

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790314

研究課題名(和文) 内皮リパーゼを標的とした動脈硬化治療の新戦略 - 新規モデルによる臨床への橋渡し研究

研究課題名(英文) Targeting endothelial lipase as a novel therapeutic strategy for the treatment of atherosclerosis

研究代表者

小池 智也 (KOIKE TOMONARI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：40432158

研究成果の概要(和文)：

善玉リポ蛋白として知られる高比重リポ蛋白(HDL)を増加させる新たな治療法の確立を目指し、HDL分解酵素のひとつである内皮リパーゼ(EL)の役割について、HDL代謝系がヒトによく類似したウサギを用いて検討を行った。その結果、血中のHDL-コレステロールが低いウサギでELが多く合成されていることが明らかになった。また、ELを減少させる処置によって、HDL-コレステロールが増加した。これにより、ELを標的とした治療法の有効性が示された。

研究成果の概要(英文)：

To establish a novel strategy for raising plasma HDL-cholesterol levels, we analyzed the functions of endothelial lipase (EL), a newly-identified HDL phospholipase, using rabbit models. We found that EL expression was increased in rabbits with low HDL-cholesterol levels. Inhibition of EL expression using EL specific antisense led to increased plasma HDL-cholesterol levels. These results indicate the therapeutic inhibition of EL activity may become a new mean to elevate plasma 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	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

内皮リパーゼ(EL)は、1999年に発見された新規のリポ蛋白分解酵素であり、高比重リポ蛋白(HDL)のリン脂質を基質として、HDL代謝に直接関与している。これまでに、マウスモデルを用いた検討により、ELの過剰発現が

HDL-コレステロール(HDL-C)を低下させ、ELの発現抑制がHDL-Cを増加させることが報告された。一方、炎症性疾患やメタボリックシンドローム患者の血中でELが増加しているという報告がある。そのため、ELの制御により、低HDL血症の改善と動脈硬化性疾患の

発症予防が期待されている。しかしながら、動脈硬化に対する EL の役割については、マウスモデルでは一致した見解が得られていない。その理由として考えられるのが、マウスとヒトとの脂質代謝の違いである。そのため、EL を標的とした HDL 増加療法の、動脈硬化性疾患予防における有効性を解明するためには、マウスに代わる、適切な動物モデルを用いた検討が求められていた。

2. 研究の目的

EL 研究に適した動物モデルとして、脂質代謝系においてヒトとの類似点が多く、動脈硬化が発症しやすい動物であるウサギを用いて、EL の脂質代謝ならびに動脈硬化における役割を解明する。

3. 研究の方法

(1) ウサギ EL 発現分布の解析:

我々が同定に成功したウサギ EL の cDNA 配列を元にプローブを作成し、ウサギの各臓器における EL mRNA 発現分布を Northern blot により明らかにし、他の主要なリパーゼ (リポ蛋白リパーゼ、肝性トリグリセリドリパーゼ) の発現臓器と比較して、EL 発現の特性を明らかにする。また、発現が同定された臓器における発現細胞の同定のため、*in situ* hybridization を行う。

(2) 脂質異常症ウサギにおける EL 発現解析:

低 HDL 血症を示す遺伝的脂質異常症モデルウサギである Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) ウサギを用いて、肝臓における EL 発現を正常ウサギと比較し、低 HDL 血症と EL 発現との関連性を検証する。

(3) 動脈硬化病変における EL 発現局在の解明:

動脈硬化病変における EL 発現の有無とその局在を明らかにするため、WHHL ウサギの大動脈硬化病変を採取し、*in situ*

hybridization を行う。

(4) EL 発現阻害実験:

ウサギ EL mRNA を阻害するアンチセンスの合成とウサギへの投与を行う。ウサギ EL 配列をもとに、20 塩基の候補配列を 90 種類合成し、ウサギ肝細胞を用いたスクリーニングによって、効果的に発現阻害する配列を 10 種類程度選択する。その配列について、用量依存的 mRNA 阻害効果をウサギ肝細胞により検証し、最も効果的だった配列 1 種類を選抜し、ウサギへの投与実験を行う。静脈注射によるアンチセンス投与を 6 週間継続し、その間の血中 HDL-C の値を毎週測定して、6 週間後に詳細なリポ蛋白解析を行う。

4. 研究成果

(1) ウサギ EL 発現分布: 我々がクローニングしたウサギ EL の mRNA が、どの臓器で発現しているかを、他の主要なリパーゼ (リポ蛋白リパーゼ、肝性トリグリセリドリパーゼ) と比較した。解析した 20 種類の臓器のうち、EL の mRNA 発現は、肝臓、副腎、精巣、脾臓、腎臓、肺、骨髄、小腸での発現が認められた。他のリパーゼ発現は、リポ蛋白リパーゼは、脂肪組織、筋肉、マクロファージに、肝性トリグリセリドリパーゼは肝臓に、それぞれ限局した発現を示すが、EL はこれらと比べ、より多くの臓器で発現していることが判明した。さらに、*in situ* hybridization によって、主要な発現臓器であった肝臓における発現の局在を検討したところ、肝細胞において mRNA が検出された。

(2) 脂質異常症ウサギの EL 発現: 低 HDL 血症を示す WHHL ウサギの肝臓における EL 発現を検討した結果、正常ウサギ (日本白色種、JW) と比べ、WHHL ウサギの EL 発現が著明に亢進していた (図 1)。

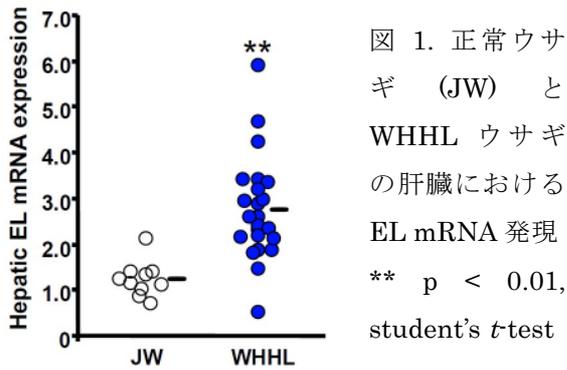


図 1. 正常ウサギ (JW) と WHHL ウサギの肝臓における EL mRNA 発現
** p < 0.01, student's t-test

(3) 動脈硬化病変における EL 発現の局在：WHHL ウサギより採取した大動脈硬化病変を用いて *in situ* hybridization を行ったところ、非病変部の血管内皮細胞に比べ動脈硬化病変の血管内皮細胞において、より強い EL mRNA シグナルが検出された。さらに、病変内のマクロファージでも EL mRNA が検出された。

(4) EL 阻害実験：肝細胞によるスクリーニング実験により EL mRNA 発現阻害効果が示されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、正常ウサギに対し、6 週間の投与実験を行った。対照群には、特定の mRNA 阻害効果のないミスマッチ配列を投与した。その結果、対照群に比べ、アンチセンス投与群で軽度の HDL-C 上昇が認められ、詳細なりが蛋白解析の結果、HDL の中でも、粒子の大きな分画と小さな分画において、コレステロール含量が増加していた (図 2)。

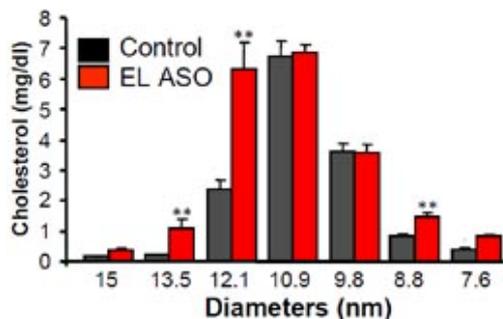


図 2. EL 発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド (EL ASO) 投与後の HDL 粒子内のコレステロール分布の変化

** p < 0.01, student's t-test, mean +/- SEM

また、アンチセンス投与群の血中の EL 蛋白ならびに肝臓の EL mRNA が対照群に比べ著明に減少していた。

本研究により、動脈硬化を発症するウサギの肝臓ならびに動脈硬化病変内に多くの EL mRNA が発現していることが明らかとなった。さらに、EL mRNA を阻害することにより、HDL 粒子の特定の分画において、コレステロール含量を増加させることに成功した。これにより、EL 研究におけるウサギモデルの有用性が明らかになるとともに、EL を標的とした新規 HDL 増加療法の有効性が示唆された。今後は、EL 阻害に伴う HDL の変化が、動脈硬化に対してどのような作用を示すかを詳細に検討したい。

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 4 件、全て査読有)

① Matsuda S, Yamashita A, Sato Y, Kitajima S, Koike T, Sugita C, Moriguchi-Goto S, Hatakeyama K, Takahashi M, Koshimoto C, Matsuura Y, Iwakiri T, Chen Y.E, Fan J, Asada Y: Human C-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits. *J Thromb Haemost* 9: 201-208, 2011.

② Waqar AB, Koike T, Yu Y, Inoue T, Aoki T, Liu E, Fan J: High-fat diet without excess calories induces metabolic disorders and enhances atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 213: 148-155, 2010.

③ Koike T, Kitajima S, Yu Y, Nishijima K, Zhang J, Ozaki Y, Morimoto M, Watanabe T, Bhakdi S, Asada Y, Chen Y.E, Fan, J: Human C-reactive protein does not promote atherosclerosis in transgenic rabbits. *Circulation* 120: 2088-2094, 2009.

④ Koike T, Kitajima S, Yu Y, Li Y, Nishijima K, Liu E, Sun H, Waqar A.B., Shibata N, Inoue T, Wang Y, Zhang B, Kobayashi J, Morimoto M, Saku K, Watanabe T, Fan J: Expression of human apoAIII in transgenic rabbits leads to dyslipidemia:

a new model for combined hyperlipidemia, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 2047-2053, 2009.

〔学会発表〕(計 11 件)

①Yu Y, Koike T, Zhang X Zhang J, Fan J: 内皮リパーゼ特異的アンチセンスによる発現阻害効果と HDL 代謝への影響. 第 4 回ウサギフォーラム、2010 年 7 月 24 日 (秋田市)

②Koike T, Kitajima S, Yu Y, Nishijima K, Waqar AB, Inoue T, Wang Y, Bo Z, Kobayashi J, Morimoto M, Saku K, Watanabe T, Fan J: Expression of Human ApoAII in Transgenic Rabbits Leads to Dyslipidemia -A New Model for Combined Hyperlipidemia. 第 42 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2010 年 7 月 15-16 日 (岐阜市)

③Matsuda S, Kitajima S, Koike T, Fan J, Asada Y: Human C-reactive protein enhances thrombus formation in transgenic rabbits. 第 42 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2010 年 7 月 15-16 日 (岐阜市)

④範江林, 小池智也, 北嶋修司, 浅田祐士郎, 渡辺照男. 動脈硬化の発生における C 反応性蛋白の役割: 遺伝子改変ウサギ・モデルによる解析. 第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 27-29 日 (新宿区)

⑤青木正, 小池智也, Waqar AB, Yu Y, 井上朋大, 柴田信光, 西島和俊, 北嶋修司, 能勢真人, 範江林. 実験的関節炎形成における C 反応性蛋白の役割. 第 99 回日本病理学会総会、2010 年 4 月 27-29 日 (新宿区)

⑥Koike T, Kitajima S, Yu Y, Nishijima K, Zhang J, Ozaki Y, Morimoto M, Watanabe T, Asada Y, Chen E, Fan J: Transgenic rabbits expressing Human C-reactive protein. 第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2009 年 7 月 17-18 日 (下関市)

⑦Waqar AB, Koike T, Yu Y, Shibata N, Inoue T, Aoki T, Fan J: High-Fat-Diet-induced metabolic disorders enhances atherosclerosis. 第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2009 年 7 月 17-18 日 (下関市)

⑧Yu Y, Zhang J, Koike T, Ishida T, Hirata K, Chen E, Fan J: Molecular cloning and characterization of rabbit endothelial lipase. 第 41 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2009 年 7 月 17-18 日 (下関市)

⑨Koike T, Yu Y, Kitajima S, Zhang J, Bhakdi S, Chen E.Y., Fan J: Transgenic rabbits expressing human C-reactive protein. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009, Xian, China

⑩Morimoto M, Kitajima S, Nishijima K, Koike T, Fan J: Immunoreactivity of neuropeptides in hypothalamus of the transgenic rabbits using immunohistochemical staining. 3rd International Meeting on Rabbit Biotechnology, Jun 4-5, 2009, Xian, China

⑪Koike T, Yu Y, Kitajima S, Zhang J, Bhakdi S, Chen YE, Fan J: Transgenic Rabbits Expressing human C-reactive Protein. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2009, April 29-May 1, 2009, Washington DC, USA

〔その他〕
ホームページ等

http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pathol01/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 智也 (KOIKE TOMONARI)
山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教
研究者番号: 40432158

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし