

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504008

研究課題名(和文)胆石症における脂質トランスポーターのトラフィッキング異常機構のin vivo解析

研究課題名(英文) In vivo analysis of the canalicular trafficking of lipid transporters in lithogenic diet-fed mouse.

研究代表者

山崎 泰広 (Yamazaki, Yasuhiro)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：80415330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝毛細胆管膜に存在するコレステロールトランスポーター・Abcg5/Abcg8の機能亢進は、コレステロール胆石症を引き起こすと考えられている。我々はこれまでに過栄養状態が肝毛細胆管膜におけるAbcg5/Abcg8の機能、および発現を顕著に増加させることを見出したが、その機構に関しては不明であった。本研究では、過栄養状態がAbcg5/Abcg8のトラフィッキング、および機能発現に与える影響について解析した。その結果、肝臓にコレステロールが蓄積した状態では、細胞内小胞に蓄えられたこれらトランスポーターの毛細胆管膜への移行が促進すること、その機構にcAMPシグナルが関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：ABC half transporters Abcg5 and Abcg8, which form heterodimer in the liver bile canaliculi, promote the secretion of cholesterol into bile. Hyperfunction of these transporters causes the formation of cholesterol gallstones in the bile. We previously demonstrated diet-induced hypernutrition caused a significant increase in the function and expression of these transporters in bile canaliculi, the mechanisms underlying this phenomenon remained to be clarified. In this study, we investigated how hypernutrition affects the canalicular trafficking and the function of Abcg5/Abcg8. As a result, we clarified that diet-induced cholesterol loading into liver accelerates the trafficking of Abcg5/Abcg8 from the intrahepatic pools to the bile canalicular membrane through cAMP signaling machinery.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝毛細胆管 細胞内トラフィッキング ABCトランスポーター 高脂肪食 cAMPシグナル

1. 研究開始当初の背景

食の欧米化(高カロリー食中心の食生活)による過栄養状態は、生体のコレステロール恒常性を乱すことにより、動脈硬化症、脳血管疾患、心臓病、胆石症等の重篤な疾患を引き起こす。特にコレステロールの体外への主要な排泄経路である肝臓から胆管への胆汁排泄、およびそれを担う ABCG5/ABCG8 コレステロールトランスポーターの発現・機能変化は、これら疾患発症のメカニズムを解明するうえで極めて重要である。これまで国内外の研究者により、ABCG5/ABCG8 の核内受容体を中心とした転写調節機構が明らかにされたが、細胞内局在の調節機構は不明な点が多い。特に、ABCG5/ABCG8 の細胞内輸送機構は培養細胞を用いて解析されてきたが、培養細胞では完全な肝毛細胆管を構築することができないため、生体内での現象を反映しているのかは疑わしい。

2. 研究の目的

これまでの研究成果から、申請者は、コレステロール胆石症発症の新規メカニズムとして、高カロリー食摂取により生体内コレステロールが過剰蓄積した状態では、ABCG5/ABCG8 はコレステロールを体外に排泄するために肝毛細胆管特異的に高発現することを見出した。またこの増加に關与する翻訳後調節を解明する手段として、ハイドロダイナミック法による蛍光タンパク融合トランスポーターの肝臓特異的発現、および新規の *in vivo* 動態解析法を構築した。本研究では、本法を用いて過栄養状態における ABCG5/ABCG8 の肝毛細胆管特異的増加のメカニズムを解明することにより、新たな作用機序を持つ治療薬の開発へと展開するための研究基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物、およびサンプル調製

4 週齢雌性 ICR マウスを日本 SLC 株式会社から購入し、1 週間の環境馴化後に使用した。

マウスを 0~7 日間 水および高脂肪食 (Harlan Teklad: TD.90221) を自由に摂取させた後、下大静脈より採血し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓から肝凍結切片を作成し、残った肝臓から粗膜画分、毛細胆管膜画分、またはエンドソーム画分をシヨ糖密度勾配法により調製した。胆汁は、麻酔をかけたマウス胆嚢にカニューレを挿入することにより採取した。

(2) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウェスタンブロット

粗膜画分、毛細胆管膜画分、およびエンドソーム画分を、SDS-ポリアクリルアミドゲルに電気泳動した。タンパク質を PVDF 膜に転写後、5%スキムミルクでブロッキングした。一次抗体を反応後、HRP 標識二次抗体を反応させた。ECL ウェスタンブロットティングキットを用いて発光後、バンドを検出した。

