

機関番号：14501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008 年度 ～ 2010 年度
 課題番号：20590825
 研究課題名（和文） 血管内皮リパーゼによる血清 HDL コレステロール値の制御と生活習慣の関連性の検討
 研究課題名（英文） Role of endothelial lipase in serum HDL cholesterol level and life style
 研究代表者
 石川 雄一 （ISHIKAWA YUICHI）
 神戸大学・大学院保健学研究科・名誉教授
 研究者番号：90159707

研究成果の概要（和文）：

高比重リポ蛋白コレステロール（HDL-C）は、動脈硬化の進展に対して防衛的に作用する。血管内皮リパーゼ（EL）は血清HDL値の規定因子である。本研究では、ヒト血中のEL濃度と血清HDL値との関係を検討した。ヒト血清EL濃度は血清HDL-C値と有意な逆相関関係を示したが、血清LDL-C濃度や中性脂肪濃度とは関連がなかった。ピタバスタチンは血清HDL-C値を増加させ、血清EL濃度を減少させた。また、ヒト血中EL活性は血清HDL-C値と有意な逆相関関係を示した。さらに、冠動脈疾患患者や喫煙者では、血清EL活性が上昇していた。一方、生活習慣病にみられる低HDL血症モデル動物でELを阻害することによりHDL値が上昇した。以上より、ヒトでもELが血清HDL-C値の規定因子であり、ELを阻害することによりHDL上昇が期待できる事が示された。

研究成果の概要（英文）：

High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) is a negative risk factor for atherosclerosis. Endothelial lipase (EL) is a regulator of plasma HDL levels. This study was undertaken to clarify the role of EL in serum HDL-C level and life style. Serum EL protein levels were inversely correlated with serum HDL-C levels. Pitavastatin decreased EL levels and increased HDL levels. Serum EL activity was inversely correlated with serum HDL-C levels, and higher in patients with coronary artery disease compared to control subjects. In animal models of low HDL levels, inhibition of EL resulted in a raise in plasma HDL-C levels. Thus, EL is a determinant of plasma HDL levels in humans, and EL inhibition would be useful for HDL-raising therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：脂質代謝、高比重リポ蛋白、血管内皮リパーゼ、動脈硬化、生活習慣病、循環器

1. 研究開始当初の背景

高比重リポ蛋白コレステロール

(HDL-C)は善玉コレステロールとも呼ばれ、コレステロール逆転送系において中

心的役割を果たしており、動脈硬化に対する新たな治療標的として注目されている。ヒトにおける HDL 値の約 50%は遺伝的に決定されていることが知られているが、HDL 値に影響を及ぼす病態や生活習慣とその機序は十分に解明されていない。

近年我々は、血管内皮細胞から新規のリパーゼ分子である血管内皮リパーゼ (Endothelial lipase; EL) を単離同定した。EL はホスホリパーゼ A1 活性を有し、HDL のリン脂質を分解する。EL の発現量は炎症性サイトカインや酸化 LDL、血管壁への物理的ストレスなどの生活習慣病に関連する刺激により大きく増強する。我々は、EL の遺伝子改変マウスを作成しその血清脂質を解析することによって、少なくともマウスにおいては EL が血清 HDL 値の主要な規定因子であることを明らかにした。すなわち、マウスの生体内において EL の発現が増加することは直接血清 HDL 値の減少をもたらす、EL を不活性化することは、血清 HDL 値を上昇させるのである。

このように、遺伝子改変動物を用いた知見からは、ヒトにおいても同様に EL の発現が種々の生活習慣に関連する因子によって制御され、結果的に血清 HDL 値に影響を及ぼしていることが推察される。しかし、EL のヒト血中濃度の測定系は確立されておらず、EL がヒトにおいても血清 HDL 値の規定因子であるのかは明らかではない。また、生体内でどのような生活習慣や病的要因が EL の発現に影響を及ぼしているのかも明らかではない。したがって、EL を分子標的として HDL 値の制御機構を明らかにすることは、善玉コレステロールに影響を及ぼす病態や生活習慣を解明する上で極めて重要で意義深いものであると考えられる。ヒトの HDL を制御する生活習慣としては、喫煙や運動、飲酒などが知られているが、これらの因子がどのように HDL を上昇させるのか、そこに EL はどの程度関与しているのかは不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト血中の EL 濃度を測定し、血清 HDL 値との関係を明らかにすること、さらに性別や年齢などの遺伝的背景、肥満、喫煙、運動などの生活習慣における HDL 値と EL との関係を解析することにある。このような解析を重ねることにより、長期的には善玉コレステロールを上昇させる生活習慣や生理的因子を明らかにし、健康増進に広く活用することを目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 血清 EL 濃度と HDL 値の関係の検討

