

**厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担総合研究報告書**

原発性高脂血症に関する研究

研究代表者 石橋 俊 自治医科大学 教授
研究分担者 平田 健一 神戸大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

多くの疫学研究や観察研究により、高比重リポ蛋白(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)が動脈硬化性疾患の発症と進展に対して防衛的に作用することが証明されており、HDL 増加療法が動脈硬化性疾患の新規の予防治療法になりうると期待されてきた。血管内皮リパーゼ(endothelial lipase, EL)は、血管内皮細胞や肝細胞などから産生・分泌されるホスホリパーゼで、HDL 粒子に対して高い結合親和性を示し、その表面のリン脂質を分解することにより HDL の分解代謝を促進している。その結果、EL は血清 HDL-C 濃度の制御因子である。本研究では、ヒトにおいて血中の EL 蛋白濃度および活性の測定系を開発することにより、原発性低あるいは高 HDL 血症の診断の一助となる診断法の開発するとともに、EL の血清 HDL-C 濃度と動脈硬化性疾患における役割を明らかにすることを旨とした。まず、ヒト EL に対する新規のモノクロナル抗体(クローン 26A1 および 48A1)を作成し、これらを用いて EL 蛋白濃度測定用の ELISA を作製・改良した。つぎに、血清中 EL 蛋白の免疫沈降物のホスホリパーゼ活性を、蛍光リン脂質を基質として測定することにより血清 EL 特異的活性測定法を開発した。これらの測定系を用いて、循環器疾患患者における EL の役割を検討したところ、冠動脈疾患患者においては血中 EL 濃度・活性が HDL-C 濃度の規定因子であることが明らかとなった。とくに、炎症や急性心筋梗塞などの病態で EL 血中濃度が増加し、HDL-C 濃度を下げる要因となることが示された。また、スタチンは EL を抑制するとともに、コレステロール引抜き能や抗酸化能を保った HDL を上昇させた。その機序として、EL の抑制により HDL 粒子中のリン脂質の含有量が増加させることが関与しているもの示唆された。以上より、血清 EL 蛋白濃度測定法および EL 特異的活性測定法は原発性低あるいは高 HDL 血症の診断に有用であるとともに、さらなる EL の血清 HDL-C 濃度や冠動脈疾患への作用を明らかにするのに寄与することが期待される。

研究目的

血清中の高比重リポ蛋白コレステロール(High-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)は冠動脈疾患の負の危険因子であり、HDL 増加療法が開発されれば動脈硬化性疾患の新規予防・治療法になりうるものと期待されている。しかし、HDL 産生・代謝は複雑で非常に多くの分子が関与しているため、HDL 増加療法の適切な分子標的は未だに確立しておらず、低あるいは高 HDL 血症の原因を同定することは極めて困難である。

血管内皮リパーゼ(EL)は、血管内皮細胞や肝細胞をはじめとして多彩な細胞から産生・分泌されるホスホリパーゼ A1 分子である[1-4]。EL は HDL 粒子と高い親和性をもって結合し、その表面のリン脂質を分解することにより HDL の分解代謝を促進して

いる。したがって、EL は血清 HDL-C 濃度の制御因子のひとつである[5,6]。

本研究では、ヒトにおける EL の蛋白濃度と活性の測定系を開発し、EL と冠動脈疾患進展の関連性、急性心筋梗塞患者や炎症性疾患患者における EL や経時的变化、さらに HDL 変動における EL の役割を解明することを目的とする。これらの検討を通して、原発性高あるいは低 HDL 血症の原因分子として関与を明らかにするとともに、EL が冠動脈疾患の発症・進展においてどのような役割を演じているかを解明することを目指すものである。

研究方法

本研究は、神戸大学大学院医学研究科に

において倫理委員会による承認のもとに、患者個人とインフォームドコンセントを得た上で行なわれた。

神戸大学医学部附属病院循環器内科の入院患者から入院翌朝に空腹時採血を行い、血清を凍結保存した。対象患者を、冠動脈造影検査で 75%以上の有意狭窄ありと診断された冠動脈疾患群と、不整脈や心不全で入院された非冠動脈疾患群の 2 群に分けて、血清 EL 蛋白濃度、血清 EL 酵素活性、血清脂質等の比較検討を行った。

1) 新規の抗 EL モノクロナル抗体の作成

EL-c-myc/pHBAP-3-neo plasmid を CHO 細胞に発現させ、定常発現株 (hEL-myc/CHO 53A5) を確立した。hEL-myc/CHO 53A5 の培養上清より EL モノクロナル抗体 (2-12E) を用いたイムノアフィニティーカラムにより EL 蛋白を精製した。これを BALB/c マウスに免疫し、ヒト EL に対するモノクロナル抗体を作製した [7]。

2) 血清 EL 蛋白濃度の測定系の開発

抗 EL 抗体 (26A1 および 48A1) を用いた Sandwich ELISA (免疫生物研究所, 藤沢, 群馬) を用いて血清 EL 蛋白濃度を測定した [7]。定量化に必要な EL 標準蛋白は、hEL-myc/CHO 53A5 の培養上清を、抗 EL 抗体 (5-3B および 2-12E) を用いたアフィニティーカラムにより精製して用いた [7]。

3) 血清 EL 活性の測定系の開発

血清中には EL 以外にもリン脂質分解活性を持った多くのリパーゼ分子が存在するため、EL 特異的活性を測定するために、まず血清からヒト EL 抗体 48A1 を用いた免疫沈降法にて血清中 EL を選択的に分離した。つぎに、免疫沈降物のホスホリパーゼ活性を、蛍光リン脂質 (Bis-BODIPY FL C11-PC, Invitrogen 社, Carlsbad, CA, USA) を用いて、リン脂質分解活性として測定した [8]。

4) 種々の病態における EL と HDL との関係

EL の発現は炎症性刺激により増加することから、血清 EL 濃度・活性と高感度 CRP との関係を検討した。また、急性心筋梗塞の発症後に低 HDL-C 血症が認められることが知られているが、急性心筋梗塞患者において発症から経時的に血清 EL 濃度・活性や血清脂質を検討した。さらに、食事摂取前後や 75gOGTT 糖負荷試験前後での EL 量変化と血清脂質への影響も検討した。

5) スタチンが EL と HDL に及ぼす影響

スタチンは血清 HDL-C 濃度を軽度ながら上昇させるが、その機序のひとつとして、EL の抑制を介していることが報告されている。そこで、スタチンの中でも HDL 上昇作用が比較的強いとされるピタバスタチンを

30 名の脂質異常症患者に投与し、血清脂質と EL 濃度を測定するとともに、ピタバスタチン投与前後の血清から分離した HDL 分画を用いて HDL の抗炎症作用を検討した。

研究結果

1) 新規の抗 EL モノクロナル抗体の確立

ヒト EL に対する新規のモノクロナル抗体 (アミノ末端を認識するクローン 26A1 およびカルボキシ末端を認識するクローン 48A1) を確立した。

2) 血清 EL 蛋白濃度の測定

抗 EL 抗体 26A1 および 48A1 を用いて Sandwich ELISA (免疫生物研究所, 藤沢, 群馬) を確立した。

3) 血清 EL 蛋白濃度の測定

抗 EL 抗体 (26A1 および 48A1) を用いた Sandwich ELISA (免疫生物研究所, 藤沢, 群馬) を確立し、血清 EL 蛋白濃度を測定した [7]。定量化に必要な EL 標準蛋白は、hEL-myc/CHO 53A5 の培養上清を、抗 EL 抗体 (5-3B および 2-12E) を用いたアフィニティーカラムにより精製した。1) 血清 EL 蛋白濃度と血清脂質との関係

ヒト血清 EL 蛋白濃度を、ELISA 法を用いて検討したところ、ヒト EL 血中濃度は 320 ± 9.0 ($32.3 \sim 1193.7$) pg/mL で、正規分布せず分布曲線は左方へ変位していた。また、ヘパリン投与前後で EL の蛋白量に変化はなかった。EL は血管内皮細胞から分泌された後、血管内腔側にヘパラン硫酸プロテオグリカンを通じて係留していると推察されてきたが、EL とプロテオグリカンの相互作用やヘパリンによる遊離の有無については、再検討が必要であると考えられた。

