

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14996

研究課題名(和文) マウス亜系間比較による新規コレステロール吸収制御因子の探索

研究課題名(英文) Investigation of difference in intestinal cholesterol absorption among mouse substrains to find out novel regulators for cholesterol absorption

研究代表者

山梨 義英 (Yamanashi, Yoshihide)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20582018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：コレステロールの消化管吸収は体内のコレステロールレベルを制御する上で重要なプロセスである。しかしその吸収メカニズムには未解明な点が多い。本研究ではマウス亜系間でコレステロール吸収効率が違うことに着目し、この違いを説明する新規のコレステロール吸収制御分子を見出すことを目的に企画された。本研究で行われたプロテオミクス解析により複数の制御分子候補が見出され、今後の研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Intestinal cholesterol absorption is an important process to regulate cholesterol levels in the body. However, molecular mechanisms of cholesterol absorption have not been fully uncovered yet. The aim of this study is to reveal novel regulators of intestinal cholesterol absorption by elucidating mouse substrain difference in efficiency of cholesterol absorption. Since various candidate molecules that might be accounted for the strain difference in cholesterol absorption was found by several proteomics approaches, novel key regulators of intestinal cholesterol absorption would be revealed in the near future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：消化管吸収 コレステロール

1. 研究開始当初の背景

生体内におけるコレステロールレベルは肝臓での生合成、胆汁酸などへの異化、胆汁中への排泄、そして食餌からの消化管吸収のバランスによって制御されている。上記 4 要素のうち、研究代表者らはこれまでにコレステロールの胆汁排泄^{1, 2}ならびに消化管吸収^{3, 4}に焦点をあて、その分子機構に関して研究を進めてきた。

Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) はそのノックアウトマウスを用いた検討⁵や研究代表者らの *in vitro* 機能解析⁴により、小腸上皮細胞の間腔側膜において食餌中からのコレステロール吸収を担うことが明らかとなっており、消化管コレステロール吸収阻害薬として臨床で広く使用されているエゼチミブの標的蛋白質としても知られている。しかしながら、その発現量や機能活性を制御する生理的メカニズム(因子)に関しては未解明な点が多い。また、小腸上皮細胞に取り込まれたコレステロールの大部分はキロミクロンとしてリンパ管に排出され体内に吸収されるが、この過程を制御する因子に関しては全く明らかとなっていない。

このような状況の中、研究代表者らは偶然にも C57BL/6 マウスの亜系間(J 亜系と N 亜系)でコレステロールの消化管吸収効率が大きく異なることを見出した。同一環境・餌で飼育しているにも関わらずコレステロール吸収量に大きな違いが見出されたことから、何らかの遺伝的要因が原因と考えられた。また、NPC1L1 をコードする遺伝子領域には塩基配列の違いが認められなかったことから、他の蛋白質の関与が示唆された。そこで本申請研究は、この C57BL/6 マウス亜系間で見出された表現型の違いを手掛かりに、消化管コレステロール吸収を制御する新たな因子を発見すべく企画された。

2. 研究の目的

本研究は、C57BL/6J マウスと C57BL/6N マウスのコレステロール吸収効率の違いを説明する因子を明らかにすることで、新たなコレステロール吸収制御因子を見出すことを目的にしている。両マウスのゲノム情報比

較やプロテオミクス解析の結果をもとに原因因子を探索し、候補に挙げた因子に関しては種々の *in vitro* 実験や(遺伝子改変)マウスを用いた消化管吸収実験を行うことでコレステロール吸収における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 消化管における NPC1L1 の発現量比較

消化管における NPC1L1 の発現量について C57BL/6J マウスと C57BL/6N マウスで比較した。mRNA 発現量については定量的 PCR により解析し、タンパク質発現量については、Western blotting により解析した。

(2) 候補分子の探索

小腸上皮細胞を用いたプロテオーム解析による候補分子の探索

各マウスの小腸上皮細胞から調製した細胞可溶化液を 2 次元電気泳動にかけ、SYPRO Ruby 染色により蛋白質スポットを比較した。マウス亜系間で発現量の大きく異なるスポットに関しては、ゲルから蛋白質を抽出し、高分解能かつ精密質量分析が可能な Orbitrap 質量分析装置とナノフロー液体クロマトグラフを組み合わせたプロテオーム解析系(研究室に設置済み)により蛋白質を同定した。

また、NPC1L1 と相互作用する因子に焦点を絞った検討も行った。NPC1L1 抗体を用いた免疫沈降実験を行ったのち、共沈蛋白質を上記同様の方法で解析し、NPC1L1 と相互作用する因子を網羅的に探索した。

ゲノム配列の比較による候補分子の探索

C57BL/6J マウスと C57BL/6N マウスに関しては、全長ゲノム配列を比較した論文⁶が報告されている。この論文上で明らかとなっているミスセンス変異や挿入(欠失)を伴う遺伝子変異は全部で 36 種類あり、また、染色体の構造異常により影響を受ける遺伝子コード領域は 2 つ存在していた。これら計 38 遺伝子の中には、様々な輸送担体の膜局在を制御する PDZK-1 蛋白質や中性脂質量を制御することが知られている JMJDIC といった脂質関連蛋白質も含まれており大変興味深い。こ

れら計 38 遺伝子に関しては、消化管における発現の有無を検討し、解析候補分子の絞り込みを行った。

(3) 候補分子の機能解析

上記 II の検討で解析候補に挙げた分子については、発現プラスミドまたは、発現（またはノックダウン）アデノウィルス構築し、NPC1L1 の発現量や局在・機能活性に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

(1) NPC1L1 に対する検討

まず、C57BL/6J マウスと C57BL/6N マウスで、NPC1L1 の消化管発現量を検討した。その結果、mRNA 発現量・タンパク質発現量ともにマウス亜系間で違いを見出すことはできなかった。これらの結果から、C57BL/6J マウスと C57BL/6N マウスで認められる消化管コレステロール吸収量の違いは、NPC1L1 の発現量の違いによって引き起こされているわけではないことが示唆された。

(2) NPC1L1 以外の候補分子の探索

次に、消化管に発現する蛋白質のうち、C57BL/6J マウスと C57BL/6N マウスで、発現量の異なる分子を網羅的に探索した。まず、Orbitrap 型質量分析装置とナノフロー液体クロマトグラフを組み合わせた nanoLC-MS/MS システムを用いて、生体（臓器）試料や培養細胞試料のプロテオーム解析を可能とする実験系の構築を行った。

次に構築したプロテオーム解析系を用いて候補分子の探索を行った。各マウスの小腸から調製した組織可溶化液を用いて、2次元電気泳動を行い、泳動後のゲルを SYPRO Ruby で染色したところ、各マウス間で発現量の異なる染色スポットを複数見出すことに成功した。これら染色スポットを切り出し、タンパク質を抽出したのち、nanoLC-MS/MS システムを用いたショットガンプロテオミクスを行った結果、各マウス間で発現量の異なる候補分子を複数見出すことに成功した。

並行して、NPC1L1 と相互作用する分子の網羅的探索も行った。NPC1L1 抗体を用いた

免疫沈降実験を行い、沈降サンプルをショットガンプロテオミクスで解析した。その結果、沈降サンプルから NPC1L1 が検出され、構築した実験系が機能することが確かめられた。また、NPC1L1 と共沈する蛋白質を複数見出すことにも成功した。

加えて、報告されているゲノム情報の比較から、C57BL/6J マウスと C57BL/6N マウス間で遺伝子変異（ミスセンス変異や挿入（欠失）を伴う遺伝子変異）が認められる 38 遺伝子のうち、22 遺伝子は消化管での発現が確認（報告）されており、これら分子も、コレステロール吸収の新たな制御分子の候補に挙げた。

(3) 候補分子の機能解析

II の検討結果で候補に挙げた各分子については順次、発現プラスミドを構築した。構築したプラスミドを、培養細胞に遺伝子導入し、目的の分子量にバンドが検出されることが確かめられた。現在、各候補分子がコレステロール輸送活性を有しているのかどうか、また、NPC1L1 の発現量や局在、機能活性に影響を及ぼすのか否かについて、検討を進めている。

< 引用文献 >

- (1) Yamanashi Y et al., *Hepatology*. 55(3): 953-964, 2012.
- (2) Yamanashi Y et al., *Gastroenterology*. 140(5): 1664-1674, 2011.
- (3) Yamanashi Y et al., *Pharmacogenet Genomics*. 19(11): 884-892, 2009.
- (4) Yamanashi Y et al., *J Pharmacol Exp Ther*. 320(2): 559-564, 2007.
- (5) Altmann et al., *Science*. 303(5661): 1201-1204, 2004.
- (6) Simon et al. *Genome Biol*. 14(7): R82, 2013.

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 2 件) (全て査読有り)

(1) Yamamoto H*, Takada T*, **Yamanashi Y***, Ogura M*, Masuo Y, Harada-Shiba-M, Suzuki H (*Co-first authors). VLDL/LDL acts as a drug carrier and regulates the transport and metabolism of drugs in the body. *Scientific Reports*. 7(1): 633, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-00685-9.

(2) **Yamanashi Y**, Takada T, Suzuki H. Transporters for the intestinal absorption of cholesterol, vitamin E, and vitamin K. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 24(4): 347-359, 2017. DOI: 10.5551/jat.RV16007.

〔学会発表〕(計9件)

(1) 高田龍平、**山梨義英**、豊田優、鈴木洋史。トランスポーターのリバーストランスレシヨナルリサーチ。

日本薬学会第137年会仙台国際センター(宮城県仙台市) 2017年3月24日~27日(招待講演)

(2) 高田龍平、**山梨義英**、小西健太郎、山本武人、豊田優、増尾友佑、山本英明、田中悠介、小峰瞳子、倉内亮弥、鈴木洋史。エゼチミブはビタミンKの吸収阻害を介してワルファリンの作用を増強する。

第48回日本動脈硬化学会総会・学術集会 京王プラザホテル(東京都新宿区) 2016年7月14日~15日(招待講演)

(3) **山梨義英**、高田龍平、小西健太郎、山本武人、豊田優、増尾友佑、山本英明、鈴木洋史。NPC1L1は消化管におけるビタミンK吸収担体であり、ワルファリン療法の修飾因子である。

医療薬学フォーラム2016 第24回クリニカルファーマシーシンポジウム 滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール(滋賀県大津市) 2016年6月25日~26日(招待講演)

(4) 高田龍平、**山梨義英**、小西健太郎、山本武人、豊田優、増尾友佑、山本英明、田中悠介、小峰瞳子、倉内亮弥、鈴木洋史。ビタ

ミンKの吸収阻害を介したエゼチミブとワルファリンの薬物相互作用機序の解明。

日本病院薬剤師会東北ブロック第6回学術大会 ハマツホテル(福島県郡山市) 2016年5月21日(招待講演)

(5) **山梨義英**、高田龍平、小西健太郎、山本武人、豊田優、増尾友佑、山本英明、鈴木洋史。Novel mechanism of drug-drug interaction between ezetimibe and warfarin via the alteration of vitamin K absorption.

日本薬物動態学会第30回年会 タワーホール船堀(東京都江戸川区) 2015年11月12日~14日

(6) **山梨義英**、高田龍平、小西健太郎、山本武人、豊田優、増尾友佑、山本英明、鈴木洋史。NPC1L1は消化管におけるビタミンK吸収担体であり、ワルファリン療法の修飾因子である。

第9回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 千葉大学亥鼻キャンパス(千葉県千葉市) 2015年11月7日~8日

(7) **山梨義英**、高田龍平、小西健太郎、山本武人、豊田優、増尾友佑、山本英明、鈴木洋史。ビタミンKの吸収不全を介したエゼチミブとワルファリンの薬物相互作用。

第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会 仙台国際センター(宮城県仙台市) 2015年7月9日~10日

(8) **山梨義英**、高田龍平、豊田優、山本英明、田中悠介、小峰瞳子、鈴木洋史。ビタミンKの吸収阻害を介したエゼチミブとワルファリンの薬物相互作用。

第10回トランスポーター研究会年会 慶応義塾大学薬学部芝共立キャンパス(東京都港区) 2015年6月20日~21日

(9) **山梨義英**、高田龍平、小西健太郎、山本武人、豊田優、増尾友佑、山本英明、鈴木洋史。エゼチミブとワルファリンの薬物相互作用メカニズムの解明。

日本薬剤学会 第30年会 長崎ブリックホ

ール(長崎県長崎市) 2015年5月21日～
23日

〔図書〕(計9件)

(1) **山梨義英**、高田龍平、鈴木洋史. ワルファリンとエゼチミブの薬物相互作用メカニズムの解明: Niemann-Pick C1 like 1 によるビタミンKの消化管吸収.
日本血栓止血学会誌(日本血栓止血学会)
(印刷中)

(2) **Yamanashi Y**, Takada T, Suzuki H. Bile Acid as Therapeutic Agents.
Bile Acids in Gastroenterology (Springer Japan)
Chapter 5: 61-90, 2017.

(3) 高田龍平、**山梨義英**、山本英明、田中悠介、小峰瞳子、倉内亮弥、鈴木洋史. ビタミンの体内動態変動を介した新規機序の薬物相互作用～エゼチミブはビタミンKの消化管吸収を阻害しワルファリンの抗凝固作用を促進する～.
医薬品相互作用研究(医薬品相互作用研究会) 39(3): 1-6, 2016.

(4) 高田龍平、**山梨義英**、山本武人、豊田優、山本英明、田中悠介、小峰瞳子、鈴木洋史. 新規機序の薬物相互作用: ビタミンの体内動態の重要性.
くすりと糖尿病(日本くすりと糖尿病学会)
5(1):48-50, 2016.

(5) 高田龍平、**山梨義英**、小西健太郎、山本武人、豊田優、増尾友佑、山本英明、鈴木洋史.
ビタミンK吸収輸送体の発見. ビタミン(日本ビタミン学会) 90(7): 348-349, 2016.

(6) **山梨義英**. 治療で誘発される腫瘍セクレトームが腫瘍の治療抵抗性と進行を助長する.
ファルマシア(日本薬学会) 12月号: p86,
2015.

(7) **山梨義英**、高田龍平、山本英明、田中悠

介、小峰瞳子、鈴木洋史. 腸管トランスポーター研究から明らかになったコレステロール・ビタミン・薬物の相互作用.

機能性食品と薬理栄養(日本機能性食品医学会) 9(2): 54-60, 2015.

(8) 高田龍平、**山梨義英**、鈴木洋史. ビタミンKの吸収経路の発見.
実験医学(羊土社) 33(13): 2132-2135,
2015.

(9) **山梨義英**、高田龍平、鈴木洋史. コレステロールトランスポーターNPC1L1によるビタミンKの消化管吸収.
細胞工学(学研メディカル秀潤社) 34(7):
694-695, 2015.

〔その他〕

自己紹介(研究室ホームページ内)

<http://plaza.umin.ac.jp/~todayak/yamanashi.php>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山梨 義英(YAMANASHI, Yoshihide)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 20582018