

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790143
 研究課題名（和文） 肥満症進行に伴うステロール輸送担体群の発現変動動態
 およびその調節機構の解析
 研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of sterol transporters
 under pathophysiological conditions
 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（和文）：

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と考えられている Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) について、ヒト NPC1L1 の転写調節領域制御下にヒト NPC1L1 を発現するアデノウイルスを作成することに成功した。また、脂肪酸やコレステロールとの結合能を有する細胞質蛋白質である L-FABP が、NPC1L1 蛋白質発現量を転写後調節により正に制御することが各種 *in vitro* および *in vivo* 解析により明らかとなった。これらの成果は、肥満症などの病態発症・病態進行とヒトコレステロール輸送担体群の関連性を明らかにする上で重要な一歩となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) is known to contribute to the cholesterol absorption in the small intestine and liver and is believed to be a pharmacological target of ezetimibe. As a result of the present study, we succeeded in the construction of human NPC1L1 promoter-driven adenovirus for the expression of human NPC1L1. In addition, it was demonstrated that L-FABP is involved in the positive regulation of the expression of NPC1L1 protein in a post-transcriptional manner. These results would be important to understand the relationship between the pathogenesis of obesity-related diseases and sterol transporters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子薬物動態学、臨床薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：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

近年の研究の進展により、肥満症や糖尿病、脂質異常症などの病態は相互に増悪因子となり、脂肪肝に引き続く非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) などの肝病態や胆石症、動脈硬化症などの発症リスクを高めることが明らかとされてきた。メタボリックシンドロームの場合、内蔵脂肪の蓄積を発端としてインスリン抵抗性や脂肪肝などに至るが、コレステロール動態の変動を含む脂質異常症もその重要な構成因子の一つである。

生体内のコレステロール量は、体内での生合成、胆汁酸等への異化、消化管からの吸収、胆汁中への排出により厳密に調節されていることは古くから知られているが、Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) および ABCG5/ABCG8 の発見により、ここ数年で吸収・排出に関する研究は大きく進展した。シトステロール血症の原因遺伝子である ABCG5/8 が胆汁中や消化管管腔へのコレステロール・植物ステロールの排出を担う一方で、高コレステロール血症治療薬エゼチミブの薬理標的分子である NPC1L1 は吸収方向に働き、両者の発現量・機能のバランスによりコレステロールの挙動が決定すると考えられていた。

2. 研究の目的

これらのトランスポーターの発現調節については、コレステロールの必要性に応じた合理的な転写制御として、ABCG5/8 が LXRs による正の制御を、NPC1L1 が SREBP2 および HNF4 α によるコレステロール依存的な負の制御を受けることが報告されている。一方、糖尿病患者における消化管 NPC1L1 mRNA の上昇、ABCG5/8 mRNA の低下や遺伝性肥満症モデルマウスの肝 ABCG5/8 蛋白質量の大幅な減少など、合目的性からは説明困難な変動も散見される。また、特に NPC1L1 に関しては、げっ歯類と比べ顕著に高いヒト肝臓での発現などの種差も見られ、系統的な解析・報告のない現状では、コレステロール吸収・排出トランスポーターの発現および機能変動に基づくコレステロール挙動の予測や病態発症との関連性の解明は極めて困難である。

このような背景のもと、ヒトコレステロール輸送担体群の発現制御の *in vivo* における重要性や肥満症進行に伴う発現変動への関

与を明らかにするとともに、mRNA・蛋白質量・輸送能の個別評価により病態時のコレステロール吸収・排出動態の全体像の解明を目指し、本研究は企画された。

3. 研究の方法

ヒトコレステロール輸送担体群の *in vivo* における発現制御を明らかにするために、ヒト転写調節領域制御下にヒト輸送担体を発現するアデノウィルスを作成し、マウスに投与することにより、一過性トランスジェニックマウスの作成を試みた。

一過性トランスジェニックマウスの構築のためには、ヒト NPC1L1 およびヒト ABCG5/8 の遺伝子および転写調節領域の DNA 配列が必要となるが、研究代表者らは過去にこれらの輸送担体の遺伝子導入系を用いた輸送機能評価を行っており、必要な遺伝子配列はクローニング済であった。転写調節領域についても、ヒト NPC1L1 に関しては HNF4 α や SREBP2 の結合部位を含み、細胞の脂質・薬物依存的な発現応答を反映する 5' -上流域は既に保有していた。ヒト ABCG5/8 の転写調節領域に関しては、両遺伝子の 5' -上流域をゲノム PCR により増幅し、ルシフェラーゼアッセイにより転写活性を見出した。

4. 研究成果

一過性トランスジェニックマウスの構築のために、ヒト NPC1L1 およびヒト ABCG5/ABCG8 の遺伝子および発現調節領域の DNA 配列が必要となるため、保有していなかった配列に関しては、ヒト由来培養細胞やヒト組織等より得た。ヒト・マウス間での類似性および種差について検討するために、マウス NPC1L1 遺伝子および転写調節領域の DNA 配列も得た。

次に、生理的な発現調節を反映する一過性トランスジェニックマウスを作成するために、ヒト NPC1L1 の発現調節領域の制御下にヒト NPC1L1 の遺伝子配列を配置したアデノウィルスベクターを作成した。培養細胞系においてはヒト NPC1L1 タンパク質を発現可能であることが確認できたものの、*in vivo* に導入した場合、マウス肝臓における発現は微弱であったため、発現量を高めるべくエ

ンハンサー配列を加えたアデノウイルスベクターの構築を進めている。

また、レポータージーンベクターに3' -UTRを挿入し、NPC1L1の3' -UTRがmRNA安定性にもたらす影響について検討した結果、NPC1L1の3' -UTRには複数のmiRNA標的配列が存在し、NPC1L1が複雑な転写後調節を受けていることを示唆する結果を得た。制御因子の候補となるmiRNAには脂肪肝の進行に伴い発現量が変動するものも含まれており、現在、病態発症・病態進行との関連性について検討中である。

さらに、脂肪酸やコレステロールとの結合能を有する細胞質蛋白質であるL-FABPの発現は、ABCG5/ABCG8には影響を与えないものの、NPC1L1蛋白質発現量を正に制御することが各種in vitroおよびin vivo解析により明らかとなった。一方、NPC1L1のmRNA量はL-FABP発現による影響を受けないことから、L-FABPによる発現制御が転写後調節であることが示唆された。

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、全て査読有)

(1) Iwayanagi Y*, Takada T[#], Tomura F, Yamanashi Y, Terada T, Inui K, Suzuki H. (*: equally contributed, #: corresponding author) Human NPC1L1 expression is positively regulated by PPAR α . **Pharm Res.** 28(2), 405-12 (2011).

(2) Yoshikado T*, Takada T[#], Yamamoto T, Yamaji H, Ito K, Santa T, Yokota H, Yatomi Y, Yoshida H, Goto J, Tsuji S, Suzuki H. (*: equally contributed, #: corresponding author) Itraconazole-induced cholestasis: involvement of the inhibition of bile canalicular phospholipid translocator MDR3/ABCB4. **Mol Pharmacol.** 79(2), 241-50 (2011).

(3) Takada T[#], Suzuki H. (#: corresponding author) Molecular mechanisms of membrane transport of vitamin E. **Mol Nutr Food Res.** 54(5), 616-22 (2010).

(4) Yamanashi Y*, Takada T[#], Suzuki H. (*: equally contributed, #: corresponding

author) In-vitro characterization of the six clustered variants of NPC1L1 observed in cholesterol low absorbers. **Pharmacogenet Genomics.** 19(11), 884-92 (2009).

[学会発表] (計16件)

(1) 高田龍平、山梨義英、鈴木洋史 Transportsome in biliary cholesterol secretion 第84回日本薬理学会年会 横浜 2011年3月22日~24日

(2) 高田龍平、山梨義英、吉門崇、鈴木洋史 コレステロール胆汁分泌におけるABCG5/G8とNPC2の機能連関 BMB2010 神戸 2010年12月7日~10日

(3) 高田龍平、山梨義英、鈴木洋史 NPC1L1, a pharmacological target of dyslipidemia 第25回日本薬物動態学会年会 大宮 2010年10月7日~9日

(4) 吉門崇、高田龍平、伊藤晃成、三田智文、鈴木洋史 Effect of ticlopidine on MDR3/ABCB4-mediated biliary secretion of phospholipids 第25回日本薬物動態学会年会 大宮 2010年10月7日~9日

(5) 高田龍平 脂質異常症治療薬の薬効標的分子NPC1L1による脂溶性物質輸送 第54回日本薬学会関東支部大会 東京 2010年10月2日

(6) 吉門崇、高田龍平、山本武人、山道寛子、伊藤晃成、三田智文、鈴木洋史 MDR3/ABCB4阻害を介したイトラコナゾール誘発性胆汁うっ滞 第5回トランスポーター研究会 東京 2010年7月10日~11日

(7) 高田龍平、成島和哉、山梨義英、小西健太郎、鈴木洋史 コレステロールトランスポーターNPC1L1によるビタミンEの消化管吸収 日本ビタミン学会第62回大会 盛岡 2010年6月11日~12日

(8) 高田龍平、成島和哉、山梨義英、小西健太郎、鈴木洋史 NPC1L1を介した腸管におけるコレステロールとビタミンEの吸収機構-薬剤との相互作用- 第64回日本栄養・食糧学会大会 徳島 2010年5月21日~23日

(9) 山梨義英、高田龍平、吉門崇、鈴木洋史

胆汁中における分泌型Niemann-Pick C2 の機能解析 日本薬剤学会第 25 回年会 徳島 2010 年 5 月 12 日～14 日

(10) Hiroshi Suzuki, Takashi Yoshikado, Takehito Yamamoto, Hiroko Yamaji, Kousei Ito and Tappei Takada Effect of itraconazole on the biliary secretion of phospholipids in vitro and in vivo 3rd FEBS Special Meeting ABC2010 Innsbruck, Austria 2010 年 2 月 27 日～3 月 5 日

(11) 高田龍平、中村英寛、岩柳有起、山梨義英、鈴木洋史 コレステロールトランスポーターNPC1L1 の脂肪酸関連蛋白質群による発現制御 第 31 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 大阪 2009 年 11 月 30 日～12 月 1 日

(12) 吉門崇、高田龍平、山本武人、山道寛子、伊藤晃成、三田智文、鈴木洋史 胆汁脂質輸送体発現系を用いた薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズム解析 第 31 回胆汁酸研究会 東京 2009 年 11 月 7 日

(13) Tappei Takada, Yuki Iwayanagi and Hiroshi Suzuki Transcriptional regulation of NPC1L1 by nuclear receptors Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009, 1st Fukuoka, Japan 2009 年 10 月 15 日～18 日

(14) Tappei Takada, Kazuya Narushima, Yoshihide Yamanashi and Hiroshi Suzuki Vitamin E transport by a cholesterol importer NPC1L1 XXXVI International Congress of Physiological Sciences Kyoto, Japan 2009 年 7 月 27 日～8 月 1 日

(15) 高田龍平 薬物関連トランスポーター 山口県性差医療研究会第 5 回学術講演会 山口 2009 年 6 月 28 日

(16) Hiroshi Suzuki, Yoshihide Yamanashi and Tappei Takada Functional analysis of NPC1L1, a cholesterol transporter Bioactive Lipid Molecules and Transporters (The Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, 5th) Tokyo, Japan 2009 年 5 月 25 日～26 日

〔図書〕 (計 4 件)

(1) 山梨義英、高田龍平、鈴木洋史 薬効標的としてのABCタンパク質 遺伝子医学MOOK 19, 176-81 (2011).

(2) 山梨義英、高田龍平、吉門崇、正田純一、鈴木洋史 Niemann-Pick C2 はABCG5/G8 によるコレステロール排出を促進する 薬理と治療 38, 127-9 (2010).

(3) 高田龍平、鈴木洋史 コレステロールトランスポーターNPC1L1 によるビタミンEの消化管吸収 ビタミン 84(8), 376-83 (2010).

(4) 高田龍平、鈴木洋史 NTCP, ASBT, MRP3, BCRPの項 薬物トランスポーター 活用ライブラリー—機能・輸送基質から創薬・臨床応用まで 32-3, 34-5, 143-5, 153-5 (2009).

〔その他〕

ホームページ

<http://square.umin.ac.jp/~todayak/index.html>

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：9 0 3 7 6 4 6 8

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし