

## 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 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390068

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法の新たな戦略 - 遺伝子改変ウサギを用いた研究

研究課題名（英文） Elucidation of endothelial lipase as a new therapeutic strategy for atherosclerosis: a study using transgenic rabbits

研究代表者

範 江林 (FAN JIANGLIN)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：60272192

### 研究成果の概要（和文）：

内皮細胞リパーゼ（Endothelial lipase, EL）は HDL 代謝においては重要な酵素として知られている。EL の発現を低下させることによって、血漿 HDL 値を上昇させることが、動脈硬化に対する新たな治療法になりうると思われる。この仮説を証明するために、我々はウサギモデルを用いて、EL の発現様式や、EL と血漿 HDL との関係、動脈硬化病変内の EL の発現、EL のアンチセンスの投与により血漿 HDL の変化などの解析を行った。また、ヒトの EL 遺伝子を用いて、EL の過剰発現トランスジェニックウサギの作製にも挑戦した。

### 研究成果の概要（英文）：

Existing evidence suggests that endothelial lipase (EL) plays an important role in high-density-lipoprotein (HDL) metabolism. First, we cloned the rEL cDNA and gene of rabbits. Using Northern blotting, real-time RT-PCR, Western blotting, and *in situ* hybridization, we revealed that rEL mRNA was highly expressed in the cholesterol synthesis-related organs including the liver, testis, and adrenal along with its expression in the lung, kidney, bone marrow, and small intestine. The plasma HDL levels in WHHL rabbits were inversely associated with high levels of plasma rEL proteins and hepatic expression of rEL mRNA. Injection of rEL-specific antisense oligonucleotides into rabbits resulted in an elevation of plasma large-sized HDLs. Furthermore, we demonstrated that the rEL mRNA was expressed by both endothelial cells and macrophages in the lesions of aortic atherosclerosis of WHHL rabbits. rEL is expressed in multiple tissues and may have many physiological and pathophysiological functions such as in the regulation of cholesterol metabolism and atherosclerosis. Our results suggest that EL is an important regulator of plasma HDL levels in rabbits. In addition, we generated two transgenic rabbits expressing different levels of human EL in the liver.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2012 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：高脂血症、動脈硬化、遺伝子改変ウサギ、HDL、アンチセンス

### 1. 研究開始当初の背景

脂質代謝異常症(高 LDL 並びに低 HDL)は動脈硬化の主要な危険因子であり、臨床治療に

おいては、動脈硬化の患者に対して積極的に悪玉と呼ばれる LDL コレステロールを下げる薬剤の処方是一般的である。特に、強力な降

脂質作用のあるスタチンの使用によって現在の動脈硬化疾患の合併症発病率は著しく減少している。しかし、スタチンの単独使用では動脈硬化性心筋イベントの減少が30%にしかとどまらず、新しい動脈硬化の治療薬の開発が期待されている。特に血中の善玉である抗動脈硬化作用のHDLの上昇が、その治療戦略として注目されるようになっている。内皮細胞リパーゼ (Endothelial lipase, EL) は、1999年にアメリカの研究者により発見され、HDLの代謝において最も重要な酵素として報告された。ELの発現上昇あるいは血漿濃度の増加は血漿HDL値と逆相関していることが動物実験と臨床試験により明らかにされた。また、EL欠損マウスでは動脈硬化の病変が正常マウスより減少することも報告されている。これらの報告により、ELの抑制は血中のHDL値を上昇させ、結果として動脈硬化の発生を抑制できるのではないかといった仮説が唱えられるようになった。しかし、これまでの多くの研究結果は、脂質代謝系がヒトと全く異なっているマウスの実験から得られたもので、ヒトには適当かどうかは不明である。そこで、我々はよりヒトの代謝系に近い、動脈硬化及び脂質代謝研究において最も優れたウサギモデルに着目して本研究の遂行を図った。

## 2. 研究の目的

本研究では三つの手法 (EL阻害法、分子病理学的解析、EL過剰発現Tgモデル) により、脂質代謝および動脈硬化の発生におけるELの役割を解明し、EL阻害による、新たな脂質異常症ならびに動脈硬化の治療戦略の有効性を検証した。

