

令和元年6月20日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08376

研究課題名(和文) 脂質トランスポーターのトラフィッキング異常が惹起する胆汁分泌障害発症機構の解明

研究課題名(英文) Study on the pathogenic mechanisms of cholelithiasis induced by the defect of the canalicular translocation of lipid transporters

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝毛細胆管膜上のトランスポーターは、細胞膜への挿入や細胞内への取込みにより機能制御されているため、細胞内輸送機構を解明することは胆汁分泌異常に起因する疾患を解明する鍵となりうる。本研究では、栄養状態の変化や病的環境が誘発するトランスポーターのトラフィッキング異常、およびそれに付随する脂質代謝疾患(コレステロール胆石症)発症機構について解析した。その結果、高脂肪食による胆石形成にコレステロールトランスポーターのProtein kinase Aを介した毛細胆管膜での発現上昇、および胆汁酸トランスポーターの在来型Protein kinase Cを介した発現低下が関与する可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝ABCトランスポーターは、生体の脂質恒常性維持において重要な役割を担っており、過栄養状態における脂質異常症の発症に深く関与すると言われている。トランスポーターは肝毛細胆管に発現することで初めて機能を発揮するため、これら分子の細胞内トラフィッキング機構を解明することは極めて重要であるが、有効な解析法がないためその詳細は明らかにされていない。本研究では、申請者が構築した新規in vivo解析系により、これらトランスポーターの高脂肪食負荷によるトラフィッキング異常機構の一端を明らかにした。本研究により、新たな作用機序を持つ脂質代謝疾患治療薬開発のための基盤研究へと発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)： The physiological function of ABC transporters in liver bile canaliculi is regulated by canalicular translocation and/or internalization into cytosol, we investigated how hypernutrition and/or pathological condition cause the dysfunction of canalicular trafficking of ABC transporters. As a result, we found that protein kinase A is involved in the canalicular localization of cholesterol transporter Abcg5/Abcg8 induced by high-fat diet consumption. Furthermore, we found that the concentration of bile acids decreased in high-fat diet fed mice. This event was thought to be involved in the mislocalization of bile acids transporter Abcb11 via conventional protein kinase C signaling. These results suggest that the high-fat diet perturbed the distribution of ABC transporters in hepatocytes, which led to the supersaturation and crystallization of cholesterol in bile.

研究分野：生化学

キーワード：ABCトランスポーター 胆汁分泌 胆石症 細胞内トラフィッキング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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ABCトランスポーター(ABCG5/ABCG8:コレステロール、ABCB4:リン脂質、ABCB11:胆汁酸)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、ABCトランスポーター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、これらトランスポーター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

申請者は、トランスポーターの生体内でのトラフィック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。本解析法を用いることにより、これまで高脂肪食摂取により肝内コレステロールが過剰蓄積した状態ではABCG5/ABCG8の肝毛細胆管膜への移行が促進されること、またこの現象にcAMPが関与することを見出した。本研究では、胆汁分泌に關与する脂質トランスポーター(ABCG5/ABCG8、ABCB4、ABCB11)の毛細胆管膜局在化機構を明らかにするとともに、過栄養状態におけるこれらトランスポーターのトラフィック異常、およびそれに続発する脂質代謝疾患の発症機構を解明することが目的である。本研究ではコレステロール胆石症に焦点をあて研究を行った。

### 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、または7週齢雄性C57BL/6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0~28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、毛細胆管膜画分をショ糖密度勾配法により調製した。

#### (2) 胆汁分泌能の測定

マウスを麻酔下固定し、肝臓および胆嚢を露出させた。総胆管の末端を結紮した後、胆嚢管からカニユーレを差し込んで総胆管まで到達させ、カニユーレを胆嚢ごと2カ所で結紮して固定した。胆汁は最初の10分間は廃棄し、その後の30分間分を直接採取した。胆汁脂質成分の解析は市販のキット(総コレステロールE-テストワコー、総胆汁酸テストワコー、リン脂質C-テストワコー)を用いた。

#### (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、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO)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) 毛細胆管膜画分の調製

マウス肝臓を粗調製用ペストルですりつぶした後、40倍量の低張液に再懸濁したものをガーゼで2回濾した。その後、遠心分離(4、1,500g、10分間)し、上清を除いた。沈殿物に低張液を加え、ピペティングにより懸濁させ、55%スクロース溶液を加えることにより47%スクロース懸濁液を作成した。この懸濁液を遠心用チューブに移し、その上から

42.9%スクロースを重層した。遠心分離(4、40,000rpm、70分間)した後、二層のスクロース溶液間にある白濁層を採取し、さらに低張液を5mL加えた後に遠心分離(4、40,000rpm、30分間)することで毛細胆管膜画分を得た。

#### (5) 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

粗膜画分と毛細胆管膜画分を、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ングキットを用いて発光後、バンドを検出した。

#### (6) プラスミドDNAの構築

マウス肝臓からmRNAを抽出し、ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix( TOYOBO )を用いて Abcb4、Abcb11、Protein kinase A 制御サブユニット1 ( PKA RI )、PKA 触媒サブユニット ( PKA C )のcDNAを調製した。トランスポーターはEYFP-C1ベクター、PKAサブユニットはpCMV-Tag1ベクターにサブクローニングした。さらに、KOD-plus-mutagenesis kitを用い、触媒サブユニットが解離されない機能抑制型変異体( PKA RI G324D )のFLAG融合タンパク質発現プラスミドを構築した。Abcg5-CFP、Abcg8-YFPは以前作成したものをを用いた。

#### (7) 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2.0~2.4ml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秒間でマウスに尾静注した。

#### (8) 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 (BSA) / 5% Normal goat serum (NGS) / 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で一晚反応させた。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で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 高脂肪食飼育マウスにおける胆汁、および胆汁分泌能の経時変化

雄性C57BL/6マウスを高脂肪食(Harlan Teklad: TD.90221)で飼育することにより、胆石症モデルマウスを作成した。胆嚢から胆汁を採取し、光学顕微鏡でコレステロール結晶の有無を観察したところ、摂餌4日目からコレステロール結晶が発生し、7日目以降それらが拡大、重合しコレステロール結石が形成される様子が確認された。胆嚢に貯留した胆汁の脂質成分を解析したところ、胆汁酸濃度は摂餌開始から4日目にかけて上昇傾向が見られたが、7日目以降は普通食群の約60~70%に減少した。総コレステロール濃度は2日目に4.1倍に急増し、以降普通食群に比べて2.6~3.3倍高い値を示した。リン脂質濃度はほぼ変化がなかった。各脂質成分の濃度変化が胆汁分泌能に依存しているか確認するために、マウスに麻酔下カニューレを挿入し、得られた胆汁の各脂質成分の単位時間あたりの分泌量、および成分比を求めた。その結果、コレステロール分泌量は摂餌2日目に急増し、その後も上昇傾向を示し、コレステロール比率は段階的に増加した。一方、胆汁酸分泌量と胆汁酸比率はともに2日目から4日目は増加したが7日目で減少した。以上の結果から、コレステロール結石の発生には胆汁中におけるコレステロール濃度の上昇、および胆汁酸濃度の低下が重要であること、この濃度変化にはそれぞれの脂質の胆汁分泌能変化によるものである可能性が示唆された。

## (2) 高脂肪食飼育マウス肝臓における ABC トランスポーターの発現変動

高脂肪食飼育マウス肝臓における脂質トランスポーターの mRNA 量の経時変化を比較した。コレステロールを胆管に排泄する Abcg5 および Abcg8 の mRNA は摂餌開始から 2 日目にかけてそれぞれ 4.4 倍、および 3.7 倍に急上昇し、2 日目から 14 日目にかけてそれぞれ 5.3 倍、および 5.1 倍までゆるやかに上昇し、28 日目では共に普通食群の 2.8 倍まで下降した。リン脂質トランスポーターである Abcb4、および胆汁酸トランスポーターである Abcb11 は、摂餌開始から 4 日目までは発現レベルは変わらなかったが、7 日目から 14 日目にかけてそれぞれ 2.4 倍、および 1.7 倍に増加し、28 日目はそれぞれ 1.8 倍、および 0.9 倍まで減少した。次に、同じマウスから肝毛細胆管膜画分を調製し、Abcg5 および Abcg8 のタンパク質発現量を調べた結果、2~7 日目にかけては mRNA と同様に顕著な発現増加が認められたが (Abcg5: 3.9 倍~4.9 倍, Abcg8: 4.1~5.1 倍)、それ以降は減少する傾向が認められた。以上の結果から、食事によるコレステロール胆石発生には、Abcg5/Abcg8 の発現増加によるコレステロールの過剰分泌が関与する可能性が示唆された。

