

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究 C
 研究期間： 2006 年 ~ 2008 年
 課題番号： 18590998
 研究課題名(和文) マクロファージにおけるリポ蛋白リパーゼが動脈硬化に及ぼす影響について
 研究課題名(英文) The role of macrophage lipoprotein lipase on the development of atherosclerosis
 研究代表者 野牛宏晃 (Yagyu Hiroaki)
 自治医科大学・医学部・講師
 研究者番号：60348018

研究成果の概要：

リポ蛋白中のトリグリセリドを水解するリポ蛋白リパーゼは、血清脂質代謝に重要な酵素である。さらにマクロファージにおけるリポ蛋白リパーゼは、動脈硬化形成にも関与しており、この作用は血清脂質を介さない直接的な作用と考えられている。今回の研究では、マクロファージ特異的なリポ蛋白リパーゼ欠損マウスを作成し動脈硬化について検討した。マクロファージリポ蛋白リパーゼ欠損マウスでは、血清脂質には変化を来たさないがコレステロール負荷に対するマクロファージの泡沫化が抑制された結果動脈硬化が抑制された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、代謝学

キーワード：リポ蛋白リパーゼ、マクロファージ、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

リポ蛋白リパーゼ(Lipoprotein lipase: LPL) は主に心筋、骨格筋、脂肪細胞で産生されており、リポ蛋白中のトリグリセリドを水解することが生体における主な機能である。HDL 形成に重要であることから、抗動脈硬化的な蛋白として考えられてきた。一方、マクロファージに存在する LPL は、血清リポ蛋白代謝とは別に、LDL などのリポ蛋白のマクロファージへの取り込みを促進する作用があると考えられており、動脈硬化に対して促進的

に機能する可能性が示されていた。

2. 研究の目的

LPL のマクロファージ泡沫化への関与及び動脈硬化への影響を検討する

3. 研究の方法

(1) LPL 遺伝子のプロモーターの上流とイントロン 1 にそれぞれ loxP 配列を挿入した flox-LPL マウスを作成する。

(2) Lysozyme プロモーターによりマクロファージ特異的に Cre 蛋白を過剰発現したマウス (Jackson Lab より購入) と、flox LPL マウスを交配させ、cre-loxP システムによりマクロファージ特異的 LPL 欠損(M-LpLK0) マウスを作成する。

(3) M-LPLK0 マウスを用いて、マクロファージの LPL 欠損を、realtime PCR、酵素活性測定により確認する。さらに血清脂質について検討する。

(4) 高脂血症、動脈硬化モデルマウスのアポ蛋白 E 欠損 (apoEK0) マウスと M-LPLK0 マウスを交配し、ダブル欠損(M-LPL/apoEK0) マウスを作成する。

(5) ダブル欠損マウスに高コレステロール diet を3ヶ月間投与し、以下の実験についての血清脂質、動脈硬化病変について検討する。

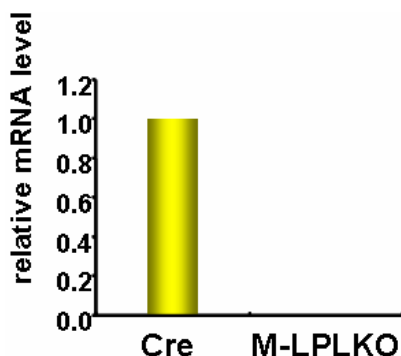
(6) ダブル欠損マウスの腹腔にチオグリコール酸を投与することにより刺激し、マクロファージを採取する。マクロファージを培養し、¹⁴C-oleate 及び apoEK0 マウス由来の VLDL を用いて、マクロファージ泡沫化能を検討する。

(7) 長期的な動脈硬化を検討するため、1年間通常食で飼育下の後、動脈硬を検討する。

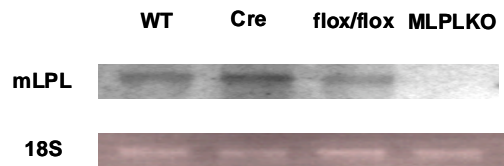
4. 研究成果

(1) マクロファージ LPL mRNA 発現検討：M-LPLK0 マウスからマクロファージを採取し、realtime PCR 及び Northern blot により LPL の発現を検討した。M-LPLK0 マウスでは LPL mRNA の発現は消失していた。

