

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 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790705

研究課題名（和文） HDL の抗動脈硬化作用における EL の機能解析

研究課題名（英文） Role of endothelial lipase in anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein

研究代表者

原 哲也 (HARA TETSUYA)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：70547504

研究成果の概要（和文）：

高比重リポ蛋白（HDL）は抗炎症作用を有するが、炎症などの状態においては「悪玉＝dysfunctional HDL」として働くことが知られている。本研究では、血清HDL値の制御因子である血管内皮リパーゼ（EL）阻害によって上昇したHDL-Cの質的变化を検討した。EL欠損マウスから採取したHDLは、野生型マウスのHDLと比べて抗炎症および抗炎症作用が同等または強く、敗血症性マウスの炎症を強力に改善する作用を示した。以上のことから、EL阻害で上昇するHDLは、動脈硬化や炎症などの病態を軽減する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Inhibition of endothelial lipase (EL) increases plasma high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) level. In this study, we assessed the functional quality of HDL isolated from EL^{-/-} and WT mice. Anti-inflammatory functions of HDL, such as PON-1 or PAF-AH activities, inhibition of cytokine-induced VCAM-1 expression, inhibition of LDL oxidation, were similar between WT and EL^{-/-} mice. In contrast, lipopolysaccharide-neutralizing capacity of HDL was higher in EL^{-/-} mice than in WT mice. Intravenous injection of HDL isolated from EL^{-/-} mice improved the mortality in LPS-treated mice. Thus, EL inactivation increased plasma HDL particles with preserved anti-inflammatory and anti-atherosclerotic functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：炎症、動脈硬化、脂質代謝、血管内皮、リパーゼ、高比重リポ蛋白質

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、心血管疾患における負の危険因子であり、新たな治療標的として注目されている。血清 HDL 値は、肥満や喫煙、運動不足、ア

ルコール摂取、糖尿病、脂質異常症によって低下し、低 HDL 血症はメタボリックシンドロームの診断基準の一項目となっている。しかし、低 HDL 血症を来す分子機序は明らかでないために、低 HDL 血症に対して、

高LDL血症に対するスタチン療法のような確立された治療法は開発されていない。近年、血清HDL-C値を上昇させるCETP阻害剤であるトルセトラピブの臨床試験結果が発表されたが、驚くことに血清HDL-C値は約1.5倍上昇したにも関わらず、死亡率や冠動脈疾患の発症率は増加した。さらに、「善玉」コレステロールであるはずのHDL-Cが、炎症などの病的状態では含有脂質あるいは蛋白質成分が変化し、「悪玉」として作用することが報告されている。したがって、動脈硬化治療においてはHDLの量的な制御のみならず、質的な解析と制御も必要である。

近年我々は、血管内皮細胞から新規のリポ蛋白質代謝酵素である血管内皮リパーゼ (Endothelial lipase: EL) を同定した (文献 1)。EL はホスホリパーゼ A1 活性を有し、HDL 中のリン脂質を選択的に分解して HDL 代謝を促進している。我々は EL 遺伝子改変マウスを作製し、その血清脂質を解析したところ、EL 欠損マウスでは血清 HDL-C 値が増加しており EL 過剰発現マウスでは血清 HDL-C 値が減少していることを見だし、EL が血清 HDL の直接の規定因子であることを示した。それゆえ、EL 阻害薬は HDL 上昇療法の分子標的となりうると期待されるが、EL 阻害によって上昇した HDL にどのような質的变化をもたらすのかは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は、EL 阻害により上昇した HDL の「善玉」コレステロールとしての質を検査することにより、EL 阻害による HDL 増加療法が臨床応用に有用か否かを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) EL 完全阻害後の HDL モデルとして EL 欠損マウスより採取した HDL (EL^{-/-}HDL) と、対照として野生型マウスの HDL (EL^{+/+}HDL) について以下の項目を評価した。

①炎症性サイトカイン刺激による接着分子の発現抑制効果

炎症性サイトカイン刺激により、血管内皮細胞において VCAM-1 や ICAM-1 などの接着分子の発現が誘導されるが、この誘導された接着分子により血管内皮細胞と単球系細胞との接着が誘引され、動脈硬化層へのマクロファージ浸潤が引き起こされる。この一連の反応を HDL は接着分子の発現を抑制することにより抗動脈硬化的に作用することが知られている。それゆえ、ヒト培養血管内皮細胞 (HUVEC) に TNF- α 刺激を行い、誘導される VCAM-1 などの接着分子の発現の HDL による抑制能をウェスタンブロット法で比較検討す

る。

②リポポリサッカライド (LPS) の中和効果

グラム陰性菌細胞壁外膜の内毒素である LPS は動脈硬化惹起を含め、多彩な生物活性を発現する。HDL は LPS と直接結合し、その生理活性を中和する能力がある。そこで、HDL の LPS 中和能を LAL 活性や、血管内皮細胞およびヒト単核球細胞の LPS 刺激による TNF α 産生能を測定することによって比較検討した。

③LDL の酸化抑制効果

HDL は LDL の酸化を抑制することから、ヒト精製 LDL を用いて硫酸銅により酸化された酸化 LDL 産生量を計測し、HDL の酸化抑制能を比較検討した。

④HDL 関連酵素活性

HDL 中には多くの HDL 関連酵素が存在することが知られている。そのうち、パラオキシナーゼ 1 (PON1) や PAF アセチルヒドラーゼ (PAF-AH) は抗酸化作用を持ち、抗動脈硬化的に作用する。そこで、EL^{-/-}HDL および EL^{+/+}HDL それぞれの PON1 活性や PAF-AH 活性を比較検討した。

(2) EL 阻害による高 HDL 血症の生体での効果
高 HDL 血症を呈する EL 欠損マウスと野生型マウスに LPS を投与し、エンドトキシンショックモデルを作製する。両群において、マウスの死亡率、臓器における炎症を比較検討した。また、エンドトキシンショックに陥った野生型マウスに EL^{-/-}HDL または EL^{+/+}HDL を投与し、死亡率の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) EL 阻害後の HDL の抗炎症作用の評価

EL 欠損マウスでは野生型マウスにくらべて血清 HDL-C 値が約 60% 上昇していた。EL 阻害によって増加した HDL 粒子は、リン脂質に富み、大型化していた。

次に、EL 阻害することにより増加した HDL (EL^{-/-}HDL) と、野生型マウスから採取した HDL (EL^{+/+}HDL) の抗炎症作用を以下の評価項目において比較した。

①炎症性サイトカイン刺激による接着分子の発現抑制効果

HUVEC における TNF- α 刺激による VCAM-1 発現は、HDL の前処置により著明に抑制されたが、その抑制効果は EL^{-/-}HDL と EL^{+/+}HDL との間で差はなかった。つまり、EL^{-/-}HDL は正常状態の HDL と同程度の抗炎症作用を有することが示された。

②LPS の中和効果

EL^{-/-}HDL は、EL^{+/+}HDL と比べて、LPS 中和作用が増強していた。EL^{-/-}HDL は、粒子中にリン脂質を豊富に含むことから、LPS の脂質 (Lipid A) との親和性が高く、中和作用

が増強したと考えられた。その結果、EL+/+HDL と比べて EL-/-HDL の方が、単球における LPS による TNF α 産生を強く抑制した。つまり、EL-/-HDL は正常状態の HDL 以上に LPS に対する抗炎症作用が強いことが示された。

③LDL の酸化抑制効果

硫酸銅による酸化 LDL 形成は、HDL の前処置により著明に抑制されたが、その抑制効果は EL-/-HDL と EL+/+HDL との間で差はなかった。つまり、EL-/-HDL は正常状態の HDL と同程度の抗酸化作用を有することが示された。

④HDL 中 PON1 および PAF-AH 活性

HDL 中の PON1 および PAF-AH 等の抗酸化酵素活性は、EL-/-HDL と EL+/+HDL との間で差はなかった。つまり、EL-/-HDL は正常状態の HDL と同程度の抗酸化作用を有する機序と考えられた。

(2) EL 阻害による高 HDL 血症の生体での効果
高 HDL 血症を呈する EL 欠損マウスと野生型マウスにおいて、LPS によるエンドトキシンショックモデルを作製したところ、高 HDL 血症を呈する EL 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて、死亡率が改善し、心臓や肺での炎症が軽減していた。さらに、エンドトキシンショックに陥った野生型マウスに EL-/-HDL または EL+/+HDL を投与したところ、死亡率は改善したが、その改善効果は EL-/-HDL の方が強かった。

以上のことから、EL 阻害状態で上昇する HDL は、抗炎症・抗酸化作用が保たれており、動脈硬化や敗血症性ショックなどの病態を軽減する可能性が示唆された。

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 6 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 ;64:677-87.
2. 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 ;52:57-67.
3. Yasuda T, Ishida T, Rader DJ. Update on the role of endothelial lipase in HDL metabolism, reverse cholesterol

transport, and atherosclerosis. *Circ J.* 2010 ;74:2263-70.

4. 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 ;80:179-87.
5. 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: 133-41.
6. 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: 385-93.

[学会発表] (計 5 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.
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.
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.
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.

5. 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. 28 June, 2011. Gothenburg, Sweden.

[図書] (計1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.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 哲也 (HARA TETSUYA)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
研究者番号: 70547504

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

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

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