



Endothelial lipase is increased by inflammation and promotes LDL uptake in macrophages

安田, 知行

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4051

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004051>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 157 】

氏 名・(本 籍) 安田 知行 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博い第1855号
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付 平成19年3月25日

【 学位論文題目 】

Endothelial lipase is increased by inflammation and promotes
LDL uptake in macrophages
(血管内皮リパーゼはマクロファージにおいて、炎症により誘導され
低比重リポ蛋白の取り込みを誘導する)

審 査 委 員

主 査 教 授 林 祥剛
教 授 秋田 穂束
教 授 中村 俊一

【背景と目的】

内皮リパーゼ(Endothelial lipase: EL)は、1997 年に発見された新規のリパーゼでリポ蛋白リパーゼファミリーに属し、リン脂質分解活性を有している。リポ蛋白リパーゼファミリーである、リポ蛋白リパーゼ(LPL)や肝性リパーゼ(HL)は、中性脂肪分解活性を持ち、超低比重リポ蛋白(VLDL)や低比重リポ蛋白(LDL)の代謝に関与している。一方、EL はリン脂質の比率の高い高比重リポ蛋白(HDL)の代謝に影響を与えていた。EL 遺伝子欠損マウスは、高 HDL 血症を呈し、EL 過剰発現マウスは HDL の低下を認める。ヒト血中にも EL の存在は確認されており、血中 EL 量は HDL 値と逆相関することが報告されている。また、炎症は動脈硬化の進展に関与していることが知られているが、EL の発現は、炎症性サイトカインや、グラム陰性菌の外膜にある強力な炎症誘導物質である Lipopolysaccharide(LPS)により、誘導されることが報告されている。EL は、リン脂質分解活性とは別に架橋反応にて、血中の単球や、リポ蛋白の細胞表面への接着を介助する。HDL 値への影響を与えること、炎症により誘導されること、さらに単球の血管への接着に関与することから、動脈硬化への影響は大きいと考えられる。事実、マウスモデルにて、EL 遺伝子の欠損は動脈硬化を抑制するとの報告されている。他のリパーゼファミリーの LPL はマクロファージにも発現しており、リポ蛋白の取り込みに関与し、動脈硬化の進展に重要な役割を果た

していることが報告されている。しかし、EL のマクロファージにおける機能や発現調節については、まだ解明されていない。

【方法】

野生型マウス (WT) と EL 遺伝子欠損マウス (ELKO) の腹腔内にチオグリコートを注射し、4 日後に腹腔内を生理食塩水にて回収し、培養皿に接着した細胞を、滲出性腹腔マクロファージとして実験に使用した。マクロファージは、Lipopolysaccharide(LPS) や炎症性サイトカインで刺激したのち、TRIZOL 試薬にて回収し、EL の発現は、ノザンプロットにて行った。酸化ストレスの関与を調べるため、抗酸化剤である N-acetyl-L-cysteine (NAC) と diphenylene iodonium (DPI) を使用し、酸化ストレスの評価には、ルシゲニン試薬を用い、NADPH 存在下での、活性酸素種の生成を評価した。リポ蛋白の取り込みの評価には、ヒトの空腹時の血清を超遠心法にて分離し、LDL を精製した。その後、蛍光色素である 1,1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanide perchlorate (DiI) にて標識し、マクロファージ内への取り込みを、フローサイトメトリーにて評価した。動脈硬化発症、進展を抑制することが報告されている HMG-CoA reductase 阻害剤のスタチンの EL 発現に対する影響を調べるため、シンバスタチンを使用し、ノザンプロットや取り込み実験の LPS 刺激前に投与し、効果を

調べた。

【結果】

LPSはマクロファージにおいてELの発現を誘導する。

野生型マウスから、滲出性マクロファージを回収し、LPS にて刺激を行った。ノザンプロット解析において、LPS は時間経過と、LPS 量に依存して、EL の発現を誘導した。

TLR4以下の経路がLPSによるEL発現誘導に必要である。

血管内皮細胞や血管平滑筋において、炎症性サイトカインが、EL の発現を誘導するため、マクロファージにおいても同様の結果が得られるかを調べた。しかし、TNF- α 、IL-1 β 、INF- γ やアンギオテンシンII では発現誘導が認められなかった。LPS の受容体の一つに toll-like receptor4(TLR4) があり、LPS 刺激のシグナルを伝える重要な役割を果たしていることが知られている。TLR4 の関与を調べるために、TLR4 遺伝子変異マウスの C3H/HeJ マウスのマクロファージを用いて実験を行った。TLR4 遺伝子変異マウス由来のマクロファージでは LPS 刺激による EL の発現誘導が認められなかったため、LPS/TLR4 の経路が EL 発現に不可欠であることがわかった。