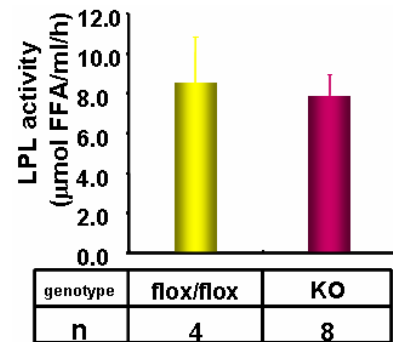
Realtime PCR



Northern blot

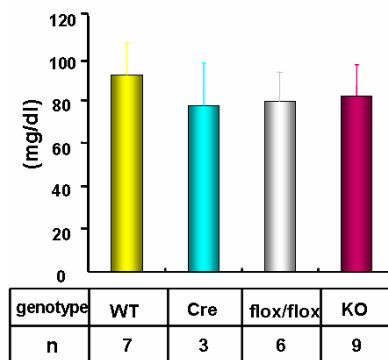


(2) LPL 活性の検討：M-LPLK0 マウスからマクロファージ及びヘパリン投与後血清における LPL 活性を測定した結果、マクロファージ LPL の活性はほぼ完全に消失したが、血清 LPL 活性の低下はミと得なかった。従って、マクロファージ LPL は血清 LPL 活性には大きく関与していないことが明らかとなった。

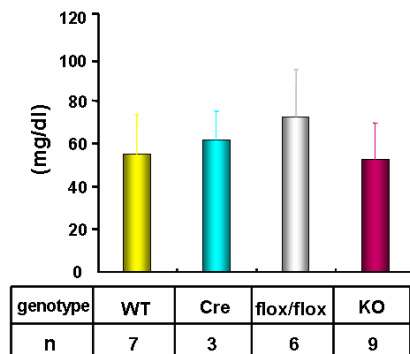


(3) 血清脂質の検討：M-LPLK0 マウスの血清コレステロール (TC) 及びトリグリセライド (TG) に変化は認められなかった。従って、マクロファージ LPL は血清 LPL 活性だけではなく、血清脂質代謝にも影響しないことが明らかとなった。

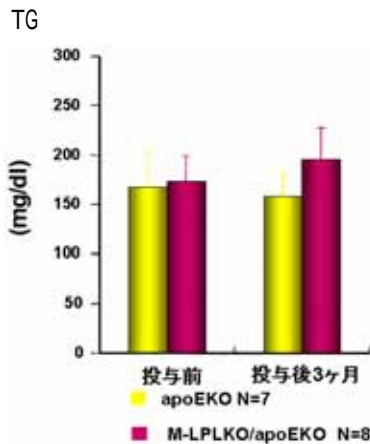
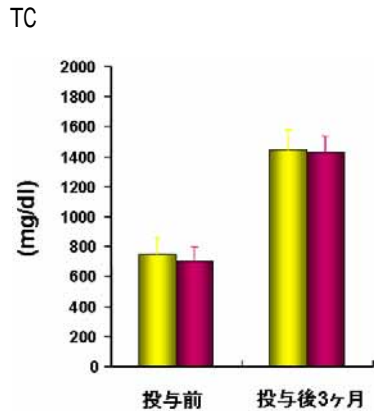
TC



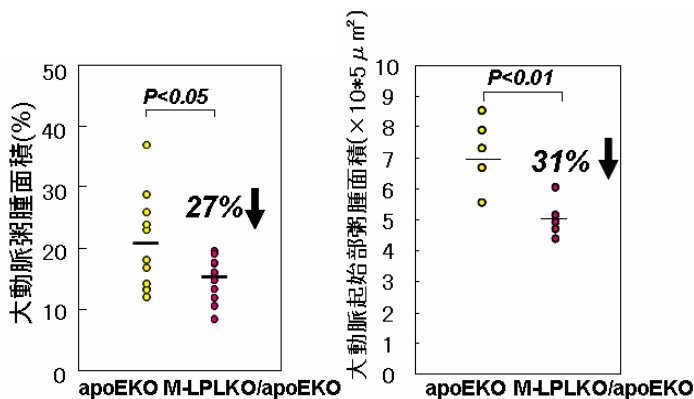
TG



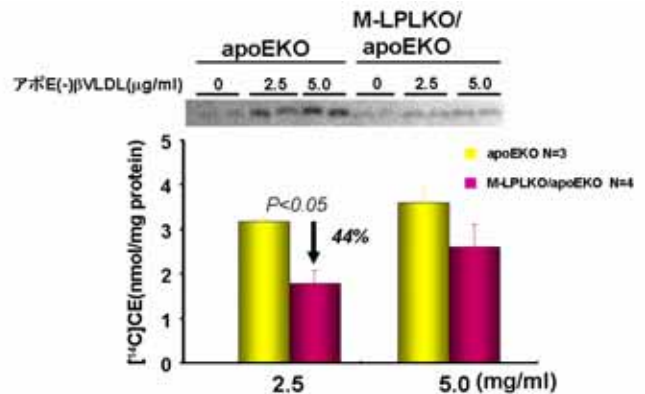
(4) M-LPL/apoEKO マウスの血清脂質の検討 : M-LPLKO と apoEKO を交配し、M-LPL/apoEKO ダブル欠損マウスを作成した。高コレステロール食 3 ヶ月間の投与前後での血清脂質は、対照群の apoEKO マウスと比較して差を認めなかった。



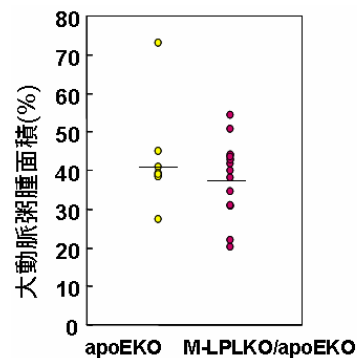
(5) 動脈硬化の評価 : 3 ヶ月間の高コレステロール食負荷後、動脈硬化について評価した。大動脈全体および大動脈弁起支部を Oil Red O 染色し、粥腫の面積を比較した。大動脈粥腫の面積は M-LPL/apoEKO マウスにおいて、対照群の apoEKO マウスに比べ 27%抑制されていた。また大動脈弁起支部の粥腫も、M-LPL/apoEKO で 31%抑制されていた。



(6) マクロファージ泡沫化能の評価 : C14-oletae を用いて施行した VLDL によるマクロファージ泡沫化能は、apoEKO マクロファージに比べ、M-LPL/apoEKO マクロファージで最大で 44%抑制された。



(7) 通常食 1 年飼育における動脈硬化評価 : 1 年間の通常食飼育下では、M-LPL/apoEKO と apoEKO の間に、血清脂質及び動脈硬化病変の変化は認められなかった。



以上の結果より、マクロファージの LPL は血清リポ蛋白活性、リポ蛋白代謝に大きな影響を持たないが、リポ蛋白によるマクロファージの泡沫化促進には関連していることが明らかとなった。その結果、マクロファージ LPL を欠損したマウスでは、血清脂質代謝とは独立して動脈硬化が抑制された。1 年後の長期的な動脈硬化抑制が認められなかった点については、(1) 両群で動脈硬化の促進が既にピークに達したことにより差が消失した、(2) 初期の粥腫形成にマクロファージの泡沫化が重要である一方、進展した病変ではマクロファージの関与は少ない、といった可能性が挙げられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

(1) マクロファージ特異的リポタンパクリパーゼ欠損マウスにおける動脈硬化進展の短期及び長期的検討

高橋学、野牛宏晃、田副文子、永島秀一、岡田健太、宮本倫聡、大城太一、江藤一弘、石橋俊

第52回糖尿病学会年次集会(2009.5/21-24, 大阪)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野牛宏晃 (Yagyu Hiroaki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：60348018

(2) 研究分担者

石橋俊 (Ishibashi Shun)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90212919

田副文子 (Tazoe Fumiko)

自治医科大学・医学部・研究生

研究者番号：20406127

永島秀一 (Nagashima Shuichi)

自治医科大学・医学部・研究生