

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07153

研究課題名（和文）リンパ浮腫と肥満とコレステロール動態の関連性の解明とその予防策の構築

研究課題名（英文）Study of the relationship between lymph edema, obesity and cholesterol

研究代表者

佐藤 夕紀 (Sato, Yuki)

北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：00564981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脂肪細胞とコレステロール等の脂溶性成分の動態について着目し、肥満との影響を明らかにすることを目標に検討した。現在までに、我々は、ヒトリンパ管内皮細胞を用いて、レプチン曝露によるVE-cadherinの変化を伴うアルブミンなどの透過性変化を確認した。ヒトリンパ管内皮細胞において、レプチン曝露により蛍光標識アルブミンの透過量がコントロール群と比較して、若干増大することが確認された。また、コレステロール動態を詳細に検討できるようアフリカツメガエル卵母細胞を用いてトランスポーター発現系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、本研究では、混合ミセルに組み込んだコレステロールトランスポーターNPC1L1を介したコレステロール取り込みに対する新規in vitro評価系として、oocyte発現系の構築に成功した。Oocyte発現系の利用によりNPC1L1の輸送機構の一端がより詳細に解明されることが期待される。また、HDLECを用いた検討ではcontrol群と比較して、レプチン曝露により、蛍光標識アルブミン透過量が増大する傾向が認められた。今後その詳細なメカニズムが明らかになることで、肥満やリンパ節郭清に伴う浮腫の予防策を講じることが可能となると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the dynamics of fat-soluble components such as adipocytes and cholesterol and investigated to clarify the effects of obesity. To date, using human lymphatic endothelial cells, we have confirmed changes in the permeability of albumin and other substances that accompany changes in VE-cadherin following leptin exposure. In human lymphatic endothelial cells, it was confirmed that leptin exposure slightly increased the permeation amount of fluorescent-labeled albumin compared to the control group. In addition, we constructed a transporter expression system using *Xenopus laevis* oocytes to study cholesterol dynamics in detail.

研究分野：医療薬学

キーワード：コレステロール レプチン リンパ ヒアルロン酸 吸収

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは、1981年以降連続して本邦における死因の第一位であり、がんの罹患者数は年々増大し、現在約180万人と推計されている。その一方、近年の医薬品開発ならびに医療技術の急速な発展により、がんとの診断後の延命期間は延長している。がんは、早期であれば薬物治療ならびに外科的手術により完治の可能性が高いが、切除しきれなかった場合や悪性度に応じ、再発や転移が認められる。特にリンパ行性転移は、原発巣からリンパ液の流れに沿って進行する性質があり、がん細胞の転移している可能性のあるリンパ節を予防的に切除し、腫瘍の取り残しをできるだけ減らす目的で、リンパ節郭清が行われる。リンパ節郭清は、主に乳がん、子宮、卵巣がん、泌尿器系がん、一部の消化器系がん等で、転移の可能性の有無とがんの進行程度に応じて行われる。この処置により、リンパの流滞により、高頻度(乳がん患者で約50%、子宮および卵巣がんで15-20%)で四肢(上肢または下肢)のリンパ浮腫が起こることが知られている。リンパ浮腫は、リンパ流の停滞により間質にリンパ液が貯留してゆき、浮腫により四肢の太さの変化のみならず、重症化すると象皮症となる他、蜂窩織炎と呼ばれる感染症を発症するなど難治性疾患である。

現在までに、肥満(BMI; body mass indexが25以上)は乳がんの発症リスクと相関すること、乳がん診断時あるいは診断後、肥満の場合は、乳がんの再発ならびに死亡リスクが高いことなどが複数の臨床研究により報告されている。また、肥満はリンパ浮腫の高いリスク・増悪因子となっていることは知られているが、リンパ浮腫の発症期間や発症メカニズムに関しては不明な点も多く、リンパ浮腫が肥満を誘発・増悪させているかに関しての因果関係は明らかになっていない。レプチンは脂肪細胞から分泌される食欲抑制ホルモンであり、肥満症では血中濃度が高値であることが知られている。レプチンはアディポカインの一つで、脂肪組織に蓄積されたエネルギー量を反映しており、神経内分泌機能や生殖、造血、血管新生などエネルギーを必要とする生理的プロセスの制御に重要な役割を果たしている。そして、高濃度のレプチンは、ヒトリンパ管内皮細胞の管腔形成能の低下や増殖能の低下を引き起こすことと、Interleukin-6によりその増殖抑制が救済されることが報告されており、このことがリンパ浮腫の発症と関連している可能性がある。