活性酸素種(ROS)産生が、LPSによるEL発現に関わっている。

LPS は酸化ストレスの強い誘導物質の一つであり、EL 発現への酸化ストレス

の関与を調べた。抗酸化剤である N-acetyl-L-cysteine (NAC)、diphenylene iodonium (DPI) の前刺激にて、LPS による EL 発現が抑制された。さらに、TLR 4 が酸化ストレス産生に関与しているかを調べるため、TLR4 変異マウスより、マクロファージを採取し、LPS による酸化ストレスの誘導をルシゲニン試薬にて、活性酸素種の産生を測定した。TLR4 変異マウスのマクロファージでは、有意に酸化ストレスの産生が低下した。これらの結果より、LPS による EL 発現誘導は、TLR4-酸化ストレスの経路にて活性化されることがわかった。

LPS刺激後のLDL取り込み量はELK0マクロファージで減少した

EL のマクロファージにおける機能を調べるため、LPS 刺激後の野生型由来(WT) マクロファージと、ELK0 マクロファージの機能を比較した。LPS 刺激後に、マクロファージにおいてリポ蛋白の取り込みが増加することは、すでに報告されている。今回の実験においても、WT マクロファージは LPS 刺激後、36%の LDL の取り込みが増加したが、ELK0 マクロファージでは 18%しか増加を認めなかった。LPS 刺激後の LDL 取り込み増加量のうち、約半数は EL が関与している可能性が示唆された。また、EL 由来のリポ蛋白の取り込みに、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG) が、関与しており、ヘパリン投与にて HSPG が切断されることが他の細胞を用いた実験にて報告されていたため、今回の実験においてもヘパリンの前刺激を行った。結果は、ヘパリン投与にて、LPS 刺激後の LDL 取り込みが減

少した。この結果からも、LPS 刺激下の LDL 取り込みに EL の関与が示唆された。

シンバスタチンはLPS刺激によるEL発現とLDL取り込みを抑制する

スタチンは動脈硬化抑制に多面的効果(pleiotropic effect)を示すことや抗酸化作用、抗炎症作用を持つことが報告されている。そこで、スタチンの EL 発現に対する効果を調べた。シンバスタチンは、LPS 刺激による EL 発現を抑制した。さらに、シンバスタチンは LPS 刺激下の酸化ストレスを抑制し、リポ蛋白取り込みを抑制した。これらの結果より、シンバスタチンは酸化ストレスを抑制することで、LPS 刺激による EL 発現を抑制し、EL 発現を抑制することで部分的にリポ蛋白取り込みを抑制することが証明された。

【考察】

本研究の結果、EL のマクロファージにおける発現調節と機能について新たな事実を明らかにした。血管内皮細胞や血管平滑筋では、様々な炎症性サイトカインが EL 発現を誘導したが、マクロファージにおいては、LPS のみ誘導した。TLR4 遺伝子変異マウスを用いた実験から、LPS/TLR4 の経路がマクロファージにおける EL 発現に重要であることが証明できた。

EL は動脈硬化巣内のマクロファージに発現していることは、すでに発表されているが機能については不明なままであった。マクロファージ上の EL がリン脂

質分解活性にて HDL 代謝に関与し、動脈硬化に影響を与える可能性もある。

一方、EL はリン脂質分解酵素活性の他に、架橋反応を介助する機能も持つおり、我々は血管内皮細胞上において、血管内皮と血液中の単球の接着を介助する役割を持っていることを報告した。今回の実験において、マクロファージ上の EL も架橋反応にてリポ蛋白の取り込みに関与しており、HSPG の関与も確認された。

マクロファージの泡沫化は、主に変性（酸化）LDL がスカベンジャー受容体にて取り込まれ、マクロファージ内にコレステロールが蓄積する現象で、動脈硬化の進展には不可欠な段階であるが、native LDL、つまり変性をうけていない LDL ではコレステロールは蓄積しないと言われていた。しかし、最近炎症刺激下のマクロファージは、native LDL を取り込み泡沫化し動脈硬化進展に影響を与えるとの報告があった。このことより、EL の native LDL 取り込み増強作用も動脈硬化進展に関与している可能性が高い。

スタチンは、動脈硬化進展に多面的作用を有しており、抗酸化、抗炎症作用がある。今回の実験において、LPS 刺激による酸化ストレス、EL 発現と LDL 取り込みを抑制した。この EL 阻害効果も、スタチンの多面的効果の一つとして挙げられるかもしれない。

【結論】

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

EL は LPS/TLR 4 の経路にて発現誘導され、LDL の取り込みを誘導する。シンバスタチンは LPS 刺激による EL 発現と LDL 取り込みを阻害した。我々はこの結果から EL の動脈硬化に対する新たな役割と、スタチンの新たな抗動脈硬化作用の一つとして EL 発現阻害も含まれるという説を提言する。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1858 号	氏名	安田 知行
論文題目 Title of Dissertation	Endothelial lipase is increased by inflammation and promotes LDL uptake in macrophages 血管内皮リパーゼはマクロファージにおいて、炎症により誘導され 低比重リボ蛋白の取り込みを誘導する		
審査委員 Examiner	主査 杯祥剛 Chief Examiner 副査 木田健太 Vice-examiner 副査 中村俊一 Vice-examiner		
審査終了日	平成 19 年 4 月 18 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

内皮リパーゼ(Endothelial lipase: EL)は、新規のリパーゼでリポ蛋白リパーゼファミリーに属し、リン脂質分解活性を有している。ヒト血中にも EL の存在は確認されており、血中 EL 量は HDL 値と逆相関することが報告されている。EL の発現は、炎症性サイトカインや、グラム陰性菌の外膜にある強力な炎症誘導物質である Lipopolysaccharide (LPS) により、誘導されることが報告されているおり、動脈硬化への影響は大きいと考えられている。しかし、EL のマクロファージにおける機能や発現調節については、まだ解明されていない。野生型マウス (WT) と EL 遺伝子欠損マウス (ELKO) の腹腔内にチオグリコレートを注射し、4 日後に腹腔内を生理食塩水にて回収し、培養皿に接着した細胞を、滲出性腹腔マクロファージとして実験に使用した。LPS はマクロファージにおいて EL の発現を誘導することを明らかにした。TLR4 遺伝子変異マウスを使用して TLR4 経路が LPS による EL 発現誘導に必要であることを明らかにした。EL のマクロファージにおける機能を調べるため、LPS 刺激後の野生型由来 (WT) マクロファージと、ELKO マクロファージの機能を比較した。WT マクロファージは LPS 刺激後、36% の LDL の取り込みが増加したが、ELKO マクロファージでは 18% しか増加を認めなかった。LPS 刺激後の LDL 取り込み増加量のうち、約半数は EL が関与している可能性が示唆された。また、EL 由来のリポ蛋白の取り込みに、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) が、関与しており、ヘパリン投与にて HSPG が切断されることが他の細胞を用いた実験にて報告されていたため、今回の実験においてもヘパリン投与にて、LPS 刺激後の LDL 取り込みが減少した。この結果からも、LPS 刺激下の LDL 取り込みに EL の関与が示唆された。スタチンは動脈硬化抑制に多面的効果 (pleiotropic effect) を示すことで、抗酸化作用、抗炎症作用を持つことが報告されている。シンバスタチンは、LPS 刺激による EL 発現を抑制した。さらに、シンバスタチンは LPS 刺激下の酸化ストレスを抑制し、リポ蛋白取り込みを抑制した。これらの結果より、シンバスタチンは酸化ストレスを抑制することで、LPS 刺激による EL 発現を抑制し、EL 発現を抑制することで部分的にリポ蛋白取り込みを抑制することが証明された。本研究の結果、血管内皮細胞や血管平滑筋では、様々な炎症性サイトカインが EL 発現を誘導したが、マクロファージにおいては、LPS のみ誘導した。TLR4 遺伝子変異マウスを用いた実験から、LPS/TLR4 の経路がマクロファージにおける EL 発現に重要であることが証明できた。EL は動脈硬化巣内のマクロファージに発現していることは、すでに発表されているが機能については不明なままであった。マクロファージ上の EL がリン脂質分解活性にて HDL 代謝に関与し、動脈硬化に影響を与える可能性もある。一方、EL はリン脂質分解酵素活性の他に、架橋反応を介助する機能も持っており、血管内皮細胞上において、血管内皮と血液中の单球の接着を介助する役割を持っていることが報告されているが、本実験においても、マクロファージ上の EL も架橋反応によってリポ蛋白の取り込みに関与しており、HSPG の関与も確認された。マクロファージの泡沫化は、主に変性 (酸化) LDL がスカベンジャー受容体にて取り込まれ、マクロファージ内にコレステロールが蓄積する現象で、動脈硬化の進展には不可欠な段階であるが、native LDL、つまり変性をうけていない LDL ではコレステロールは蓄積しないと言われていた。しかし、

最近炎症刺激下のマクロファージは、native LDL を取り込み泡沫化し動脈硬化進展に影響を与えるとの報告があった。このことより、EL の native LDL 取り込み増強作用も動脈硬化進展に関与している可能性が高い。スタチンは、動脈硬化抑制に多面的作用を有しており、抗酸化、抗炎症作用がある。本研究は、スタチンが LPS 刺激による酸化ストレス、EL 発現と LDL 取り込みを抑制することを明らかにした。この EL 阻害効果も、スタチンの動脈硬化進展抑制効果の一つと考えられる。EL は LPS/TLR4 の経路にて発現誘導され、LDL の取り込みを誘導し、シンバスタチンは LPS 刺激による EL 発現と LDL 取り込みを阻害した。本研究は、内皮リパーゼについて、その動脈硬化進展に対する役割を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかつた、マクロファージにおける機能や発現調節について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。