

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590897

研究課題名（和文）血清中血管内皮リパーゼ酵素活性の測定法確立と血清 HDL 値の関連の解明

研究課題名（英文）Role of serum mass and activity of endothelial lipase in serum high-density lipoprotein cholesterol level in humans

研究代表者

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

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、動脈硬化の負の危険因子である。しかし、血清 HDL-C 値の制御機構は十分に明らかにされていない。近年同定された新規の脂質代謝酵素である血管内皮リパーゼ（Endothelial lipase; EL）は血清 HDL 値の主要な規定因子である。本研究は、血清 EL 活性・蛋白量と血清 HDL 値との関係を明らかにすること、また冠動脈疾患の発症における HDL 値と EL との関係を解析することを目指した。

我々は、これまでヒト血清 EL 蛋白濃度を測定する ELISA を用いて血清 EL 濃度と血清 HDL-C 濃度との関係を検討してきた。本課題研究では、新規の抗 EL モノクロナル抗体を作製し、血清中 EL 蛋白量を定量するための ELISA をさらに改良した。新規の ELISA ではヒト EL 血中濃度は  $319.9 \pm 9.0$ （ $74.6 \sim 1193.7$ ）pg/mL と既報より 2 桁低値を示した。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、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。また、冠動脈疾患患者は、非冠動脈疾患患者と比較して血清 EL 濃度が上昇しており、血清 HDL-C 値が低値であった。さらに、ヘパリン投与前後で EL の蛋白量に変化はなかった。EL は血管内皮細胞から分泌された後、血管内腔側にヘパリン硫酸プロテオグリカンを通じて係留していると推察されてきたが、EL とプロテオグリカンの相互作用やヘパリンによる遊離の有無については、再検討が必要であると考えられた。

また、新規に作成した抗 EL 抗体で血清を免疫沈降した後に、その活性を蛍光標識した合成リン脂質 Bis-BODIPY FL C11-PC を基質として測定する系を独自に開発した。ヒト血中 EL 活性と血清 HDL-C 値との関係を検討したところ、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。また、冠動脈疾患患者は、非冠動脈疾患患者と比較して血清 EL 活性が上昇しているとともに高感度 CRP が高値で、血清 HDL-C 値が低値であった。血清 EL 活性は冠危険因子と正の相関を示した。ただし、EL 蛋白量と活性は有意な相関は示さず、これは血清中の EL には不活性型が多いのかなどを含めて更なる検討が必要であると考えられた。

結論として、我々はヒト血清 EL 蛋白濃度および活性の測定系を独自に確立した。ヒト血中 EL 濃度および活性は、血清 HDL-C 値の制御因子であるとともに、冠動脈硬化のマーカーであることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：High-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) has a variety of athero-protective actions. Endothelial lipase (EL) hydrolyzes phospholipids in the HDL particle and promotes its catabolism. However, the role of EL in HDL-C levels and atherosclerosis in humans has not been fully elucidated. In this study, we further investigated the role of plasma concentration and activity of EL in HDL-C levels in human subjects.

We have established a novel ELISA system for plasma EL mass by using two monoclonal antibodies against human EL. EL-specific plasma phospholipase activity was measured using a fluorogenic phospholipid as a substrate, after plasma EL protein was immunoprecipitated using anti-EL antibodies. The plasma EL mass and activity were inversely correlated with plasma HDL-C levels. In addition, the EL mass or activity in patients with cardiovascular diseases was significantly higher than those in patients with cardiovascular diseases. The EL mass or activity was correlated with coronary risk factors including cigarette smoking, high-sensitive CRP, and dyslipidemia.

In conclusion, plasma EL mass and activity are determinants of plasma HDL-C levels, and correlated with risks in cardiovascular diseases. Because inhibition of plasma EL activity increased anti-inflammatory HDL particles, EL may represent a novel target for HDL-raising pharmaceutical interventions for patients with low HDL levels.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
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：内科系臨床医学、循環器内科学

キーワード：脂質代謝、循環器、血管内皮、リポ蛋白代謝、リパーゼ、脂質異常症

### 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、動脈硬化の負の危険因子である。しかし、血清 HDL 値の制御機構は十分に明らかにされていない。血管内皮リパーゼ (Endothelial lipase; EL) は血管組織に高発現するポスホリパーゼで HDL 粒子への基質特性が高い。EL は HDL 中のリン脂質を加水分解することにより、HDL の代謝分解を促進しており、血清 HDL-C 値の主要な規定因子である。

### 2. 研究の目的

EL は血清 HDL-C 値の主要な規定因子であるが、ヒトの血中 EL 蛋白量や EL 活性が血清 HDL-C や動脈硬化との関係は明らかではなかった。本研究は、血清 EL 活性・蛋白量と血清 HDL 値との関係を明らかにすること、また冠動脈疾患の発症における HDL 値と EL との関係を解析することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血清 EL 蛋白濃度の測定系の改良

ヒト EL 蛋白に対する 2 種類のモノクロナル抗体を作成し、これを用いてヒト血中 EL 濃度の測定用 ELISA を確立した。つぎに、

#### (2) 血清 EL 活性の測定系の開発

EL は血清中で酵素的に切断不活性化される。そこで、血清を抗 EL 抗体で免疫沈降した後、その活性を蛍光標識した合成リン脂質 Bis-BODIPY FL C11-PC を基質として測定する系を確立した。

神戸大学医学部附属病院において心血管病を有する患者より採血し、上記の測定系を用いて血清 EL 蛋白濃度および活性と血清脂質や冠危険因子との関係を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 血清 EL 蛋白濃度と血清 HDL-C の関係

ヒト血中 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。また、ヒト血中 EL 濃度は、高感度 CRP 濃度と正相関した。一方、高脂血症治療薬であるピタバスタチンは血清 HDL-C 値を 12% 増加させ、血清 EL 濃度を 15% 減少させた。すなわち、ヒトにおいても EL 濃度は血清 HDL-C 値の規定因子であり、スタチンの HDL-C 上昇作用に EL が関与することを示された。

#### (2) 血清 EL 活性と血清 HDL-C の関係

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

動脈疾患患者は、非冠動脈疾患患者と比較して血清 EL 活性が上昇しているとともに血清 HDL-C 値が低値であった。また、喫煙患者では血清 EL 活性が上昇し、血清 HDL-C 値が低値であった。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。さらに、運動習慣は血清 EL 活性を低下させた。したがって、EL が血清 HDL-C 値の規定因子のみならず、冠動脈疾患の発症に関与することが示された。

#### (3) 考察

これまでの基礎的研究から、EL は血管への物理的刺激、血圧上昇、酸化 LDL、アンジオテンシン、炎症性サイトカイン、リポポリサッカライド、酸化ストレスなどの種々の炎症性刺激によって発現が増加し、低 HDL-C 血症の原因と考えられていた。本研究では、ヒトにおいて EL 蛋白量や EL 活性と血清 HDL-C 濃度が逆相関することから、EL はヒトの低 HDL-C 血症の原因のひとつであることが示唆された。また、EL 蛋白量は、高感度 CRP 濃度や冠危険因子と正相関することから、EL は直接あるいは血清 HDL-C 値を介して動脈硬化を促進する可能性が示唆された。したがって、EL を阻害できると血清 HDL-C 値を増加させ動脈硬化を抑制するための薬物療法の標的となりうることを期待される。

#### (4) 結論

ヒト血清 EL 蛋白濃度および活性の測定系を確立した。ヒト血中 EL 濃度および活性は、血清 HDL-C 値の制御因子であるとともに、冠動脈硬化のマーカーであ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 14 件)

1. Yasuda T, Johnston TP, Shinohara M, Inoue M, Ishida T. The Effect of Poloxamer 407 on the Functional Properties of HDL In Mice. J Pharm Pharmacol. 2012 ;64(5):677-87.
2. Zhang J, Yu Y, Nakamura K, Koike T, Waqar AB, Zhang X, Liu E, Nishijima K, Kitajima S, Shiomi M, Qi Z, Yu J, Graham MJ, Crooke RM, Ishida T, Hirata K, Hurt-Camejo E, Chen YE, Fan J. Endothelial lipase mediates hdl levels in normal and hyperlipidemic

- rabbits. *J Atheroscler Thromb.* 2012;19(3):213-26.
3. Kurogane Y, Miyata M, Kubo Y, Nagamatsu Y, Ishida T, Kundu RK, Quertermous T, Hirata K, Rikitake Y. FGD5 Mediates Pro-angiogenic Activity of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Vascular Endothelial Cells. 2012;32(4):988-96.
  4. Nakajima K, Yamashita T, Kita T, Takeda M, Sasaki N, Kasahara K, Shinohara M, Rikitake Y, Ishida T, Yokoyama M, Hirata K. Orally Administered Eicosapentaenoic Acid Induces Rapid Regression of Atherosclerosis Via Modulating the Phenotype of Dendritic Cells in LDL Receptor-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(9):1963-72.
  5. Fujioka Y, Fukuda A, Ishida T, Kagimoto S, Nakamura Y, Iwakura A, Hara K, Yamamoto T, Kuroe A, Ohya M, Fujimoto S, Hamamoto Y, Honjo S, Ikeda H, Nabe K, Tsuda K, Taniguchi A, Tanaka K, Koshiyama H, Kume N, Hirata K. Pitavastatin reduces elevated IL-18 levels in Japanese subjects with hypercholesterolemia: Sub-analysis of Kansai Investigation of Statin for Hyperlipidemic Intervention in Metabolism and Endocrinology (KISHIMEN). *J Atheroscler Thromb.* 2011 27;18(1):8-15.
  6. Hara T, Ishida T, Kojima Y, Tanaka H, Yasuda T, Shinohara M, Toh R, Hirata K. 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.
  7. Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Nakajima K, Kita T, Shinohara M, Ishida T, Hirata K. Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 ;30(12):2495-503.
  8. 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.
  9. 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.
  10. 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.
  11. 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.
  12. 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
  13. 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.
  14. 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. *医学のあゆみ* 234:7-8:2010.
- [学会発表] (計9件)
1. Ishida T, Mori T, Sun L, Yasuda T, Hirata K. Plasma mass and activity of endothelial lipase are associated with coronary risk factors in humans. The XVI International Symposium on Atherosclerosis (ISA2012) 2012. 3. 27 Sydney, Australia. Workshop, Oral.
  2. Ishida T, Miyashita K, Kinoshita N, Seito S, Hirata K, Nakajima K. Establishment of a novel, high-sensitive ELISA system for human endothelial lipase. HDL Satellite symposium 2012. Cairns, Australia. 2012. 3. 30-4. 1. Poster.
  3. Nakajima H, Ishida T, Sasaki M, Kondo K, Mori K, Hasokawa M, Haraguchi Y, Yasuda T, Kobayashi S, Hirata K. Cardiac endothelial lipase expression is augmented in the early stage of heart failure. The XVI International

- Symposium on Atherosclerosis (ISA2012) 2012. 3. 27 Sydney, Australia. Poster.
4. Nakajima H, Ishida T, Monguchi T, Sasaki M, Kondo K, Mori K, Hasokawa M, Haraguchi Y, Sun L, Yasuda T, Shinohara M, Toh R, Kobayashi S, Hirata K. Cardiac endothelial lipase expression is augmented in a murine model of heart failure. 第76回日本循環器学会学術集会 2012. 3. 17. 福岡. 一般口述
  5. Haraguchi Y, Toh R, Ishida T, Hirata K. Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ratio is an independent predictor for repeat revascularization after percutaneous coronary intervention. Scientific Sessions 2010 American Heart Association. Poster. 2010. 11. 17. Chicago, USA.
  6. Ishida T, Toh R, Sun L, Yasuda T, Hirata K. Role of endothelial lipase in HDL metabolism and atherosclerosis in humans. 79th European Atherosclerosis Society Congress (Gothenburg, Sweden, 28 June, 2011. ワークショップ口述
  7. 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, USA. 一般口述.
  8. 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. シンポジウム口述
  9. 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. 一般口述.

[図書] (計2件)

1. 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) 152-159. 中外医学社. 2010. 1. 25 pp152-159.
2. 石田達郎. 血管内皮リパーゼの血中濃度と活性が血清HDL-Cと冠動脈硬化に及ぼす影響の検討. 循環医学研究年報 第4集. 2012;4:4-5.

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(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

(3)連携研究者 なし