

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591050

研究課題名(和文) 血管内皮リパーゼのDysfunctional HDLと動脈硬化の成因に及ぼす影響

研究課題名(英文) Impact of endothelial lipase on dysfunctional HDL and atherosclerosis

研究代表者

石田 達郎 (Ishida, Tatsuro)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：00379413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：高比重リポ蛋白(HDL)中の構成成分の変化により抗炎症作用が減弱したHDL (dysfunctional HDL)が生成される。本研究では、dysfunctional HDLの評価方法や、HDL代謝の制御因子である血管内皮リパーゼ(EL)の関与、冠動脈疾患における意義を検討した。血清EL mass/活性は動脈硬化、食事、冠危険因子に連動して上昇し、低HDL-C値の原因となることが示唆された。次に、基礎的および臨床的にヒト血清HDLの機能を評価したところ、血清中のdysfunctional HDL量は冠動脈疾患の予後に影響を及ぼし、スタチンやn-3脂肪酸(EPA)はHDLの機能を改善した。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the role of endothelial lipase (EL) on dysfunctional high-density lipoprotein (HDL) and coronary artery disease. We found that EL has a modest impact on baseline HDL-C levels. EL expression is elevated in inflammation, acute myocardial infarction, or postprandial states, which was associated with the reduction of serum HDL-C levels. The inflammation-activated EL may contribute to the low HDL-C levels in these pathological states. Next, we established clinical and in vitro cell-based assays for HDL quality. The presence of dysfunctional HDL modulated the progression of coronary artery lesions through regulating functional quality of HDL. Administration of pitavastatin or eicosapentaenoic acid improved anti-inflammatory, anti-oxidative, and cholesterol efflux capacity of HDL in dyslipidemic patients, and these drugs may be useful for treatment of dysfunctional HDL. Taken together, EL and dysfunctional HDL may exert a marker and modulator of atherosclerosis.

研究分野：循環器内科

キーワード：HDL コレステロール 血管内皮 リパーゼ 循環器 動脈硬化 炎症 脂質異常症

1. 研究開始当初の背景

「善玉」と呼ばれる高比重リポ蛋白 (HDL) は、多面的な抗動脈硬化作用を有するが、糖尿病や脂質異常症、動脈硬化症などの病態では、HDL 中の脂質および蛋白構成成分が量的および質的に変化し、抗動脈硬化作用が減弱した HDL (dysfunctional HDL) が生成されることが報告されている。しかし、dysfunctional HDL の簡便な評価方法や冠動脈疾患における意義は明らかにされていない。血管内皮リパーゼ (EL) は HDL 代謝の制御因子であり HDL 増加療法の分子標的のひとつである。しかし、dysfunctional HDL の臨床診断・評価方法や、EL が dysfunctional HDL の成因に及ぼす影響は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、血清 EL mass や EL 活性の測定方法を開発し、HDL の質的機能との関係を、細胞・生化学的手法、質量分析などを駆使して測定するとともに、冠動脈疾患の予後や重症度との関係を検討する。また、動物実験を通じて、dysfunctional HDL の病態解明と治療法、さらに HDL 増加療法および動脈硬化の進展防止・退縮における EL 阻害療法の正当性を解明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 血清 EL mass/活性の測定法の改良

ヒト EL 蛋白に対する 2 種類のモノクロナル抗体を用いてヒト血清 EL mass の測定用 ELISA の確立と改良を行った。

血清を抗 EL 抗体で免疫沈降した後に、その活性を蛍光標識した合成リン脂質 Bis-BODIPY FL C11-PC (Invitrogen) を基質として測定する系を確立した。

神戸大学医学部附属病院において心血管病を有する患者より採血し、上記の測定系を用いて血清 EL 蛋白濃度および活性と血清脂質や冠危険因子との関係を検討した。

(2) dysfunctional HDL の測定系の開発

i) 実験的評価法：放射性標識したコレステロールを取り込ませた培養マクロファージ (THP1) からのコレステロール引抜き能、抗酸化酵素 パラオキシナーゼ 1 (PON1) の活性および蛋白量、培養血管内皮細胞 (HUVEC) の創傷治癒促進作用、接着分子 VCAM1 発現の抑制作用、アポ A1 を変性させるミエロペルオキシダーゼ (MPO) 蛋白量、を組み合わせることにより、ヒト血清中の dysfunctional HDL を評価した。

ii) 臨床的評価法：血中ミエロペルオキシダーゼ (MPO) とパラオキシナーゼ 1 (PON1) を測定し、患者血清中の HDL の抗炎症作用と MPO/PON1 比との関係を検討した。