神戸大学医学部附属病院循環器内科においてインフォームドコンセントの得られた通院または入院患者から血液を採取し、我々の作成したヒト EL に対する 2 種類のモノクロナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法によって、ヒト血漿中の EL 濃度を測定した。標準蛋白として、COS 細胞における強制発現系より精製したヒト EL 蛋白を使用した。

血清糖脂質の生化学的解析を行い、血中 EL 濃度との関係を検討する。

- ① 遺伝的背景：性別、年齢、家族歴など
- ② 生活習慣：肥満、喫煙、運動、飲酒、ストレス、嗜好品など
- ③ 疾患背景：糖尿病(耐糖能異常)、高脂血症、高血圧、狭心症/心筋梗塞、脳卒中など
- ④ 薬物の効果：スタチン、フィブレート、ビオグリタゾン、ニコチン酸、プロブコール、等をもちいて治療を行った症例について血中 EL 値と血清 HDL 値との関連性を解析した。

(2) 低 HDL 血症動物を用いた検討

- ① 高 LDL 血症に合併する低 HDL 血症における EL の関与

野生型 C57BL6 マウスに高脂肪食を投与することにより高脂血症を作成した。また、遺伝性高脂血症のモデルである LDL 受容体欠損マウスに通常食および高脂肪食を負荷した。これらの高脂血症マウスの摘出臓器における EL の発現を検討する。

つぎに、EL 遺伝子改変(欠損および過剰発現)マウスを、高 LDL 血症とともに低 HDL 血症を呈する LDL 受容体欠損マウスと交叉交配し、EL/LDL 受容体の両欠損マウスを作成し脂質解析を行う。すなわち、高 LDL 血症に合併する低 HDL 血症における EL 阻害/過剰発現の機序を検討した。

- ② 高中性脂肪血症に合併する低 HDL 血症における EL の関与

EL 遺伝子改変マウスに、リポ蛋白リパーゼおよび肝性リパーゼの強力な阻害剤である Paloxamer 407 (P-407) を投与し、ヒトの IV 型高脂血症類似の高中性脂肪血症と低 HDL 血症を惹起した。高中性脂肪血症に合併する低 HDL 血症の成因における EL の影響を検討した。

- ③ 肥満・インスリン抵抗性に合併する脂質代謝異常における EL の関与

肥満・高インスリン血症のモデルである db/db マウスにおける EL 発現を検討する。

つぎに、EL 遺伝子改変マウスを肥満・インスリン抵抗性モデルであるレプチン受容体欠損 (db/db) マウスと交叉交配する。得られた EL/db 両欠損マウスの脂質糖代謝、肥満を解析し、肥満・インスリン抵抗性に

合併する低HDL血症におけるELの役割を解明する。

4. 研究成果

(1) ELがヒト血清HDL値に及ぼす影響

ヒト血清EL濃度と血清HDL-C値との関係を検討したところ、EL濃度は女性に比べて男性で高値を示す傾向があったが、年齢による変動は認めなかった。また、血清EL濃度は、血清HDL-C値と有意な逆相関関係を示したが、血清LDL-C濃度や中性脂肪濃度とは関連がなかった。すなわち、血清EL濃度は血清HDL-C値の規定因子であることが明らかとなった。

高脂血症治療薬であるピタバスタチンは血清HDL-C値を10-12%増加させると同時に血清EL濃度を減少させることが明らかとなった。その作用には低分子量蛋白Rhoの阻害が関与していることが明らかとなった。

一方、血清を抗EL抗体で免疫沈降した後に、その活性を蛍光標識した合成リン脂質を基質として測定したところ、EL活性は血清HDL-C値と有意な逆相関関係を示したが、血清LDL-C濃度や中性脂肪濃度とは関連がなかった。さらに、冠動脈疾患患者では、非冠動脈疾患患者と比較して、血清HDL-C値が低値であるとともに、血清EL活性が上昇していた。また、喫煙習慣は血清EL活性を上昇させるとともに、血清HDL-C値を低下させた。さらに血清EL活性はフラミンガムリスクスコアと正の相関を示した。