ここで、我々はリンパ浮腫によりリンパの流滞が物理的に生じるだけでなく、その流滞により蓄積された脂肪細胞がリンパ管に対して何らかの影響を及ぼしているのではないかと考えた。また、肥満時には、コレステロール(chol)動態が変動することが知られており、リンパ浮腫の際にも何らかの影響を与えている可能性がある。

2. 研究の目的

本申請研究では、リンパ節郭清に伴うリンパ浮腫について、chol等の脂溶性成分の動態に着目しながら、脂肪細胞への影響、ならびに肥満との関連性を明らかにすることを目的として、まずはヒトリンパ管内皮細胞(HDLEC)を用いて種々検討した。

また、cholをはじめとした脂溶性成分の動態が変動する可能性も考慮し、その検討の前段階として、脂溶性栄養成分の吸収動態の解明のためのアフリカツメガエル卵母細胞 oocytes を用いた chol トランスポーター発現系を構築することとした。

3. 研究の方法

・細胞培養

HDLECをディッシュに播種し、37℃、5% CO₂条件下で培養した。培養液はリンパ管内皮細胞に推奨されているPromocell社 Endothelial Cell Growth Medium MV2に100 U/mL ペニシリンと100 µg/mL ストレプトマイシンを添加したものを使用し、2日おきに交換した。継代は、0.68 mM EDTAを含むPBS溶液5 mLで2回洗浄後、トリプシン0.5 mLを添加し37℃で5分静置し、遊離させた細胞を必要なプレート等に播種して実験に用いた。

・試薬調製

milli Q水で20 mMになるようTrisを溶解し、HClでpH 8.0とした。オートクレーブで滅菌した20 mM Tris-HClでヒトレプチン(バイオテック社)を溶解し、1 mg/mLのレプチン溶液として、-20℃で保存した。培養には、通常の培養液としてEndothelial Cell Growth Medium MV2 (Endothelial Cell Basal Medium MV 2にEndothelial Cell Growth Medium MV 2 SupplementPackを全て添加したもの)を、FBS不含培養液としてEndothelial Cell Growth Medium MV 2 SupplementPackからFBSを除いてEndothelial Cell Basal Medium MV 2に添加したものをを用いた。

・HDLECのTranswellへの播種と透過性評価

コンフルエントになった細胞をトリプシン処理し細胞懸濁液を回収した後、血球計測盤でセルカウントし、 1.5×10^5 cell/mLに調製した。その細胞懸濁液を500 µL/wellでコラーゲンコ

ートした transwell の apical 側に播種した。basal 側には通常の培養液を 1500 μ L 添加した。Apical と basal 側の培養液を回収し、FBS 不含培養液に交換して 3 時間プレインキュベートした。その後、apical 側から 250 μ L 除去し、FBS 不含培養液で 20, 200 ng/mL に希釈したレプチン (終濃度 10, 100 ng/mL) または 2 mg/mL FITC-Albumin (終濃度 1 mg/mL) control として FBS 不含培養液を 250 μ L 添加して、1 時間インキュベートした。wash 工程として各 well の apical 側 400 μ L、basal 側 750 μ L を除去し、同量の FBS 不含培養液を添加する操作を交互に二回ずつ行った。apical 側から 250 μ L 吸引し、100 μ M FITC-dextran (終濃度 50 μ M) を 250 μ M 添加し、1 時間インキュベートした。basal 側から 100 μ L 回収し、プレートリーダーで蛍光強度を測定した。

・ *hNPC1L1* in pGH19 と *hNPC1L1* cRNA の作製

pCR-XL-TOPO に組み込まれている *hNPC1L1* の CDS 領域を *Bam*HI, *Xba*I により切り出し、アフリカツメガエル卵母細胞発現用ベクターである pGH19 へと乗せ換えた。*hNPC1L1* in pGH19 を *Nhe*I により処理し、プラスミド DNA を直鎖状にした後、mMESSAGE mMACHINE T7 kit を使用して cRNA への転写を行った。これを *Nhe*I により処理し、プラスミド DNA を直鎖状にした後、mMESSAGE mMACHINE T7 kit を使用して cRNA への転写を行った。