1000 名以上の全患者における解析では、血清 EL 濃度と HDL-C 濃度との間に有意な相関は認められなかった。冠動脈疾患患者は、非冠動脈疾患患者と比較して HDL-C 濃度が低値で EL 濃度が高値であったため、冠動脈疾患患者のみで検討を行ったところ、EL 値と HDL-C 値に有意な逆相関関係を認めた。一方、血清 EL 濃度は LDL-C 濃度やトリグリセリド濃度と相関は認めなかった。

2) 血清中 EL 酵素活性と血清脂質との関係

血中 EL 活性は正規分布せず分布曲線は左方へ変位していた。また、ヘパリン投与前後で EL 活性に変化はなかった。

血中 EL 活性と血清 HDL-C 値との関係を検討したところ、EL 活性は血清 HDL-C 値と有意な逆相関関係を示したが、血清 LDL-C 濃度や中性脂肪濃度とは関連がなかった。ま

た、冠動脈疾患患者は、非冠動脈疾患患者と比較して血清中の高感度 CRP 濃度が高値を示すとともに、血清 EL 活性が上昇しており、血清 HDL-C 値は低値であった。また、血清 EL 活性は高感度 CRP 濃度と有意な正相関を示した。また、血清 EL 活性は冠危険因子と正の相関を示した。ただし、EL 蛋白量と活性は有意な相関は示さず、これは血清中の EL には不活性型が多く含まれる可能性もあり、更なる検討が必要であると考えられた。

3) EL 濃度・活性の変化と血清脂質の関係

EL は患者間での濃度差が大きいと、同一患者における EL 蛋白濃度変化が血清脂質にどのような影響を及ぼすのかを検討した。まず、急性心筋梗塞患者において来院時から経時的に HDL-C 値と EL 値を測定したところ、急性心筋梗塞発症後から高感度 CRP の増加に伴って EL 蛋白濃度と内因性の EL 阻害分子である Angpt13 濃度がともに増加した。Angpt13 濃度が発症 1 週間程度で減少に転じるのに対して EL 濃度は 1 週間を過ぎても持続的に高値を示し、この時期に一致して血清 HDL-C 値が低下した。

また、肥満症例において、食事摂取によって RLP-TG 濃度の増加に伴って血清 EL 値も増加し HDL-C 値は低下した。一方、75gOGTT による検討では、EL 蛋白量や EL 活性は、血糖およびインスリン上昇による変化を受けなかった。

4) EL を介するスタチンの HDL 修飾作用

脂質異常患者に対してピタバスタチン 2mg を 1 ヶ月間投与したところ、血清 EL 蛋白濃度は約 15%減少し、HDL-C 濃度は約 12%増加した。次に、ピタバスタチン投与前後の HDL の抗炎症作用の変化を検討したところ、ピタバスタチン投与後に増加した HDL はコレステロール引抜き作用が増強しており、HDL 中の抗酸化酵素であるパラオキソナーゼ 1 (PON1) 活性が増加していた。ピタバスタチンによる血清 EL の抑制が HDL の量のみならず質の改善をもたらすことが明らかとなった。

考察

本研究の結果、冠動脈疾患患者において血清 EL 濃度・活性が血清 HDL-C 値と逆相関を示したことから、ヒトにおいて EL mass は HDL-C 濃度の規定因子であることが確認された。しかし、EL 蛋白濃度が約 30 ~1200 pg/mL の変動であるのに対して、HDL-C の変動は約 30~100 mg/dL の変動であったこと

を考えると[7]、血中の EL 蛋白には不活性型が含まれている可能性が示唆される。一方、血清 EL 活性は、約 1.5 ~3.5 Unit の変動であることを考えると[8]、活性の方がより鋭敏に血清 HDL-C 濃度を反映することが示唆された。しかし、本研究で用いた EL 活性測定法は、免疫沈降に多量の抗体を必要とし手順も複雑で汎用性に欠ける。今後、より簡便で信頼性の高い EL 活性の測定法の開発が望まれる。これらの検査法の臨床応用により原発性低あるいは高 HDL 血症の原因診断に役立つことが期待される。

一卵性双生児における臨床研究から、血清 HDL-C 濃度を制御する因子として、遺伝的要因が 50%、環境的要因が 50%程度と報告されている。本研究において、全患者群においては、EL 蛋白濃度と HDL に相関が見られなかったことから、EL の血清 HDL-C 濃度の基礎値への寄与は少なく、CETP や apoA-1 等の HDL 関連蛋白の影響が大きいものと考えられる。しかし、EL は様々な炎症性刺激でその発現が誘導される特徴を持つ[9]。実際に、急性心筋梗塞や炎症の病態や食後では、EL の血中濃度が増加し、血清 HDL-C 濃度が減少する。すなわち、炎症や食後における EL 濃度・活性の変動は個々の患者における HDL-C 濃度に影響を与えることが推察された。EL は、遺伝子要因のみならず環境的要因として血清 HDL-C 濃度を制御する可能性がある。換言すれば、慢性炎症等に伴う低 HDL-C 血症を呈する患者には EL を阻害することにより血清 HDL-C 濃度を上昇させることが示唆された。

近年、HDL の抗炎症作用が減弱あるいは欠落した dysfunctional HDL の存在が注目されている。それでは、EL を阻害・抑制して上昇する HDL は、いわゆる「善玉」しての機能を有しているのであろうか。本研究では、ピタバスタチンが EL を抑制するとともに、コレステロール引抜き能や抗酸化能を保った HDL を上昇させることが証明された[6,10]。コレステロール引抜き能は HDL リン脂質含有量に依存すると報告されていることから、スタチンが EL の抑制により HDL 粒子中のリン脂質の含有量が増加させ、HDL の機能を保持させる機序が示唆された。EL の抑制によりリン脂質に富み抗炎症作用を有した HDL 粒子が増加することは、機能的 HDL を増加させることを示唆するものである。したがって、将来 EL 阻害薬が開発されればその有効性を示唆するものであり[11]、今後の発展が期待されることである。

結論

冠動脈疾患患者で血中 EL 濃度・活性は、HDL-C 濃度の規定因子であった。とくに、炎症や急性心筋梗塞などの病態で EL 血中濃度が増加し、HDL-C 濃度を下げる要因となることが示唆された。今後、EL 蛋白濃度や活性が心血管イベントの予測因子であるか前向き臨床研究によって評価することが望まれる。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Sun L, Ishida T, Miyashita K, Kinoshita N, Mori K, Yasuda T, Toh R, Nakajima K, Imamura S, Hirata K. Plasma activity of endothelial lipase impacts high-density lipoprotein metabolism and coronary risk factors in humans. *J Atheroscler Thromb*. In press.
- 2) Sasaki-Miyamoto M, Yasuda T, Monguchi T, Nakajima H, Mori K, Toh R, Ishida T, Hirata K. Pitavastatin increases HDL particles functionally-preserved with cholesterol efflux capacity and anti-oxidative action in dyslipidemia patients. *J Atheroscler Thromb*. 2013; 20: 708-16.
- 3) 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; 61: 1002-7.
- 4) Sun L, Ishida T, Okada T, Yasuda T, Hara T, Toh R, Shinohara M, Yamashita T, Rikitake Y, Hirata K. Expression of endothelial lipase correlates with the size of neointima in a murine model of vascular remodeling. *J Atheroscler Thromb*. 2012; 19: 1110-27.
- 5) Ishida T, Miyashita K, Shimizu M, Kinoshita N, Mori K, Sun L, Yasuda T, Imamura S, Nakajima K, Stanhope KL, Havel PJ, Hirata K. ELISA system for human Endothelial lipase. *Clin Chem*. 2012; 58: 1656-64.
- 6) 石田達郎. 血管内皮リパーゼの血中濃度

と活性が血清HDL-Cと冠動脈硬化に及ぼす影響の検討. 循環医学研究年報 第4集. 2012;4:4-5.

- 7) 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;10:41-50.

2. 学会発表

- 1) Ishida T, Hirata K. Role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism in humans. The 81st Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS 2013), Lyon, France.
- 2) Mori K, Ishida T, Miyashita K, Kinoshita N, Nakajima H, Yasuda T, Toh R, Kawata M, Sakamoto S, Nakajima K, Hirata K. Increases of Serum Mass of Endothelial Lipase Impact Plasma High-Density Lipoprotein-Cholesterol Concentrations in Acute Myocardial Infarction. The 81st Congress of the European Atherosclerosis Society (EAS 2013), Lyon, France.
- 3) Ishida T. Endothelial Lipase would be a molecular target for HDL-raising therapy. 2013 Workshop on Innovation and Pioneering Technology (WINPTTECH) 2013.
- 4) Ishida T, Mori K, Yasuda T, Hirata K, Miyashita K, Kinoshita N, Nakajima K, Stanhope K, Havel PJ. Postprandial Increases of Circulating Mass of Endothelial Lipase Impact Plasma High-Density Lipoprotein-Cholesterol Concentrations. American Heart Association Scientific Sessions 2012, Los Angeles, USA.
- 5) Ishida T, Miyashita K, Kinoshita N, Seito S, Hirata K, Nakajima K. Establishment of a novel, high-sensitive ELISA system for human endothelial lipase. International Symposium on Atherosclerosis HDL Satellite symposium 2012.
- 6) Ishida T, Toh R, Sun L, Yasuda T, Hirata K. Role of endothelial lipase in HDL metabolism and atherosclerosis in humans. 79th European Atherosclerosis Society Congress (Gothenburg, Sweden, 2011)
- 7) Ishida T, Mori K, Sun L, Yasuda T, Hirata K. Plasma mass and activity of endothelial lipase are associated

- with coronary risk factors in humans. The XVI International Symposium on Atherosclerosis (ISA2012) 2012.3.27 Sydney, Australia.
- 8) Ishida T, Miyashita K, Kinoshita N, Seito S, Hirata K, Nakajima K. Establishment of a novel, high-sensitive elisa system for human endothelial lipase. HDL Satellite symposium 2012. Cairns, Australia.
- 9) 宮下かずや、石田達郎、安田知行、孫麗、木下憲明、中嶋克行、平田健一 Generation of a high-sensitive and reliable ELISA system that can quantitatively measure human serum mass of endothelial lipase. 第44回日本動脈硬化学会総会 (2012.7) 福岡
- 10) 佐々木真希、安田知行、石田達郎、門口倫子、近藤健介、森健太、破磯川実、中島英人、原口英子、平田健一。 Pitavastatin increases "functional" high-density lipoprotein cholesterol in dyslipidemic patients. 第44回日本動脈硬化学会総会 (2012.7) 福岡
- 11) 孫麗、石田達郎、森健太、安田知行、中島英人、破磯川実、原口英子、佐々木真希、近藤健介、平田健一。 血管内皮リパーゼ特異的酵素活性と血清HDLコレステロールおよび冠動脈疾患との関連性の検討。 第12回日本NO学会総会 (2012,6) 福岡

知的財産権の出願・登録状況
無し。

参考文献

- [1] Hirata K, Dichek HL, Cioffi JA, et al: Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J Biol Chem.* 1999;274:14170-5.
- [2] Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, et al: A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet.* 1999;21:424-8.
- [3] Yasuda T, Ishida T, Rader DJ. Update on the role of endothelial lipase in HDL metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Circ J.* 2010;74:2263-70.
- [4] Choi SY, Hirata K, Ishida T, et al. Endothelial lipase: a new lipase on the block. *J Lipid Res.* 2002;43:1763-9
- [5] Ishida T, Choi S, Kundu RK, et al. Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. *J Clin Invest.* 2003;111:347-55.
- [6] Kojima Y, Ishida T, Sun L, et al. Pitavastatin decreases the expression of endothelial lipase both in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res.* 2010;15:87:385-93
- [7] Ishida T, Miyashita K, Shimizu M, et al: Enzyme-linked immunosorbent assay system for human endothelial lipase. *Clin Chem.* 2012 ;58:1656-64.
- [8] Sun L, Ishida T, Miyashita K, et al: Plasma activity of endothelial lipase impacts high-density lipoprotein metabolism and coronary risk factors in humans. *J Atheroscler Thromb.* In press.
- [9] Hirata K, Ishida T, Matsushita H, et al: Regulated expression of endothelial cell-derived lipase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272:90-3.
- [10] Sasaki-Miyamoto M, Yasuda T, Monguchi T, 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.
- [11] Hara T, Ishida T, Kojima Y, et al: Targeted deletion of endothelial lipase increases HDL particles with anti-inflammatory properties both in vitro and in vivo. *J Lipid Res.* 2011;52:57-67.