## (3) 高脂肪食負荷が誘発する Abcg5/Abcg8 の毛細胆管膜局在化促進機構の解析

これまで申請者らは高脂肪食摂取により肝臓にコレステロールが蓄積すると、Abcg5/Abcg8 が肝毛細胆管膜へ局在することを見出した。このトランスポーター局在化に、cAMP シグナルが関与することを示唆する結果は得られたものの、詳しい分子機構はいまだ不明である。そこで本研究では、プロテインキナーゼ A (PKA: protein kinase A) に着目し、コレステロール蓄積による Abcg5/Abcg8 の局在化のメカニズムを検討した。

PKA の関与を調べるため、PKA 触媒サブユニット (PKA C ) の GFP 融合タンパク発現遺伝子を作製し、解析に用いた。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、肝臓をホモジネートしウェスタンブロットにより遺伝子産物の発現を調べた結果、分子量 69kDa のバンドが観察されたことから、目的の発現遺伝子が作製できたことが確認された。次に、PKA C -GFP を発現させたマウス肝毛細胆管膜における Abcg5 および Abcg8 の発現量を調べたところ、発現量がともに増加していた。以上の結果は、外因的に導入した PKA により Abcg5/Abcg8 の肝毛細胆管膜への局在化が促進されたことを示唆した。次に、PKA 制御サブユニット I (PKA RI ) の野生型および、触媒サブユニットが解離されない機能抑制型変異体 (G324D) についても、PKA C と同様にマウス肝臓に遺伝子導入した。PKA RI の野生型と変異体 G324D ともに目的の分子量 50kDa のバンドが得られた。次に、高脂肪食飼育マウスの肝臓に PKA RI の野生型と変異体 G324D を発現させ、肝毛細胆管膜画分における Abcg5 および Abcg8 のタンパク質発現がどのように変化するかについて調べた。その結果、野生型では変化がなかったが、変異体 G324D では Abcg5 と Abcg8 の発現量がともに有意に減少した。さらに Abcg5-YFP/Abcg8-YFP を共発現させ、PRKAR1 発現細胞における蛍光トランスポーターの分布を調べたところ、変異体 G324D 発現細胞ではその発現レベルに依存して細胞質へ蛍光が拡散する様子が観察された。変異体 G324D が内因性 PKA の働きを阻害することにより、Abcg5 と Abcg8 の毛細胆管膜への移行を阻害したと考えられる。以上の結果から、Abcg5 および Abcg8 の肝毛細胆管膜への移行に PKA が関与する可能性が示唆された。

## (4) 高脂肪食負荷が誘発する Abcb11 の毛細胆管膜局在化異常機構の解析

高脂肪食飼育群では、胆汁酸の分泌が減少しているのにも関わらず、胆汁酸トランスポーターである Abcb11 の mRNA は上昇傾向を示した。この結果から、Abcb11 の翻訳後調節機構の異常が生理機能の低下に関与する可能性が示唆された。肝臓における脂質トランスポーターは、毛細胆管膜近傍の細胞質に存在する貯蔵部位に蓄えられており、必要に応じて毛細胆管膜へ移行

