

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659142

研究課題名（和文） 脂質トランスポートソームを介した脂質代謝制御と破綻の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism underlying the regulation of lipid metabolism via lipid transportsome and its failure.

研究代表者

赤羽 悟美 (ADACHI-AKAHANE SATOMI)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：00184185

研究成果の概要（和文）：

【内容】本研究の目的は、脂質転移蛋白 Stard10 に注目して肝臓における脂質代謝の制御と破綻の分子機構を明らかにし、新たな治療戦略の分子基盤を構築することである。H23 年度は、Stard10 ノックアウトマウス (Stard10 KO) の肝臓においてコレステロールおよび中性脂肪の含有量が野生型マウス (WT) に比較して有意に低く、高脂肪食の負荷に対して脂肪肝になりにくいことを見出した。平成 24 年度は、さらに詳細な網羅的メタボローム解析と胆汁酸解析を行い、胆汁酸の腸管循環を検討した。その結果、以下の研究成果を得た。①マウス肝臓細胞において Stard10 は、肝細胞膜、毛細胆管側膜、脂肪滴膜とその近傍の小胞体周囲など、胆汁酸分泌や VLDL 産生に重要な場所に局在していた。②Stard10 KO では WT に比較して胆汁酸および脂肪酸の代謝産物に著名な変化が認められ、また、関連遺伝子の発現レベルも同様に変化していた。③Stard10 と胆汁酸取り込みトランスポーター (ASBT) は、小腸粘膜上皮細胞膜に共局在しており、Stard10 KO では ASBT の発現が著名に低下していた。④上記①～③から予測された通り、Stard10 KO では糞便中に排泄される胆汁酸の量が WT に比較して有意に高かった。Stard10 KO における胆汁酸消費の亢進は、肝臓に脂質が蓄積しにくい理由の一つと考えられた。⑤Stard10 が PPAR- $\alpha$  制御遺伝子の一部、すなわち胆汁酸代謝や脂肪酸代謝に関わる遺伝子の転写制御に関わっているという重要な知見を得た。⑥肝臓において Stard10 と複合体を形成する蛋白として、リポ蛋白生成および脂質代謝調節に関連する蛋白を同定した。【意義・重要性】 Stard10 は、胆汁酸代謝および脂肪酸代謝に関連した PPAR- $\alpha$  制御遺伝子の発現調節を介して脂質代謝の制御に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

STARD10, a member of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-related lipid transfer (START) protein family, is highly expressed in the liver and has been shown to transfer phosphatidylcholine. Therefore it has been assumed that STARD10 may function in the secretion of phospholipids into the bile. To help elucidate the physiological role of STARD10, we produced *Stard10* knockout mice (*Stard10*<sup>-/-</sup>) and studied their phenotype. Neither liver content nor biliary secretion of phosphatidylcholine was altered in *Stard10*<sup>-/-</sup> mice. Unexpectedly, the biliary secretion of bile acids from the liver and the level of taurine-conjugated bile acids in bile were significantly higher in *Stard10*<sup>-/-</sup> mice than wild type (WT) mice. In contrast, the levels of the secondary bile acids were lower in the liver of *Stard10*<sup>-/-</sup> mice, suggesting that the enterohepatic cycling is impaired. STARD10 was also expressed in the gallbladder and small intestine where the expression level of apical sodium dependent bile acid transporter (ASBT) turned out to be markedly lower in *Stard10*<sup>-/-</sup> mice than in WT mice when measured under fed condition. Consistent with the above results, the fecal excretion of bile acids was significantly increased in *Stard10*<sup>-/-</sup> mice. Interestingly, PPAR $\alpha$ -dependent genes responsible for the regulation of bile acid metabolism were down-regulated in the liver of *Stard10*<sup>-/-</sup> mice. The loss of STARD10 impaired the PPAR $\alpha$  activity and the expression of a PPAR $\alpha$ -target gene such as *Cyp8b1* in mouse hepatoma cells. These results indicate that STARD10 is involved in regulating bile acid metabolism through the modulation of PPAR $\alpha$ -mediated mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：(1) 脂質代謝 (2) 胆汁酸 (3) リポ蛋白 (4) コレステロール (5) トリグリセリド (6) 肝臓 (7) 脂質転移蛋白 (8) マウス

1. 研究開始当初の背景

現在、高コレステロール血症および高トリグリセリド血症の治療薬は広く使われているが、副作用の発現率が高いという問題があり、これまでにない新しい作用機序を持つ治療薬の開発が強く望まれている。申請者は、Stard10 ノックアウトマウス (Stard10 欠損マウス) を作成し、これを用いた基礎的研究から、脂質転移蛋白 Stard10 が脂質代謝やリポ蛋白の生成に深く関わることを初めて見出した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝臓および消化管のネットワークを介した脂質代謝の制御機構を明らかにすることである。特に脂質転移蛋白 (Stard10) の役割に注目してその脂質代謝およびリポ蛋白生成における役割を解明することにより、肝臓と消化管のネットワークを介した脂質トランスポートソーム制御の分子実態を明らかにし、その制御と破綻の分子機構を明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

(1) Stard10 相互作用蛋白の解析: pull-down 法と質量分析法により Stard10 の相互作用蛋白の同定を試みた。

(2) 脂質トランスポートソームにおける Stard10 の役割: 野生型マウスと Stard10 欠損マウスに高脂肪食を与えて飼育し、肝臓および小腸のマイクロアレイ、肝臓の大規模メタボローム解析およびリポ蛋白プロファイリングとリン脂質解析を施行し、脂質代謝における Stard10 の役割を解析した。

(3) 上記の結果を踏まえて、胆汁酸の解析と核内受容体および転写調節因子の解析を行った。

4. 研究成果

(1) Stard10 欠損マウス (Stard10 KO) の肝臓においてコレステロールおよび中性脂肪の含有量が野生型マウス (WT) に比較して有意に低く、高脂肪食の負荷に対して脂肪肝になりにくいことを見出した。

(2) マウス肝臓細胞において Stard10 は、肝細胞膜、毛細胆管側膜、脂肪滴膜とその近傍の

小胞体周囲など、胆汁酸分泌や VLDL 産生に重要な場所に局在していた。

(3) Stard10 KO では WT に比較して胆汁酸および脂肪酸の代謝産物に著名な変化が認められ、また、関連遺伝子の発現レベルも同様に変化していた。

(4) Stard10 と胆汁酸取り込みトランスポーター (ASBT) は、小腸粘膜上皮細胞膜に共局在しており、Stard10 KO では ASBT の発現が著名に低下していた。

(5) 上記(1)~(3)から予測された通り、Stard10 KO では糞便中に排泄される胆汁酸の量が WT に比較して有意に高かった。Stard10 KO における胆汁酸消費の亢進は、肝臓に脂質が蓄積しにくい理由の一つと考えられた。

(6) Stard10 が PPAR- $\alpha$  制御遺伝子の一部、すなわち胆汁酸代謝や脂肪酸代謝に関わる遺伝子の転写制御に関わっているという重要な知見を得た。

(7) 肝臓において StarD10 と複合体を形成する蛋白として、リポ蛋白生成および脂質代謝調節に関連する蛋白を同定した。

以上より、Stard10 は、胆汁酸代謝および脂肪酸代謝に関連した PPAR- $\alpha$  制御遺伝子の発現調節を介して脂質代謝の制御に関与していることが明らかとなった。

本研究の成果は、脂質異常症の病態解明と新たな治療薬の開発に向けて大きな社会的意義を持つ。

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4件)

1. Ito M, Yamanashi Y, Toyoda Y, Izumi-Nakaseko H, Oda S, Sugiyama A, Kuroda M, Suzuki H, Takada T, Adachi-Akahane S. Disruption of Stard10 gene alters the PPAR $\alpha$ -mediated bile acid homeostasis. *Biochim Biophys Acta*. 1831(2):459-468, 2013. 査読有り doi: 10.1016/j.bbali.2012.11.008.

2. Kitahara K, Nakamura Y, Tsuneoka Y, Adachi-Akahane S, Tanaka H, Yamazaki H, Takahara A, Yamazaki J, Ikeda T, Sugiyama A. Cardiohemodynamic and Electrophysiological

Effects of Anti-influenza Drug Oseltamivir In Vivo and In Vitro. Cardiovasc Toxicol. in press 2013. 査読有り

PubMed PMID:23420508.

3. Morimoto S, Ito M, Oda S, Sugiyama A, Kuroda M, Adachi-Akahane S. Spinal mechanism underlying the antiallostatic effect of gabapentin studied in the mouse spinal nerve ligation model. J Pharmacol Sci. 118(4):455-466, 2013. 査読有り

PubMed PMID:22447299.

4. Sugiyama A, Nakamura Y, Nishimura S, Adachi-Akahane S, Kumagai Y, Gayed J, Naseem A, Ferber G, Taubel J, Camm J. Comparison of the effects of levofloxacin on QT/QTc interval assessed in both healthy Japanese and Caucasian subjects (pages. Br J Clin Pharmacol. 73(3):455-459, 2012. 査読有り PubMed Central PMCID:PMC3370350.

[学会発表] (計 2 1 件)

1. Adachi-Akahane S. Cross-communication between the L-type  $Ca^{2+}$  channel and  $\beta$ -adrenergic receptor/adenylylcyclase/cAMP pathway in mouse ventricular myocytes. 第 90 回日本生理学会大会 2013/3/27, タワーホール船堀(東京都)

2. 赤羽悟美, 心筋興奮収縮連関における L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの  $Ca^{2+}$  依存性調節機構、第 86 回日本薬理学会年会 2013/3/22 福岡国際会議場(福岡県)

3. 伊藤雅方, 脂質転移タンパク質 STARD10 は PPAR $\alpha$  下流遺伝子の発現を正に調節する、第 35 回日本分子生物学会、2012/12/13、福岡国際会議場・マリメッセ福岡(福岡県)

4. 伊藤雅方, 脂質転移タンパク質 STARD10 の胆汁酸調節への関与、第 126 回日本薬理学会関東部会、2012/7/14、北里大学薬学部(東京都)

5. 伊藤雅方, 脂質転移タンパク質 STARD10 の胆汁酸調節への関与について、第 7 回トランスポーター研究会年会、2012/6/9、京都大学農学部(京都府)

6. 中瀬古寛子, 杉山篤, 赤羽悟美: Uncharged amino acids at ascending limbs of the pore region are involved in the  $Ca^{2+}$  selectivity of the L-type  $Ca^{2+}$  channel Cav1.3. The 89th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan、2012/3/29、松本文化会館(長野県)

7. Adachi-Akahane S: Molecular mechanism underlying regulation and failure of intracellular  $Ca^{2+}$  signaling via molecular complex associated with L-type  $Ca^{2+}$  channel in cardiac myocytes. 89th Annual Meeting of Japanese Physiological Society、2012/3/29、松本文化会館(長野県)

8. 丸山 博子, 中瀬古寛子, 伊藤雅方, 杉山篤, 赤羽悟美: 心房の自動能制御に脂肪酸が

及ぼす影響 第 85 回日本薬理学会年会、2012/3/14、国立京都国際会館(京都府)

9. Ito M, Izumi-Nakaseko H, Maruyama H, Sugiyama A, Adachi-Akahane S: Role of steroidogenic acute regulatory protein-related lipid transfer domain containing 10 (STARD10) in lipid droplet formation 第 85 回日本薬理学会年会 2012/3/14、国立京都国際会館(京都府)

10. Izumi-Nakaseko H, Sugiyama A, Adachi-Akahane S: L-type  $Ca^{2+}$  channel (LTCC) activity and the response to beta-AR stimulation are negatively regulated by  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$ -release (CICR) in cardiac myocytes. 第 85 回日本薬理学会年会 2012/3/14、国立京都国際会館(京都府)

11. 伊藤雅方, 山梨義英, 高田龍平, 中瀬古寛子, 杉山篤, 鈴木洋史, 赤羽悟美: 脂質転移タンパク質 STARD10 の胆汁酸調節における役割、日光シンポジウム、2011/12/17、日光東照宮晃陽苑(栃木県)

12. 中瀬古寛子, 杉山篤, 赤羽悟美: L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルのポア入り口付近のアミノ酸が  $Ca^{2+}$  選択性に重要である 平成 23 年度「筋生理の集い」2011/12/17、慈恵会医科大学(東京都)

13. 伊藤雅方, 山梨義英, 高田龍平, 中瀬古寛子, 杉山篤, 鈴木洋史, 赤羽悟美: 脂質転移タンパク質 Stard10 欠損マウスにおける胆汁分泌と再吸収の変化 第 34 回日本分子生物学会年会、2011/12/14、パシフィコ横浜(神奈川県)

14. Izumi-Nakaseko H, Ito M, Maruyama H, Sugiyama A, Adachi-Akahane S: A lipid binding protein participates in the regulation of  $Ca^{2+}$  modulation of L-type  $Ca^{2+}$  channel Cav1.2 function in atria. The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section、2011/12/3、学術総合センター(東京都)

15. Maruyama H, Ito M, Izumi-Nakaseko H, Sugiyama A, Adachi-Akahane S: Involvement of lipid binding protein in the modulation of parasympathetic receptor signaling in atria. The 28th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section、2011/12/2、学術総合センター(東京都)

16. 行方衣由紀, 恒岡弥生, 小川亨, 中瀬古寛子, 赤羽悟美, 田中光: Efonidipine 光学異性体を用いた洞房結節緩徐脱分極に関与する  $Ca^{2+}$  チャンネル分子種(Cav1.2, Cav1.3, Cav3.1) の薬理的検討 生体機能と創薬シンポジウム、2011/9/2、日本薬学会長井記念ホール(東京都)

17. 伊藤雅方, 山梨義英, 高田龍平, 中瀬古寛子, 杉山篤, 鈴木洋史, 赤羽悟美: 脂質転移タンパク質 Stard10/PCTP-L の胆汁酸調節における役割 第 6 回トランスポーター研究会年会、

2011/6/11 東北大学（宮城県）

18. 田邊思帆里, 伊藤雅方, 中瀬古寛子, 佐藤陽治, 杉山篤, 赤羽悟美 : Stard10/PCTP-Lノックアウトマウスを用いた機能解析 日本ケミカルバイオロジー学会第6回年会、2011/5/24、東京工業大学大岡山キャンパス（東京都）

19. 中瀬古寛子, 伊藤雅方, 丸山博子, 杉山篤, 赤羽悟美 : 脂質結合蛋白質PCTP-Lによる心房筋L型カルシウムチャネルの制御 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会(誌上)、2011/3

20. 行方衣由紀, 恒岡弥生, 小川 亨, 古美門千紗, 高原 章, 中瀬古寛子, 赤羽悟美, 田中光 : 洞房結節緩徐脱分極に関するCa<sup>2+</sup>チャネル分子種の薬理的検討 : efonidipine光学異性体、nifedipineの活動電位波形およびCav1.2、Cav1.3、Cav3.1 チャネルに対する作用 第84回日本薬理学会年会(誌上) 2011/3

21. 中瀬古寛子, 伊藤雅方, 丸山博子, 杉山篤, 赤羽悟美 : 洞房結節のL型カルシウムチャネルCav1.3 は弛緩期脱分極相の電流を構成する。第84回日本薬理学会年会(誌上) 、2011/3

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

赤羽 悟美 (ADACHI-AKAHANE SATOMI)  
東邦大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 00184185

### (2) 研究分担者

中瀬古 寛子 (IZUMI-NAKASEKO HIROKO)  
東邦大学・医学部・助教  
研究者番号 : 80408773

伊藤 雅方 (ITO MASANORI)  
東邦大学・医学部・助教  
研究者番号 : 20459811

### (3) 連携研究者 該当なし