動脈硬化 26 (3): 123-128, 1998

シンポジウム 2　リポ蛋白代謝酵素と動脈硬化

リポ蛋白リパーゼ (LPL) と動脈硬化症[1]

小林淳二[2,3]　長嶋　泉[3]　平　晃一[3]　疋田　稔[3]
武城英明[3]　森崎信尋[3]　齋藤　康[3]

はじめに

リポ蛋白リパーゼ (LDL) は，心筋細胞，骨格筋細胞，脂肪細胞，マクロファージにて合成分泌される分子量約61,000の糖蛋白である．1987にヒトLPLのcDNAの構造が[1]，1989年にその遺伝子の構造が明らかにされ[2]，第8染色体の短腕に存在し大きさは約30 kbで10個のエキソンからなることが明らかとなった．その機能は，リポ蛋白代謝においてカイロミクロンや超低比重リポ蛋白 (VLDL) 中のトリグリセリド (TG) を水解し細胞にエネルギーを供給する一方でリポ蛋白の成熟に関わっていることは，以前より明らかにされていた．1990年代に入ると，LPLが，その水解酵素としての作用とは別に，種々のリポ蛋白の細胞への結合，取り込みに関与することを示す成績が数多く報告されるようになった．本項ではLPLと冠動脈硬化症との関連性を論ずるにあたり，LPLのもつこの二つの機能に分けて述べることとする．

I. 水解酵素としてのLPL

1980年代の終盤よりLPL欠損症の遺伝子解析が世界中で精力的になされるようになった．その遺伝子変異の種類は多様である (Fig. 1)．LPL欠損症では，一般に血清中の空腹時カイロミクロンが著増するがLDLやHDLは減少する．Zilversmitらは，カイロミクロン粒子はそのサイズが大きすぎて血管の内皮下に通過しえないためこの粒子のみの増加では動脈硬化症は発症しないと推測した．このような理論に基づき，一般にLPL欠損症は動脈硬化症のリスクとは考えられていない．一方，1989年，米国のSeattleのグループ[3]は，LPL欠損症の6家系の高脂血症の有無を調べたさいに6家系中4家系のobligate heterozygous LPL欠損の症例に家族性複合型高脂血症 (FCHL) に一致した高脂血症の存在を見出した．その後，臨床的にFCHLと診断された計56名の症例を対象として，そのヘパリン静注後血漿中LPL活性と酵素量を調べたところ，うち20名 (36%) にそれらの減少がみられることを明らかにし，FCHLの成因の一部にLPLの低下が関与することを示唆している[4]．一方，これらの報告は，LPL欠損症のホモ (古典的LPL欠損症) が冠動脈硬化症の発症や進展と関連性が低いのに，なぜそのヘテロの変異が動脈硬化性疾患であるFCHLの一部の成因となりうるかの議論を生み出していた．1990年代に入ると，LPLとFCHLの発症とを関連づける報告が海外で数多くみられるようになった．

Yangら[5]は，先に述べたFCHLと診断され，かつLPL活性と蛋白量が減少している20名の症例のLPL遺伝子の変異を検討したところ，1名にLPL遺伝子のプロモーター領域 (−39) にT→Cのヘテロの変異が存在し，この変異がLPL蛋白の発現の減少に関与することを示した．その後，残りの19名の症例群のLPL遺伝子にヘテロ型のG→Cの変異 (−53) を見出している[6]．さらに，臨床的に冠動脈硬化症と診断された症例115例のなかにT→G (−93) の変異やCCの挿入が見出され，これらの変異が対照群に決して見出されないことから，FCHLの成因として重要であると示唆している．

LPLの遺伝子のintronと冠動脈硬化症の発症を関連づける報告も数多くみられる．Peacockら[7]が，若年で心筋梗塞に罹患した87名のSweden人を対象としてLPLの遺伝子のHind III (intron 8) とPvu II (intron 6) のPCR-RFLPを行い，Hind III siteの有無と血清トリグリセリドレベルやHDLコレステロールレベルとの関連性を見出した．

---

[1] 1998年6月，第30回日本動脈硬化学会総会 (東京) において発表．

[2] 千葉大学保健管理センター
[3] 千葉大学医学部第二内科

Lipoprotein lipase and atherosclerosis

[2,3]Junji Kobayashi, [3]Izumi Nagashima, [3]Koichi Taira, [3]Minoru Hikita, [3]Hideaki Bujo, [3]Nobuhiro Morisaki, and [3]Yasushi Saito: [2]Health Sciences Center Chiba University, Chiba, Japan, [3]Second Department of Internal Medicine Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan

Key words: Lipoprotein lipase, Familial combined hyperlipidemia, Macrophage, Acetylated LDL, Visceral fat
原稿受取日：1998年7月13日

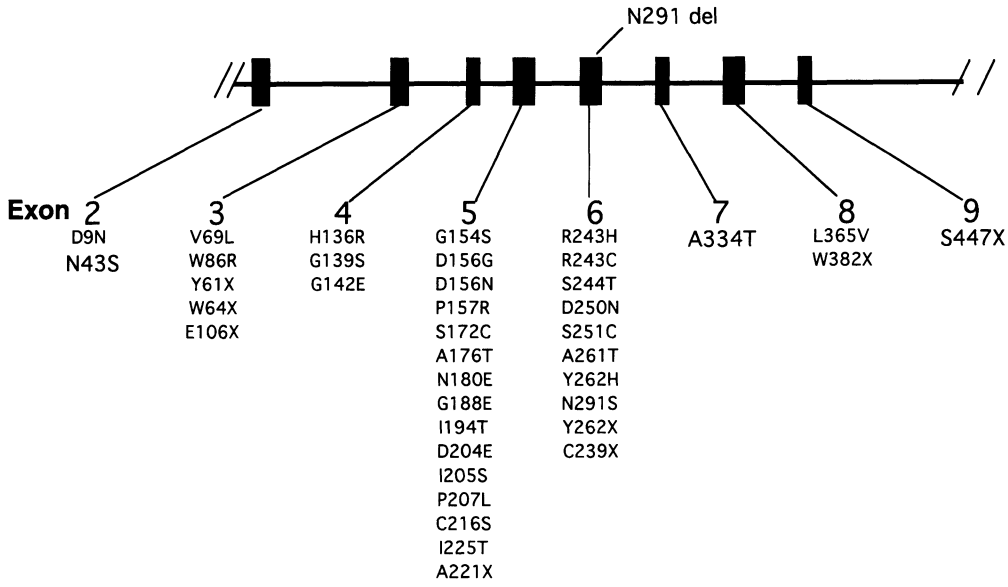


Fig. 1 リポ蛋白リパーゼ (LPL) 欠損症にみられた LPL 遺伝子変異の部位.

Ahn ら[8]は, ヒスパニック系 (579 名) と非ヒスパニック系白人 (615 名) の糖尿病患者を対象として, Hind III+/+を有する症例では有さない症例と比較して有意に血清トリグリセリドが高く, HDL コレステロールが低かったと報告している. Mattu ら[9]は, 235 名の南部イギリスの冠動脈硬化症の患者を対象として LPL の polymorphism を検討したところ, Hind III+/+が冠動脈硬化症患者にて有意に多かったと報告している. また, Ukkola ら[10]は, 240 名 (男性 126 名, 女性 114 名) のインスリン非依存性糖尿病の白人の患者を対象として LPL の遺伝子を調べたところ, Pvu II+/+あるいは Hind III+/+の症例で冠動脈硬化症を有する頻度が有意に高かったと報告している.

これまでに数多くの報告があるにもかかわらず, 依然としてその意義について議論の的となっている変異として Ser 447 → Ter がある. *in vitro* での発現実験の成績に基づき本変異を有すると LPL 活性が低下するという報告[11], 不変であるという報告[12], 逆に増加するという報告[13]がある. 最近, オランダのグループでの疫学的調査で HDL-C の高い群 (n=73), 低い群 (n=98) と両者の中間の群 (n=70) の 3 群に分けたところ, この変異の carrier の出現率がそれぞれ 38, 7, 19% となり, ホモ, ヘテロ, 野生型の順に血清 HDL コレステロールが高いことが判明し, 本変異が動脈硬化症の発症予防に関し, むしろ好ましい脂質プロファイルを生み出す可能性が示唆されている[14]. 一方, 本邦ではこの変異と中間型リポ蛋白の出現を示唆する報告もあり, この変異と動脈硬化症発症の可能性について人種間で相違があるか否かを, 今後検討すべきである.