する機構が提唱されている。そこで各脂質トランスポーターの肝細胞における発現分布が、高脂肪食摂餌により影響するかについて、免疫組織染色法を用いて調べた。高脂肪食摂餌7日目は胆嚢貯留胆汁に初めてコレステロール結晶が確認された時期であり、また胆汁酸の濃度が減少し始めたことから、摂餌7日目の肝臓を普通食群と比較した。それぞれのマウス肝臓から凍結切片を作製し、脂質トランスポーターの特異抗体、および毛細胆管膜マーカーである抗CD13抗体を用いて二重染色をし、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、高脂肪食群では普通食群に比べて Abcb11 の毛細胆管膜上への局在が低下した。一方、Abcg5、およびリン脂質トランスポーターである Abcb4 は高脂肪食摂餌によって毛細胆管膜上への局在が促進された。

さらに Abcb11 の詳細な発現分布を確認するために Abcb11 の YFP 融合タンパク発現遺伝子を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。遺伝子導入24時間後における遺伝子産物の局在を免疫組織染色法により解析した結果、高脂肪食飼育群の肝臓では Abcb11-YFP のシグナルが毛細胆管膜近傍の細胞質へ拡散していた。以上の結果から、高脂肪食摂餌により Abcb11 の毛細胆管膜上への局在が阻害され、胆汁酸の分泌が減少する可能性が示唆された。

Abcb11 の毛細胆管膜上への局在化は在来型 Protein kinase C (cPKC) によって抑制されることが報告されている。そこで胆石症誘発食摂餌による Abcb11 の毛細胆管膜局在化異常に cPKC の一つである PKC が関与するかについて検討した。マウス毛細胆管膜画分における PKC 発現量をウェスタンブロットで調べた結果、胆石症誘発食摂餌群では普通食摂餌群と比較して肝毛細胆管膜における PKC、およびリン酸化 PKC の発現量が増加した。以上の結果から、食事による Abcb11 の毛細胆管膜での発現低下には在来型 PKC が関与する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

### 〔学会発表〕(計8件)

青野雅士、山崎泰広、村田柚季、小野千夏、上野歩美、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の毛細胆管膜局在化機構の解析

第80回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(津)、2016年5月21日

山崎泰広、青野雅士、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子：肝臓へのコレステロール蓄積はコレステロールトランスポーター Abcg5/Abcg8 の毛細胆管膜への移行を促進させる

第11回トランスポーター研究会年会(京都)、2016年7月2日

山崎泰広、青野雅士、小野千夏、上野歩美、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子：Protein kinase A が関与する ABC トランスポーターの肝毛細胆管膜移行メカニズムの解析

第89回日本生化学会大会(仙台)、2016年9月25日

小野千夏、山崎泰広、山口賢彦、五十里彰、菅谷純子、黒川洵子：肝臓へのコレステロール蓄積はコレステロールトランスポーター Abcg5/Abcg8 の毛細胆管膜への移行を促進させる

第81回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(名古屋)、2017年5月20日

Chinatsu Ono, Yasuhiro Yamazaki, Kazuho Sakamoto, Masahiko Yamaguchi, Junko Kurokawa: Comprehensive analysis of the ATP-binding cassette transporters expression in liver from gallstone disease model mouse.

The 22nd Shizuoka forum on health and longevity (Shizuoka)、2017年11月24日

三枝香都貴、小野千夏、大西あゆみ、山崎泰広、黒川洵子：胆石症モデルマウスにおける BSEP の毛細胆管膜局在化異常機構の解析

第 138 回日本薬理学会関東部会（東京） 2018 年 3 月 10 日

三枝香都貴、小野千夏、山崎泰広、黒川洵子：高脂肪食負荷により惹起される肝胆汁酸トランスポーターの毛細胆管膜局在化異常機構の解析

第 64 回日本薬学会東海支部総会・大会（名古屋） 2018 年 6 月 30 日

Yasuhiro Yamazaki, Chinatsu Ono, Kazuki Saegusa, Ayumi Ohnishi, Kazuho Sakamoto, Junko Kurokawa : Diet-induced mislocalization of the ATP-binding cassette transporters is involved in the development of cholesterol crystal in bile from gallstone disease model mouse.

The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology（Kyoto） 2018 年 7 月 4 日

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：山崎 泰広

ローマ字氏名：Yasuhiro YAMAZAKI

所属研究機関名：静岡県立大学

部局名：薬学部

職名：講師

研究者番号（8 桁）：80415330

### (2)研究分担者

なし