. 11. 11 New Orleans, LA
2. Sun Li, Tatsuro Ishida, Yoko Kojima, Tomoyuki Yasuda, Akira Fukuda, Fumie Kureha, Ken-ichi Hirata. Effect of pitavastatin on serum concentrations of endothelial lipase and high-density

lipoprotein cholesterol in humans. American Heart Association Scientific Sessions 2008. 2008. 11. 10 New Orleans, LA

3. Tatsuro Ishida, Hiroshi Otera, Tomoyuki Yasuda, Yoshihiro Nishimura, Ken-ichi Hirata. Targeted Deletion Of Endothelial Lipase Protects Against Allergic Asthma Through Raising Plasma HDL Level And Attenuating Eosinophil Infiltration. American Heart Association Scientific Sessions 2008. 2008. 11. 10 New Orleans, LA
4. 石田達郎、福田亨、児島陽子、安田知行、平田健一. 血管内皮リパーゼの血中濃度と血清HDL値との関係. 第 105 回日本内科学会講演会 2008. 4. 11 東京
5. Li S, Ishida T, Kuriyama M, Yasuda T, Hara T, Hayashi Y, Hirata K. RAGE Deficiency Inhibit the Atherosclerosis Progression in non diabetic Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice. 第 72 回 日本循環器学会総会・学術集会 2008. 3. 28 福岡
6. Fukuda A, Ishida T, Yasuda T, Hirata K. Endothelial Lipase is a Key Molecule of Postprandial Hypertriglycemia in Mice. 第 72 回 日本循環器学会総会・学術集会 (JCS2008) 2008. 3. 28 福岡
7. Yasuda T, Ishida T, Okada T, Fukuda A, Hara T, Inoue M, Kureha F, Hirata K. Endothelial lipase selectively regulates HDL metabolism in rabbits. 第 72 回 日本循環器学会総会・学術集会 (JCS2008) 2008. 3. 28 福岡
8. Yasuda T, Ishida T, Kojima Y, Tanaka H, Okada T, Fukuda A, Hara T, Inoue M,

Hirata K. Overexpression of endothelial lipase in the liver promotes the clearance of plasma lipids but accelerates liver steatosis in a mouse model of metabolic syndrome. American Heart Association Scientific Sessions 2007. 2007.11.10. Chicago, IL

9. 安田知行、平田健一、石田達郎、福田亨. 炎症により発現したLDL受容体はマクロファージにおいて中性脂肪優位リポ蛋白の取り込みに重要である. 第39回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2007.7.13 大阪.
10. 石田達郎、安田知行、福田亨、平田健一. Role of endothelial lipase in the HDL-raising effects of statins. 第40回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2008.7.11 つくば

[図書] (計4件)

1. 石田達郎、平田健一. 先端医学社. DATA UPDATE循環系 第4版. 「JELIS」 2009. Pp354-355.
2. 石田達郎、平田健一. 文光堂. 新・心臓病診療プラクティスシリーズ 12 冠動脈疾患の病態に迫る「高LDLコレステロール血症/低HDLコレステロール血症の関与」 2008. pp40-46.
3. 原哲也、石田達郎、平田健一. 先端医学社. β 遮断薬のすべて 第3版. 「 β 遮断薬の血管・血管内皮に対する作用」 2008. pp95-100.
4. 石田達郎、横山光宏. 南江堂. 循環器疾患最新の治療 2008-2009 「冠動脈疾患と抗血小板療法」 2008. pp99-102.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 健一 (HIRATA KEN-ICHI)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号 20283880

(2) 研究分担者

石田 達郎 (ISHIDA TATSURO)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号 00379413

(3) 連携研究者

なし