(3) リアルタイム PCR による発現遺伝子の定量

マウス肝臓から mRNA を抽出し、PrimeScript® RT reagent Kit (TaKaRa) を用いて cDNA を調製した。PCR 反応は Thunderbird qPCR SYBR Mix (TOYOBO) を用いて行った。

(4) プラスミド DNA の構築

マウス肝臓から mRNA を抽出し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix を用いて Abcg5、Abcg8、および CD13 の cDNA を調製した。Abcg5 は pECFP-C1、Abcg8 および CD13 は pEYFP-C1 ベクターにサブクローニングし、蛍光タンパク質を融合した。

(5) ハイドロダイナミック法によるマウス肝臓への遺伝子導入

生理食塩水 2.0~2.4 ml に発現プラスミド DNA を加え、プラスミド DNA 溶液を作製した。予めマウスの尾をお湯で温めて血管を怒張させた後、マウスの体重の十分の一量のプラスミド DNA 溶液を 8~10 秒以内にマウスに尾静脈投与した。

(6) 免疫組織染色

肝凍結切片を 95%エタノール溶液で 4、10 分間固定したのち、PBS で 20 分間洗浄した。Blocking buffer (2% Bovine Serum Albumin/ 5% Normal goat serum/ PBS) を肝切片に載せて室温 1 時間ブロッキングした。再度 PBS で 15 分間洗浄後、肝切片に 1 次抗体液を載せて 4 で一晩反応させた。翌日 PBS で洗浄後、対応する 2 次抗体を 1 時間反応させた。再度 PBS で洗浄を行い、50%グリセロール / PBS で肝切片を封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM510) で観察した。

4. 研究成果

(1) 肝毛細胆管膜での Abcg5/Abcg8 の発現量と胆汁分泌能との相関関係の解析

マウスを高脂肪食で飼育し、肝臓における Abcg5/Abcg8 の mRNA 量、肝毛細胆管膜におけるタンパク質量の経時変化を調べた。Abcg5 および Abcg8 の遺伝子発現は高脂肪食負荷開始から 7 日目にかけて連続的に増加したが、毛細胆管膜上でのタンパク質の発現は摂餌開始 0.5 日後では増加せず、2、4 日目では顕著に増加し、7 日目では 4 日目と比べ低下していた。遺伝子発現変動と毛細胆管膜での発現変動が相関しないことから、毛細胆管膜における Abcg5/Abcg8 の発現増加には翻訳後調節機構が関与する可能性が示唆された。

トランスポーターの発現増加とコレステロール排出能との相関関係を調べるため、高脂肪食で飼育したマウス胆嚢にカニューレを挿入し、胆汁中のコレステロール分泌量を測定した。その結果、摂餌開始 0.5 日後では変化は見られなかったが、2 日目から 4 日目にかけて顕著に増加し、摂餌 7 日目では 4 日目と比較してコレステロール分泌量の有意な減少が見られた。この分泌量変動パターンは、肝毛細胆管膜上における Abcg5/Abcg8 の発現量の変動パターンと極めて類似しており、高脂肪食負荷によって肝毛細胆管膜上の

Abcg5/Abcg8 の発現量が増加すること、およびそれに相関して胆汁中へのコレステロール分泌量が増加することが確認できた。

(2) マウス肝細胞における Abcg5/Abcg8 の細胞内局在

肝細胞における Abcg5/Abcg8 の細胞内分布を調べるため、マウス肝臓から粗膜画分、粗面小胞体、ゴルジ体、エンドソーム、および毛細胆管膜画分をショ糖密度勾配遠心法により調製し、ウェスタンブロット法により内因性 Abcg5 および Abcg8 の細胞内分布を調べた。その結果、これらトランスポーターは、毛細胆管膜、およびエンドソーム画分で発現が見られ、特にエンドソーム画分に顕著に濃縮されていることがわかった。肝毛細胆管膜に発現する ABC トランスポーターは、細胞内に存在する貯蔵部位から何らかのシグナルによって毛細胆管膜へ輸送されること、またこの貯蔵部位はエンドソーム画分として生化学的に分離できることが提唱されている。よって Abcg5/Abcg8 も同様に、肝細胞内に存在するプールに貯えられている可能性が示唆された。

(3) Abcg5/Abcg8 の *in vivo* 動態解析法の確立、および毛細胆管膜への移行経路の解明

マウス肝臓における Abcg5/Abcg8 の細胞内トラフィックを解析するために、Abcg5-CFP および Abcg8-YFP 発現遺伝子を作成し、ハイドロダイナミック法によりマウス肝臓に *in vivo* 導入した。導入 12 時間後における遺伝子産物の細胞内分布を調べた所、内因性のトランスポーターと同様にエンドソーム画分、および毛細胆管膜画分に濃縮していた。Abcg5/Abcg8 は小胞体でヘテロ二量体を形成し、毛細胆管膜上へ移行・機能することが報告されている。そこで Abcg5-CFP 単独、Abcg8-YFP 単独、または Abcg5-CFP と Abcg8-YFP を同時に発現させ、導入 12 時間後における発現分布を調べた。Abcg5-CFP、ま

たは Abcg8-YFP を単独で発現させたマウス肝臓では、細胞質に一様に分布し、毛細胆管膜への局在はほとんど見られなかった。一方で、Abcg5-CFP および Abcg8-YFP を同時に発現させたマウスの肝臓では毛細胆管膜マーカーである CD13、Abcg5-CFP、および Abcg8-YFP の共同在が見られた。さらに2つの遺伝子を同時に発現させた場合のみ、エンドソーム画分や毛細胆管膜画分における遺伝子産物の発現を確認できた。以上の結果から、これら蛍光標識トランスポーターが、内因性の Abcg5/Abcg8 と同様にヘテロ二量体を形成し、毛細胆管へ移行すること、また CFP および YFP が二量体形成や毛細胆管膜への移行を阻害しないことが確認された。

Abcg5/Abcg8 の肝細胞内でのトラフィッキングを解析するため、マウス肝臓に Abcg5-CFP および Abcg8-YFP 発現プラスミド DNA を同時に *in vivo* 導入し、免疫組織染色法により発現分布の経時変化を調べた。その結果、遺伝子導入6時間後から毛細胆管への局在が見られ、12~18時間後には細胞質に認められる蛍光シグナルが弱くなっていき、24時間後ではほとんどが毛細胆管膜へ局在していた。次に粗膜画分（肝臓における全発現量の指標）、エンドソーム画分、毛細胆管膜画分における Abcg5-CFP/Abcg8-YFP の発現量を経時的に調べたところ、粗膜画分は、遺伝子導入3時間後から Abcg5-CFP/Abcg8-YFP の発現が経時的に増加し、12時間後をピークとして減少していき、36時間後では発現がほとんど見られなかった。また、エンドソーム画分では4.5時間後から発現が見られ、12~24時間後まで強い発現が認められた。一方、毛細胆管膜画分では組織染色の結果と同様に遺伝子導入6時間後に初めてバンドが検出され、以後12時間後をピークとした増減が認められた。以上の結果は、ゴルジ体を出た Abcg5/Abcg8 が毛細胆管へ移行する前に、エンドソーム画分に存在する何らかの小胞に貯えられる可能

性を示唆している。

(4) 高脂肪食負荷による Abcg5/Abcg8 の トラフィッキングへの影響

高脂肪食摂取が Abcg5/Abcg8 の肝細胞におけるトラフィッキングに及ぼす影響を調べるために、Abcg5-CFP/Abcg8-YFP をハイドロダイナミック法により高脂肪食飼育マウス肝臓に発現させ、発現分布の経時変化を調べた。

遺伝子導入から6時間後までのウェスタンブロット、および免疫組織染色の結果から、高脂肪食群における Abcg5-CFP/Abcg8-YFP の毛細胆管での発現は4.5時間後に初めて検出されたのに対し、普通食群では6時間後であった。また、エンドソーム画分および肝毛細胆管膜画分におけるこれら遺伝子産物の発現は、高脂肪食群の方が高かった。以上の結果は、新たに翻訳された Abcg5/Abcg8 の細胞内プールおよび肝毛細胆管への移行が、高脂肪食摂取により促進されたことを示している。遺伝子導入18時間、および24時間後の Abcg5-CFP/Abcg8-YFP の発現を両群で比較すると、肝毛細胆管での発現は高脂肪食群の方が高かったが、エンドソーム画分では逆に普通食群の方が高かった。また免疫染色の結果から、これら遺伝子産物が高脂肪食群でより毛細胆管に局在していることがわかった。これらの結果は、高脂肪食負荷により肝細胞にコレステロールが蓄積した状態では、Abcg5/Abcg8 は細胞内プールから動員される可能性を示唆している。以上の結果から、高脂肪食負荷マウス肝臓における Abcg5/Abcg8 の肝毛細胆管での高発現には、遺伝子発現調節だけでなく、翻訳されたタンパク質の細胞内プールへの移行促進、および細胞内プールから毛細胆管への供給亢進といったトラフィッキング調節機構が関与する可能性が示唆された。

(5) 高脂肪食負荷による Abcg5/Abcg8 の 毛細胆管膜移行促進に関するシグナル系の同定

肝細胞内小胞にプールされている ABC トラ

ンスポーターは、cAMP のシグナルによって毛細胆管に移動・供給されることが報告されている。そこで本研究では、Abcg5/Abcg8 の毛細胆管へのトラフィッキングが cAMP シグナルにより調節されているのではないかという仮説を立て、cAMP シグナルが制御する Abcg5/Abcg8 の毛細胆管局在化機構について調べた。

高脂肪食負荷による Abcg5/Abcg8 の毛細胆管での発現増加に cAMP が関与するか調べるため、高脂肪食摂餌マウスに Protein kinase A (PKA)インヒビター・H-89 を投与し、毛細胆管におけるこれらトランスポーターの発現量変化を調べた。その結果、H-89 処理によるトランスポーター遺伝子発現への影響は確認されなかったが、肝毛細胆管膜における Abcg5/Abcg8 の発現量は減少した。また、高脂肪食負荷が PKA の発現に及ぼす影響について調べた結果、肝毛細胆管膜画分において高脂肪食摂餌による PKA、リン酸化 PKA の発現増加が同程度に認められたが、粗膜画分および肝ホモジネートにおける発現量変化は認められなかった。以上より、高脂肪食負荷による Abcg5/Abcg8 の毛細胆管膜での発現増加に PKA が関与していること、高脂肪食負荷によって PKA の毛細胆管膜へのリクルートが誘導されている可能性が示された。さらに、cAMP アナログである dibutyryl cAMP をマウスに投与し、肝臓における Abcg5/Abcg8 の mRNA 量の経時変化、および肝毛細胆管におけるトランスポーター、および PKA 発現量の変化を調べた。その結果、毛細胆管膜における PKA の発現が増えた後に、Abcg5/Abcg8 の毛細胆管膜発現が増えるというタイムラグが存在した。このタイムラグは、cAMP シグナルによって毛細胆管膜にリクルートされた PKA 複合体から触媒サブユニットが解離し、細胞内プールの何らかの分子に作用してトランスポーターが毛細胆管膜に移行するまでの時間を反映しているものと考えられる。以上

の結果から、高脂肪食摂餌によって PKA の毛細胆管膜へのリクルートが誘導され、毛細胆管で増加した PKA 四量体から cAMP シグナルにより触媒サブユニットが解離されることにより、Abcg5 および Abcg8 の肝毛細胆管膜への移行が促進されるという cAMP シグナルの関与する Abcg5/Abcg8 の細胞内トラフィッキング機構の存在が示唆された。

Abcg5/Abcg8 トランスポーターの cAMP アナログ投与による詳細な細胞内分布変化を調べる目的で、蛍光タンパク質融合トランスポーターである Abcg5-CFP/Abcg8-YFP をハイドロダイナミック法により普通食摂餌マウス肝臓に発現させ、dibutyryl cAMP 投与による発現分布変動を調べた。その結果、dibutyryl cAMP 投与群では Abcg5-CFP/Abcg8-YFP の毛細胆管膜への局在が亢進すること、また毛細胆管膜周辺の発現が減少することが確認された。以上の結果から、Abcg5/Abcg8 が貯蔵された細胞内小胞は、毛細胆管膜近傍に存在する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Yasuhiro Yamazaki, Kenta Yasui, Takahiro Hashizume, Arisa Suto, Ayaka Mori, Yuzuki Murata, Masahiko Yamaguchi, Akira Ikari, Junko Sugatani: Involvement of a cyclic adenosine monophosphate-dependent signal in the diet-induced canalicular trafficking of adenosine triphosphate-binding cassette transporter g5/g8. *HEPATOLOGY*, **62**, 1215-1226 (2015) 査読有
DOI: 10.1002/hep.27914

[学会発表](計14件)

山崎泰広、村田柚季、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子: Protein kinase A が介在する ABC トランスポーターの毛細胆管膜局在化機構の解析
第 136 年回日本薬学会(横浜) 講演要旨集, p.196, 2016 年 3 月 27 日
山崎泰広、村田柚季、青野雅士、上野歩美、小野千夏、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子: 高脂肪食負荷により誘導される Abcg5/Abcg8 の毛細胆管膜移行促進機構の解析

第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会合同大会(神戸) 講演要旨集、p.264、2015 年 12 月 1 日
村田柚季、山崎泰広、青野雅士、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子：高脂肪食マウスにおけるコレステロールトランスポーターの *in vivo* 動態解析
第 79 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(松本) 講演要旨集、p.71、2015 年 5 月 23 日
山崎泰広、周藤有紗、村田柚季、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子：コレステロールトランスポーター・Abcg5/Abcg8 の肝毛細胆管膜局在化機構の解析
第 135 年回日本薬学会(神戸) 講演要旨集、p.161、2015 年 3 月 28 日
Ayako Mori, Yasuhiro Yamazaki, Masahiko Yamaguchi, Junko Sugatani: Comprehensive analysis of the ATP-binding cassette transporter expression in liver of lithogenic diet-fed mice.
The 2nd International Conference on Pharma and Food (Shizuoka), Abstract, p.122, 2014 年 11 月 6 日
Arisa Suto, Yasuhiro Yamazaki, Masahiko Yamaguchi, Junko Sugatani: A cAMP-dependent signaling pathway is involved in the canalicular trafficking of the ATP-binding cassette transporter g5/g8 in mouse liver.
The 2nd International Conference on Pharma and Food (Shizuoka), Abstract, p.121, 2014 年 11 月 6 日
山崎泰広、森彩夏、周藤有紗、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子：肝臓における ABC トランスポーターの機能解析
第 87 回日本生化学会大会(京都) 講演要旨集、p.121、2014 年 10 月 16 日
周藤有紗、山崎泰広、村田柚季、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子：コレステロールトランスポーター・Abcg5/Abcg8 の毛細胆管膜局在化機構の解析
第 78 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(名古屋) 講演要旨集、p.52、2014 年 5 月 24 日
森彩夏、山崎泰広、佐野一生、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子：胆石用誘発食飼育マウスにおける肝脂質トランスポーターの発現変動解析
第 78 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(名古屋) 講演要旨集、p.51、2014 年 5 月 24 日
山崎泰広、安井健太、森彩夏、周藤有紗、村田柚季、佐野一生、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子：高脂肪食摂餌マウスにおけるコレステロールトランスポーターの *in vivo* 動態解析
第 134 年回日本薬学会(熊本) 講演要

旨集、p.189、2014 年 3 月 28 日
Kenta Yasui, Yasuhiro Yamazaki, Ayaka Mori, Arisa Suto, Yuzuki Murata, Masahiko Yamaguchi, Akira Ikari, Junko Sugatani: Diet-induced lipid accumulation in liver enhances ATP-binding cassette transporter Abcg5/Abcg8 transport to the bile canaliculi.
The 18th Shizuoka Forum on health and longevity (shizuoka), Abstract, p.87, 2013 年 11 月 1 日
山崎泰広：新規動態解析法を用いた肝脂質トランスポーターの細胞内輸送機構の解明
US フォーラム 2013(静岡) 要旨集、p.61、2013 年 9 月 25 日
山崎泰広、安井健太、森彩夏、周藤有紗、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子：高脂肪食負荷マウスにおけるコレステロールトランスポーターの *in vivo* 動態解析
第 86 回日本生化学会大会(横浜) 講演要旨集、p.141、2013 年 9 月 12 日
安井健太、山崎泰広、周藤有紗、森彩夏、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子：新規 *in vivo* 動態解析を用いたコレステロールトランスポーター・Abcg5/Abcg8 のトラフィッキング制御機構の解析
第 59 回日本薬学会東海支部例会・大会(名古屋) 講演要旨集、p.77、2013 年 7 月 6 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/rinsho/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 泰広 (YAMAZAKI, Yasuhiro)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：80415330

(2) 研究分担者

なし