

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号 : 14501
 研究種目 : 若手研究 (B)
 研究期間 : 2011~2012
 課題番号 : 23790854
 研究課題名(和文)
 家兔における血管内皮リパーゼ阻害・過剰発現の血清脂質と動脈硬化に及ぼす効果の検討
 研究課題名(英文)
 Effect of altered expression of endothelial lipase on plasma lipids and atherosclerosis in rabbits
 研究代表者
 孫 麗(SUN LI)
 神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員
 研究者番号 : 10547508

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、冠動脈疾患における負の危険因子で新たな治療標的である。血管内皮リパーゼ(EL)は血清 HDL-C 値の規定因子であり、HDL 増加療法の分子標的として期待されている。本研究は、ヒトに近い脂質代謝機構を有する家兔において、抗 EL ワクチンおよび EL 遺伝子導入により EL を阻害・活性化し、EL が HDL 増加療法の分子標的として適当かどうかを評価した。ヒト EL を組み込んだアデノウイルスを日本白色家兔の耳静脈より注射し、EL を過剰発現させたところ、一過性に家兔においても最大 70% の HDL-C 値低下を確認できた。血清アポ A-I 濃度や血清 LDL-C 濃度、中性脂肪濃度には変化は認めなかったが、血清のパラオキシナーゼ活性は EL 過剰発現により有意に減少した。血清中のアポ蛋白 A-I 値は維持されたため、EL 過剰発現後も血清のコレステロール引抜き能は残存していた。一方、EL の Lid または活性中心のペプチドと、tetanus toxin(TT)の一部を fusion させたキメラペプチド(TT/EL ワクチン)を合成し、家兔に免疫し、抗 EL 中和抗体を誘導することにより EL 阻害モデルの作製を試みた。複数の TT/EL ワクチンの効果を検討したが、抗体は誘導されるものの血清脂質には影響を及ぼさなかった。EL 阻害の方法と効果については現在も検討中で、今後は EL 阻害薬や新規の阻害抗体を用いた評価が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文) : Endothelial lipase (EL) regulates circulating high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) levels. There is a discrepancy of EL effect in lipid profiles between mice and humans. Therefore, we investigated the effect of altered EL expression on lipid profile and HDL anti-atherogenic properties in rabbits. Adenovirus encoding human EL (AdhEL) was injected into Japanese white rabbits, which induced hEL overexpression. Consequently, serum HDL-C levels were significantly decreased, while LDL-C levels were not affected. Lipoprotein fractions isolated from humans, rabbits and mice were treated with the EL-rich medium, and measured free fatty acids liberated from the lipoprotein substrates. The hEL hydrolyzed HDL from all three species, while it hydrolyzed mouse LDL much greater than rabbit- and human-LDL. Serum paraoxonase activity, a major component of HDL anti-oxidant properties, significantly reduced in EL-overexpressing rabbits, whereas serum cholesterol efflux capacity did not change despite of the reduced HDL levels. In conclusion, Human EL reduced HDL-C and HDL anti-oxidative property in rabbits. Considering that lipid profile of rabbits resembles that of humans, alteration of EL expression or activity may improve HDL levels and anti-oxidant properties without affecting LDL-C levels in humans.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

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 : 高比重リポ蛋白、炎症、脂質代謝、血管内皮、リパーゼ、動脈硬化、家兔

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、冠動脈疾患における負の危険因子であり、新たな治療標的であ

る。しかし、低 HDL 血症の成因は十分に明らかにされていないため、HDL を上昇させる治療法の開発は遅れている。血管内皮リパーゼ(Endothelial

lipase; EL)は血清 HDL-C 値の規定因子であり、将来の HDL 増加療法の分子標的として期待されている。生体内における EL の阻害・活性化の影響は、マウスを用いて評価されてきた。しかし、ヒトとマウスでは大きく脂質代謝がことなるために、マウスでの知見をヒトに直接応用することはできない。家兎は、CETP を有するとともに、VLDL、LDL、HDL などのヒトと同じリポ蛋白分画を有し、高脂肪食負荷により高脂血症と動脈硬化が惹起されるという点で、脂質代謝においてヒトに近い動物モデルとして受け入れられている。本研究では、ヒトに近い脂質代謝機構を有する家兎において、抗 EL ワクチンおよび EL 遺伝子導入により EL を阻害・活性化し、EL が将来の HDL 増加療法の分子標的として適当かどうかを評価する。

2. 研究の目的

家兎を用いて EL 阻害と EL 過剰発現の血清 HDL-C 値と動脈硬化に対する影響を検討することにより、EL を分子標的とした HDL 増加療法の有効性を検証することを目指した。

3. 研究の方法

(1) EL 過剰発現の効果検討

ヒト EL を組込んだアデノウイルスを日本白色家兎の耳静脈より注射する。数日毎に採血し、血中の EL 活性と EL 蛋白量、血清脂質(HDL-C 値)に及ぼす影響を検討する。対照処置として、LacZ 遺伝子変異を導入したアデノウイルス投与する。

(2) EL 阻害の効果検討

EL の Lid と呼ばれる HDL との結合を規定する部位のペプチドと、tetanus toxin(TT)の一部を fusion させたキメラペプチド(TT/EL ワクチン)を合成する。tetanus toxin は宿主免疫を賦活化するためのものである。この合成ペプチド(TT/EL ワクチン)をタイターマックスとともに、日本白色家兎に 1 週目および 5、8、16、22 週目に接種し免疫する。5 週目、15 週目、以後 5 週毎に採血し、血中の EL 抗体価と EL 活性を測定する。血清 EL 活性は、血清を抗ヒト EL 抗体(ウサギと交叉反応すること確認済み)で免疫沈降した後、合成蛍光基質 Bis-BODIPY FL C11-PC を基質として蛍光強度で測定する。正脂血症状態(通常食飼育)において、血清 EL 活性の低下と血清脂質(HDL、

VLDL/LDL、中性脂肪など)に及ぼす影響を明らかにする。

(3) EL 過剰発現/阻害後の HDL の機能評価

EL 過剰発現や阻害にて HDL-C が変化した場合、HDL を分離し、コレステロールを貪食したマクロファージと共培養することによりマクロファージからのコレステロール引抜き能を検討する。また、HDL の抗酸化酵素であるパラオキシナーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) ウサギにおける EL 過剰発現の効果検討

アデノウイルスを用いて、JW 家兎に EL 導入を行い、ヒト EL 過剰発現モデルウサギを確立した。マウス実験においては、ヒト EL アデノウイルスの強発現において、血清 HDL 値の著明な低下を確認できた。マウスの約 100 倍の体重を有する家兎では、100 倍量のアデノウイルス投与を試みた。その結果、一過性に家兎においても、最大 70% の HDL-C 値低下を確認できた。しかし、血清 LDL-C 濃度や中性脂肪濃度には変化は認めなかった。ついで、EL によって低下した HDL の質的評価を行った。予想に反し、EL 過剰発現にて HDL-C は低下を認めたが、血清中のアポ蛋白 A-I 値はほとんど変化を認めなかった。その影響もあり、EL 過剰発現後の HDL 質的低下は、HDL-C が半減したにも関わらず、軽度であった。

(2) ウサギにおける EL 阻害の効果検討

EL の Lid および活性部位に一致する TT/EL ワクチン(合成ペプチド)を数種類作成し、家兎に投与し、抗体を誘導した。計時的に経過を見たが、抗 EL 抗体は誘導されるもの現状では EL 活性の低下や血清脂質変化は認められていない。その原因として、抗体は誘導されても複雑な立体構造をとる EL 蛋白の Lid や活性中心を被覆し阻害することができなかったことが推察される。

以上より、家兎において EL を過剰発現させることにより選択的に血清 HDL-C 濃度が低下する。しかし、アポ蛋白 A-I が残存することにより、コレステロール逆転送系に与える影響は軽微であったと考えられた。EL 阻害の方法と効果については、現在も検討中であり、今後は EL 阻害薬や新規の阻害抗体の発明による評価が必要であると考えられる。

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 7 件)

1. Sasaki-Miyamoto M, Yasuda T, Monguchi T, Nakajima H, Mori K, Toh R, Ishida T, Hirata K. Pitavastatin increases HDL particles functionally preserved with cholesterol efflux capacity and anti-oxidative action in dyslipidemia patients. J Atheroscler Thromb. 掲載確定
2. Nakajima H, Ishida T, Satomi-Kobayashi S, Mori K, Hara T, Sasaki N, Yasuda T, Toh R, Tanaka H, Kawai H, Hirata K. Endothelial lipase modulates pressure overload-induced heart failure through alternative pathway for fatty acid uptake. Hypertension. 2013; 61(5): 1002-7.
3. Mori K, Ishida T, Yasuda T, Monguchi T, Sasaki M, Kondo K, Hasokawa M, Nakajima H, Haraguchi Y, Sun L, Shinohara M, Toh R, Nishimura K, Hirata K. Fasting serum concentration of apolipoprotein B48 represents residual risks in patients with new-onset and chronic coronary artery disease. Clin Chim Acta. 2013;421C:51-56. doi: 10.1016/j.cca.2013.02.005.
4. Ishida T, Miyashita K, Shimizu M, Kinoshita N, Mori K, Sun L, Yasuda T, Imamura S, Nakajima K, Stanhope KL, Havel PJ, Hirata K. Enzyme-linked immunosorbent assay system for human endothelial lipase. Clin Chem. 2012;58(12):1656-64. doi: 10.1373/clinchem.2012.187914.
5. Sun L, Ishida T, Okada T, Yasuda T, Hara T, Toh R, Shinohara M, Yamashita T, Rikitake Y, Hirata K. Expression of endothelial lipase correlates with the size of neointima in a murine model of vascular remodeling. J

Atheroscler Thromb.
2012;19(12):1110-27.

6. Hasokawa M, Shinohara M, Tsugawa H, Bamba T, Fukusaki E, Nishiumi S, Nishimura K, Yoshida M, Ishida T, Hirata K. Identification of biomarkers of stent restenosis with serum metabolomic profiling using gas chromatography/mass spectrometry. Circ J. 2012; 76(8): 1864-73.
7. 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 KI, 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.

[学会発表](計 6 件)

1. Yasuda T, Ishida T, Mori K, Hirata K. Effect of overexpression of endothelial lipase on HDL metabolism and HDL anti-atherogenic properties in rabbits. 一般口述演題. 第 77 回日本循環器学会総会 (2013.3.15) 横浜.
2. 孫麗、石田達郎、森健太、安田知行、中島英人、破磯川実、原口英子、佐々木真希、近藤健介、平田健一. 血管内皮リパーゼ特異的酵素活性と血清 HDL コレステロールおよび冠動脈疾患との関連性の検討. 第 12 回日本 NO 学会総会 (2012.6.29) 神戸
3. 宮下かずや、石田達郎、安田知行、孫麗、木下憲明、中嶋克行、平田健一. Generation of a high-sensitive and reliable ELISA system that can quantitatively measure human serum mass of endothelial lipase. 第 44 回日本動脈硬化学会総会 (2012.7.15) 福岡
4. Ishida T, Mori K, 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.

5. 石田達郎. 糖尿病性動脈硬化における脂質異常の関与. 第26回日本糖尿病合併症学会総会 (2011.10.14). 大宮

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 (2011.6.28). Gothenburg, Sweden.

6. 研究組織

(1)研究代表者

孫 麗 (SUN LI)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号:10547508

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

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

安田 知行 (YASUDA TOMOYUKI)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号:20457047