



Targeted inactivation of endothelial lipase attenuates lung allergic inflammation through raising plasma HDL level and inhibiting eosinophil infiltration

大寺, 博

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4679

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004679>

※ 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。



氏 名	大寺 博
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4679 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 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Targeted inactivation of endothelial lipase attenuates lung allergic inflammation through raising plasma HDL level and inhibiting eosinophil infiltration(血管内皮リパーゼ阻害による高 HDL 血症と好酸球浸潤阻害を通しての肺アレルギー反応の減少)

審 査 委 員

主 査	教 授	秋田 穂束
	教 授	杉村 和朗
	教 授	伊藤 智雄

背景

気管支喘息は気道の慢性炎症性疾患である。その中でも好酸球浸潤は重要な要素である。近年、気管支喘息患者数は増加傾向であるが、その明確な原因は不明である。

HDL は抗動脈硬化作用やコレステロールの引き抜き、抗炎症効果や抗酸化作用、VCAM-1 や ICAM-1 、E-セレクトインなどの接着因子の発現阻害、リポポリサッカライドの中和作用、炎症性サイトカインの阻害、抗酸化作用をもつビタミンEの2型肺胞上皮への供給など様々なことが報告されている。しかし、HDL とアレルギー、特に気管支喘息との関連については良悪それぞれ報告されており明確な結論は出ていない。

血管内皮リパーゼ (EL) は血清 HDL コレステロール値を決める一つの重要なリパーゼとして近年発見され、研究報告がされている。今回我々は、EL をノックアウトし高HDL血症を示すマウスを使うことにより、EL が肺の好酸球性炎症に対していかに影響するかを検討するため喘息モデルマウスを用い検討した。

方法

＜動物実験＞EL ノックアウトマウスと、その野生型である C57BL/6J マウスを用いた。それぞれに対して卵白アルブミンと水酸化アルミニウムゲルを腹腔内注射することで感作し、その後に卵白アルブミンの吸入曝露を行うことによって喘息モデルを作成した。喘息モデルマウスの気管支洗浄液や肺の組織像、気道過敏性などを比較検討した。

＜細胞実験 1＞ヒト肺微小血管内皮細胞を用いた。TNF- α 、IL-4 にてさまざまな濃度で刺激し VCAM-1 の発現を評価した。また、それらにさまざまな濃度の HDL を加えることで VCAM-1 の発現に変化があるか否かを評価した。

＜細胞実験 2＞EL 発現をさせている COS 細胞とそうでない COS 細胞、さらに好酸球である HL-60 細胞を用いて接着実験を行った。また、ヘパリンを投与してそれらの接着の阻害を評価した。

＜動物実験＋ウイルス実験＞EL を発現させる EL アデノウイルスとそのコントロールとして LacZ アデノウイルスを用いた。それらをマウスの尾静脈より投与した。それらのマウスでの気道反応性の違いを評価した。

結果

好酸球性炎症にて肺における EL 発現が増加した

喘息を誘導したマウス肺を採取しウエスタンブロットにて EL 蛋白の発現を検討した結果、EL 発現量が増加していた。また、EL の肺組織の免疫染色にて肺胞上皮細胞、マクロファージ、血管内皮細胞などに発現が認められた。

EL ノックアウトマウスで気道炎症が抑制された

肺組織を比較し、EL ノックアウトマウスでの炎症が抑制されていた。また、気管支肺胞洗浄液を検討した結果、総細胞数、その中でも好酸球とリンパ球が有意に EL ノックアウトマウスで抑制されていた。また、気管支肺胞洗浄液中のサイトカインの検討でも IL-4、IL-5、IL-13 といった Th2 サイトカインの抑制が示された。気道過敏性検査においても野生型マウスに比べて EL ノックアウトマウスがより過敏性が抑制されていた。

EL ノックアウトマウスにおいて VCAM-1 発現が抑制された

喘息を誘導したマウス肺を採取しウエスタンブロットにて VCAM-1 の発現を検討した結果、EL ノックアウトマウスでは VCAM-1 の発現が抑制されていた。

細胞実験にて HDL により VCAM-1 の発現が抑制された

ヒト肺微小血管内皮細胞を $\text{TNF}\cdot\alpha$ + IL-4 で刺激すると、VCAM-1 発現は濃度依存性に増加することを確認した。また、その VCAM-1 発現は HDL によって濃度依存性に抑制された。

EL 過剰発現にて血清 HDL 値は低下し、一部好酸球炎症が増悪した

動物実験＋ウイルス実験にて EL を高発現させる EL アデノウイルスを経静脈的に投与したが、これによる EL 発現は肺には起こらず、肝臓でのみ EL 過剰発現することが以前の研究で示されている。

EL アデノウイルスを投与したマウスの血清 HDL 値は感度以下となり、さらにその効果も持続することを、EL ノックアウトマウスと C57BL/6J の両方において確認した。

EL アデノウイルスを投与したマウスでは LacZ アデノウイルス投与群より血清 HDL 値が低値となり、好酸球炎症も増悪していた。しかし、EL アデノウイルスを投与し、血清 HDL 値が感度以下と同じ状態になっている EL ノックアウトマウスと C57BL/6J マウスを比較すると、やはりここでも EL ノックアウト

マウスで好酸球性炎症が抑制されていた。

EL は上皮細胞と好酸球の架橋分子として働く

HL-60 細胞も EL 蛋白を発現していることは確認した。

EL を高発現している COS 細胞の方が、EL 発現していない COS 細胞より、HL-60 細胞と多く接着した。またそれらはヘパリンで阻害された。

考察

肺での好酸球浸潤において接着因子は重要な役割を果たしており、その中の一つである VCAM-1 の重要性についてもこれまでに報告されている。今回、我々の研究でも EL を抑制することで血清 HDL 値が上昇し、VCAM-1 発現を抑制することで好酸球浸潤が軽減された。

その一方で、EL アデノウイルスを用いた遺伝子導入実験では EL ノックアウトマウスとコントロールマウスの両方で血清 HDL 値が感度以下となり、同様の血清 HDL 値であるのに、EL ノックアウトマウスでは好酸球浸潤が抑制されていた。つまり、血清 HDL 値だけで抗炎症効果を説明することはできない。以前の報告でヘパランサルフェートプロテオグリカンを通しての単球と血管内皮細胞との架橋構造に EL が発現していることが報告されている。同様に我々の実験でも好酸球細胞表面上に発現した EL が好酸球の血管内皮への接着を亢進し、それがヘパリンで阻害されることを証明した。気道上皮細胞、肺胞Ⅱ型上皮細胞、血管内皮細胞での EL 発現が炎症を助長し、気道への好酸球浸潤を亢進させているものと考えられる。EL は血清 HDL 値を規定する作用と好酸球の接着作用の二つのメカニズムで肺の炎症を規定している。ヒトにおける更なる研究が期待される。

EL 発現は CRP、IL-6、ホスホリパーゼ A2 などさまざまな炎症刺激にて規定されていることがこれまでの研究で示されている。また一方で、EL による HDL への作用で、PPAR-α の活性化や白血球の接着などに作用するなど抗炎症作用が示唆されている。炎症過程における EL についての更なる研究が必要と考えられる。

以上より、我々は EL 欠損にて好酸球浸潤を抑制し、肺でのアレルギー性炎症を抑制することを示した。この作用は高 HDL 血症による VCAM-1 発現抑制によるものと、EL のもつ直接的な架橋形成阻害によるものである。血清 HDL 値と気管支喘息の重症度は関係があり、EL 阻害による高 HDL 血症はアレルギー性喘息の重症度を改善させるのに役立つと考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2018号	氏 名	大寺 博
論文題目 Title of Dissertation	Targeted inactivation of endothelial lipase attenuates lung allergic inflammation through raising plasma HDL level and inhibiting eosinophil infiltration 血管内皮リパーゼ阻害による高HDL血症と好酸 球浸潤阻害を通しての肺アレルギー反応の減少		
審査委員 Examiner	主 査 秋田 穂東 Chief Examiner 副 査 杉村 和朗 Vice-examiner 副 査 伊藤 智雄 Vice-examiner		
審査終了日	平成 21 年 2 月 17 日		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

気管支喘息は気道の慢性炎症性疾患である。
その中でも好酸球浸潤は重要な要素である。
近年、気管支喘息患者数は増加傾向であるが、
その明確な原因は不明である。

HDLは抗動脈硬化作用やコレステロールの
引き抜き、抗炎症効果や抗酸化作用、VCAM-1や
ICAM-1、E-セレクチンなどの接着因子の発現阻
害、リポポリサッカライドの中和作用、炎症
性サイトカインの阻害、抗酸化作用をもつビ
タミンEの2型肺胞上皮への供給など様々な
ことが報告されている。しかし、HDLとアレ
ルギー、特に気管支喘息との関連については
良悪それぞれ報告されており明確な結論は出
ていない。

血管内皮リパーゼ(EL)は血清HDLコレス
テロール値を決める一つの重要なリパーゼと
して近年発見され、研究報告がされている。
今回我々は、ELをノックアウトし高HDL血症
を示すマウスを使うことにより、ELが肺の好
酸球性炎症に対していかに影響するかを検討

するため喘息モデルマウスを用い検討した。

＜動物実験＞ELノックアウトマウスと、そ
の野生型であるC57BL/6Jマウスを用いた。それ
ぞれに対して卵白アルブミンと水酸化アルミ
ニウムゲルを腹腔内注射することで感作し、
その後に卵白アルブミンの吸入曝露を行うこ
とによって喘息モデルを作成した。喘息モデ
ルマウスの気管支洗浄液や肺の組織像、気道
過敏性などを比較検討した。

＜細胞実験1＞ヒト肺微小血管内皮細胞を
用いた。TNF- α 、IL-4にてさまざまな濃度で刺
激しVCAM-1の発現を評価した。また、それらに
さまざまな濃度のHDLを加えることでVCAM-1の
発現に変化があるか否かを評価した。

＜細胞実験2＞EL発現をさせているCOS
細胞とそうでないCOS細胞、さらに好酸球で
あるHL-60細胞を用いて接着実験を行った。ま
た、ヘパリンを投与してそれらの接着の阻害
を評価した。

＜動物実験＋ウイルス実験＞ELを発現させ

る EL アデノウイルスとそのコントロールとして LacZ アデノウイルスを用いた。それらをマウスの尾静脈より投与した。それらのマウスでの気道反応性の違いを評価した。

喘息を誘導したマウス肺を採取しウエスタンブロットにて EL 蛋白の発現を検討した結果、EL 発現量が増加していた。また、EL の肺組織の免疫染色にて肺胞上皮細胞、マクロファージ、血管内皮細胞などに発現が認められた。

肺組織を比較し、EL ノックアウトマウスでの炎症が抑制されていた。また、気管支肺胞洗浄液を検討した結果、総細胞数、その中でも好酸球とリンパ球が有意に EL ノックアウトマウスで抑制されていた。また、気管支肺胞洗浄液中のサイトカインの検討でも IL-4、IL-5、IL-13 といった Th2 サイトカインの抑制が示された。気道過敏性検査においても野生型マウスに比べて EL ノックアウトマウスがより過敏性が抑制されていた。

喘息を誘導したマウス肺を採取しウエスタ

ンブロットにて VCAM-1 の発現を検討した結果、EL ノックアウトマウスでは VCAM-1 の発現が抑制されていた。

ヒト肺微小血管内皮細胞を TNF- α + IL-4 で刺激すると、VCAM-1 発現は濃度依存性に増加することを確認した。また、その VCAM-1 発現は HDL によって濃度依存性に抑制された。

動物実験 + ウイルス実験にて EL を高発現させる EL アデノウイルスを経静脈的に投与したが、これによる EL 発現は肺には起こらず、肝臓でのみ EL 過剰発現することが以前の研究で示されている。

EL アデノウイルスを投与したマウスの血清 HDL 値は感度以下となり、さらにその効果も持続することを、EL ノックアウトマウスと C57BL/6J の両方において確認した。

EL アデノウイルスを投与したマウスでは LacZ アデノウイルス投与群より血清 HDL 値が低値となり、好酸球炎症も増悪していた。しかし、EL アデノウイルスを投与し、血清 HDL

値が感度以下と同じ状態になっているELノックアウトマウスとC57BL/6Jマウスを比較すると、やはりここでもELノックアウトマウスで好酸球性炎症が抑制されていた。
HL-60細胞もEL蛋白を発現していることは確認した。
ELを高発現しているCOS細胞の方が、EL発現していないCOS細胞より、HL-60細胞と多く接着した。またそれらはヘパリンで阻害された。
EL欠損にて好酸球浸潤を抑制し、肺でのアレルギー性炎症を抑制することを示した。
本研究は喘息について、そのELの役割を研究したものであるが、従来殆ど行なわれなかったELの役割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。