以上より、EL濃度と活性は、血清HDL-C値の規定因子であり、スタチンのHDL上昇作用にELが関与することが明らかとなった。また、ELは冠動脈疾患の発症に対して血清HDL-Cを介して関与するのみならず、直接的な促進作用を示すことが示された。

(2) 高TG血症に伴う低HDL血症とEL

Paloxamer 407は、リポ蛋白リパーゼおよび肝性リパーゼを阻害することにより、マウスにおいてヒトのIV型高脂血症類似の高中性脂肪血症と低HDL血症を惹起した。そこで、EL欠損マウス(ELKO)および野生型マウス(WT)にPaloxamer 407を投与し、高TG主体の高レムナント血症・高脂血症を作製し血清脂質の解析を行った。ELの欠損による低HDL血症の程度を比較検討したところ、WTに比してELKOでは負荷前からHDLが70%上昇するとともに、HDL粒子が大型化していた。また、LDLは軽度増加していたが、VLDLには変化がなかった。これらのマウスにP407を単回投与することによりTGが増加し著しい高中性脂肪血症が惹起されたが、その程度は両群間で差がなかった。P407投与により両群ともHDLは減少したが、

ELKOではWTに比してHDLが79%高値で、HDL粒子が大型化していた。すなわち、高TG血症に合併する低HDL血症がELの不活性化により改善することが示唆された。

(3) 肥満マウスにおけるELの関与

肥満・糖尿病モデルマウス(db/dbマウス)におけるEL発現分布を調べたところ、野生型マウスと比較して肝臓におけるELの発現が約5倍増加していた。一方、脂肪組織における発現量は、野生型マウス、db/dbマウスともに極めて少なかった。アデノウイルスベクターを用いて肝臓にELを強発現させると、肝臓の腫大と脂肪肝の増悪と、血中のTG、遊離脂肪酸やHDLの減少が認められた。以上のことから、メタボリック症候群の動物モデルにおいては、ELの肝臓における発現が増加すると、過食や肥満により増加した血清脂質の血中からのクリアランスが促進され、結果的に脂肪肝が増悪することが判明した。

(4) 高LDL血症におけるELの関与

高脂肪食を負荷した野生型マウスやLDL受容体欠損マウスでは諸臓器におけるELの発現が増強しており、同時に低HDL血症を合併していた。

EL/LDL受容体の両欠損マウスにおいては、対照のLDL受容体単欠損マウスと比べて血清HDL-C濃度が増加していた。すなわち、高LDL血症に合併する低HDL血症においてELを不活性化することによりHDL値が増加することが示された。

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15件)

1. Hara T, Ishida T, Kojima Y, Tanaka H, Yasuda T, Shinohara M, Toh R, Hirata KI. Targeted deletion of endothelial lipase increases HDL particles with anti-inflammatory properties both in vitro and in vivo. *J. Lipid Res.* 2011; 52(1):57-67.
2. Yasuda T, Ishida T, Rader DJ. Update on the role of endothelial lipase in HDL metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Circ J.* 2010; 74(11):2263-70.
3. 安田知行, 石田達郎. 脂質リポ蛋白の検査 血管内皮リパーゼ. *Medical Technology.* 2010;38:1361-1365.
4. 石田達郎, 平田健一. HDL代謝における血管内皮リパーゼの役割と治療への応用. 特集: コレステロール吸収・リポ蛋白代謝研究から新たな脂質異常症治療へ. *医学のあゆみ* 234;7-8:2010.