Asn 291Ser と FCHL との関連性については, 近年, 海外において多くの報告がある. Hoffer ら[15]は, オランダ人で FCHL と診断された症例のおよそ 9.3% に LPL の Asn 291Ser の変異が見出されたと報告している. さらに, 本変異を有すると, 対照と比較し血清 VLDL-TG, VLDL-C が高く, HDL-C が低値をとることが見出された. また, Reymer ら[16]は, 169 名の FCHL の症例中 20 名 (11.8%) に本変異がみられ, これは対照の 4.6% と比較し明らかに高いと結論している. Zhang ら[17]は, アポ E2/2 を有する type III 高脂血症の症例とアポ E2/3, E2/4 を有する高脂血症の症例における本変異の頻度を調べたところ, 前者で 18 例中 5 例に後者で 22 例中 6 例にこの変異がヘテロ型にみられ, これが高脂血症を有さない正常対照者 (230 例中 3 例) と比較し有意に高いと報告している. しかし, 本邦ではこの変異が FCHL の症例に存在したという報告はなく, 人種差をこえた普遍的なその成因とはなりえないと考えられる.

Asp 9 Asn と血清脂質との関係についても比較的多くの報告がみられている. 英国での健常者 773 名を対象としてこの変異の有無を検討したところ, 25 名のヘテロと 2 名のホモが見出された[18]. 本変異を有すると, 対照者と比較し血清トリグリセリドが有意に高かった. *in vitro* での検討では, 本変異を有すると LPL の酵素としての specific activity が 20% ほど低下することが示された. 一方, Lohse ら[19]は, この変異は *in vitro* の発現実験で LPL の酵素活性や蛋白量に影響をおよぼさないとしている.

以上のように, LPL の遺伝子の変異と FCHL あるいは冠動脈硬化症の発症を関連づける疫学的研究は, 1990 年代に入り主として海外で精力的になされている. 一方, 本邦では Asn 291Ser のように FCHL の成因として注目されて

いるような変異がきわめてまれであり，今のところ，LPL遺伝子とFCHLの成因を結びつけた報告はみられておらずLPLの構造遺伝子の変異がFCHLの成因となりうるという確たる証拠がないのが現状である．

私どもは，Reavenらの提唱したsyndrome XやFCHLと類似した病態を呈すると考えられる内臓脂肪蓄積により，ヘパリン静注後血漿 (PHP) 中のLPL活性，蛋白量の低下がもたらされることを報告してきた (Fig. 2)[20]．さらに，このことが脂肪負荷後の脂質代謝の遅延につながることを示してきた (Fig. 3)[21]．食後高脂血症は冠動脈硬化症の独立した危険因子であることを考慮すると，LPLの低下した病態は少なくとも血清脂質代謝という面では動脈硬化促進性であると示唆される．このことから，LPLは少なくとも血清脂質代謝という面では動脈硬化症の発症に関し，防御的に作用すると推測される．

LPLと冠動脈硬化症について動物モデルにて検討した報告がある．Shimadaら[22]は，LDLレセプター欠損マウスとLPL過剰発現マウスを交配したマウスはLDLレセプター欠損を単独に有するマウスと比較し，血中のレムナントが著明に減少し，大動脈の動脈硬化症の進展も約1/20に抑制されたと報告している．これもLPLが動脈硬化症に対して抑制的に作用する可能性を裏づけている成績である．

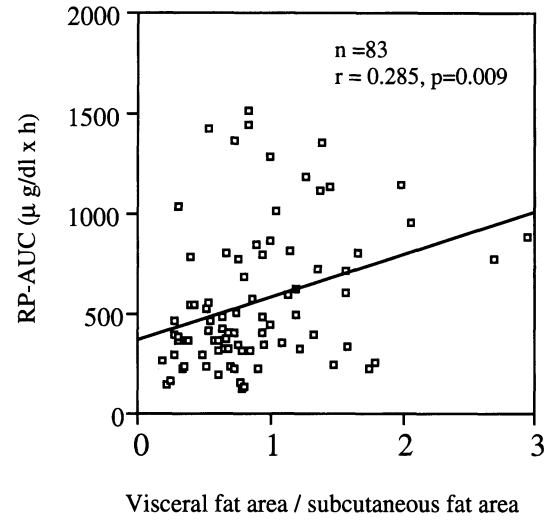


Fig. 3 臍高部単純CT像にて評価した，内臓脂肪面積 (V)/皮下脂肪面積 (S) とビタミンA-脂肪負荷後の血清レチノールパルミテート濃度time course曲線下面積との関係について (文献21)).