(3) HDL の質を改善する薬剤の検討

スタチンや n-3 系不飽和脂肪酸 (EPA) による治療後の HDL の質的特性を、上記方法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) ヒト血清 EL mass/活性と HDL-C の関係

血清 EL mass/活性は、血清 HDL-C 値と有意な逆相関関係を示した。さらに、冠動脈疾患患者は、非冠動脈疾患患者と比較して血清 EL mass/活性が上昇しているとともに HDL-C 値が低値であった。また、血清 EL mass/活性は喫煙や肥満、高血圧などの危険因子に連動して上昇し、低 HDL-C 値の原因となることが示唆された。

肥満患者において、食事前で血清 EL mass を測定したところ、トリグリセリド (TG) を多く含む RLP-TG の増加に伴って、EL mass が増加し、HDL-C が減少することが明らかとなった。すなわち、EL の変動は食後高脂血症に合併する低 HDL 血症の成因に寄与することが示唆された。

急性心筋梗塞患者では、発症早期に一過性に低 HDL 血症が認められることが知られている。急性心筋梗塞患者における EL mass を時間的経過から検討したところ、急性心筋梗塞発症後、合併する炎症反応と連動して EL mass が増加し、内因性の EL 阻害分子である Angptl3 が減少した。その結果として、血清 HDL-C 濃度が低下したことから、急性心筋梗塞と炎症による EL の変動が、低 HDL-C 値の原因となることが示唆された。

以上より、EL は冠動脈疾患の発症進展に寄与することが示された。

(2) dysfunctional HDL の測定系の確立

i) ヒト血清中 HDL がもつ抗動脈硬化作用をコレステロール引抜き能、抗酸化能、血管内皮細胞再生作用、VCAM1 発現抑制作用を指標として評価したところ、これらの指標は互いに独立して変動することが明らかとなり、dysfunctional HDL の半定量的測定を行うことが可能となった。実際に、脂質異常症などの生活習慣病では、dysfunctional HDL が増加していた。

ii) 血清 MPO/PON1 比は、冠動脈疾患患者において非冠動脈疾患患者と比べて有意に高値を示し、dysfunctional HDL が増加していることが明らかとなった。冠動脈画像診断 (冠動脈造影と OCT) による検討の結果、血清中の dysfunctional HDL 量は、カテーテルインターベンション後のステント再狭窄や新規病変の進行と正相関しており、プラークの性状や不安定化と関連することが示唆された。細胞学的検討により、MPO/PON1 比が高い患者の HDL は抗炎症作用が減弱していた。すなわち、MPO/PON1 比は dysfunctional HDL の臨床的な簡易マーカーとなり、冠動脈疾患の予後を規定する因子であることが証明された。

(3) HDL の質を改善する薬剤の検討

スタチン治療によって HDL-C 値が増加することはよく知られているが、スタチンによって増える HDL の質の評価はされていない。脂質異常症患者において、ピタバスタチン (2mg) は HDL-C を増加させた、血清 EL mass

を減少させるとともに HDL 粒子中のリン脂質の含有量を増加した。ピタバスタチンによって増加した HDL は、その HDL 増加量に比例してコレステロール引抜き能や抗酸化能 (PON1 活性) を保持していた。すなわち、スタチンは HDL の機能を改善し、スタチンによって増加した HDL は抗動脈硬化作用を有していることが確認された。スタチンは LDL 低下作用に依存しない心血管イベント抑制効果を有することが報告されているが、その作用の一部に HDL の質的改善作用が関与することが示唆された。

高純度 EPA 製剤は血清脂質の量的改善を超えた抗動脈疾患作用を示すことが示唆されている。脂質異常症患者において、高純度 EPA 製剤 (1800mg) は、血清脂質に変化を及ぼさなかったが、HDL のコレステロール引抜き能、抗酸化能、血管内皮細胞修復作用、接着分子 VCAM1 発現の抑制作用を保持していた。以上より、EPA の経口投与で HDL 中リン脂質を構成する脂肪酸の中で EPA の含有量を増やすことにより、HDL のコレステロール引抜き能、抗酸化能、血管内皮細胞再生作用、VCAM1 発現抑制作用が改善し、dysfunctional HDL を減少させることができた。EPA の量的脂質改善を超えた抗動脈硬化作用にこのような HDL の質的改善作用が関与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 18 件)