## 3. 研究の方法

### Tgウサギの作製と解析:

肝臓特異的に高発現できるベクターであるpIivHEG/LE6にヒトELc DNAを挿入して、pIivLE6-hELコンストラクトを作製した。このコンストラクトは肝臓にELをconstitutiveに高発現できるので、血中リポ蛋白代謝に及ぼすELの影響や動脈硬化発生・進展との相互関係が検討可能である。また、ヒトTie-2遺伝子のプロモーター/エンハンサーを用いてpTie-2-hELコンストラクトを構築する。このコンストラクトは血管内皮細胞特異的にELの過剰発現ができるので、血管内皮、特に病変部に発現しているELと動脈硬化の進展との関係について検討できる。この二つのコンストラクトを用いて、我々が確立したウサギ受精卵のマイクロインジェクション法により遺伝子改変ウサギの作製を行った。

1ヵ月後に生まれた子ウサギの耳生検を行い、その組織細胞からDNAを抽出し、サザンブロット法によって導入遺伝子が染色体上に組み込

まれているかどうかを確認する。Tgウサギ各組織から抽出したmRNAを用いてノーザンブロットを行い、肝臓や内皮細胞特異的なヒトEL mRNAの発現を検索する。血中EL濃度はヘパリン静注後の血清を用いて、ウェスタンブロット法により確認後、ELISA法により定量する。血中ELの活性はMcCoy氏らの方法にて測定する (McCoy et al. J Lipid Res 2002)。正常ウサギならびにTgウサギの血中の総コレステロール、トリグリセライド、HDL-コレステロールを測定する。リポ蛋白は超遠心法あるいはcITP法により分離し、アガロースゲルで分析する。リポ蛋白の顆粒サイズの変化はnegative staining法を用いて電子顕微鏡で観察する。アポ蛋白の分析はSDS-PAGEで分離後、ウェスタンブロット法により行う。

### EL特異抗体の作製:

抗ウサギEL抗体は市販されていないため、抗体の作製が必要である。我々が同定したウサギEL配列に基づいて、他のリパーゼ (LPLとHL) と交差反応しない配列をペプチド抗原として、モノクローナル抗体を作製する。この抗体はELISAやウェスタンブロットなどで使用できる。一方で、体内への投与によりEL活性が阻害可能な「阻害抗体」の作製は、哺乳類細胞で発現させた全長のEL蛋白の精製が必要である。ペプチド抗体の作製は、米国GenScript社に委託した。

### ELアンチセンスの合成:

抗体の体内投与は一回のみに限られるため、短期間のELの抑制効果しか検討出来ない。長期間に体内のEL活性を抑制させて、HDLの上昇効果やその抗動脈硬化作用を検討できる方法としては、ウサギへのELアンチセンスの投与がある。我々が単離同定したウサギEL配列を基にして90個の候補配列からスクリーニングし、培養ウサギ肝細胞でのEL発現を強力に抑制できる二つの配列を同定した。この二つのアンチセンスと、対照となるミスマッチコントロールの合成は、米国カリフォルニア州にある製薬会社ISISと協力して行った。

### 動脈硬化病変におけるELの発現の解析:

動脈硬化病変にELが発現しているかどうかは不明である。ヒト冠状動脈並びにWHHLウサギの大動脈を用いてEL免疫染色を行う。特にELの局在や分布、不安定プラークとの関係について検討する。病変内の細胞や細胞外基質との関係を調べるために、マクロファージ、平滑筋細胞、アポ蛋白Bをそれぞれ、ELと共に二重染色する。EL免疫染色が陽性であることを確認したうえで、in situ hybridization法でELの発現細胞を同定する。

### EL阻害による血清リポ蛋白の変化:

2種類のELアンチセンスと、対照のミスマッチコントロール (100mg/kg/week) を正常ウサギ (各群20羽) に6週間 (週2回) 静注する。投与開始後、毎週採血し、血液検査 (血算・生

