

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790117

研究課題名（和文） 消化管ステロール輸送担体の多層的発現調節

研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of sterol transporters in the gut

研究代表者

高田 龍平（TAKADA TAPPEI）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90376468

研究成果の概要：

本研究により、小腸上皮細胞・肝細胞の頂端膜においてステロール類の吸収に働き、エゼチミブの薬効標的であるヒト Niemann Pick C1-like 1 (NPC1L1) が SREBP2/HNF4 $\alpha$ によりコレステロール依存的な制御を受けること、脂肪酸を生理的リガンドとする核内受容体 PPAR $\alpha$ /NR1C1により正の転写調節を受けること、および、糖尿病時に機能上昇が見られる PGC1 $\alpha$ が SREBP2/HNF4 $\alpha$ および PPAR $\alpha$ による NPC1L1 転写活性を亢進することが明らかとなった。これらの知見は、相互に増悪因子となる高脂血症と糖尿病の病態生理の解明に向けた重要な一歩となることが期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	330,000	3,530,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態学、発現制御、薬理学、生理学、脂質、トランスポーター

## 1. 研究開始当初の背景

生体内におけるコレステロールの恒常性は、体内での合成・異化、胆汁への排出および消化管からの吸収のバランスの上に成り立っている。このうち、消化管からのコレステロール吸収には不明の点が多かったが、近

年の脂質トランスポーター分子の相次ぐ発見・新規脂質異常症治療薬 ezetimibe（申請当時本邦未承認）の誕生により、ここ数年で急速に研究が進んできた。

小腸上皮細胞の管腔側には、コレステロール・植物ステロールの胆汁ミセルからの吸収に働くと考えられ、ezetimibe の薬効標的で

ある Niemann-Pick C1-like 1 ( NPC1L1 ) ( Science, 2004 ) と、ヘテロダイマーとしてその逆方向の輸送を担う ABCG5/ABCG8 ( Science, 2000 ) が発現しており、両者の発現量・機能のバランスにより食餌中からのステロール類の吸収率が決まっていることが見出されていた。

## 2. 研究の目的

コレステロールの恒常性維持に関わる NPC1L1 や ABCG5/ABCG8 などのトランスポーターの発現量・機能は、生体のステロール量を反映し、しかるべき変動を受けるものと考えられる。実際、ABCG5/G8 に関しては、オキシステロールを生理的リガンドとする liver X receptor ( LXR ) により正に制御され、ステロール過剰時にはコレステロールの消化管吸収を低下させることが報告されている ( J. Biol. Chem., 2003 )。本研究で解析の標的とする NPC1L1 についても、同様の合目的性の高い制御がなされていることが予想されるが、高コレステロール・高胆汁酸食が NPC1L1 mRNA 量の低下を招くことが報告されているのみであり ( J. Biol. Chem., 2004 )、詳細な解析はなされていない状況であった。

そこで、薬物・胆汁脂質 ( 胆汁酸・リン脂質・コレステロール ) トランスポーターによる肝細胞から胆汁中への分泌過程・消化管からの吸収過程に着目し、輸送機構・発現調節機構に関する研究を進めていた研究代表者は、NPC1L1 に関する多層的な発現制御の存在を仮定し、その制御機構を解明することを目的として本研究は企画された。

## 3. 研究の方法

種々条件下での内因性 NPC1L1 の発現量変動を見出すとともに、その変動を反映する実験系 ( 転写調節領域を用いたレポーター遺伝子アッセイによる転写活性の評価 ) を構築し、核内受容体の導入・ゲルシフトアッセイなどと合わせて詳細な機構を解析した。

NPC1L1 の発現量変動に関しては、ヒト由来の培養細胞にコレステロールなどの内因性物質やスタチン類などの薬物の負荷、発現調節因子の siRNA 導入を行い、NPC1L1 の mRNA レベルにどのような影響が生じるかを定量的 PCR により検討した。

転写調節のメカニズム解明に用いる NPC1L1 の 5' 上流域は、ゲノム DNA を鋳型に用い PCR を行うことにより得た。得られた配列をレポーターベクターへと組み込み、転写

活性の評価を行った。NPC1L1 の発現制御への関与が想定された転写因子群 ( sterol responsive element binding protein ( SREBP ) 1a, SREBP1c, SREBP2, hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  ( HNF4 $\alpha$  ), peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  ( PPAR $\alpha$  ), PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  ( PGC1 $\alpha$  ) など ) はヒト由来培養細胞より適宜クローニングし、発現ベクターを構築した。

NPC1L1 5' 上流域を含むレポーターベクターおよび転写因子群を培養細胞系に導入し、内因性遺伝子の挙動に対応する転写活性の変化を見出した。応答配列の特定には、上流域の長さを削ったベクターや人為的変異を導入したベクターを適宜構築して使用した。その後、in vitro 翻訳産物および特異的抗体を用いたゲルシフトアッセイにより結合蛋白の検出を行った。

## 4. 研究成果

### 1) SREBP2/HNF4 $\alpha$ による NPC1L1 の発現調節の検討

#### (1) NPC1L1 上流域を用いた SREBP2/HNF4 $\alpha$ による転写活性化の検討

SREBP1a/1c/2 と HNF4 $\alpha$  の NPC1L1 転写活性への影響を調べるために、NPC1L1 の 5' 上流域約 1.3kbp をレポーターベクターに組み込み、SREBP・HNF4 $\alpha$  発現ベクターと共にヒト肝臓由来の HepG2 細胞に一過性導入し、ルシフェアッセイを行った。その結果、SREBP2 の単独導入により転写活性が上昇し、この活性は HNF4 $\alpha$  の同時導入で顕著に亢進した ( Fig. 1 )。この傾向は、ヒト消化管由来の Caco-2 細胞を用いた場合でも同様であった。この結果から、HNF4 $\alpha$  は SREBP2 による NPC1L1 の転写活性化を増強することが示唆された。

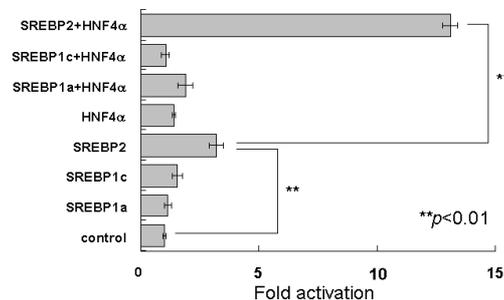


Fig. 1 NPC1L1 上流域を用いたルシフェアッセイ

#### (2) HNF4 $\alpha$ 結合サイトの同定

HNF4 $\alpha$  は direct repeat -1 ( DR -1 ) を介した直接的な転写調節をすることが知られてい

る。そこで、5' -上流域の deletion mutant を用いて HNF4 $\alpha$  応答に重要な領域を同定し、その範囲内にある DR -1 様の配列に変異を導入して転写活性を測定した。その結果、2 つの HNF4 $\alpha$  応答配列が同定された (Fig. 2)。ゲルシフトアッセイで見出されたこれらの配列への HNF4 $\alpha$  の結合と合わせ、HNF4 $\alpha$  は NPC1L1 上流域の 2ヶ所の配列と直接結合し転写制御を行うと考えられた。

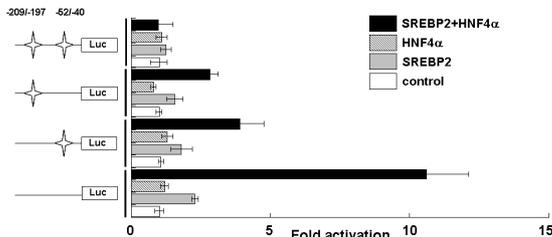


Fig. 2 HNF4 $\alpha$ 結合サイトに変異を導入した上流域を用いたルシフェーラスアッセイ

### (3) NPC1L1 のコレステロール依存的発現変動への HNF4 $\alpha$ の関与

HNF4 $\alpha$  の内因性 NPC1L1 発現への影響を調べる目的で、HNF4 $\alpha$  特異的 siRNA を HepG2 細胞に導入したところ、NPC1L1 発現量は著しく低下し、本来見られたコレステロール量による NPC1L1 の負の発現変動が消失した (Fig. 3)。この結果は、HNF4 $\alpha$  が NPC1L1 発現に重要であるのみならず、HNF4 $\alpha$  による SREBP2 の活性増強が NPC1L1 のコレステロール応答性発現調節に重要な役割を果たしていることを示している。

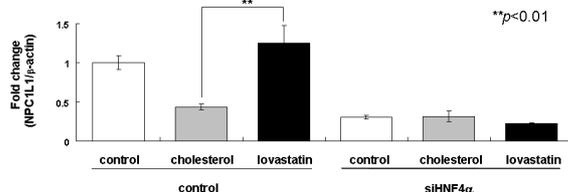


Fig. 3 siHNF4 $\alpha$  と NPC1L1 のコレステロール依存的発現変動

## 2) PPAR $\alpha$ による NPC1L1 の転写調節

HepG2 細胞を用いた検討の結果、脂肪酸を生理的リガンドとする核内受容体 PPAR $\alpha$  がヒト NPC1L1 を正に制御することが見出された。5' -上流域への PPAR $\alpha$  の直接結合を介したこの制御は、エゼチミブと同時使用される他の脂質異常症治療薬群であるフィブラート系薬剤により活性化することから、脂質異常症の薬物治療における薬剤選択にも示唆を与える知見である。さらに、糖尿病時に機能上昇が見られる PGC1 $\alpha$  が SREBP2/HNF4 $\alpha$  および PPAR $\alpha$  によるヒト NPC1L1 転写活性を亢進することが明らかとなった。この知見は、相

互に増悪因子となることが知られる高脂血症と糖尿病の病態生理の解明に向けた重要な一歩となることが期待される。

## 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) Yuki Iwayanagi, Tappei Takada and Hiroshi Suzuki. HNF4 $\alpha$  is a crucial modulator of the cholesterol dependent regulation of NPC1L1. *Pharm Res.* 2008 May;25(5):1134-41.

(2) Takehito Yamamoto, Kousei Ito, Masashi Honma, Tappei Takada and Hiroshi Suzuki. Cholesterol-lowering effect of ezetimibe in UGT1A-deficient (Gunn) rats. *Drug Metab Dispos.* 2007 Sep;35(9):1455-8.

[学会発表] (計 4 件)

(1) 高田龍平、岩柳有起、鈴木洋史 PPAR $\alpha$  によるヒト NPC1L1 の転写制御 **第 23 回日本薬物動態学会年会** 熊本 2008 年 10 月 30 日 ~ 11 月 1 日

(2) 高田龍平、岩柳有起、鈴木洋史 HNF4 $\alpha$ ・SREBP2 による NPC1L1 の転写調節機構 **第 1 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム** 東京 2007 年 12 月 15 日 ~ 16 日

(3) 高田龍平、岩柳有起、成島和哉、山梨義英、鈴木洋史 NPC1L1 によるコレステロール輸送およびその調節機構の解析 **第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム** 仙台 2007 年 11 月 26 日 ~ 27 日

(4) 岩柳有起、高田龍平、鈴木洋史 HNF4 $\alpha$  による NPC1L1 の発現制御機構の解明 **日本薬剤学会第 22 年会** 大宮 2007 年 5 月 21 日 ~ 23 日

[図書] (計 3 件)

(1) 高田龍平、鈴木洋史 NPC1L1・ABCG5/ABCG8 によるコレステロール輸送と創薬 **遺伝子医学 MOOK** 2009 年 1 月 12, 231-6

(2)高田龍平、鈴木洋史 消化管コレステロールトランスポーターNPC1L1 と高脂血症治療薬 膜 2008年5月 33(3), 88-93

(3)高田龍平、鈴木洋史 ABCタンパク質による胆汁脂質分泌と遺伝性疾患 最新医学 2007年11月 62(11), 63-7

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

高田 龍平 (TAKADA TAPPEI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90376468

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし