シンポジウム 2 リポ蛋白代謝酵素と動脈硬化

リポ蛋白リパーゼと動脈硬化

—— 合成化合物を用いての検討 ——¹堤 一 彦²

はじめに

リポ蛋白リパーゼ (LPL) は、主として、心筋、骨格筋、脂肪組織の実質細胞で合成され、トリグリセリド (TG) に富む TG リッチリポ蛋白であるカイロミクホン、VLDL 粒子中の TG の加水分解の律速段階を支配する酵素である。LPL が抗動脈硬化的か、動脈硬化惹起的かについては、多くの議論がなされてきた。最近では、トランスジェニックマウスを用いての研究が行われている。本稿では、LPL 活性化剤 NO-1886 を用いて LPL と動脈硬化との関係について検討したので、報告する。

I. LPL 活性化剤 NO-1886 とは

NO-1886 (4-[4-bromo-2-cyanophenyl]-carbamoyl] benzylphosphonate) は株式会社大塚製薬工場で合成された新規合成化合物であり、ヘパリン静注後の血漿 (PHP) 中の LPL 活性を上昇させる作用を有している。その結果、血漿 TG 値を低下させるのはもちろん、HDL-C を積極的に上昇させる¹⁻³⁾。

NO-1886 は、LPL の合成組織である脂肪組織や心筋の LPL mRNA の発現を亢進させ、これらの組織の LPL 活性を上昇させることが確認されている。また、PHP の LPL 活性のみならず、LPL の酵素蛋白も増加させる。したがって、NO-1886 による LPL 活性化の作用メカニズムは、NO-1886 が LPL mRNA の発現を亢進させ、LPL の酵素蛋白の合成

を促進させ、その結果、活性が上昇すると考えられる。

NO-1886 による PHP の LPL 活性の上昇作用は用量依存的である (Fig. 1)。したがって、血漿 TG の低下作用ならびに HDL-C の上昇作用も、用量依存的である (Fig. 2)。なお、本化合物は肝性 TG リパーゼ (HTGL) 活性には影響を与えない。

II. LPL と動脈硬化

LPL が抗動脈硬化的か、動脈硬化惹起的かについては、多くの議論がなされ、多くの論文が発表されてきた。最近、Shimada らは、LPL 過剰発現マウスと LDL 受容体ノックアウトマウスとの cross breeding により、LPL 過剰発現/LDL 受容体ノックアウトマウスを作製し、これを高コレステロール飼料で飼育したところ、LPL 過剰発現/LDL 受容体ノックアウトマウスは、LDL 受容体ノックアウトマウスに比べて血漿 TG およびコレステロールが低値を示し、大動脈の硬化病変の発生を抑制したと報告している⁴⁾。また、LPL 過剰発現の結果、動脈硬化惹起的リポ蛋白であるレムナントが低下し、それが動脈硬化の抑制に関与しているとの考察を加えている。

われわれは、LPL 活性を上昇させる合成化合物 NO-1886 を動脈硬化のモデル動物に投与し、動脈硬化におよぼす影響について検討を加えた。

1) 老齢ラットの血管弛緩反応におよぼす影響

血管の内皮細胞は加齢に伴い障害をうける。したがって、老齢動物の血管は動脈硬化の前段階としてとらえることができる。血管の収縮、弛緩反応には内皮細胞および平滑筋細胞が関与していることから、内皮細胞の障害は血管弛緩反応を低下させる。そこで、NO-1886 が老齢ラットの血管弛緩反応にどのような影響をおよぼすかについて検討した⁵⁾。

老齢モデルとして、生後 9 ヶ月齢のラットを用い、NO-1886 を 3 ヶ月間経口投与し、試験最終日に胸部大動脈を摘出した。リング状にした血管の入ったメデイウムにフェニ

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 株式会社大塚製薬工場研究開発本部

Effects of lipoprotein lipase on atherosclerosis using a synthetic compound

Kazuhiko Tsutsumi: Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc. Research & Development, Tokushima, Japan

Key words: Lipoprotein lipase, HDL cholesterol, Triglyceride, Atherosclerosis

原稿受取日: 1998 年 7 月 7 日

Fig. 1 Postheparin plasma LPL in NO-1886-treated normal rats. Dose relationship: NO-1886 was administered to rats, and 4 h later the rats were injected with heparin (100 U/kg body weight) via the tail vein. Blood samples were collected 5 min later, and LPL activity in postheparin plasma were measured. Data are expressed as means $\pm$ SD. Significantly different from the value in control rats: * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Fig. 2 Plasma lipid levels in NO-1886-treated normal rats. Dose relationship: NO-1886 was administered to rats. Blood samples were collected 4 h later, and plasma lipids were measured. Data are expressed as means $\pm$ SD. Significantly different from the value in control rats: * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

レフィリンを 10^{-6} M 添加し、血管を収縮させたのち、ヒスタミンを加え、血管を弛緩させた。対照として生後 7 週齢の若齢ラットを用いた。Fig. 3 に示したように、老齢ラットの血管弛緩反応は若齢ラットに比べて低下していた。一方、NO-1886 を投与したラットの血管弛緩反応は若齢ラットと同程度であった。ヒスタミンによる血管弛緩反応は内皮依存性の弛緩反応であることから、NO-1886 には血管内皮細胞の障害を抑制する作用を有すると考えられた。このときの血漿脂質、血糖、インスリンを Table 1 に示した。老齢ラットは若齢ラットに比べて、高コレステロール、高 TG、高血糖、高インスリン血症であった。しかし、NO-1886 を投与されたラットの TG はコントロール群より 26% 低く、HDL-C は約 2 倍高値であった。NO-1886 による内皮細胞障害抑制は脂質代謝異常改善作用によるものと考えられる。

2) 実験的動脈硬化症モデルラット

実験的動脈硬化症モデルは、高コレステロール飼料で動物を飼育し、血中コレステロール濃度を上昇させて作製するのが一般的である。しかし、ラットはコレステロールを胆汁酸へ排泄させる作用が強いため、コレステロールを負荷しても血中コレステロール濃度は上昇しない。そこで、あらかじめ、ビタミン D₂ 35 万 U/kg を 4 日間経口投与して、血管中膜にカルシウムを沈着させ、その後、コレステロールを 2%、コレステロールの腸での吸収を促進させる目的でコル酸 Na を 0.5%、そして甲状腺機能を低下させる目的で 6-メチル-2-チオウラシルを 0.2% 含有させた動脈硬化食でラットを 3 ヶ月間飼育し、冠状動脈に動脈硬化を発生させた。NO-1886 の投与は、3 mg/kg および 30 mg/kg の投与量で、3 ヶ月間行った。3 ヶ月後、心臓を摘出し、病理検査を行った。冠状動脈の病理写真の 1 例を Fig. 4

Table 1 Plasma levels of lipid, glucose and insulin in old rats treated with NO-1886.

	n	(mg/dl)			(pg/ml)	
		Total cholesterol	HDL-C	Triglycerides	Glucose	Insulin
Young rats	7	65±1*	60±2	151±13*	128±3*	23.1±5.7*
Old rats						
Control	10	98±4	72±6	233±10	194±6	67.0±8.6
NO-1886	9	173±5*	142±6*	172±16*	185±6	68.8±9.5

Data are expressed as means±SE, *P<0.01 vs old control rats

Fig. 3 Effects of NO-1886 on the dilator response of old rat thoracic aorta to histamine. Data are expressed as means±SD. Significantly different from the value in old control rats: †P<0.05, *P<0.01.

に示した。コントロール群のラットの冠状動脈では、内膜の肥厚、泡沫細胞の集ぞく、内弾性板の断裂、内弾性板へのカルシウムの沈着がみられた。一方、NO-1886を30 mg/kg投与したラットでは、内膜の肥厚、泡沫細胞の集ぞくもみられず、ほぼ正常な状態であった。NO-1886は投与量に応じて泡沫細胞の蓄積抑制、内弾性板へのカルシウムの沈着抑制を示し、冠状動脈硬化の発生を抑制した。ラットの血漿脂質と冠状動脈における泡沫細胞の蓄積の程度との関係を多重回帰分析した結果、HDL-Cがもっとも強い抗動脈硬化作用を示していた¹⁾。

3) 実験的動脈硬化症モデルウサギ

ウサギはラットと違って、高コレステロールの飼料で飼育することにより大動脈に動脈硬化を発生させることができる。今回の試験では、0.25% コレステロール含有飼料で20週間飼育することにより動脈硬化を惹起させた。NO-1886の投与は、NO-1886を飼料に0.5%および1.0%含有させた飼料を与えることにより行った。

高コレステロール含有飼料でウサギを20週間飼育する

Fig. 4 (A) Coronary artery section stained with hematoxylin and eosin, showing marked thickening of tunica intima with foam cell accumulation and fibrous proliferation from an atherogenic diet-fed rat. Magnification, 175. (B) Section of a corresponding portion of a coronary artery from an atherogenic diet-fed, NO-1886 (30 mg/kg)-treated rat showing no atherosclerotic lesions. Magnification, 231.

ことにより、血中コレステロール値が正常ウサギの約20倍上昇し、TG値も2倍上昇した。NO-1886は血漿コレステロール値にはほとんど影響を与えなかったが、用量依存的にTGを低下させ、HDL-Cを上昇させた。HDL-Cについては、20週間後にはコントロール群と比べて、0.5%投与群では1.9倍、1%投与群では2.1倍上昇していた。

ウサギの大動脈の起始部から総腸骨動脈の分岐部までの血管を切開し、観察したところ、コントロール群では血管の多くの部分に脂肪の沈着、プラークの形成がみられた。これに対して、化合物を投与したウサギの血管ではプラークの形成が用量依存的に抑制されていた。全血管面積におけるプラーク部分の占める割合 (atheromatous area) を求めたところ、atheromatous areaはコントロール群では53%、化合物0.5%投与群では23%、1.0%投与群では16%となり、本化合物は統計的に有意にプラークの形成を抑制した。

Atheromatous areaと血漿TGおよびHDL-C値の20週間分の積分値 (AUC) との相関関係を求めたところ、TG値のAUCとatheromatous areaとの間には正の相関が、HDL-C値のAUCとatheromatous areaの間には負の相関が得られた。このことは、高TG、低HDL-Cは動脈硬化

惹起的であり、低 TG、高 HDL-C が抗動脈硬化的であることを示している。血漿脂質値の AUC と atheromatous area との関係を多重回帰分析したところ、ラットと同様に、プラークの形成抑制には HDL-C の上昇がもっとも強く関与しているとの結果が得られた⁶⁾。

ま と め

LPL 活性化剤 NO-1886 は、実験的動脈硬化症ラットおよびウサギの動脈硬化の発症を抑制した。NO-1886 による動脈硬化の発症抑制は、LPL 活性の上昇により、TG が低下し、HDL-C が上昇した結果と考えられた。多重回帰分析の結果は、動脈硬化発症抑制における HDL-C 上昇の重要性を示唆していた。

LPL は、動脈硬化の発症抑制に重要な役割を担っていると考えられる。

文 献

- 1) Tsutsumi K, Inoue Y, Shima A, Iwasaki K, Kawamura M, and Murase T: The novel compound NO-1886 increases lipoprotein lipase activity with resulting elevation of HDL cholesterol, and long-term administration inhibits Atherogenesis in the coronary arteries of rats with experimental atherosclerosis. *J Clin Invest*, 92: 411-417, 1993
- 2) Tsutsumi K, Inoue Y, Shima A, and Murase T: Correction of hypertriglyceridemia with low high-density lipoprotein cholesterol by the novel compound NO-1886, a lipoprotein lipase-promoting agent, in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes*, 44: 414-417, 1995
- 3) Tsutsumi K, Inoue Y, Hagi A, and Murase T: The novel compound NO-1886 elevates plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in hamsters and rabbits by increasing lipoprotein lipase without any effect on cholesteryl ester transfer protein activity. *Metabolism*, 46: 257-260, 1997
- 4) 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 over expressing lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 7242-7246, 1996
- 5) Hara T, Kusunoki M, Tsutsumi K, Okada K, Sakamoto S, Ohnaka M, Nakamura T, Miyata T, Nakayama K, Fukatsu A, Kato K, Kakumu S, and Nakaya Y: A lipoprotein lipase activator, NO-1886, improve endothelium-dependent relaxation of rat aorta associated with aging. *Eur J Pharmacol*, 350: 75-79, 1998
- 6) Chiba T, Miura S, Sawamura F, Uetsuka R, Tomita I, Inoue Y, Tsutsumi K, and Tomita T: Antiatherogenic effects of a novel lipoprotein lipase-enhancing agent in cholesterol-fed New Zealand White rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 2601-2608, 1997