・ Oocyte の調製

Oocyte は *Xenopus laevis* から摘出し、oocyte が 30-50 個程度固まっている状態に切り分けた。OR2 buffer (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5mM HEPES adjusted to pH 7.5 with Tris) 40 mL で 5 回洗浄後、コラゲナーゼ 1 mg/mL を含む OR2 buffer 20 mL を用いて 5 分ごとに手動で撹拌しながら 20 分間処理した。コラゲナーゼ処理後、ゲンタマイシン硫酸塩を終濃度 0.05 g/L となるように加えた Barth's buffer (88 mM NaCl, 2.4 mM NaHCO₃, 1 mM KCl, 0.41 mM CaCl₂, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.82 mM MgSO₄, 10 mM HEPES adjusted to pH 7.4 with Tris) 40 mL で 5 回洗浄し、実体顕微鏡下で精密ピンセットと defolliculation buffer (110 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM HEPES adjusted to pH 7.6 with Tris) を用いて実験に用いる oocyte の濾胞細胞と卵黄膜を除いた。

・ マイクロインジェクションおよび培養

流動パラフィンを満たしたキャピラリーガラス (Drummond Scientific) をインジェクターに取り付けた後に cRNA を吸い、マニピュレーターを用いて oocyte の植物極側に *hNPC1L1* cRNA (1 μ g/ μ L) を 30 nL/個となるようにインジェクションし、Barth's buffer を用いて 16 時間で 3-6 日間培養した。また、control として DEPC 処理水を同量インジェクションした oocyte を同様に Barth's buffer を用いて 16 時間で 3-6 日間培養した。

・ Oocyte への [³H]-chol 取り込み実験および定量

Oocyte を 24 穴プレートへ 5-7 cells/well となるように移し、Barth's buffer から ND96 buffer に置換し、25 分で 30 min プレインキュベートした。その後 ND96 buffer を除去し、30 nM [³H]-コレステロールおよび 0, 25 μ M エゼチミブを含む薬液を 500 μ L/well となるよう添加し、25 分で一定時間インキュベートした。その後薬液を除去し、oocyte を氷冷した ND96 buffer で 3 回洗浄して取り込みを停止させた。顕微鏡で oocyte が破裂していないことを確認し、SDS 溶液 (4% (w/v) SDS in 0.2 M NaOH) 250 μ L で oocyte を溶解させた。放射活性の測定は液体シンチレーションカウンターにより行った。

4. 研究成果

・ ウエスタンブロット法による *hNPC1L1* の発現確認

cRNA インジェクションにより、*hNPC1L1* が oocyte 内で正常に発現するか確認するため、ウエスタンブロットを行ったところ、*hNPC1L1* cRNA をインジェクションした oocyte サンプルにおいて *hNPC1L1* の発現が確認された (Figure 1)。一方、DEPC 処理水をインジェクションした oocyte (control) では *hNPC1L1* の発現は認められなかった。

NPC1L1 Control

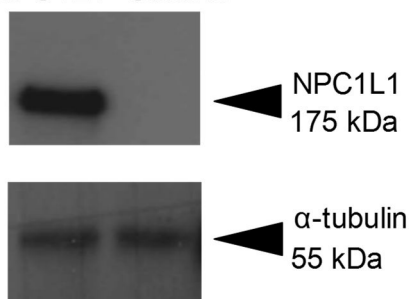


Figure 1 *hNPC1L1* 発現 oocyte における *hNPC1L1* 発現確認

hNPC1L1 cRNA または水をインジェクションした oocyte を超音波ホモジナイザーでホモジナイズし、遠心分離により粗膜画分を得た。この粗膜画分中の *hNPC1L1* の発現をウエスタンブロット法により確認した。ローディングコントロールとして α -tubulin の発現も確認した。

・エマルションおよび混合ミセルに可溶化した chol の取り込み実験

hNPC1L1 の細胞膜上への局在が確認された培養 5 日目の oocyte を用いて、エマルションおよび混合ミセルの取り込み実験を行い、hNPC1L1 の輸送活性を評価した。安定発現細胞系の結果と同様に、エマルションの取り込み実験においては control 群と NPC1L1 発現群の間に chol 取り込み量の有意な差はなく、エゼチミブによる阻害も認められなかった (Figure 2a)。一方で混合ミセルの取り込み実験においては cRNA インジェクションにより chol 取り込み量が有意に増大し、エゼチミブによりその取り込み量が有意に減少した (Figure 2b)。これらの結果より、oocyte の細胞膜上に発現した hNPC1L1 が機能していることが示された。一方、培養 3 日目の oocyte では chol 取り込み量に有意差は認められなかった (データは示さない)。これらの結果は別検討で得た免疫染色法により確認した発現量と関連していた (データは示さない)。この結果を受け、以降の検討には培養 5-6 日目の oocyte を用いることとした。

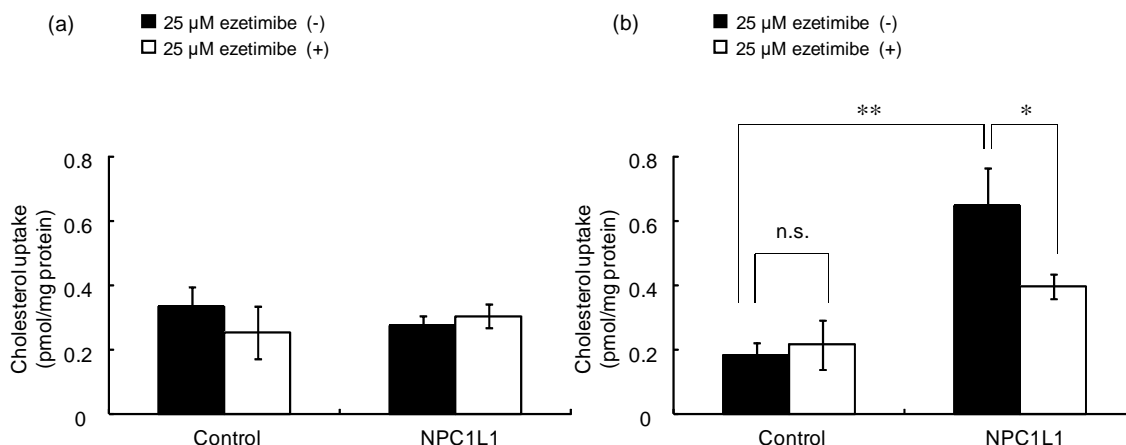


Figure 2 Oocyte におけるエマルション中(a)および混合ミセル中(b)の ^3H - chol 輸送活性の確認

(a) $n=3$, mean \pm S.D., (b) $n=3$, mean \pm S.D., * $p<0.05$, ** $p<0.01$ by two-way factorial ANOVA followed by the Tukey-Kramer's multiple comparisons test.

続いて chol 取り込みのタイムコースを観察したところ、いずれの群においても経時的に取り込み量は増加し、各取り込み時間において、control 群と比較した NPC1L1 発現群の有意な取り込み量の増大が認められた (Figure 3)。

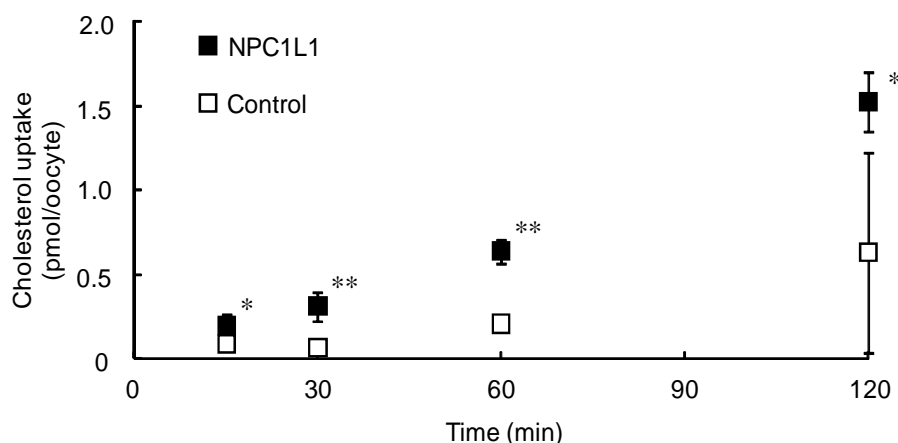


Figure 3 Oocyte における混合ミセルに組み込んだ ^3H -chol 取り込みのタイムコース

$n=4-6$, mean \pm S.D., * $p<0.05$, ** $p<0.01$ by Student's t-test.

さらに NPC1L1 阻害薬エゼチミブを用いて、oocyte における hNPC1L1 を介した chol 取り込みの阻害効果を検討した。Control 群ではエゼチミブの濃度に関わらず、取り込み量の顕著な減少は認められなかった。一方で NPC1L1 発現群ではエゼチミブ濃度依存的に取り込みは阻害され、25 μM でその阻害効果は最大となった。また、阻害薬濃度 50 μM においても NPC1L1 依存的な取り込みは完全には阻害されず、エゼチミブは NPC1L1 を介した chol 取り込みを部分的に阻害することが示唆された (Figure 4)。

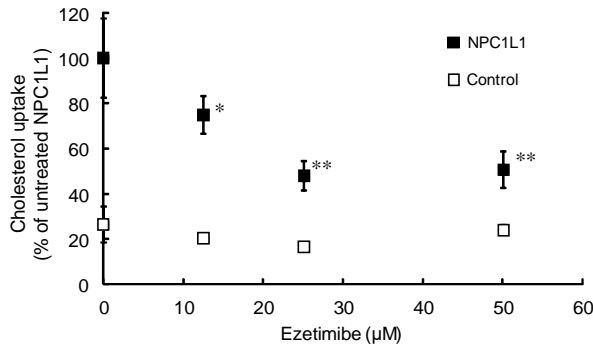


Figure 4 Oocyte への³H]-chol 取り込みに及ぼすエゼチミブの阻害効果

n=4-5, mean ± S.D., *p<0.05, **p<0.01 by two-way factorial ANOVA followed by the Tukey-Kramer's multiple comparisons test.

・ NPC1L1 L216A 変異が chol 取り込みに及ぼす影響

続いて、oocyte 発現系を用いて chol 取り込みに及ぼす L216A 変異の影響を評価した。hNPC1L1 L216A cRNA を oocyte にインジェクションし、ウエスタンブロット法および免疫染色法により hNPC1L1 L216A の発現を確認した (Figure 5)。その後 chol の取り込み実験を行ったところ、L216A 変異体発現群においては chol の取り込み量が野生型 NPC1L1 発現群と比較して顕著に低下することが示された (Figure 6)。Figure 6 より、NPC1L1 L216A 変異体発現 oocyte においては chol 輸送活性がほぼ消失し、chol 輸送に 216 番目のロイシンが重要であることが示された。

(a)

(b)

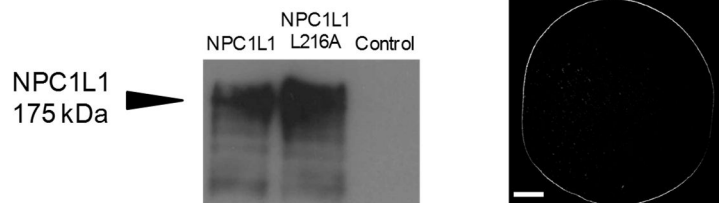


Figure 5 hNPC1L1 L216A 発現 oocyte における hNPC1L1 発現確認および細胞膜への局在確認

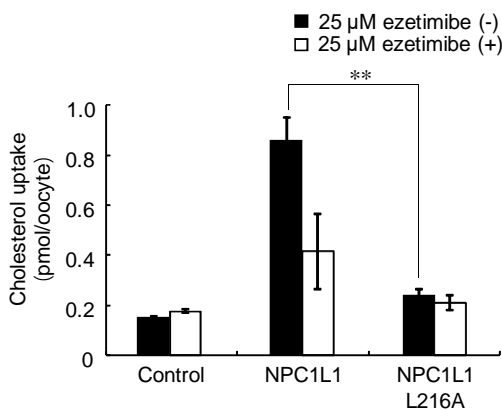


Figure 6 L216 変異が oocyte への³H]-chol 取り込みに及ぼす影響

n=4-6, mean ± S.D. **p<0.01 by two-way factorial ANOVA followed by the Tukey-Kramer's multiple comparisons test.

・ HDLEC 細胞に対する FITC-alubmin の透過量の変化

また、HDLEC を用いてレプチン曝露による蛍光標識アルブミンの透過性を確認した。Control 群と比較して、レプチンのヒトの生理学的濃度曝露した場合、有意差は無いものの、アルブミン透過が増大する傾向が認められた (データは示さない)。なお、レプチン曝露による細胞生存率への影響はほぼないことを確認している。肥満ではレプチン濃度が 100 ng/mL になる場合もあり、今後さらなる検討を続けていく予定である。

本研究では、混合ミセルに組み込んだ chol の NPC1L1 を介した取り込みを評価する *in vitro* 系として、従来の培養細胞を用いた発現系に加え、新規評価系として oocyte 発現系の構築に成功した。従来の培養細胞では内在性 NPC1L1 の発現が認められる一方、oocyte 発現系においては内在性 NPC1L1 の発現は認められず、内在性の輸送活性が低かった。そのため、oocyte 発現系は NPC1L1 単独の輸送活性の評価に有用であり、変異体解析にも応用可能な系であると考えられる。Oocyte 発現系の利用により NPC1L1 の輸送機構の一端が解明されることが期待される。また、HDLEC を用いた検討では control 群と比較して、レプチン曝露により、蛍光標識アルブミン透過量が増大する傾向が認められた。引き続き、細胞接着因子である VE-カドヘリンなどの免疫染色法や real-time qPCR 法等により、レプチン曝露による透過性変化のメカニズムの詳細な解明を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Y., Yamaguchi K., Ogawa M., Takekuma Y., Sugawara M.	4. 巻 16
2. 論文標題 An imaging approach for determining the mechanism of enhancement of intestinal absorption of an L-theanine supplement	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0253066
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0253066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 佐藤夕紀	4. 巻 5(10)
2. 論文標題 サプリメントに含まれる添加物による腸管血流増大のイメージング手法の構築	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 899-902
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nashimoto S., Takekawa Y., Takekuma Y., Sugawara M., Sato Y.	4. 巻 35
2. 論文標題 Transport via Niemann-Pick C1 Like 1 contributes to the intestinal absorption of ubiquinone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Metabolism and Pharmacokinetics	6. 最初と最後の頁 527 ~ 533
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dmpk.2020.08.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nashimoto S., Yagi S., Takeda N., Nonaka M., Takekuma Y., Sugawara M., Sato Y.	4. 巻 1863
2. 論文標題 A new system to evaluate characteristics of Niemann-Pick C1 Like 1-mediated cholesterol transport using <i>Xenopus laevis</i> oocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta.	6. 最初と最後の頁 183508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamem.2020.183508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐藤夕紀	4. 巻 4 (14)
2. 論文標題 経口投与されたヒアルロン酸の消化管吸収	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 1305-1307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 榎聡美, 鳥山竜也, 佐藤夕紀, 柏木仁, 今井俊吾, 武隈洋, 菅原満.
2. 発表標題 吸収改善を目的とした乳剤化に適する薬物の物性の解明
3. 学会等名 第34回北海道薬物作用談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田真由美, 横山さや香, 八巻義朗, 佐藤夕紀, 柏木仁, 今井俊吾, 武隈洋, 菅原満
2. 発表標題 乳剤化によるコエンザイムQ10の吸収改善が抗酸化作用に与える影響
3. 学会等名 第34回北海道薬物作用談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野中美玖, 佐藤夕紀, 柏木仁, 今井俊吾, 武隈洋, 菅原満.
2. 発表標題 アフリカツメガエル卵母細胞を用いたNPC1L1による基質輸送機構の解析.
3. 学会等名 第34回北海道薬物作用談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梨本俊亮, 竹川悠人, 武隈洋, 菅原満, 佐藤夕紀.
2. 発表標題 Xenopus laevis oocyteを用いたコレステロールトランスポーター-Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) 発現系の構築
3. 学会等名 第15回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鳥山竜也, 佐藤夕紀, 柏木仁, 今井俊吾, 武隈洋, 菅原満.
2. 発表標題 卵黄レシチンを用いた乳剤化に適した化合物の物理化学的特性
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高林直央, 佐藤夕紀, 柏木仁, 今井俊吾, 武隈洋, 菅原満.
2. 発表標題 血漿中から低分子量のヒアルロン酸を抽出する前処理法の構築
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第149回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 池田真由美, 横山さや香, 八巻義朗, 佐藤夕紀, 柏木仁, 今井俊吾, 武隈洋, 菅原満.
2. 発表標題 虚血再灌流による組織障害に対するコエンザイムQ10乳剤の保護作用
3. 学会等名 第32回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------