

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19643

研究課題名（和文）機能性脂質の含有量に着目したリポ蛋白質の生理機能解析と生活習慣病への影響評価

研究課題名（英文）Analyses of physiological functions of lipoproteins focusing on functional lipid contents and evaluation of their effects on lifestyle-related diseases

研究代表者

山梨 義英（Yamanashi, Yoshihide）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20582018

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は脂質異常症に伴い、そのリポ蛋白質分布パターンがHDLからLDLに大きくシフトする機能性脂質Xに着目し、LDLに分布した当該脂質Xの生理活性・標的分子・生活習慣病の病態進行に与える影響を明らかにすべく企画された。当該脂質Xを含むLDLの生理活性として炎症惹起作用が示唆され、その作用標的分子の候補を見出すことに成功した。また、CRISPR-Cas9システムを用いて、上記標的分子の遺伝子欠損マウスの作出および繁殖に成功し、LDL分布型脂質Xの病態生理学的意義の解析を行う上で必要なマウスが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、脂質異常症の進行に伴い増加する機能性脂質Xを含む新規LDLサブタイプが炎症惹起作用を有すること、またその標的作用分子の候補が見出された。今後、本研究で作出した標的分子の遺伝子欠損マウスを用いて、当該LDLサブタイプの病態生理学的意義が明らかになることで、生活習慣病に対する新たなバイオマーカー、予防/治療戦略、創薬標的の提唱に繋がる可能性があり、公衆衛生および健康科学上の大きな貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study focused on functional lipid X, whose lipoprotein distribution pattern shifts dramatically from HDL to LDL in dyslipidemia, and was designed to clarify the physiological activity, target molecules, and pathophysiological significance of LDL-distributed lipid X (LDL-lipidX).

Our studies have revealed that LDL-lipid X has an inflammation-inducing effect as its physiological activity, and we succeeded in identifying candidate target molecules for the activity. We also succeeded in generating and breeding mice deficient in the genes for the target molecules of LDL-lipid X using the CRISPR-Cas9 system, and obtained the mice necessary for analyzing the pathophysiological significance of LDL-lipid X.

研究分野：脂質動態学

キーワード：LDL 機能性脂質 動脈硬化症 非アルコール性脂肪肝

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

近年の食生活の変化により、脂質（リポ蛋白質）代謝異常により引き起こされる動脈硬化性疾患や非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）の罹患率は増加の一途を辿っており、これら疾患の予防や克服が健康長寿社会の実現に向けて喫緊の課題といえる。近年、これら生活習慣病の進行には脂質代謝異常に加えて慢性炎症が関わる事が明らかとなってきたが、脂質代謝と炎症反応を繋ぐ分子機構など、その制御機構には未解明な点が多い。

応募者はこれまで、脂質代謝/動態の中心的役割を担うリポ蛋白質中には、コレステロールや中性脂肪のみならず、様々な食事由来成分や服用薬物が含まれることを見出し、それら成分（薬物）の体内動態におけるリポ蛋白質の生理的役割を解析してきた。その過程で、これまで HDL に主に分布するとされていた機能性脂質（lipid X）が、高脂肪食誘発性の脂質異常症進行に伴い、VLDL や LDL へも高い比率で分布することを見出した。HDL に分布した lipid X（HDL-lipid X）は、アルブミン結合型の lipid X とは異なり、抗炎症作用を有することが報告されていたが、VLDL や LDL に分布した lipid X（LDL-lipid X）の生理活性は不明である。

### 2. 研究の目的

上記背景を踏まえて、本研究では、LDL-lipid X の生理活性をその分子機構（標的分子）も含めて明らかにするとともに、疾患モデル動物を用いた解析やヒト血液検体を用いた臨床的解析を通じて、動脈硬化症や NAFLD の進行に及ぼす LDL-lipid X の生理的役割を明らかにし、LDL-lipid X を標的とした新たな生活習慣病の予防・治療法、バイオマーカー開発の可能性を検証することにした。

### 3. 研究の方法

#### （1）LDL-lipid X の機能解析

脂質異常症または健常マウスから採取・精製した LDL-lipid X および HDL-lipid X を用いて、各リポ蛋白質の炎症応答（誘導/抑制能）を *in vitro* で解析する。具体的には、血管内皮細胞や培養肝細胞に対する炎症誘導/抑制作用や、マクロファージなどの免疫細胞における炎症応答（細胞遊走性やサイトカインの産生/分泌能）について検討を行い、HDL-lipid X やアルブミン結合型の lipid X と比較しながら、各細胞における LDL-lipid X の生理活性を解析する。また、lipid X の前駆物質を負荷した高脂肪食でマウスを飼育すると、LDL 中の lipid X が上昇することを見出しているため、これらマウスからも LDL-lipid X を採取・精製し、LDL 中の lipid X 含有量に応じて上記活性の強度が変動するの否かについて検討を行う。

#### （2）LDL-lipid X の標的分子探索

Lipid X には、5 つの特異的 G 蛋白質共役型受容体（R1~R5）が報告されており、HDL-lipid X は R1 を介して抗炎症作用を示すことが報告されている。一方、LDL-lipid X については標的となる受容体が不明のため、各受容体の阻害剤を用いた検討により標的受容体の同定を進める。見出された候補分子については、阻害剤または遺伝子ノックダウン細胞を用いた検討により、LDL-lipid X の生理活性制御における関与の有無を解析する。

#### （3）LDL-lipid X が動脈硬化症や NAFLD の病態進行に及ぼす影響の解析

LDL-lipid X が動脈硬化症の病態進行に与える影響を動脈硬化症モデルマウスとして繁用されている LDL 受容体欠損マウス（所属研究室で飼育中）を用いた *in vivo* 実験により検討する。動脈硬化症の発症・進行の程度は、腹部大動脈にできる動脈硬化巣の面積測定や、病変部に浸潤したマクロファージなどの免疫細胞の解析により評価する。また、血清中のサイトカイン濃度や各リポ蛋白質中の脂質（コレステロール・トリグリセリド・lipid X）濃度の測定も並行して行う。項目 2 で見出された LDL-lipid X の標的受容体に対するアゴニスト（またはアンタゴニスト）の投与実験や当該分子の遺伝子欠損マウス（CRISPR-Cas9 システムで作出予定）を用いて解析を行うことで、LDL-lipid X の生理活性が動脈硬化症の発症・進行に及ぼす影響を明らかにする。NAFLD の発症・進行に及ぼす影響についても、高脂肪食誘導性の NAFLD モデルマウス（所属研究室でモデル動物作成済）を用いて上記と同様に検討を進める。NAFLD の病態進行については、肝臓組織中の脂質濃度解析、病理学的解析、病変部に浸潤した免疫細胞の解析、血清中のサイトカインや肝機能マーカー（AST・ALT 等）の測定により評価する。

#### （4）LDL-lipid X の臨床的重要性の検証

動脈硬化症患者や NAFLD 患者の血清サンプルを用いて（生化学検査の残検体を使用）、各種リポ蛋白質中の lipid X 濃度を測定する。LDL-lipid X または、LDL-lipid X と HDL-lipid X の濃度比について、健常人との比較や各疾患の病態進行度との相関を解析する。

### 4. 研究成果

#### （1）LDL-lipid X は炎症惹起作用を有する

動脈硬化症研究で汎用されるヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を炎症性サイトカインである Tumor necrosis factor- $\alpha$ （TNF- $\alpha$ ）で刺激すると、炎症反応の起点となる血管内皮細胞の活性化に応じて、soluble ICAM-1（sICAM-1）の分泌量が上昇することが知られている。そこで、この実験系を用いて各リポ蛋白質に分布する lipid X の炎症惹起性を評価した。陽性対照として、HDL-lipid X を添加したところ、従来の報告通り、培養上清中の sICAM-1 濃度は有意に低下した（HDL-lipid X による抗炎症作用）。一方、LDL-lipid X を添加したところ、培養上清中の sICAM-1 濃度は有意に上昇した。この sICAM-1 上昇の程度は、LDL 中の lipid X 含有量に依存していた。以上より、LDL-lipid X は HDL-lipid X と異なり、炎症惹起作用を有することが示唆された。

#### （2）LDL-lipid X の炎症惹起作用は、lipid X 受容体 2 および lipid X 受容体 3 を介する

続いて、LDL-lipid X が炎症惹起する分子機構解明を目指した。一般的に lipid X は lipid X 受容体を介してその生理作用を発揮すると考えられている。本解析で用いた HUVEC には lipid X 受容体 1（R1）・R2・R3 が発現していることが知られており、これは *in vivo* における血管内皮細胞上の lipid X 受容体の発現分布と同じである。そこで、LDL-lipid X が R1・R2・R3 のいずれを介して炎症惹起するのかを検討した。まず、R1 阻害剤を用いた検討を行った。従来の報告通り、HDL-lipid X による培養上清中 sICAM-1 濃度低下は R1 阻害剤によって抑制された。一方で、LDL-lipid X による培養上清中 sICAM-1 濃度上昇は R1 阻害剤によって抑制されず、LDL-lipid X による炎症作用は R1 を介したものでない可能性が示唆された。続いて、R2 阻害剤を用いた検討を行ったところ、LDL-lipid X による培養上清中 sICAM-1 濃度上昇は有意に抑制された。R3 阻害剤を用いた検討においても同様に、LDL-lipid X による培養上清中 sICAM-1 濃度上昇は有意に抑制された。R2 阻害剤・R3 阻害剤を共存させた条件では、単独添加よりも培養上清中

sICAM-1 濃度は大きく低下した。以上の結果は、LDL-lipid Xによる炎症惹起作用が R2・R3 を介したものである可能性を示唆するものである。

### (3) LDL-lipid X の *in vivo*における生理機能

#### ① LDL-lipid X は動脈硬化症の増悪に関わりうる

つぎに、LDL-lipid Xによる R2・R3 を介した炎症惹起作用が動脈硬化症発症に関わり得るかを検討した。高脂肪食に R2 阻害剤または R3 阻害剤を添加して LDL 受容体機能欠損マウスに 20 週間与えた後の、腹部大動脈切片の Oil Red O 染色及び血漿中総コレステロール値・中性脂肪値の測定を行った。腹部大動脈切片の Oil Red O 染色の結果、R2 阻害剤・R3 阻害剤は共に動脈硬化巣面積を有意に低下させた。一方、R2 阻害剤・R3 阻害剤の混餌投与群において、血漿中総コレステロール値・中性脂肪値は上昇傾向を示した。これらの結果から、R2 阻害剤・R3 阻害剤は、血漿中総コレステロール値・中性脂肪値の低下作用を示さないにもかかわらず、動脈硬化症進行を抑制しうることを示唆された。上記 *in vitro*, *in vivo*の結果を総合的に考えると、LDL-lipid Xによる R2・R3 を介した炎症惹起作用は動脈硬化症の増悪に関わる可能性が考えられる。

#### ② R2 遺伝子および R3 遺伝子欠損マウスの作出

①の阻害剤の検討結果を踏まえて、R2 および R3 の病態生理学的重要性をさらに検討するために、各受容体の遺伝子欠損マウスを CREIPR-Cas9 システムを用いて作出することにした。動脈硬化症モデルマウスでの検討も見据えて、LDL 受容体機能欠損マウスをベースにした各受容体の遺伝子欠損マウスの作出も進めた。その結果、R2 および R3 をともに遺伝子欠損したマウスは仔の産出が認められなかったが、各受容体を個別に遺伝子欠損したマウスは、仔の産出を認め、特に異常なく成長し、繁殖も可能であった。現在、各遺伝子欠損マウスの繁殖を進めており、マウス数が十分に増えた段階で、高脂肪食による動脈硬化症を惹起し、病態発症・進行の程度を野生型マウスと比較する予定である。

### (4) ヒトの血液中においても LDL-lipid X は存在しうる

LDL-コレステロール値が極度に高い家族性高コレステロール血症患者は動脈硬化症発症及びそれに伴う心血管系イベント発症リスクが高いため、LDL 除去療法が施される。LDL 除去療法は、LDL 除去カラムに用いられているデキストラン硫酸と LDL 上に発現したアポ B 間の静電相互作用を活用して、LDL 粒子を特異的に除去する治療法である。仮に LDL-lipid X がヒトでも存在する場合、LDL 除去療法前後で、LDL の特異的除去に伴って、血清中 lipid X 濃度が低下するのではないかと考えた。従来報告通り、LDL 除去療法により、LDL 分画中のコレステロールが特異的に除去されていることを確認した後、血清中 lipid X 濃度を定量したところ、期待通り、測定を行った全ての患者において LDL 除去療法による血清中 lipid X 濃度の有意な低下が認められた。この結果は、ヒトにおいても LDL-lipid X が存在する可能性を示唆するものであった。今後は、動脈硬化症の進行度と、LDL-lipid X の血清中濃度との間に何らかの関連性が認められるのか、更なる臨床的解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsuo Michinori, Ogata Yutaka, Yamanashi Yoshihide, Takada Tappei	4. 巻 15
2. 論文標題 ABCG5 and ABCG8 Are Involved in Vitamin K Transport	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 998 ~ 998
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu15040998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamanashi Yoshihide, Takada Tappei, Tanaka Yusuke, Ogata Yutaka, Toyoda Yu, Ito Sayo M., Kitani Maiko, Oshida Natsumi, Okada Kosuke, Shoda Junichi, Suzuki Hiroshi	4. 巻 156
2. 論文標題 Hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 exacerbates non-alcoholic fatty liver disease by re-absorbing specific biliary oxysterols	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 113877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biopha.2022.113877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山梨 義英、高田 龍平、田中 悠介、緒方 裕、豊田 優、伊藤（松岡） 紗代、木谷 真依子、押田 夏海、岡田 浩介、正田 純一、鈴木 洋史
2. 発表標題 Niemann-Pick C1-Like 1による非アルコール性脂肪肝の発症・増悪に関わる酸化ステロールの胆汁排泄制御
3. 学会等名 第55回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamanashi Y, Tanaka Y, Ogata Y, Toyoda Y, Ito S, Kitani M, Oshida N, Okada K, Shoda J, Suzuki H, Takada T
2. 発表標題 Hepatic NPC1L1 exacerbates NAFLD by suppressing biliary excretion of oxysterols
3. 学会等名 2023 International Joint Meetings of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics in Shizuoka（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山梨 義英、緒方 裕、豊田 優、伊藤 紗代、高田 龍平
2. 発表標題 コレステロール吸収輸送体NPC1L1の病態生理学的役割
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山梨義英、高田龍平、田中悠介、緒方裕、豊田優、伊藤紗代、木谷真依子、押田夏海、岡田浩介、正田純一、鈴木洋史
2. 発表標題 肝臓のNPC1L1による酸化ステロールの胆汁排泄抑制と非アルコール性脂肪肝の増悪
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023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
---------	---------