化学)並びにリポ蛋白の測定を行う。特に、HDLコレステロール濃度やHDL粒子径、アポ蛋白の変化を解析した。

#### WHHLウサギへのELアンチセンスの投与:

6ヵ月齢のWHHLウサギに、ELアンチセンスと、対照のミスマッチコントロール

(100mg/kg/week)を16週間(週2回)静注する。投与開始後、毎週、血液検査とリポ蛋白の測定を行う。16週目でウサギを安楽死させ、大動脈並びに冠状動脈を採取し、動脈硬化病変(マクロとミクロ)を解析する。

#### 4. 研究成果

まず、ウサギEL cDNA配列を同定しGenbankに登録した (accession No. NM\_001195638)。ウサギELアミノ酸配列はヒトELと比べ85.4%相同性があると認めた (図1)。

更にウサギEL cDNA配列に基づいて、遺伝子構造を推定できた。

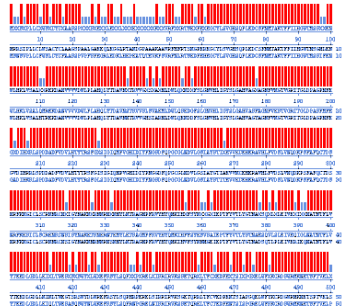


図1 ウサギEL cDNA配列(上)と遺伝子構造(下)

図1に示したよう、ウサギEL遺伝子には10個のエクソンがあり、ヒトとマウスと同様であった。



FISH法を用いて、さらにウサギEL遺伝子の染色体座の位置(9q14.3-15.1)を同定した(図2)。

図2 ウサギEL遺伝子の染色体

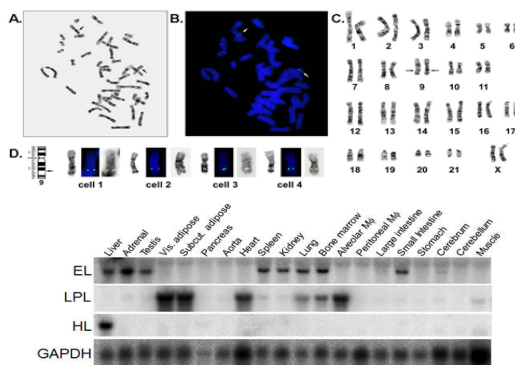


図3 ノーザンプロット解析

次に、我々は各組織でのEL mRNAの発現様式をNorthern blotで検討した。20種類の各臓器の組織をEL cDNA probeでハイブリッドしたとこ

ろ、ELの発現は肝臓、副腎、精巣、脾臓、腎臓、肺、骨髄、小腸などで確認された(図3)。しかし、同じリパーゼファミリーに属しているHLやLPLの発現と異なっている。ウサギのHL発現は肝臓のみで、LPLの発現は脂肪組織や心臓、マクロファージで確認されている。肝臓と腎臓のEL発現部位は、さらにHybridization法で検出した。肝臓にはEL mRNAの発現細胞が肝細胞であり、腎臓のELは尿細管と小血管であった(図4)。

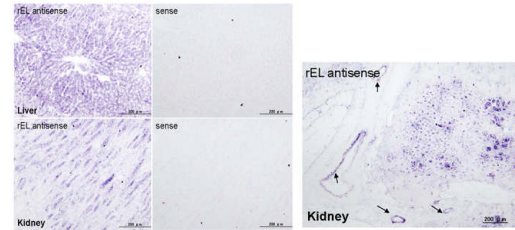


図4 肝臓(上)と腎臓のEL mRNA発現(Hybridization法) ELの発現と血中HDLとの関係:

ELは血中のHDL値との関係があるかどうかについて、正常ウサギと高脂血症とHDL値の低いWHHLウサギを用いて、検討を行った。まず、血中のEL蛋白量をWestern Blotで比較した。図5に示しているようにEL蛋白はヘパリン静注に関係なく血中に存在しており、WHHLウサギの血中ELはいずれにしても正常ウサギの血中ELより多いことが判明した。更にWHHLウサギの肝臓でのEL mRNA発現も正常ウサギより亢進していることも認められた(図5)。

