動脈硬化 25 (11・12): 427-429, 1998

フォーラム 13 リポ蛋白代謝と動脈硬化性疾患 —— 最近の知見 ——

レムナントリポ蛋白と動脈硬化性疾患

—— 発生工学的手法による解析 ——[1]

大須賀 淳 一[2] 嶋 田 昌 子[2] 石 橋 俊[2] 野 牛 宏 晃[2]
原 田 賢 治[2] 大 橋 健[2] 山 田 信 博[2] 矢 崎 義 雄[2]

はじめに

レムナントは動脈硬化惹起性のリポ蛋白の一つである．レムナント粒子の減少が虚血性心疾患の二次予防につながったとする最近の疫学データからも，高レムナント血症の治療は重要である．一般にレムナントと呼ばれるリポ蛋白は，カイロミクロンレムナントおよびVLDLレムナントである．カイロミクロンおよびVLDLは，リパーゼによる水解をうけながらLDL受容体 (LDLR) あるいはレムナント受容体経路により異化され，血中より取り除かれている．III型高脂血症や糖尿病は，この過程に障害があるためにレムナントが停滞すると考えられている病態である．

LDL受容体ノックアウトマウス (LDLRKO)[1] およびアポEノックアウトマウス (apoEKO) は，レムナント代謝の動脈硬化におよぼす影響を検討するのに適したモデル動物である．

LDLRKOは，約7ヵ月間高コレステロール食で飼育すると，ヒトの家族性高コレステロール血症に特徴的な黄色腫 (皮膚，腱) を呈してくることが知られている[2]．動脈硬化性病変は，普通食飼育下では軽微で大動脈起始部の内皮下に泡沫細胞が散見する程度であるが，8ヵ月間の高コレステロール食飼育下で大動脈に顕著なアテローマが認められるようになる．一方，apoEKOは普通食飼育下でも大動脈にアテローマが形成される．食事の差はあるものの，これら2種類のマウスに共通していることはリポ蛋白分画上レムナントが著増している点であり，レムナントによりアテローマ形成が促進させられた点である．

動物モデルからもわかるように，動脈硬化症の進展を抑制するためにはレムナントを減少させることが必要である．レムナントが除去される機構のなかで，リポ蛋白リパーゼ (LPL) とLDLRは特に重要な働きをしている．

肝臓より生成されるVLDLは，LPLにより水解されレムナントであるIDL，さらにLDLへと転換される．このさい，一部のVLDLは水解されながらリポ蛋白表面上のアポEがLDLRに認識されて除去されている．嶋田が報告したヒトLPLの過剰発現マウス (LPLトランスジェニックマウス；LPLTg) では，VLDLのLDLへの変換が促進されてVLDLレムナントの消失が確認された[3]．

また，食事由来の脂肪を運搬するカイロミクロンもLPLにより水解される．LPLTgにレチノール負荷試験を行ったところ，LPLTgではレチノールの消退が促進していることより，LPLの過剰発現はカイロミクロンレムナントの除去を促進させることが明らかになった．このLPLによる水解過程で，カイロミクロンはアポEをうけ取って，いわゆる“アポE受容体”により除去されている．LDLRKOおよびapoEKOを用いて検討した石橋の報告によれば，カイロミクロンレムナントの約75%はLDLR経路で異化されている．この事実からもレムナント受容体も担うLDLRの役割は大きいと考えられる[4]．

LPLの過剰発現はレムナントを消失させた．これにより，動脈硬化病変の形成を抑制する可能性が示唆された．LPLの抗動脈硬化作用を例証するために，LPLTgとLDLRKOを交配してLPLを過剰発現したLDLRKO (LPL/LDLRKO) を作製し，LPLのリポ蛋白代謝および動脈硬

---

[1] 1997年6月，第29回日本動脈硬化学会総会 (東京) において発表．

[2] 東京大学医学部第三内科

Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase

Jun-ichi Osuga, Masako Shimada, Shun Ishibashi, Hiroaki Yagyu, Kenji Harada, Ken Ohashi, Nobuhiro Yamada, and Yoshio Yazaki: The Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

Key words: Lipoprotein lipase, Low density lipoprotein receptor, Remnant lipoproteins
原稿受取日：1998年4月10日

化におよぼす影響ついて検討した[5].

I. 材料および方法

1) 動 物

ヒトLPLの過剰発現マウス (LPLTg) は嶋田により，LDL受容体ノックアウトマウス (LDLRKO) は石橋により作製された．ヘテロ接合体のLPLTgを，ホモ接合体のLDLRKOと交配して得られた子孫のうちLPLのトランスジーンをもつマウスともたないマウスを交配した．PCR法により遺伝型を決定し，LPLを過剰発現したホモ接合体のLDL受容体ノックアウトマウス (LPL/LDLRKO)，およびLPLのトランスジーンをもたないLDL受容体ノックアウトマウス (LDLRKO) を得た．LPLTgはC57BL/6とDBA/2のF2をC57BL/6へ6回戻し交配しており，L-DLRKOは129SvとC57BL/6のF2なので，本実験に用いたマウスの系統は，C57BL/6が72%，129Svが25%，DBA/2が3%になっている．

2) 食 餌

普通食としてオリエンタル酵母社のMFを使用し，動脈硬化食として，MFに1.25%のコレステロール，0.5%のコール酸と15%のココアバターを添加したものを使用した．

3) リポ蛋白分析

16時間絶食後，後眼窩静脈叢から採血し，血漿コレステロール値と中性脂肪値を酵素法により測定した．また，HPLC法によりリポ蛋白分析を行った．HPLC法には10 μlのプールした血漿を用い，TSK G3000SWとG50000SW (東ソー，東京) を連結したカラムで展開した．アポ蛋白分析を行うために，血漿を臭化カリウムで比重1.21に調整し超遠心法で比重1.21以下の分画を回収した．この分画を，0.15 M NaCl，1 mM EDTA，1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (pH 7.4) で透析し，エタノール/エーテル (1:1) で脱脂した．脱脂したアポ蛋白は，5〜20%のアクリルアミド濃度勾配のSDS含有ゲルで電気泳動 (SDS/PAGE) し，クーマシーブリリアントブルー染色を行った．

4) リポ蛋白の動態分析

VLDLは正脂血症のドナーの血漿から，LDLはC57BL/6の血漿から超遠心法で分離した．リポ蛋白は一塩化ヨウ素法により^{125}Iで標識した．^{125}I-VLDLおよび^{125}I-LDLはマウスあたり5 μ Ciを尾静脈へ注射した．経時的に採血し，注射後1分の値を100%として用いた．アポBの放射活性はイソプロパノール沈殿法で測定した．VLDLを注射した場合には，採血した血漿を超遠心しVLDLをIDL+LDLと分離し，放射活性を測定した．

5) 動脈硬化病変の脂肪染色

動脈硬化病変はPaigenの方法を多少改変して評価した．動脈硬化食で2ヵ月飼育したのち，心臓と大動脈を切除し生理食塩水に1時間浸したのち，7%のホルマリンで48時間固定した．O.C.T. compound embedding medium (Tissue Tek) に包埋後凍結し，クリオスタットで凍結切片を作製した．心尖部側より切りはじめ，大動脈洞の終末2枚と大動脈洞と上行大動脈の接合部2枚の合計4切片で病変面積を計算し，それらの平均値を用いた．

II. 成 績

普通食で飼育した場合，LPL/LDLRKOの中性脂肪値およびコレステロール値は，LDLRKOに比べそれぞれ86.4%，22.3%低下していた．LPLによる脂質低下作用は動脈硬化食を負荷した場合にも認められ，LPL/LDLRKOのコレステロール値はLDLRKOの62%であった．HPLC法でリポ蛋白分析を行ったところ，普通食飼育下のLDLR-KOでは中性脂肪はVLDL (分画a) とLDL (分画c) の間の分画bに分布しているが，LPLを過剰発現したLPL/LDLRKOではこの分画が減少していた．また，コレステロールはLDLRKOではIDL/LDL (分画b+c) とHDL (分画e) に分布しているが，LPL/LDLRKOのIDL/LDLはLDLRKOに比べ著明に減少していた．動脈硬化食を投与した場合，LDLRKOのIDL/LDLは著明に増加するが，LPLの過剰発現はIDL/LDLのうちより大きな粒子を含む分画bを選択的に減少していた．アポ蛋白のSDS/PAGE分析上，LDLRKOとLPL/LDLRKOの間でアポBの量には大きな差は認められなかったが，アポEはLPL/LDLRKOのほうで減少していた．

