

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15349

研究課題名(和文)小腸におけるコレステロール排出機構の解明

研究課題名(英文)Explication of cholesterol efflux mechanism from small intestine

研究代表者

辻田 麻紀(TSUJITA, MAKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10253262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体内コレステロールの排出機構の主となる肝-胆管-小腸軸とは別のTICEと呼ばれる小腸を介した循環からの直接的な排出機構が注目されている。本プロジェクトは我々が小腸吸収上皮細胞基底膜に局在を確認したSR-BI受容体のTICEでの役割を検討する事を目的としている。本研究期間に小腸特異的なSR-BI欠損モデル動物を交配により作成・比較できる複数の遺伝子改変マウスを確保するに至った。またマウスリポ蛋白質に対するratモノクローナル抗体の作成にも成功した。更にin vivoでの代謝測定に必要なマウス血漿プールを得た。今後これらを用いて小腸を介する血中LDLとHDLからのコレステロール排出を評価する。

研究成果の概要(英文)：The TICE is alternative pathway for reverse cholesterol transport. Acceleration of TICE pathway may become one of the new strategies without causing cholesterol polypus leading cholecystolithiasis, or gallbladder inflammation. We aim to evaluate SR-BI function on TICE which SR-BI receptor also localized at basolateral membrane in intestinal absorptive cell. In the project, SR-BI flox and CAG-Cre mice were obtained. The SR-BI fx/fx-CAG+ mice was created. The plasma analysis indicated accumulation of large HDL. This result proved the quality of the SR-BI flox mice and current propagation system. Vil-Cre mice and Alb-Cre mice have arrived from the collaborator to create intestinal- and liver-specific SR-BI KO mic for the future study. WT mice plasma was harvested and the isolated mouse LDL, HDL, and mouse apoA-I were shipped to the company and the rat monoclonal antibodies were successfully ready. They will be also useful tool for mouse lipoprotein analyses for up-coming experiments.

研究分野：脂質・リポ蛋白質

キーワード：SR-BI flox CAG cre Villin cre mouse apoA-I mouse HDL mouse LDL TICE

## 1. 研究開始当初の背景

脂質異常症に起因するアテローム性動脈硬化疾患の予防・治療の更なるブレークスルーとして現在その詳細が明らかにされていない小腸からの新規排出経路の分子機構の解明が重要課題である。肝臓からの生体内 cholesterol の過剰な排出は胆嚢での cholesterol 結晶化やその蓄積を引き起こし、胆嚢炎等の副作用を伴う。そのため血中リポ蛋白質 cholesterol の排出経路として小腸からの cholesterol 排出機構である TICE (Transintestinal cholesterol efflux) の機序を明らかにし、TICE を介する新規の“コレステロール逆輸送系”により安全性の高い cholesterol 排出促進治療法の確立が必要とされている。

本課題以前の我々の成果においてマウス小腸吸収上皮細胞の基底膜に SR-BI の局在を確認している。SR-BI は血中 HDL コレステロールの受容体として知られているが、LDL コレステロールも受容することが報告され、血中リポタンパク質コレステロールの排出経路の最も有力な候補受容体であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では肝臓・副腎皮質・小腸などの臓器に高く発現する SR-BI 受容体をマウス腸特異的に欠損させた組織特異的欠損マウス、すなわちコンディショナルノックアウトマウスを作成し、TICE の検討を行うことを目的としている。まずリポタンパク質受容体 SR-BI の flox マウスの確保と Villin プロモーターを有する Cre マウスの入手を計画した。実験動物の準備の他にリポ蛋白質の解析に必要なモノクローナル抗体の作成を試みた。またその生体内での代謝を評価する為の放射標識リポ蛋白質作成に必要なマウス血漿を回収・保存した。

## 3. 研究の方法

### (1) SR-BI のコンディショナルマウスの作成の準備並びに Cre マウスの購入手配。

SR-BI flox マウスを既に作成している研究機関の研究者からの譲渡の可能性について調査する。また Villin プロモーターを有する Cre 導入マウスの購入手配を行う。対照として全細胞で Cre の発現が期待できる CAG (cytomagalovirus immediate early enhancer-chicken -actin hybrid) をプロモーターとした Cre 導入マウスを本学実験動物センターより提供を受ける。

### (2) マウスリポ蛋白質の単離と抗マウス apoA-I 並びに抗マウス apoE ラットモノクローナル抗体の作成。

野生型マウスを飼育し、20 から 30 週令で麻酔下に眼窩採血し、その後安楽死させる。マウス 1 匹から 400 から 500  $\mu$ L の血漿を得る。マイナス 30  $^{\circ}$ C に凍結し保管する。実験動物を用いた実験操作は全て名古屋市立大学大学院医学研究科実験動物委員会の承認を得ている。保存マウス血漿を一部解凍し NaBr を用いて比重を調製し超遠心法によりリポ蛋白質の単離を行った。マウス LDL 画分並びにマウス HDL 画分を透析後一部は apoA-I の精製を行い 50%グリセロール溶液中可溶化しモノクローナル抗体作成の為に MabTech AB 社(Sweden)へ提供した。

## 4. 研究成果

(1) 副腎皮質特異的な SR-BI 欠損マウスの成果報告からフランスの研究者へ問い合わせを行ったが良好な返事を貰えなかった。一方、米国 UT サウスウエスタン医学研究所 PW Shaul 教授より承諾が得られ凍結精子の提供を受けることになった。本学遺伝子組み換え実験の許可を得て施設間での MTA を結び、輸送の手配を行った。ドライシッパーによる凍結精子の輸送が完了し、本実験動物研究センターにて個体化が行われた。飼育室への搬入後に CAG-Cre マウスとの交配を行った。各

genotyping に必要な primer をデザインし SR-BI のエクソン 2 の上流に導入されている LoxP の有無を同定した。また CAG-Cre は CAG 領域の 3' 付近と Cre の 5' 付近を認識する primer pair を選択し CAG-Cre 以外の異なる Cre マウスが区別できる同定方法を確立した。Tail DNA は proteinase K にて消化後に希釈した DNA をテンプレートとして用いて Power UP SYBR master mix 試薬により ABI StepOnePlus system で PCR を増幅後に melt curve にて PCR 産物を評価した。また新規 primer pair を使用時には PCR 産物を sequence 法にて遺伝子配列を確認した。LoxP 配列を有する SR-BI flox アレルのホモ型マウ

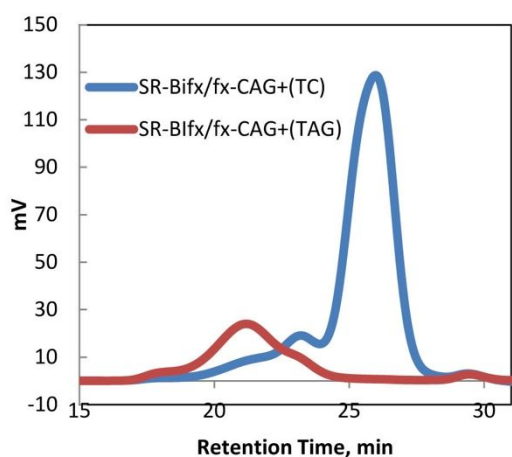
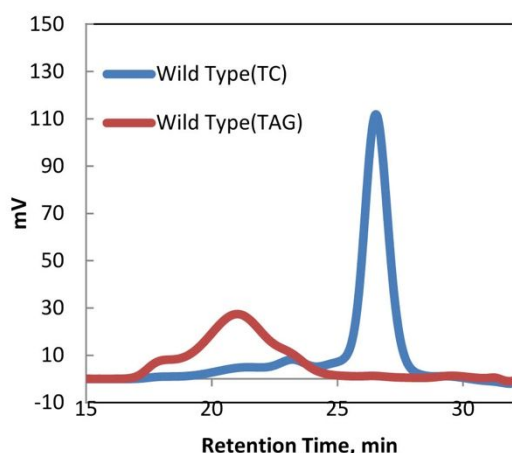


図 血漿リポタンパク質プロファイル

CAG-Cre の発現により SR-BI 中の LoxP で挟まれた exon2 領域が切断され SR-BI 欠損マウスが作成されている。野生型と比較して血漿 HDL 代謝が遅延し HDL 粒子の大型化と濃度の増加が観察された。(分析は スカイライトバイオテック)

スを CAG-cre マウスと交配し、CAG-cre ヘテロ型 SR-BI flox/flox マウスの仔を得た。リポ蛋白質プロファイル(図)から通常の SR-BI 欠損マウスと同じく血漿 HDL の増加とその大型化が確認された。全 SR-BI 欠損マウスは副腎皮質や性腺への血中リポ蛋白質コレステロールの運搬に障害がありステロイド産生不全となっている。このため繁殖効率が極度に低下している。今回も SR-BI flox ホモ型で CAG-cre 陽性の仔は 1 匹が離乳したのみである。小腸や肝臓のみ cre が発現する場合には正常の繁殖を期待している。

Villin-Cre マウスの購入については事務的な手配に問題があり予定の価格を大幅に超えていた為に共同研究として Dr. AT Remaley より提供を受ける事となった。遺伝子組み換え実験並びに動物実験の承諾後、施設間の MTA を締結し、Villin-Cre と Albumin-Cre マウス個体の提供を受け、本学実験動物研究教育センターへ搬入された。本研究期間終了時にはクリーンアップが終了している。

また検疫室飼育時に搬入個体の組織を一部得ている。これらについて Villin-Cre 並びに Albumin-Cre を検出する為にデザインした primer pair の評価を行った。いずれも目的の配列の増幅が確認している。今後これらの SR-BI flox マウスとの交配により腸特異的 SR-BI 欠損マウスと対照として肝特異的 SR-BI 欠損マウスを作成し、SR-BI の機能について評価する準備が整った。

(2) 抗マウス apoA-I の作成は Mab Tech AB 社で成功し、本研究室が提供したマウスアポリポ蛋白質を抗原として利用されているマウス apoA-I ELISA Pro キット

(<https://www.mabtech.com/products/mouse-apoa1-elisa-pro-kit-3750-1hp>) が現在販売されている。この抗体により今後血漿リポ蛋白質のプロファイルのより詳細な同定が可能となる。またリポ蛋白質コレステロールの実験動物生体内での代謝速度の測定に利

用できる放射標識マウス HDL 並びに LDL 作成はマウス個体数が整った後に行う。それに必要な野生型マウス血漿は現在凍結サンプルとして確保できている。

目的の組織特異的な SR-BI 欠損マウスが交配により作成可能であり、遺伝子改変マウスの genotyping や血漿リポ蛋白質プロファイルの検討に用いるラットモノクローナル抗体もある。リポ蛋白質の標識に用いるマウスリポ蛋白質の準備も整った。研究期間内に実際の操作が終了しなかったのは残念であるが、目的の実験動物や抗体、リポ蛋白質は全て本期間内に名古屋市立大学大学院医学研究科施設に集めることを達成した。関係者の方々に心より御礼申し上げる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Tsujita M, Hossain MA, Lu R, Tsuboi T, Okumura-Noji K, Yokoyama S. Exposure to High Glucose Concentration Decreases Cell Surface ABCA1 and HDL Biogenesis in Hepatocytes. *J Atheroscler Thromb*. 2017 Nov 1;24(11):1132-1149. PMID:28428480

2. Hoshikawa M, Kato A, Hojo H, Shibata Y, Kumamoto N, Watanabe M, Ugawa S. Distribution of ASIC4 transcripts in the adult wild-type mouse brain. *Neurosci Lett*. 2017 Jun 9;651:57-64. PMID: 28461138

3. Sano O, Tsujita M, Shimizu Y, Kato R, Kobayashi A, Kioka N, Remaley AT, Michikawa M, Ueda K, Matsuo M. ABCG1 and ABCG4 Suppress  $\alpha$ -Secretase Activity and Amyloid Production. *PLoS One*. 2016 May 19;11(5):e0155400. PMID:27196068

4. Ueda T, Hoshikawa M, Shibata Y, Kumamoto N, Ugawa S. Basal cells express functional TRPV4 channels in the mouse nasal epithelium. *Biochem Biophys Res*. 2015 Sep 16;4:169-174. PMID: 29124201

5. Watanabe M, Ueda T, Shibata Y, Kumamoto N, Shimada S, Ugawa S. Expression and Regulation of Cav3.2 T-Type Calcium Channels during Inflammatory Hyperalgesia in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons. *PLoS One*. 2015 May 14;10(5):e0127572. PMID: 25974104

6. Watanabe M, Ueda T, Shibata Y, Kumamoto N, Ugawa S. The role of TRPV1 channels in carrageenan-induced mechanical hyperalgesia in mice. *Neuroreport*. 2015 Feb 11;26(3):173-8. PMID: 25590988

〔招待講演〕(計 7 件)

1. Tsujita M. Multiple functions of Scavenger Receptor class B type I: From taste cells to plasma apoA-I recycling. Seminar, Department of medicine, UT southwestern medical center, Dallas, USA 2017. Hosted by Prof. PW Shaul

2. Tsujita M. ABCA1/G1/G4 transporters in pre-beta-HDL and beta-amyloid assembly/biosynthesis in mice. Lecture, Department of Medicine, Harvard University, Boston, USA. 2016. Co-hosted by Dr. M Aikawa and Prof. FM Sacks

3. Tsujita M. Hyperglycemia modulates HDL biogenesis: Implication for diabetic atherosclerosis. Lecture, Cardiovascular Medicine, 317PRB(Preston Research Building) Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA. 2016. Hosted by Dr. KC Vickers

4. Tsujita M. Lipoprotein Characterization using Transmission Electron Microscopy and the Developer Toolbox(R). Lecture, Lipoprotein Metabolism Section, 10/8N212 1-2 pm, NHLBI, NIH, Bethesda, USA. 2015. Hosted by Dr. AT Remaley

5. Tsujita M. Hyperglycemia modulates HDL biogenesis: Implication for diabetic Atherosclerosis. DOCE seminar Diabetes and Metabolism Seminar Series, Orin Smith Auditorium, SLU Campus, University of Washington, Seattle USA. 2015. Hosted by Prof. JW Heinecke

6. Tsujita M. ProbucoI, an anti-lipidemic drug, rescued reproduction of hypo-lipoproteinemia model mice. Department of Chemistry and Biochemistry, California State University, Long Beach Seminar, HSCI-room105 4pm, CSULB, Long Beach, USA. 2015. Hosted by Prof, V Narayanaswami

7. Tsujita M. ProbucoI rescued litter size and genome type ratio in reproduction of hypolipoproteinemia model mice. Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI) Research Seminar, the Little Theatre in Room 2319 CHORI, Oakland, USA.

2015. Hosted by Prof. RO Ryan

[学会発表](計 19 件)

[国外]

1. **Maki Tsujita**, Rui Lu, Tomoe Tsuboi, Kuniko Okumura-Noji, M Anwar Hossain, Shinji Yokoyama, High D-glucose level reduced distribution of ABCA1 on plasma membrane and reduced HDL assembly in liver cells. ATPBinding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases, March 6-12, 2018, Hotel Grauer Bär, Innsbruck, Austria

2. **Maki Tsujita**, Hiroshi Takase, Naohisa Hosomi, Nobukatsu Akita, Nobuyuki Ohte, Takeshi Yamazaki, Shinji Yokoyama. S. Probucol Increased Adrenal CYP11a1, HMGCoAR and VKORC1 Expression and Rescued LCAT Null Male Mice Propagation. **Oral presentation**, The 20th International Conference on Cytochrome P450, 27-31 August 2017. Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Germany

3. **Maki Tsujita**, **Shinya Ugawa**, Shinji Yokoyama. Short Term Taste Preference for Cholesterol-Rich Diet in ABCA1 null Mice. ATVB/PVD 2017 Scientific Sessions, May 4-6, 2017, Minneapolis, Minnesota, USA. **Conference proceedings** ATVB. 2017;37:A571. [http://atvb.ahajournals.org/content/37/Suppl\\_1/A571](http://atvb.ahajournals.org/content/37/Suppl_1/A571)

4. **Maki Tsujita**, Tomo Yokota, Nobukatsu Akita, Frank J Gonzalez, Shinji Yokoyama. SR-BI involved on plasma HDL2-apoA-I recirculation to pre- $\square$ HDL in mice. **Oral presentation**. The 84<sup>th</sup> European Atherosclerosis Society EAS Congress, May29-June1, 2016, Innsbruck, Austria.

5. Yasutaka Maekawa, Hiroshi Takase, Yasuki Ito, Sissel Lund-Katz, **Maki Tsujita**, LDL-like Particle In HDL Density Has Small Diameter While Stimulate Macrophages Similar To LDL. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology | Peripheral Vascular Disease 2016 Scientific Sessions, May 5-7, 2016, Nashville, Tennessee, USA. **Conference proceedings** ATVB. 2016;36:A434. [http://atvb.ahajournals.org/content/36/Suppl\\_1/A434](http://atvb.ahajournals.org/content/36/Suppl_1/A434)

6. **Maki Tsujita**, **Shinya Ugawa**, Fumihiko Kobayashi, Junki Yamamoto, Yasuhiro Hakamata, Shunsuke Ito, Tomo Yokota, M

Anwar Hossain, Nobukatsu Akita, Shoichi Shimada, Shinji Yokoyama. Taste Preference for Cholesterol-Rich Diet in Mice. Vanderbilt Cardiovascular Symposium 2016 State of the Art: Cardiac and Peripheral Vascular Disease Research, the North Lobby of Light Hall, Vanderbilt University Medical Center. Nashville, TN, USA.

7. **Maki Tsujita**, Hiroshi Takase, Yasutaka Maekawa, Nobukatsu Akita, Naohisa Hosomi, Shinji Yokoyama. Propagation revealed ABCA1 null allele has benefit on ABCA1 heterozygote mice reproduction and probucol corrected the modulation in breeding by increasing cellular HMGCoA reductase expression in mice. *ABC2016 - 6th Special Meeting on ABC Proteins From Multidrug Resistance to Genetic Diseases* Hotel Grauer Bär\*\*\*\*, March 5-11, 2016, Innsbruck, Austria

8. **Maki Tsujita**, Nobukatsu Akita, Tomo Yokota, Noriyuki Ikehara, Nobuyuki Ohte, Takeshi Yamazaki, Shinji Yokoyama. Probucol rescued litter size and gender ratio in reproduction of hypo-lipoproteinemia model mice. 17th International Congress on Atherosclerosis 2015, 23 -26 May 2015 in the conference centre Amsterdam RAI, Europaplein Entrance G, NL 1078 GZ Amsterdam, the Netherlands.

9. **Maki Tsujita**, Tomo Yokota, Nobukatsu Akita, Yasutaka Maekawa, Junki Yamamoto, Alan T Remaley, Shinji Yokoyama. SR-BI functions on plasma HDL homeostasis -Low plasma pre- $\square$ HDL level in SR-BI null mice by 2D PAGE analysis- Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology | Peripheral Vascular Disease 2015 Scientific Sessions, May 7-10, 2015, San Francisco, California, USA. **Conference proceedings** ATVB. 2015;35:A546. [http://atvb.ahajournals.org/content/35/Suppl\\_1/A546](http://atvb.ahajournals.org/content/35/Suppl_1/A546)

[国内]

10. 橘菜里奈, 杉原涼, 藤見紀明, 西辻和親, 坂下直実, **辻田麻紀**, 奥平桂一郎, ヒトアポ A-I 結合タンパク質 AIBP の新規機能解明、日本薬学会 第 138 年会、2018 年 3 月 25 日-28 日、石川県立音楽堂・金沢市アートホール・ANA クラウンプラザホテル金沢、金沢

11. **Maki Tsujita**, Paul Weers. 単量体アポリポタンパク質 A-I 変異体は ABCA1 非依存的にマクロファージ泡沫化細胞から脂質をマイ

クロソルビライズさせる。  
Monomeric apolipoprotein A-I variant micro-solubilize cellular lipids via non-ABCA1 pathway in mouse peritoneal macrophages foam cells. 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会・第90回日本生化学会合同大会)、2017年12月6日-9日、神戸ポートアイランド、神戸

12. **辻田麻紀**・アンワルホサイン・呂鋭・野路久仁子・横山信治 Exposure to High Glucose Concentration Decreases Cell Surface ABCA1 and HDL Biogenesis in Hepatocytes 高グルコース血症における HDL 新生反応低下の分子機構の解明 第49回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2017年7月6日7日、グランドプリンスホテル広島、広島

13. **辻田麻紀**・アンワルホサイン・呂鋭・野路久仁子・横山信治 Reduced HDL generation in HepG2 under high glucose and low HDL in Insulin-deficient DM mice were caused by reduction of cellular surface ABCA1 in hepatocytes 第81回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム2017(平成29)年5月20日、名古屋市立大学薬学部 宮田専治記念ホール・キャンパスモール

14. 藤見紀明, 杉原涼, 西辻和親, 坂下直実, 辻大輔, 伊藤孝司, **辻田麻紀**, 奥平 桂一郎 ヒトApoA-I 結合タンパク質AIBP のLPS 誘導性マクロファージ炎症反応抑制効果 日本薬学会 第137年会、2017年3月24日-27日、仙台国際センター、仙台

15. **辻田麻紀**・アンワルホサイン・呂鋭・野路久仁子・横山信治 高グルコース血症における HDL 新生反応低下の分子機構の解明 Implication for diabetic atherosclerosis: Hyperglycemia modulates HDL biosynthesis 第89回日本生化学会大会、2016年9月25日-27日、仙台国際センター・東北大学川内北キャンパス、仙台

16. **辻田麻紀**、高瀬博嗣、秋田展克、横山信治 ProbucoI Rescues Deflection of Genotypes Yield in HDL-Deficient Mice Propagation 第48回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2016年7月14日15日、京王プラザホテル、東京

17. **Maki Tsujita**, Tomo Yokota, Nobukatsu Akita, Alan T Remaley, Shinji Yokoyama ApoA-I on HDL2 particles recirculates as pre $\beta$ HDL-apoA-I and was delayed in SR-BI null mice compared to wild type. HDL2 を由来とする apoA-I は pre $\beta$ HDL-apoA-I とし

て再構成され、これは SR-BI 欠損マウスでその生合成速度が低下した BMB2015・第38回日本分子生物学会・第88回日本生化学会合同大会、2015年12月1日-4日、神戸ポートピアホテル・神戸国際会議場、神戸

18. **辻田麻紀**・前川泰孝・高瀬弘嗣 高比重 LDL を用いたマウス常在腹腔マクロファージ細胞の泡沫化はコリンリン脂質合成速度を亢進する、第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2015年7月9日10日、仙台国際センター・新展示施設、仙台

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辻田 麻紀 (TSUJITA, Maki)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：10253262

### (2) 研究分担者

鶴川 眞也 (UGAWA, Shinya)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：20326135