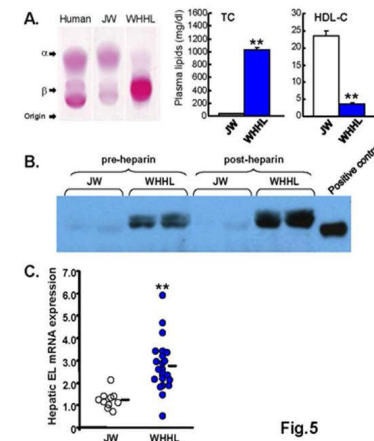


Fig.5

図5 リポ蛋白の解析と肝臓でのEL発現

#### ELアンチセンスの静注実験:

ELの発現抑制は血中HDL-C値にどのように影響を及ぼすかを調べるために、ウサギにELアンチセンスを投与して、6週間の血中HDL-Cの変化を観察した。図6で示したように、血中のHDL-CはELアンチセンスの投与後、低下傾向が認められ、特にリン質を富むサイズの大きいHDL粒子の増加も認めた(図6)。

図6 アンチセンスの投与実験

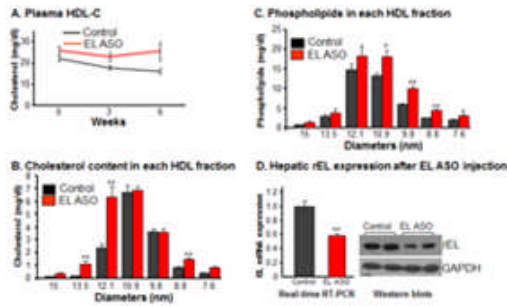


Fig.6

また、ELアンチセンスの投与後6週目でウサギを安楽死させ、肝臓でのEL発現量を調べたところ、正常群より約50%の減少が認められた。動脈硬化病変内にELの存在を確認するために、免疫染色とIn situ hybridization法で検討した。ELの発現は主に内皮細胞と内膜に浸潤したマクロファージに観察された (図7)。

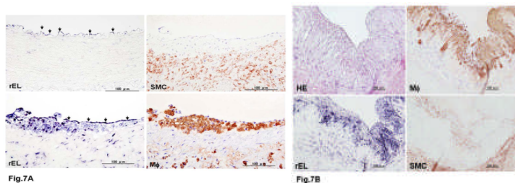


図7 免疫染色とIn situ hybridization

#### EL Tgウサギの作製:

肝臓で発現したELコンストラクトを用いて、ウサギの受精卵1081個にマイクロインジェクションを行った後、32羽仮親に移植した。妊娠したウサギが12羽で延べ18羽子ウサギが生まれた。PCR法で検査したところ2羽にヒトEL遺伝子が導入されていることが確認できた。