^{125}I-VLDLの消退速度は，LDLRKO (11.1プール/日) に比べLPL/LDLRKO (16.2プール/日) の方が50%速かった．VLDLは実質的にはIDL/LDLに変換されていた．^{125}I-LDLのクリアランスはLDLRKOとLPL/LDLRKOの間で差はなかった．

動脈硬化食投与により動脈硬化惹起性について検討した．LDLRKOの病変面積は309,100±216,200 μm^{2}に対しLPL/LDLRKOでは17,100±9,900 μm^{2}であった．LPLの過剰発現により病変面積は18分の1に抑制されていた．組織学的にはLDLRKOの病変は泡沫細胞が広範におよび，一部は壊死性の無細胞領域を伴っていた．一方，LPL/LD-LRKOではところどころに脂肪斑が散見される程度であった．

III. 考 察

これまでの報告でLPLTgはHDL_2分画が軽度増加していることが示されているが，LPL/LDLRKOでは，LDLR-KOに比べHDLコレステロールもアポA-Iも増えてはいなかった．したがって，LPLの抗動脈硬化作用はHDLの増加によるとするよりもLPLの直接的な作用と考えられ

た．

リポ蛋白のHPLC分析より，LPL/LDLRKOにおいて減少している分画は中性脂肪含量の多い分画bであった．この分画は，いわゆるレムナントリポ蛋白に相当するものと考えられる．したがって，LPLの抗動脈硬化作用はレムナント粒子の減少によるところが大きいと考えられた．レムナントリポ蛋白の動脈硬化惹起性についてはこれまでの臨床研究により示されてきたが，二次予防試験においてもレムナントリポ蛋白の減少が有効であることが示されている．

レムナントリポ蛋白は減少したものの，LPL/LDLRKOとLDLRKOの間ではアポBを含有する粒子数には差は認められなかった．これは，^{125}I-VLDLの動態分析からもわかるように，LPLの過剰発現はアポB含有リポ蛋白の正味の（VLDLとIDL/LDLの合計）のクリアランスを増加させていなかったことと合致する．この結果から，LPLによるアポB含有リポ蛋白の取り込み促進は主としてLDLRを介していると考えられる．LDLR以外，たとえばLDL受容体関連蛋白（LRP）の経路による異化をLPLが促進するという *in vitro* の結果も示されているが，今回の結果はこれを支持するものではなかった．*in vivo* の系では，過剰のLPLによりこの経路は飽和しているのかも知れない．

粒子数の変化がなかったことより，LPL/LDLRKOではレムナントリポ蛋白がより小さなコレステロール含量の少ない粒子に変換されたと考えられた．アポ蛋白のSDS/PAGE上LPL/LDLRKOにはLDLRKOに比べアポE含量が少ないので，LPL/LDLRKOではアポEがはじき出されるほどにレムナントリポ蛋白は過度の水解をうけていると推察された．

LPLのリポ蛋白に対する影響以外に，LPLTgでは大動脈にもトランスジーンの発現が認められるので，動脈壁での局所的なLPLの作用が動脈硬化進展に抑制的に働いた可能性もある．しかしながら，現在のところ直接的な証拠は見い出されてはいない．

IV. 結　論

今回の検討により，LPLの過剰発現は動脈硬化食によってもたらされるLDLRKOの動脈硬化を顕著に抑制することが示された．これは，レムナントリポ蛋白にLPLが作用して，動脈硬化をおこしにくいより小さなリポ蛋白粒子に変換されたことが原因と推察された．この *in vivo* の観察により，LPLを過剰発現させる薬剤ないし遺伝子導入が動脈硬化進展の抑制につながる可能性が示された．

文　献

1) Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerad RD, Hammer RE, and Herz J: Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. J Clin Invest, 92: 883-893, 1993
2) Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, and Burns DK: Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. J Clin Invest, 93: 1885-1893, 1994
3) Shimada M, Shimano H, Gotoda T, Yamamoto K, Kawamura M, Inaba T, Yazaki Y, and Yamada N: Overexpression of human lipoprotein lipase in transgenic mice. J Biol Chem, 268: 17924-17929, 1993
4) Ishibashi S, Perrey S, Chen Z, Osuga J-I, Shimada M, Ohashi K, Harada K, Yazaki Y, and Yamada N: Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. J Biol Chem, 271: 22422-22427, 1996
5) Shimada M, Ishibashi S, Inaba T, Yagyu H, Harada K, Osuga J-I, 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