5. Inoue M, Ishida T, Yasuda T, Toh R, Hara T, Cangara HM, Rikitake Y, Taira K, Sun L, Kundu RK, Quertermous T, Hirata K. Endothelial cell-selective adhesion molecule modulates atherosclerosis through plaque angiogenesis and monocyte-endothelial interaction. *Microvasc Res.* 2010; 80(2): 179-87.
6. Cangara HM, Ishida T, Hara T, Sun L, Toh T, Rikitake Y, Kundu RK, Quertermous T, Hirata K, Hayashi Y. Role of endothelial cell-selective adhesion molecule in hematogenous metastasis. *Microvasc Res.* 2010; 80(1):133-41.
7. Kimura R, Ishida T, Kuriyama M, Hirata K, Hayashi Y. Interaction of endothelial cell-selective adhesion molecule and MAGI-1 promotes mature cell-cell adhesion via activation of RhoA. *Genes Cells.* 2010;15(4):385-396.
8. Kojima Y, Ishida T, Sun L, Yasuda T, Toh T, Rikitake Y, Fukuda A, Kume N, Koshiyama H, Taniguchi A, Hirata K. Pitavastatin decreases expression of endothelial lipase both in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res.* 2010; 87(2): 385-93
9. Ooi AG, Karsunky H, Majeti R, Butz S, Vestweber D, Ishida T, Quertermous T, Weissman IL, Forsberg EC. The Adhesion Molecule ESAM1 is A Novel Hematopoietic Stem Cell Marker. *Stem Cells.* 2009; 27(3):653-61.
10. 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; 82(2):371-81
11. 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. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 2009; 296(4): L594-602.
12. Hara T, Ishida T, Cangara HM, Hirata K. Endothelial cell-selective adhesion molecule regulates albuminuria in diabetic nephropathy. *Microvasc Res.* 2009; 77(3):348-55.
13. Tanaka H, Ishida T, Johnston TP, Kojima Y, Yasuda T, Kundu RK, Quertermous T, Ishikawa Y, Hirata K. Role of endothelial lipase in low HDL levels in a murine model of hypertriglyceridemia. *J Atheroscler Thromb.* 2009; 16(4):327-38.
14. 石田達郎, 平田健一. HDLの異化の制御のCardiovascular Riskにおける役割を考える. HDLを再考する. *Progress in Medicine.* 2009; 5: 39-46.
15. 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.

〔学会発表〕（計 12 件）

国内学会

1. Ishida T, Sun L, Toh R, Hirata K. Plasma EL activity is a regulator of plasma HDL-cholesterol level and a target for HDL-raising therapies. 2010. 7. 15. 日本動脈硬化学会総会. 長良川会議場 岐阜.
2. Yasuda T, Ishida T, Johnston TP, Inoue M, Hirata K. Hypertriglycemia lowers plasma HDL-C levels and generates “dysfunctional HDL” in mice. 第75回日本循環器学会総会・学術集会 2011年3月19日
3. 石田達郎, 安田知行, 福田亨, 平田健一. Inhibition of endothelial lipase can raise anti-atherogenic HDL particles. 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2009. 7. 17 下関.
4. Sun L, Ishida T, Toh R, Hirata K. Plasma EL activity is inversely correlated with the HDL-cholesterol level in humans. 第74回日本循環器学会総会・学術集会 (JCS2010) 2010. 3. 5 京都.
5. 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回内科学会講演会. 2008. 4. 11 東京.
6. 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.
7. 石田達郎, 安田知行, 平田健一. 家兔における血管内皮リパーゼの過剰発現が血清脂質に及ぼす影響. 第3回ウサギ

- フォーラム 2008.7.26 神戸.
- Hara T, Ishida T, Kojima Y, Hirata K. Inactivation of endothelial lipase increases “good cholesterol”. 第73回 日本循環器学会総会・学術集会 (JCS2009) 2009.3.22 大阪.

国際学会

- Hara T, Ishida T, Kojima K, Hirata K. Inactivation of endothelial lipase increases anti-inflammatory HDL particles. Scientific Sessions 2009 American Heart Association. 2009.11.17. Orlando, FL.
- Ishida T, Otera H, Yasuda T, Nishimura Y, Hirata K. 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.
- Sun L, Ishida T, Kojima Y, Yasuda T, Fukuda A, Kureha F, Hirata K. 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.
- Sun L, Ishida T, Kuriyama M, Yasuda T, Hara T, Hirata K, Hayashi Y. Targetd 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.

〔図書〕(計2件)

- 乙井一典、石田達郎、平田健一. 脂質異常症、メタボリックシンドロームとストレス応答. 循環器ストレス学 2010. 第1版 (編: 横山光宏、井上信孝) pp282-293. 南山堂 2010.3.25.
- 石田達郎、平田健一. 血管内皮リパーゼの臨床的意義. Annual Review糖尿病・代謝・内分泌 2010. (編: 寺内康夫、伊藤裕、石橋俊) pp152-159. 中外医学社. 2010.1.25.

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川雄一 (ISHIKAWA YUICHI)
神戸大学・大学院保健学研究科・名誉教授
研究者番号: 90159707

(2) 研究分担者

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

石田達郎 (ISHIDA TATSURO)
神戸大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 00379413

(3) 連携研究者 なし