

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22797

研究課題名（和文）リポ蛋白質の質的变化に着目した食成分の新たな生理活性の探索

研究課題名（英文）Exploring novel bioactivities of dietary components by focusing on qualitative changes in lipoproteins

研究代表者

山梨 義英（Yamanashi, Yoshihide）

東京大学・医学部附属病院・助教

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）：マウスにおいて、高脂肪食摂取によるVLDL/LDLの構成成分の変化を網羅的に解析した結果、生理活性脂質であるスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）の増加が認められた。興味深いことに、この上昇は、消化管コレステロール吸収トランスポーターNPC1L1の遺伝子欠損マウスやNPC1L1阻害剤エゼチミブの投与により消失した。S1Pは高脂肪食に豊富に含まれるスフィンゴミエリン（SM）の代謝物であることから、SMの消化管吸収にNPC1L1が関与する可能性を考え検討を行った結果、SMはNPC1L1の生理的基質であり、エゼチミブ感受性かつNPC1L1依存的な消化管吸収制御を受けることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コレステロール吸収輸送体であるNPC1L1がSMの消化管吸収にも関わり、血液中のVLDL/LDL-S1Pレベルを制御することが示唆された。これらの成果はスフィンゴ脂質の恒常性維持におけるNPC1L1の新たな生理的役割を明らかにした点で、また、食事依存的なVLDL/LDLの構成成分の変化にNPC1L1が関わる可能性を見出した点で、生理学的・栄養学的に重要な知見である。

研究成果の概要（英文）：Comprehensive analyses of lipoprotein components in mice revealed that VLDL/LDL-associated sphingosine-1-phosphate (S1P) was increased by feeding a high-fat diet (HFD). Interestingly, this increase was abolished in mice genetically deficient NPC1L1, an intestinal cholesterol importer, and in mice treated with ezetimibe, an NPC1L1 inhibitor. Since S1P is a metabolite of sphingomyelin (SM), which is abundant in HFD, we hypothesized that NPC1L1 is involved in intestinal SM absorption. To test this possibility, we conducted a series of in vitro and in vivo experiments and revealed that SM is a physiological substrate of NPC1L1 and its intestinal absorption is regulated by an ezetimibe-sensitive and NPC1L1-dependent pathway.

研究分野：脂質動態学

キーワード：VLDL LDL S1P スフィンゴミエリン NPC1L1

1. 研究開始当初の背景

近年、動脈硬化症などの疾患発症リスクとの関連から、リポ蛋白質の「量（血液中濃度）」に加えて、「質（生理活性の強さ）」の重要性が明らかとなりつつある。ところが、リポ蛋白質の「質」を制御する因子についてはほとんど明らかでない。これまで研究代表者は、リポ蛋白質が様々な食成分（栄養素や薬物）を包含し、それらの運搬体として機能することを見出してきた。しかし、これらの副成分がリポ蛋白質の「質」に与える影響については未解明である。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究は食成分のリポ蛋白質への分布に着目し、リポ蛋白質に分布する食成分がリポ蛋白質の「質」に及ぼす影響について、動脈硬化症の発症・進行に及ぼす影響も含めて明らかにすべく企画された。

3. 研究の方法

以下の3項目について検討を行う。解析対象とする食成分は、先行検討においてリポ蛋白質に分布することが明らかとなっている脂溶性ビタミンや薬物に加えて、生活習慣病との関連が示唆されており、高速液体クロマトグラフ (UPLC) と質量分析計 (MS/MS) を組み合わせた UPLC-MS/MS システムによる高感度測定に成功している代表的な食事由来脂質とする。

(1) 食成分のリポ蛋白質分布パターンの解析

マウスに食事由来化合物を経口投与し、血清を採取する。採取した血清をサイズ排除クロマトグラフィーにより各リポ蛋白質に分画し、各分画中の化合物（および関連代謝物）濃度を UPLC-MS/MS システムにより測定する。得られる濃度データを統合し、各化合物のリポ蛋白質分布パターンを明らかにする。

(2) 食成分を含有したリポ蛋白質の「質」の解析

リポ蛋白質の「質」について、動脈硬化症との関連が示唆されているコレステロール移行能や動脈硬化症が慢性炎症疾患であることを踏まえて、リポ蛋白質の炎症惹起（抑制）作用を解析する。

(3) 食成分が動脈硬化症の病態進行に及ぼす影響の解析

項目2でリポ蛋白質の「質」を変動させた食成分を対象に、動脈硬化症の病態進行に与える影響について、動脈硬化症モデルとして汎用されている LDL 受容体機能欠損マウス (*Ldlr*^{MT} マウス) を用いた検討を行う。高脂肪・高コレステロール食飼育下のマウスに当該成分を負荷し、腹部大動脈にできる動脈硬化巣の面積測定ならびに血液中のサイトカイン濃度を測定する。また、血清中（各リポ蛋白質中）の脂質濃度の測定も並行して行う。これらの解析結果を統合し、食成分によるリポ蛋白質の「質」の変化が、動脈硬化症の病態進行に影響を及ぼすのか明らかにする。

4. 研究成果

(1) 食成分のリポ蛋白質分布パターンの解析

Ldlr^{MT} マウスを高脂肪食 (0.21%コレステロール+41% kcal fat) 給餌下で3週間および20週間飼育した際の血液を回収し、リポ蛋白質分画を回収した。その結果、高脂肪食3週間摂取群、20週間摂取群とともにVLDL/LDL-コレステロールの濃度上昇が認められた。また、この上昇は消化管コレステロール吸収トランスポーターであるNiemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) の遺伝子欠損や、NPC1L1阻害剤エゼチミブの投与により消失することが明らかとなった。後述するように、高脂肪食20週間摂取群では、NPC1L1依存的な動脈硬化症の発症・進行を認めたことから、以降の解析では、NPC1L1依存的なVLDL/LDL粒子に着目して検討を行った。

まず、高脂肪食によりコレステロール以外のVLDL/LDL構成成分が変化するかを明らかにするために、種々の網羅的解析を実施した (Yamanashi *et al.*, *Nutrients*. 2020)。プロテオーム解析の結果、高脂肪食摂取マウスのVLDL/LDL分画中でアポリポ蛋白質M (アポM) が、NPC1L1依存的かつエゼチミブ感受的に上昇することが見出された。血液中においてアポMは主にHDLに分布しており、生理活性脂質であるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の結合タンパク質として機能することが報告されていることから、アポM含有量と連動して、VLDL/LDL分画中のS1P濃度も変動しうると考えられた。そこで、各マウスにおけるS1Pの血漿中リポ蛋白質分布を解析した。通常食を摂取した*Ldlr^{MT}* マウスにおいては、これまでの報告通り血漿中S1Pの多くはHDL結合型 (HDL-S1P) もしくはアルブミン結合型の状態で存在していた。一方、高脂肪食を20週間摂取した*Ldlr^{MT}* マウスでは、VLDL/LDL分画中に高濃度でS1Pが検出された。このVLDL/LDL結合型S1P (VLDL/LDL-S1P) の上昇は、NPC1L1の遺伝子欠損やエゼチミブ投与により消失することも明らかとなった。また、高脂肪食を3週間摂取したマウスにおいても、同様にVLDL/LDL-S1Pが検出された。これらの結果から、NPC1L1依存的なVLDL/LDLがS1Pを運搬する可能性が示唆された。

また、VLDL/LDL-S1Pが高脂肪食摂取マウスでNPC1L1依存的に上昇するメカニズムについても検討を進めた (Yamanashi *et al.*, *Nutrients*. 2020)。S1Pがスフィンゴミエリン (SM) の代謝物であること、高脂肪食にはSMが豊富に含まれていることを踏まえると、食事から摂取されるSMがNPC1L1を介して吸収された後、S1Pに変換され、VLDL/LDL-S1Pの供給源となる可能性が考えられた。この点を検討すべく、まず、NPC1L1を高発現させた結腸癌由来の培養細胞株であるCaco-2細胞 (NPC1L1高発現細胞) を用いてSMの取り込み実験を行った。その結果、SMの取り込み活性はNPC1L1高発現細胞において亢進しており、エゼチミブによる取り込み阻害も認められた。そこで、SM吸収におけるNPC1L1の生理的意義を検討するために、SMを*Ldlr^{MT}* マウス (*Npc1l1^{WT}* マウス) またはNPC1L1を遺伝子欠損した*Ldlr^{MT}* マウス (*Npc1l1^{KO}* マウス) に経腸投与し、2時間後の血漿・肝臓中のSM由来化合物濃度を測定したところ、*Npc1l1^{WT}* マウスと比べて*Npc1l1^{KO}* マウスでは有意に低値を示した。また、*Npc1l1^{WT}* マウスではエゼチミブによるSMの消化管吸収の低下が認められた一方、*Npc1l1^{KO}* マウスではエゼチミブの効果は認められなかった。以上の一連の結果は、SMがNPC1L1を介して消化管吸収を受けることを示

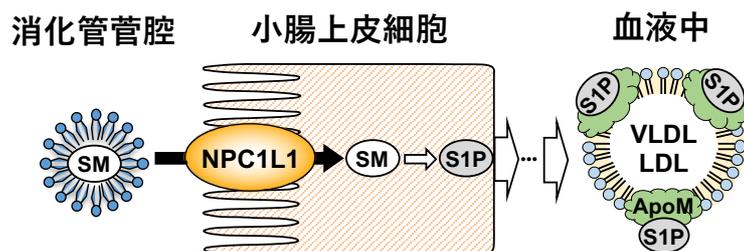


図1. NPC1L1によるスフィンゴミエリンの消化管吸収とVLDL/LDL-S1Pの産生制御
SM: スフィンゴミエリン, S1P: スフィンゴシン-1-リン酸, ApoM: apolipoprotein M

すとともに、NPC1L1 を介した SM の消化管吸収経路が VLDL/LDL-S1P の供給源となり得る可能性を示唆するものであった (図 1)。

(2) 食成分を含有したリポ蛋白質の「質」の解析

これまでに、HDL-S1P は抗炎症作用を有することが報告されていたため、各リポ蛋白質による炎症応答制御について、ヒト臍帯静脈内皮細胞である HUVEC を用いた実験系を構築した。構築した実験系では、マウスから単離した HDL-S1P を HUVEC 培養液中に添加することで、TNF α 誘導性の炎症惹起応答 (ICAM-1 の分泌量増加) が抑えられたことから、HDL-S1P の抗炎症作用が確認された。今後は、VLDL/LDL-S1P の生理作用の詳細についても検討を進める予定である。

(3) 食成分が動脈硬化症の病態進行に及ぼす影響の解析

Ldlr^{MT} マウス (*Npc1l1*^{WT} マウス) に高脂肪食を 20 週間摂取させることで、腹部大動脈に動脈硬化巣 (プラーク) が形成された。また、このプラーク形成は、エゼチミブの投与や *Npc1l1*^{KO} マウスでは有意に抑制された。したがって、消化管に発現する NPC1L1 が動脈硬化症の発症・進行に重要な役割を担うことが示唆された。今後は、上記の NPC1L1 依存的かつエゼチミブ感受的なプラーク形成に VLDL/LDL-S1P が関与する可能性について検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yamanashi Yoshihide	4. 巻 139
2. 論文標題 Translational Research Based on Understanding the Regulatory Mechanisms of in Vivo Behaviors of Fat-soluble Compounds.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Yakugaku Zasshi	6. 最初と最後の頁 1485 ~ 1494
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00136.	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 Manabe Yuki, Ichihara Misato, Fukuda Kyoko, Tomonaga Nami, Li Zhuo Si, Yamanashi Yoshihide, Suzuki Hiroshi, Takada Tappei, Matsuo Michinori, Sugawara Tatsuya	4. 巻 54
2. 論文標題 Niemann Pick C1 like 1 Promotes Intestinal Absorption of Siphonaxanthin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lipids	6. 最初と最後の頁 707 ~ 714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lipd.12194	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 Toyoda Yu, Takada Tappei, Yamanashi Yoshihide, Suzuki Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Pathophysiological importance of bile cholesterol reabsorption: hepatic NPC1L1-exacerbated steatosis and decreasing VLDL-TG secretion in mice fed a high-fat diet	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Lipids in Health and Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12944-019-1179-0.	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, Yamamoto Hideaki, Suzuki Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 NPC1L1 Facilitates Sphingomyelin Absorption and Regulates Diet-Induced Production of VLDL/LDL-associated S1P	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu12092641	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山梨 義英、高田 龍平、山本 英明、慕 爽、田中 悠介、小峰 瞳子、鈴木 洋史
2. 発表標題 肝臓に発現するNPC1L1は西欧食誘発性の動脈硬化症をエゼチミブ感受的に増悪させる
3. 学会等名 第13回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山梨 義英、高田 龍平、山本 英明、鈴木 洋史
2. 発表標題 NPC1L1によるスフィンゴリエリンの消化管吸収とVLDL/LDL-S1Pの産生制御
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

自己紹介（研究室ホームページ内） https://plaza.umin.ac.jp/~todayak/yamanashi.php

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
---------	---------