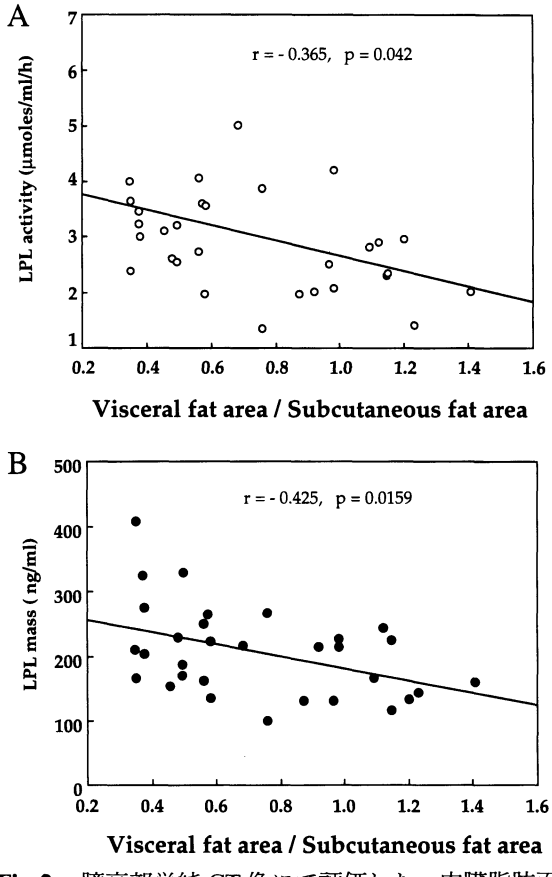


Fig. 2 臍高部単純CT像にて評価した，内臓脂肪面積 (V)/皮下脂肪面積 (S) とヘパリン静注後血漿中のリポ蛋白リパーゼ (LPL) 活性と蛋白量との関係について (文献20)).

II. 種々のリポ蛋白の細胞への取り込みを促進するligandとしてのLPLについて

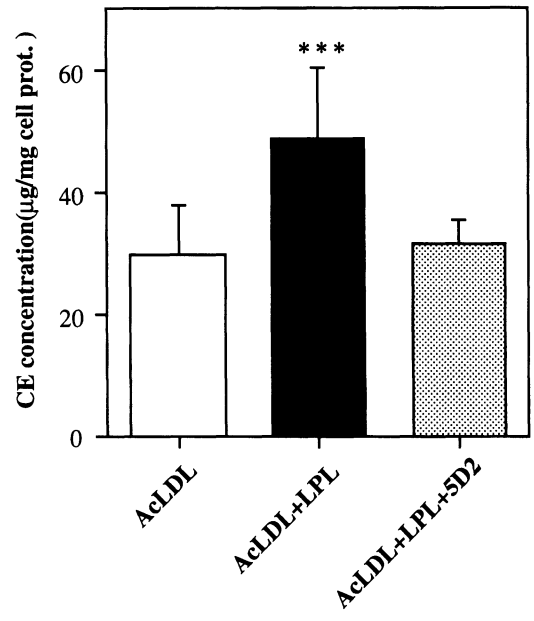
LPLが動脈硬化症の発症と密接に関連しうることを示す報告もある．そして，これらの報告は血清脂質代謝におけるLPLというよりもマクロファージなどに局在するLPLの機能に注目している特徴がある．

LPLと動脈硬化症との関連性は，1979年にZilversmit[23]が動脈硬化症を有する血管において，隣接する病変を有さない部位と比較しLPL活性が高かったと報告したことに端を発して注目され，最近では，米国の二つのグループ[24,25]で動脈硬化巣の病変のマクロファージや平滑筋細胞においてLPLの発現が高いことがmRNAのレベルで証明されている．Aviramら[26]は，LPLによるLDLのマクロファージへの取り込みの増加については，1988年にすでに検討している．抗LDL receptor抗体やLDL receptorを欠損した線維芽細胞を用いた検討によりLPLによるLDLの細胞への取り込みにおいて，LDL receptorは必須のものであると結論づけている．Saxenaら[27]は，LDLの血管内皮細胞下のmatrixへの沈着にLPLが促進的に作用することより本酵素の動脈硬化形成への関与の可能性を示唆している．Rumseyら[28]は，LPLがLDLの線維芽細胞やTHP-1マク

ロファージへの取り込みや分解を促進することを見出しているが，scavenger receptor はこれらの細胞にはあまり発現していないと考えられるため，LPL のこの機能は receptor とは独立したものであると示唆している．さらに，細胞表面に存在するヘパラン硫酸による取り込みや分解の可能性を指摘している．Eisenberg ら[29]は，LPL がカイロミクロン，VLDL, IDL, LDL, HDL3 の線維芽細胞，HepG2 細胞，細胞外マトリックスへの結合を促進し，そのさいに receptor の作用よりもヘパラン硫酸が重要であると強調している．一方，Mulder ら[30]は，LDL receptor を欠損した線維芽細胞において LPL による LDL の取り込みや分解の促進がおこらない事実から，LDL receptor が必須のものであると結論している．さらに，Williams ら[31]は，LPL のこの機能の発現に関しては LDL receptor を介する機序と LDL receptor に依存しない機序のどちらも機能している可能性を指摘している．最近，Fernandez-Borja ら[32]は，immunocytochemistry の手法を用いて，健常者と家族性高コレステロール血症患者の線維芽細胞における，LPL による DiI-LDL の取り込み能を詳細に経時的に観察している．その結果パターンは異なるが，正常細胞同様に LDL receptor を欠損した細胞においても DiI-LDL の取り込みが確かに行われていることを確認している．この成績は，LPL によって媒介される LDL の細胞への取り込みには LDL receptor と独立した経路が存在することを示唆している．

さらに，LDL のみならず酸化 LDL が LPL によって細胞への取り込みが促進されることを示した成績がある．Hendriks ら[33]は，LDL の酸化の程度と LPL によって促進される J774 細胞へのその結合と取り込み能について検討している．その結果，moderate に酸化された LDL の結合，取り込みが高く，強く酸化された LDL や AcLDL の結合，取り込みはあまりおこらなかったと報告している．これらの成績は，LPL がその水解酵素として血中のリポ蛋白を代謝する作用とは異なり，マクロファージなどに局在する LPL がリポ蛋白の取り込みを増加させ，むしろ動脈硬化症の発症，進展を促進する可能性を示唆している．事実，ラビットの動脈硬化巣において LPL の遺伝子発現の増加がみられたとする報告がある．最近，私どもは熱処理により酵素活性を失活させた LPL を用いて，アセチル LDL を培養 J774 細胞と 37°C でインキュベーションしたときの細胞内へのコレステロールエステルの取り込みにおよぼすその添加効果を検討した．その結果，不活化 LPL が細胞内へのコレステロールエステルの取り込み能を著しく高めることを示唆する成績が得られた (Fig. 4)．また，この効果は抗 LPL モノクローナル抗体 (5D2) を添加して細胞を培養することにより著明に抑制された．

これらの成績は，LPL がその水解酵素として血中のリポ蛋白を代謝する作用とは異なり，マクロファージなどに局在する場合 LDL やアセチル LDL などのリポ蛋白の細胞への取り込みを増加させ，むしろ動脈硬化症の発症，進展を促進する可能性を示唆している．



*** p<0.001 vs AcLDL only

Fig. 4 アセチル LDL による J774 内のコレステロールエステル蓄積におよぼすミルク LPL の添加効果について．アセチル LDL 50 μg/ml 添加，ミルク LPL 600 ng/ml，抗 LPL モノクローナル抗体 (40 μg/ml) 添加 48 時間後に細胞内の脂質を抽出後，コレステロール濃度を測定した．

おわりに

以上，LPL 遺伝子の変異と血清脂質，動脈硬化症との関連性について，私どもの成績を示しつつ最近の論文を引用して述べた．先にも述べたが，本邦では FCHL の成因として，また冠動脈硬化症の危険因子として，特定の LPL 遺伝子変異が候補として掲げられていない．今後，さらに人種差をこえた普遍的な FCHL の成因，あるいは冠動脈硬化症の危険因子としての LPL の変異が，提示されることが期待される．一方，動脈硬化症の発症に関する LPL のもつ二面性についても述べた．

謝辞：発表の機会を与えて下さった第 30 回日本動脈硬化学会会頭の中村治雄先生に深謝致します．

文　献

1) Wion KL, Kirchgessener TG, Lusis AJ, Schotz MC, and Lawn RM: Human LPL complementary DNA sequence. Science, 235: 1638-1641, 1987
2) Kirchgessner TG, Chuat JC, Heizmann C, Etienne J, Guilhots S, Svenson K, Ameis D, Pilon C, dAuriol L, Andablia A, *et al.*: Organization of the human LPL gene and evolution of the lipase gene family. Proc Natl Acad Sci USA, 86: 9647-9651, 1989
3) Babirak SP, Iverius PH, Fujimoto WY, and Brunzell JD: Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. Arteriosclerosis, 9: 326-334, 1989
4) Babirak SP, Brown BG, and Brunzell JD: Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. Arterioscler and Thromb, 12: 1176-1183, 1992
5) Yang WS, Navlin DN, Pang R, Brunzell JD, and Deeb SS: A mutation in the promoter of the lipoprotein lipase (LPL) gene in a patient with familial combined hyperlipidemia and low LPL activity. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 4462-4466, 1995
6) Yang WS, Nevlin DN, Iwasaki L, Peng R, Brown BG, Brunzell JD, and Deeb SS: Regulatory mutations in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial combined hypelipidemia and coronary artery disease. J Lipid Res, 37: 2627-2637, 1996
7) Peacock RE, Hamsten A, Nilsson-Ehle P, and Humphries SE: Associations between lipoprotein lipase gene polymorphisms and plasma correlation of lipids, lipoproteins and lipase activities in young myocardial infarctions suivivors and age-matched healthy individuals from Sweden. Atherosclerosis, 97: 171-185, 1992
8) Ahn YI, Ferrell RE, Hamman RF, and Kamboh MI: Two DNA polymorphism in the lipoprotein lipase gene and their associations with factors related to cardiovascular disease. J Lipid Res, 34: 421-428, 1993
9) Mattu RK, Needham EW, Morgan R, Rees A, and Hackhaw AK: DNA variants at the LPL gene locus associated with angiography defined severity of atherosclerosis and serum lipoprotein levels in a Welsh population. Arterioscler and Thromb, 14: 1090-1097, 1994
10) Ukkola O, Savolainen MJ, Salmela PI, von Dickhoff K, and Kesaniemi YA: DNA polymorphism at the lipoprotein lipase gene are associated with macroangiopathy in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. Atherosclerosis, 115: 99-105, 1995
11) Kobayashi J, Nishida T, Ameis D, Stahnke G, Schotz MC, Hashimoto H, Fukamachi I, Shirai K, Saito Y, and Yoshida S: A heterozygous mutation (the codon for Ser 447 to a stop codon) in lipoprotein lipase contributes to a defect in lipid interface recognition in a case with type I hyperlipidemia. Biochem Biophys Res Commu, 182: 70-77, 1992
12) Faustinella F, Chang A, Van Biervliet JP, Rossenea M, Vinaimaont N, Smith LC, Chen SH, and Chen L: Catalytic trial residue mutation (Asp 156 → Gly) causing familial lipoprotein lipase deficiency. J Biol Chem, 266: 14418-14424, 1991
13) Kozaki K, Gotoda T, Kawamura M, Shimada M, Yazaki Y, Ouchi Y, Orimo H, and Yamada N: Mutational analysis of human lipoprotein lipase by carboxyl-terminal truncation. J Lipid Res, 34: 1765-1772, 1993
14) Kuivenhoven JA, Groenemeyer BE, Boer JM, Reymer R, Berghuis R, Bruin T, Jansen H, Seidell JC, and Kastelein JJ: Ser 447 stop mutation in lipoprotein lipase is associated with elevated HDL cholesterol levels in normolipidemic males. Arterioscler Thromb and Vasc Biol, 17: 595-599, 1997
15) Hoffer MJ, Bredie SJ, Boomsma DI, Reymer PW, Kastelein JJ, *et al.*: The lipoprotein lipase (Asn 291 → Ser) mutation is associated with elevated lipid levels in families with familial combined hyperlipidemia. Atherosclerosis, 119: 159-167, 1996
16) Reymer PW, Groenemeyer BE, Gagne E, Miao L, Applman EE, *et al.*: A frequently occuring mutation in the lipoprotein lipase gene (Asn 291 Ser) contributes to the expression of familial combined hyperlipidemia. Human Molecular Genetics, 4: 1543-1549, 1995
17) Zhang H, Reymer PW, Liu MS, Forsythe IJ, and Groenemeyer BE: Patients with apoE3 deficiency (E2/2, E3/2 and E4/2 who manifest with hyperlipidemia have increased frequency of an Asn 291 Ser mutation in the human LPL gene. Arterioscler Thromb and Vasc Biol, 15: 1695-1703, 1995
18) Maily F, Tugrul Y, Reymer PW, Bruin T, Seed M, *et al.*: A common variant in the gene for lipoprotein lipase (Asp9 → Asn). Arterioscler Thmomb and Vasc Biol, 15: 468-478, 1995
19) Lohse P, Brewer HB Jr, and Fojo SS: Familial chylomicronemia: identification of a unique patient homozygous for two separate mutations in the LPL gene. Circulation, 84 (suppl II): II-376, 1991
20) Kobayashi J, Tashiro J, Murano S, Morisaki N, and Saito Y: Lipoprotein mass and activity in post-heparin plasma from the subjects with intraabdominal visceral fat accumulation. Clinical Endocrinology, 48: 515-520, 1998
21) Kobayashi J, Bujo H, Seimiya K, Hikita M, Murano S, Morisaki N, and Saito Y: A delayed post prandial hyperlipidemia in subjects with visceral fat accumulation. Circulation, (Supp) 96: I-413, 1997
22) Shimada M, Ishibashi S, Inaba T, Yagyu H, Harada K, Osuga J, Ohashi K, Yazaki Y, and Yamada N: Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 7242-7246, 1996
23) Zilversmit DB: Atherosclerosis: a postprandial phenomenon. Circulation, 60: 473-485, 1979
24) O'Brien K, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, and Chait A: Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaque. J Clin Invest, 89: 1544-1550, 1992
25) Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Goldberg I, Steinberg D, and Witztum JL: Macrophages and

smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and rabbit atherosclerotic lesions. Proc Natl Adad Sci USA, 88 : 10141-10147, 1991

26) Aviram M, Bierman EL, and Chain A : Modification of low density lipoprotein by lipoprotein lipase or hepatic lipase induces enhances uptake and cholesterol accumulation in cells. J Biol Chem, 263 : 15416-15422, 1988

27) Saxena U, Klein MG, Vanni TM, and Goldberg IJ : Lipoprotein lipase increase low density lipoprotein retention by subendothelial cell matrix. J Clin Invest, 89 : 373-380, 1992

28) Rumsey SC, Obunke JC, Arad Y, Deckelbaum RJ, and Goldberg IJ : Lipoprotein lipasemediated uptake and degradation of low density lipoproteins by fibroblast and macrophage. J Clin Invest, 90 : 1504-1512, 1992

29) Eisenberg S, Sehayek E, Olivecrona T, and Vlodavsky I : Lipoprotein lipase enhances binding of lipoproteins to heparan sulfate on cell surfaces and extracellular matrix. J Clin Invest, 90 : 2013-2021, 1992

30) Mulder MP, Lombardi P, Jansen H, Berkel TJC, Frants RR, and Havekes LM : Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoprotein that are bound to heparan sulfate proteoglycan via lipoprotein lipase. J Biol Chem, 268 : 9369-9375, 1993

31) Williams KJ, Fless GM, Petrie ML, Snyder ML, Broca RW, and Swenson TL : Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein (a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. J Biol Chem, 267 : 13284-13292, 1993

32) Fernandez-Borja M, Bellido D, Viella E, Olivecrona G, and Vilaro S : Lipoprotein lipase-mediated uptake of lipoprotein in human fibroblasts : evidence for an LDL receptor-independent internalization pathway. J Lipid Res, 37 : 464-481, 1996

33) Hendriks WL, van der Boom, van Vark LC, and Havekes LM : Lipoprotein lipase stimulates the binding and uptake of moderately oxidized low density lipoprotein by J 774 macrophages. Biochemical Journal, 314 : 563-568, 1996