#### 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 21 件)

- Yang D, Zhang J, Xu J, Zhu T, Fan J, Chen Y. Production of apolipoprotein c-iii knockout rabbits using zinc finger nucleases. *JoVE*. 査読有 2013: in press
- Wang Z, Li S, Sun L, Fan J, Liu Z. Comparative analyses of lipoprotein lipase, hepatic lipase and endothelial lipase and their binding properties with known inhibitors. *PLoS one*. 査読有 2013: in press
- Wang Y, Zhao S, Fan J, Liu E. Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors. *Biomed Res Internat*. 査読有 2013; 2013: Article ID 580463, 580469 pages
- Wang Y, Niimi M, Nishijima K, Yu Y, Koike T, Kitajima S, Inoue T, Waqar AB, Liu E, Kohashi M, Keyamura Y, Yoshikawa T, Zhang J, Ma L, Zha X, Watanabe T, Asada Y, Chen EY, Fan J. Human apolipoprotein aii protects against diet-induced atherosclerosis in transgenic rabbits. *Arterioscler Thromb Vas Biol*. 査読有 2013; 33: 224-231
- Chen Y, Zhao S, Huang B, Wang Y, Li Y, Waqar AB, Liu R, Bai L, Fan J, Liu E. Probucol and cilostazol exert a combinatorial anti-atherogenic effect in cholesterol-fed rabbits. *Thromb Res*. 査読有 2013: in press
- 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*. 査読有 2012; 19: 213-226
- Yu Q LY, Waqar AB, Wang Y, Huang B, Chen Y, Zhao S, Yang P, Fan J, Liu E. Temporal and quantitative analysis of atherosclerotic lesions in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. . Epub 2012 mar 14. *J Biomed Biotechnol*. 査読有 2012; 2012: 506159
- Yu Q, Lin Y, Yang P, Wang Y, Zhao S, Yang P, Fan J, Liu E. C-reactive protein is associated with the progression of acute embolic stroke in rabbit model. *J Thromb Thrombolysis*. 査読有 2012; 33: 301-307
- Yu Q, Li Y, Wang Y, Zhao S, Yang P, Chen Y, Fan J, Liu E. C-reactive protein levels are associated with the progression of atherosclerotic lesions in rabbits. *Histol Histopathol*. 査読有 2012; 27: 529-535
- Wang Y, Cheng F, Chen Y, S. Z, Yu Q, Fan J, Liu E. High-dose rosiglitazone is pro-atherogenic in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. 査読有 2012; 222: 292-294.

11. Wang X, Wang Y, Ren Z, Qian C, Li Y, Wang Q, Zhang Y, Zheng L, Jiang J, Yang C, Wang D, Fan J. Protective effects of 20(s)-protopanaxatriol on viral myocarditis infected by coxsackievirus b3. *Pathobiology*. 查読有 2012; 79: 285-289
  12. Wang J, Liao Y, Fan J, Ye T, Sun X, Dong S. Apigenin inhibits the expression of il-6, il-8, and icam-1 in dehp-stimulated human umbilical vein endothelial cells and in vivo. *Inflammation*. 查読有 2012; 35: 1466-1476
  13. Meada T, Liu E, Nishijima K, Yamaguchi S, Morimoto M, Watanabe T, Fan J, Kitajima S. Effect of the primary cooling rate on the motility and fertility of frozen-thawed rabbit spermatozoa. *World Rabbit Science*. 查読有 2012; 20: 65-70
  14. Li Y, Wang Z, Tao Y, Fan W, Li M, Huang B, Zhao S, Fan J, Liu E. Characteristics of himalayan marmots and their response to an atherogenic diet. *Exp Anim*. 查読有 2012; 61: 461-466
  15. Pravenec M, Kajiya T, Zidek V, Landa V, Mlejnek P, Simakova M, Silhavy J, Malinska H, Oliyarnyk O, Kazdova L, Fan J, Wang J, Kurtz TW. Effects of human c-reactive protein on pathogenesis of features of the metabolic syndrome. *Hypertension*. 查読有 2011; 57: 731-737
  16. 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 YE, Fan J, Asada Y. Human c-reactive protein enhances thrombus formation after neointimal balloon injury in transgenic rabbits. *J Thromb Haemost*. 查読有 2011; 9: 201-208
  17. Kitajima S, Maeda T, Nishijima K, Morimoto M, Watanabe T, Fan J. Factors influencing the number of eggs recovered from rabbits superovulated with fsh or pmsg: Analysis of five years of data from 509 rabbits. *Scand. J. Lab. Anim. Sci*. 查読有 2011; 38: 169-174
  18. Huang Q, Fang C, Wu X, Fan J, Dong S. Perfluorooctane sulfonate impairs the cardiac development of a marine medaka (*oryzias melastigma*). *Aquat Toxicol*. 查読有 2011; 105: 71-77
  19. Ding Y, Wang Y, Zhu H, Fan J, Yu L, Liu G, Liu E. Hypertriglyceridemia and delayed clearance of fat load in transgenic rabbits expressing human apolipoprotein ciii. *Transgenic Res*. 查読有 2011; 20: 867-875
  20. Zhang C, Zheng H, Yu Q, Yang P, Li Y, Cheng F, Fan J, Liu E. A practical method for quantifying atherosclerotic lesions in rabbits. *J Comp Pathol*. 查読有 2010; 142: 122-128
  21. 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*. 查読有 2010; 213: 148-155
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Fan J. Human apolipoprotein aii in atherosclerosis: an old guy has a new function? Taishan Academic Forum: The 2<sup>nd</sup> International Forum of ATVB. 2012 年 12 月 8 日, Lijing Xintiandi Hotel, China
  - ② Fan J. Human apolipoprotein aii protects against diet-induced atherosclerosis in transgenic rabbits. American Heart Association Scientific Sessions 2012. 2012 年 11 月 5 日, Los Angeles Convention Center, USA
  - ③ Liu ZC. Immunohistochemical demonstration of apolipoprotein b-48 in the lesions of human atherosclerosis. 第 101 回日本病理学会総会, 2012 年 4 月 27 日, 京王プラザホテル
  - ④ Koike T. Apoaii-rich hdlc have anti-inflammatory functions. XVI International Symposium on

Atherosclerosis, 2012 年 3 月 28 日, Sydney Convention and Exhibition Centre, Australia

- ⑤ Liu E. The anti-atherogenic effects of probucol and cilostazol in cholesterol-fed rabbits. XVI International Symposium on Atherosclerosis, 2012 年 3 月 26 日, Sydney Convention and Exhibition Centre, Australia
- ⑥ Fan J. Transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis. ISTH2011 (第 23 回国際血栓止血学会), 2011 年 7 月 23 日, 国立京都国際会館
- ⑦ Niimi M. Probucol has different anti-atherogenic effects compared to atorvastatin. 第 43 回日本動脈硬化化学会総会・学術集会, 2011 年 7 月 16 日, ロイトン札幌
- ⑧ Koike T. Apolipoprotein-aii plays an important role in lipid metabolism and atherosclerosis. 4<sup>th</sup> International Rabbit Biotechnology Meeting, 2011 年 6 月 30 日, Hungarian Academy of Sciences, Hungary
- ⑨ 于 イン、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, 秋田大学
- ⑩ Koike T, Expression of Human Apoaii in transgenic rabbits leads to dyslipidemia- A new model for combined hyperlipidemia. 第 42 回日本動脈硬化化学会総会・学術集会, 2010 年 7 月 15 日, 長良川国際会議場
- ⑪ 範 江林, 動脈硬化の発生に於ける 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 28 日, 京王プラザホテル
- ⑫ 範 江林, 分子病理学研究所の最前線: 動脈硬化の分子病態の解明及びトランスレーショナルリサーチへの挑戦. 第 99 回日本病理学会総会, 2010 年 4 月 27 日, 京王プラザホテル

[図書] (計 1 件)

- ① Fan J, Zhang J, Chen YE. C-reactive protein and its pathophysiological

roles in atherosclerosis. In: Wang H, Patterson C, eds. *Atherosclerosis: risk, mechanism and therapy*. Hoboken, NJ, : John Wiley & Sons Inc.; 2012: in press.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 急性心臓死ウサギモデル、およびその作製方法

発明者: 範 江林、小池智也、塩見雅志

権利者: 山梨大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-101525

出願年月日: 2013 年 5 月 13 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical\\_basic/pathol01/](http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical_basic/pathol01/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

範 江林 (FAN JIANGLIN)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号: 60272192

### (2) 研究分担者

北嶋 修司 (KITAJIMA SHUJI)

佐賀大学・総合分子実験センター・准教授

研究者番号: 70284643

小池 智也 (KOIKE TOMONARI)

神戸大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・助教

研究者番号: 40432158

(H24: 連携研究者)

### (3) 連携研究者

柴田 信光 (SHIBATA NOBUMITSU)

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号: 40452130

塩見 雅志 (SHIOMI MASASHI)

神戸大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・准教授

研究者番号: 50226106

手塚 英夫 (TEZUKA HIDEO)

山梨大学・総合分析実験センター・准教授

研究者番号: 70155456