

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 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590783

研究課題名（和文） 高比重リポ蛋白による心保護作用についての検討

研究課題名（英文） Effect of high-density lipoprotein on cardiac function

研究代表者

川合 宏哉（KAWAI HIROYA）

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：20346266

研究成果の概要（和文）：血管内皮リパーゼ（EL）は血清高比重リポ蛋白（HDL）の代謝酵素であると同時に、HDL に含まれるリン脂質を分解して脂肪酸を産生する。本研究では、高 HDL 血症を示す EL 欠損マウスを用いて、圧負荷心不全における EL 欠損と高 HDL の影響を検討した。EL 欠損マウスは野生型マウスに比べて顕著な心不全をきたした。EL は HDL を基質として心臓に脂肪酸を供給するための副経路として働いており、圧負荷心不全の病態を制御していることが証明された。

研究成果の概要（英文）： Under normal conditions, the heart utilizes nearly 70% of its energy through the oxidation of fatty acids (FA). FA are supplied to the heart from the hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by triglyceride lipase members. Lipoprotein lipase (LPL) has been considered as the only enzyme capable of this function. Endothelial lipase (EL) exhibits primarily phospholipase activity against high-density lipoproteins, but to a lesser extent, triglyceride lipase activity. In this study, we evaluated the role of cardiac EL under conditions of increased energy needs. Pressure overload-induced cardiac hypertrophy was generated in C57Bl/6 mice by ascending aortic constriction, and EL expression in the hypertrophied hearts was evaluated. Cardiac EL expression was elevated in the early stage of cardiac hypertrophy. Complementary cell culture experiments using rat neonatal cardiomyocytes revealed that inflammatory cytokines and lipopolysaccharides increased EL expression in cardiomyocytes, while LPL was decreased by the inflammatory stimuli. In addition, the inflammatory stimuli-induced EL expression was inversely correlated with the expression of carnitine palmitoyltransferase 1b, which is a key enzyme involved in the regulation of FA oxidation and utilization. Furthermore, cardiac EL expression was associated with its function. EL may be an alternative pathway to supply FA to the heart and regulate cardiac function. This function was likely relevant particularly under inflammatory conditions where LPL is downregulated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：心不全、高比重リポ蛋白、炎症、脂質代謝、血管内皮、リパーゼ

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）値と心不全死亡リスクの間に逆相関傾向が示

されている。HDL はコレステロール逆転送以外に抗炎症・抗酸化作用、内皮機能改善作用など多面的機能を有することが示唆されている。一方、病態下ではHDLが機能不全に陥ることが示唆されているが、その意義はいまだ十分に解明されていない。HDLの量的あるいは質的制御が心不全治療の標的となる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

高HDL血症を示す血管内皮リパーゼ (EL) マウスに心不全を作製し、HDLが心不全の発症・進展に保護的に作用するか検討する。さらにHDLの抗酸化・抗炎症作用、心保護効果について培養心筋細胞を用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウスの上行大動脈を26G針と共に糸で結紮することによって、大動脈縮窄による圧負荷心不全モデルを作成し、術後1、4、7、28日目の心臓におけるELとLPLのmRNA発現量の時間的変動をReal-time PCR法を用いて評価した。また、Western blotting法を用いてELの蛋白発現量を検討した。

(2) 野生型およびEL欠損マウスを用いて圧負荷心不全モデルを作成し、病的負荷のかかった心臓におけるEL欠損の影響を検討した。術後4週間目に心エコーを用いて心機能を評価した後、心不全のマーカー、脂肪酸β酸化関連酵素、ATPなどの定量評価をおこなった。

(3) 新生仔ラットの心臓から心筋細胞と非心筋細胞を分離し、炎症性刺激によるELの発現制御機構を検討した。また、アデノウイルスベクターを用いて心筋細胞にEL遺伝子を過剰発現させた後、HDLと37℃で24時間インキュベーションし、各心筋細胞におけるCPT-IとMCADのmRNA発現量を比較した。lacZ遺伝子を発現させた心筋細胞を対照として用いた。

(4) 新生仔ラット培養心筋細胞を血清除去、エンドトキシン、過酸化水素などで刺激する。このような心筋細胞に対する炎症や酸化ストレスをHDLが抑制するかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 大動脈縮窄による圧負荷心不全を作製した野生型マウスでは、心臓におけるELのmRNA発現量は圧負荷を加えていない心臓と比べて、術後1日目には13.5倍にまで著明に増加し、その後は徐々に減少した。ELの蛋白発現量も術後急性期に増加していた。対照的に、LPLのmRNA発現量は、術後1日目には約50%減少していた。

(2) 野生型およびEL欠損マウスに圧負荷心不全を作成したところ、EL欠損マウスでは野生型マウスと比較して有意に左室拡張末期径が増加し、駆出率は低下していた。一方、左室壁厚については両群とも同様に増加していた。また、心重量は両群とも同等に増加していたが、肺重量はEL欠損マウスにおいてのみ有意に増加していた。このことは、圧負荷による心肥大の程度は同等であったものの、EL欠損マウスではより顕著な肺うっ血をきたしたことを示唆している。心不全マーカーである心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) や脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) のmRNA発現量を調べたところ、EL欠損マウスでは術後野生型マウスよりも術後に有意に高値を示した。

(3) 手術1日目の血漿中および心臓における脂質含有量を評価したところ、野生型マウスでは手術によって各脂質含有量に有意な変化を認めなかったが、EL欠損マウスでは手術によって血漿中および心臓のトリグリセリド含有量の有意な増加を認めた。また、ミトコンドリアにおける脂肪酸β酸化関連酵素であるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ-1 (CPT-1) や中鎖アシルCoA脱水素酵素 (MCAD) のmRNA発現量、さらにβ-ヒドロキシアシルCoAデヒドロゲナーゼ (β-HAD) の蛋白発現量は、術後EL欠損マウスでは術後野生型マウスに比べて有意に低値であり、筋内ATP含有量は術後EL欠損マウスで有意に低値を示した。

(4) 培養心筋細胞と非心筋細胞において、リポポリサッカライド (LPS) や腫瘍壊死因子 (TNF-α) などの炎症性刺激はELの発現を誘

導する一方で、LPL の発現は逆に有意に抑制した。また、EL 遺伝子を過剰発現させた心筋細胞では、対照の心筋細胞と比較して、CPT-I と MCAD の mRNA 発現量が有意に増加し、さらに心筋細胞内 ATP 含有量も高値を示した。

(5) 新生児ラット培養心筋細胞に対して血清除去や過酸化水素によって細胞死が誘導されたが、HDL を添加することにより細胞死が抑制された。また、培養心筋細胞を LPS で刺激すると、炎症性サイトカインである TNF α が誘導されたが、HDL を添加することにより TNF α の誘導が抑制された。以上のことから、HDL は心筋保護効果を有し、飢餓、酸化ストレス、炎症などによる心筋傷害を抑制することが明らかとなった。

(6) 以上より、EL は心臓に脂肪酸を供給するための副経路として働いており、圧負荷心不全の病態で心機能を制御している可能性がある。このような効果は、特に LPL の作用が抑制された病的な心臓において顕著であることが示唆された。EL 欠損は血清 HDL を上昇させるが、EL の欠損によるエネルギー利用障害は、HDL による心筋保護効果では代償できず、心不全が進行することが示唆された。

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 1 件)

1. 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 May; 61(5): 1002-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.201608. Epub 2013 Mar 4. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. Tatsuro Ishida. Endothelial Lipase would be a molecular target for HDL-raising therapy. 2013 WINPTech. 2013. 2. 19. Kobe.
2. Hideto Nakajima, Tatsuro Ishida, Michiko Monguchi, Maki Sasaki, Kensuke

Kondo, Kenta Mori, Minoru Hasokawa, Yoko Haraguchi, Tomoyuki Yasuda, Ryuji Toh, Seimi Kobayashi, Ken-ichi Hirata. Endothelial lipase in the heart modulates pressure overload-induced heart failure through fatty acid utilization. American Heart Association Scientific Sessions 2012. Los Angeles, CA, USA. 11/7/2012.

3. Hideto Nakajima, Tatsuro Ishida, Maki Sasaki, Kensuke Kondo, Kenta Mori, Minoru Hasokawa, Yoko Haraguchi, Tomoyuki Yasuda, Seimi Kobayashi, Ken-ichi Hirata. 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. Hideto Nakajima, Tatsuro Ishida, Monguchi Tomoko, Maki Sasaki, Kensuke Kondo, Kenta Mori, Minoru Hasokawa, Yoko Haraguchi, Sun Li, Tomoyuki Yasuda, Shinohara Masakazu, Toh Ryuji, Seimi Kobayashi, Ken-ichi Hirata. 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. Hideto Nakajima, Tatsuro Ishida, Kensuke Kondo, Kenta Mori, Maki Sasaki, Minoru Hasokawa, Yoko Haraguchi, Tomoyuki Yasuda, Masakazu Shinohara, Seimi Kobayashi, Ken-ichi Hirata. Increased expression of endothelial lipase in a murine model of heart failure. 2011. 7. 16 第 43 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 札幌

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川合 宏哉 (KAWAI HIROYA)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20346266

(2) 研究分担者

杜 隆嗣 (TOH RYUJI)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50379418

(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