- 1) Kondo K, Ishida T, Hirata K, et al. *Trans-fatty acid promotes thrombus formation in mice by aggravating anti-thrombogenic endothelial functions via toll-like receptors.* Mol Nutr Food Res. 2015 ; 59: 729-40. doi: 10.1002/mnfr.201400537.
- 2) Tanaka N, Ishida T, Hirata K, et al. Administration of high dose eicosapentaenoic acid enhances anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein in Japanese patients with dyslipidemia. *Atherosclerosis.* 2014 ;237: 577-583. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.10.011.
- 3) Haraguchi Y, Ishida T, Hirata K, et al. Serum myeloperoxidase/paraoxonase 1 ratio as potential indicator of dysfunctional high-density lipoprotein and risk stratification in coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2014;234:288-294.
- 4) Nishio R, Hirata K, et al. Stabilizing effect of combined eicosapentaenoic acid and statin therapy on coronary thin-cap fibroatheroma. *Atherosclerosis.* 2014 ;234 :114-9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.02.025.
- 5) Sun L, Ishida T, Hirata K, et al. Plasma activity of endothelial lipase impacts high-density lipoprotein metabolism and coronary risk factors in humans. *J Atheroscler Thromb.* 2014; 21: 313-321.
- 6) Sasaki-Miyamoto M, Ishida T, Hirata K, et al. Pitavastatin increases HDL particles functionally-preserved with cholesterol efflux capacity and anti-oxidative action in dyslipidemia patients. *J Atheroscler Thromb.* 2013; 20: 708-16.
- 7) Shiomi M, Ishida T, Hirata K, et al. Vasospasm of Atherosclerotic Coronary Arteries Precipitates Acute Ischemic Myocardial Damage in Myocardial Infarction-Prone Strain of the Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 2518-2523. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301303
- 8) Kureha F, Ishida T, Hirata K, et al. Necl-5 Regulates Intimal Thickening Following Carotid Artery Ligation in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013; 33: 1206-11. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301425.
- 9) Satomi-Kobayashi S, Ishida T, Hirata K, et al. Osteoblast-like differentiation of cultured human coronary artery smooth muscle cells by bone morphogenetic protein endothelial cell precursor-derived regulator (BMPER). *J Biol Chem.* 2012; 287: 30336-45. doi: 10.1074/jbc.M111.329110.
- 10) Nakajima H, Ishida T, Hirata K, et al. Endothelial Lipase Modulates Pressure Overload-Induced Heart Failure Through Alternative Pathway for Fatty Acid Uptake. *Hypertension.* 2013; 61:1002-7. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.201608.
- 11) Mori K, Ishida T, Hirata K, et al. 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.
- 12) Ishida T, Hirata K, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay system for human endothelial lipase. *Clin Chem.* 2012; 58: 1656-64. doi: 10.1373/clinchem.2012.187914.
- 13) Sun L, Ishida T, Hirata K, et al. Expression of endothelial lipase

- correlates with the size of neointima in a murine model of vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb.* 2012; 19: 1110-27.
- 14) Yasuda T, Ishida T, et al. The Effect of Poloxamer 407 on the Functional Properties of HDL In Mice. *J Pharm Pharmacol.* 2012 ;64: 677-87. doi:10.1111/j.2042-7158.2011.01444.x.
 - 15) 中島英人、石田達郎. HDL 結合蛋白とその作用. *医学のあゆみ.* 2013; 245: 496-500.
 - 16) 石田達郎、平田健一. 脂質異常症による粥状硬化発症進展機序. *日本臨床 脂質異常症 -基礎・臨床研究の最新知見-*. 2013; 71: 21-28.
 - 17) 石田達郎、平田健一. 血管内皮リパーゼの炎症と血清 HDL 代謝における役割. *The Lipid.*2013; 24: 41-50.
 - 18) 安田知行, 石田達郎. HDL を標的とした動脈硬化性疾患治療の現状と未来. *Endothelial lipase. The Lipid.*2014; 25: 78-85.
- [学会発表](計 15 件)
- 1) Mori K, Ishida T, Hirata K, et al. Fasting Apolipoprotein B48 Is a Novel Marker for Residual Risks in Coronary Artery Disease during Intensive LDL-Lowering Therapy. American Heart Association Scientific Sessions. Los Angeles, USA. 2012/11/5.
 - 2) Ishida T, Hirata K, et al. Establishment of a novel, high-sensitive ELISA system for human endothelial lipase. ISA-HDL Satellite symposium 2012. 2012/4/1.
 - 3) Ishida T, Hirata K, et al. Plasma mass and activity of endothelial lipase are associated with coronary risk factors in humans. The XVI International Symposium on Atherosclerosis. 2012.4.1
 - 4) Mori K, Ishida T, Hirata K, et al. Increase in Exogenous Lipoproteins Characterized by Apolipoprotein B48 and Cholesterol Absorption/Synthesis Markers Represent Residual Risks for Coronary Artery Disease during Intensive LDL-Lowering Therapy. American Heart Association Scientific Sessions. Los Angeles, USA. 2012/11/5.
 - 5) Ishida T, Hirata K, et al. Postprandial increases of circulating EL mass impact plasma HDL-C concentrations. American Heart Association Scientific Sessions. Los Angeles, USA. 2012/11/6.
 - 6) Nakajima H, Ishida T, Hirata K, et al. Endothelial lipase in the heart modulates pressure overload-induced heart failure through fatty acid utilization. American Heart Association Scientific Sessions. Los Angeles, USA. 2012/11/7.
 - 7) Haraguchi Y, Ishida T, Hirata K. Myeloperoxidase and paraoxonase 1 modulate functional quality of HDL and progression of coronary artery lesions. American Heart Association Scientific Sessions. Los Angeles, USA. 2012/11/5.
 - 8) Kondo K, Ishida T, Hirata K, et al. *Trans*-fatty acid accelerates thrombus formation in vivo through inhibiting endothelial anti-thrombogenic actions. The 81st Congress of the European Atherosclerosis Society. Lyon, France. 2013/6/4.
 - 9) Ishida T, Hirata K, et al. Role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism in humans. The 81st Congress of the European Atherosclerosis Society. Lyon, France. 2013/6/4.
 - 10) Mori K, Ishida T, Hirata K, et al. Increases of Serum Mass of Endothelial Lipase Impact Plasma HDL-C Concentrations in Acute Myocardial Infarction. The 81st Congress of the European Atherosclerosis Society. Lyon, France. 2013/6/4.
 - 11) Mori K, Ishida T, Hirata K, et al. Impact of Serum Trans Fatty Acid Level in Risks of Coronary Artery Disease in Japan. The 81st Congress of the European Atherosclerosis Society. Lyon, France. 2013/6/4.
 - 12) Kondo K, Ishida T, Hirata K, et al. *Trans*-fatty acid accelerates thrombus formation in vivo through aggravating anti-thrombogenic phenotype of vascular endothelial cells. American Heart Association Scientific Sessions. Dallas, USA. 2013/11/19.
 - 13) Monguchi T, Ishida T, Hirata K, et al. *Trans* fatty acids induce systemic inflammation and atherosclerosis through toll-like receptor-mediated pathway in LDL receptor knockout mice. American Heart Association Scientific Sessions. Dallas, USA. 2013/11/17.
 - 14) Ishida T. Endothelial Lipase would be a molecular target for HDL-raising therapy. Workshop on Innovation and Pioneering Technology 2013. Kobe 2013.
 - 15) Ishida T, Hirata K, et al. Impact of

intestinally derived lipids on coronary artery disease during statin treatment. The 4th International Symposium on Chylomicrons in Disease. Tokyo 2014.

〔図書〕(計1件)

- 1) 安田知行、石田達郎. 血管内皮リパーゼ. In: 疾患モデルの作製と利用-脂質代謝異常と関連疾患(編:尾池雄一, 佐々木雄彦, 村上 誠). エル・アイ・シー, 東京. 2015. 450-456.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 達郎 (ISHIDA, Tatsuro)

神戸大学・大学院医学研究科・特命教授

研究者番号: 00379413

(2)研究分担者

平田 健一 (HIRATA Ken-ichi)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 20283880

(3)連携研究者

なし