

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591079

研究課題名(和文) 肝臓からのコレステロール排泄機構の解明

研究課題名(英文) Analyses on the mechanisms for cholesterol excretion from liver.

研究代表者

塚本 和久(TSUKAMOTO KAZUHISA)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20251233

研究成果の概要(和文)： 肝臓は体内のコレステロールを排泄する唯一の臓器である。今回の研究から、ヒトには肝臓特異的なステロリンが存在しており、そのコレステロール排泄力は小腸のそれとは異なること、胆汁中に排泄されたコレステロールは NPC1L1 で再度肝臓に取り込まれ、アポ E に富んだりポ蛋白の産生に関与していること、肝細胞のコレステロールがどこから由来するかにより、その生理的役割が異なる可能性があること、が示唆された。

研究成果の概要(英文)： The liver is the only organ which excretes cholesterol from the body. The present study suggested 1) the existence of liver-specific sterolin which is important for excretion of cholesterol into the bile, and 2) that the cholesterol in the bile was re-absorbed with NPC1L1, which resulted in the production of apoE rich lipoproteins. Furthermore, it has been indicated that cholesterol in the liver, depending on its source, exerted distinct metabolic properties.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：脂質代謝

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：ABCG5, ABCG8, NPC1L1, 肝臓, 胆汁

## 1. 研究開始当初の背景

肝臓はコレステロール新生、リポ蛋白分泌、リポ蛋白取り込みを行うとともに、体内のコレステロールを体外へ排泄することにより、体内のコレステロールレベルを調整する臓器である。コレステロール排泄に関しては、コレステロールそのもの、あるいは胆汁酸に変換し、胆汁として体外へ排泄できる体内で

唯一の臓器である。近年、胆汁内コレステロール排泄・再吸収に関与すると考えられる分子として、シトステロール血症の原因遺伝子ステロリン(ABCG5, ABCG8)と脂質異常症治療薬エゼチミブの標的タンパク NPC1L1 が同定された。いずれの蛋白もヒトでは主に小腸と肝臓で発現している。小腸においては、ステロリンはヘテロダイマーを形成してコレス

テロールを小腸腔へ排泄し、NPC1L1 は逆に小腸腔から吸収する働きをしていることが判明している。肝臓においてもこれらの蛋白がコレステロールのハンドリングに重要な働きを果たしていると想定されてはいたものの、その全貌は本研究開始当初は解明されていなかった。特に NPC1L1 は、ヒトでは肝臓において小腸とほぼ同程度に発現しているが、マウス肝臓での発現量は小腸の 1%未満といわれており、ほとんど発現していないことが知られていた。それゆえ、ヒト肝臓での NPC1L1 の役割の解明が待たれていた。

## 2. 研究の目的

われわれは ABCG5 の cDNA をヒト肝臓の cDNA ライブラリーよりクローニングする際、肝臓の ABCG5 は小腸のそれとは異なるスプライシングを受けていることを発見した。従来、動物研究では小腸型 cDNA を用いての検討が行われ、ABCG5 と G8 が共存と言われていたが、ヒトの肝臓検体での免疫染色での検討結果では、ABCG5 と G8 の細胞内局在が異なる、という結果も発表されていた。それゆえ、本研究では、肝臓型 ABCG5 と小腸型 ABCG5 との相違を検討し、実際のヒトでの肝臓からのコレステロール排泄におけるステロリンの役割の検討を計画した。また、ステロリンとは反対に胆汁からのコレステロール吸収を担うと想定される NPC1L1 の脂質代謝などに与える効果などを検討し、ヒトでのコレステロールハンドリングについて検討した。

## 3. 研究の方法

ヒト肝臓型 ABCG5 (hG5), ヒト小腸型 ABCG5 (iG5), ABCG8 (G8), および NPC1L1 をコードするアデノウイルスを作成し、正常 (C57BL/6) マウス、ABCG5/8 ノックアウトマウス、単層 HepG2 細胞、spheroid 化した HepG2 細胞に感染させ、それらの蛋白の性質および役割を調べる。

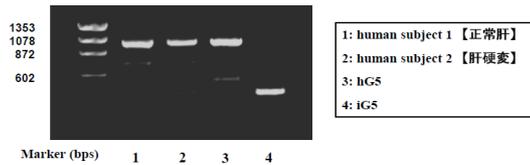
## 4. 研究成果

### (1) hG5, iG5, G8 の肝臓での性質・役割

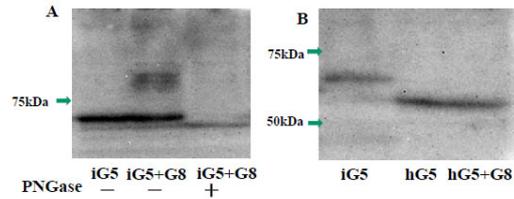
小腸型および肝臓型 ABCG5 のスプライシングの相違を利用し、該当する cDNA 領域を増幅するプライマーを用いて、実際のヒトの臨床肝臓検体から生成した cDNA を鋳型に PCR を行った。図 1 に示すとおり、日本人の肝臓標本でも、小腸型 ABCG5 ではなく肝臓型 ABCG5 が発現していることが確認された。

次に hG5, iG5 により発現する蛋白の性状を比較するため、それぞれを単独、あるいは G8 とともにアデノウイルスを用いて、HepG2 細胞に導入した。iG5 は、open reading frame (ORF) から予想された通り、hG5 よりも分子量が小さかった (iG5 約 70kDa, hG5 約 55kDa)。また、G8 と共発現させると iG5 は glycation

[図 1]



[図 2]

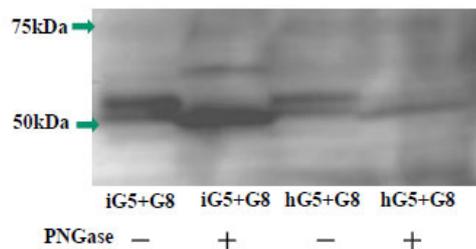


されるのに対し、hG5 は glycation されなかった (図 2)。

ABCG5/8 ノックアウトマウスに hG5, iG5 を単独あるいは G8 と共発現させたところ、HepG2 細胞に感染させた場合に認められた分子量の蛋白の他、hG5, iG5 とともに約 50kDa の大きさに蛋白質が検出され、G8 と共発現させると、いずれも glycation された (図 3)。よって、今回の結果より、in vivo と単層培養の HepG2 細胞では ABCG5/ABCG8 は異なる動態を示す可能性が示唆された。

また、まだ予備検討の段階ではあるが、これらアデノウイルスを ABCG5/8 欠損マウスに投与したところ、hG5 と G8 を共発現させた場合の方が iG5 と G8 を共発現させた場合と比較して胆汁中のコレステロール濃度が低く (iG5+G8 22.8  $\mu\text{mol/ml}$  vs hG5+G8 6.0  $\mu\text{mol/ml}$ )、hG5 が iG5 よりもコレステロール排泄能が低い可能性が示唆された。今後、動物数を増やして詳細な検討を加えるとともに、hG5・iG5・G8 をそれぞれ単独に ABCG5/8 欠損マウスに発現させ、各ステロリンが単独でも機能可能かどうかを検討する予定である。

[図 3]

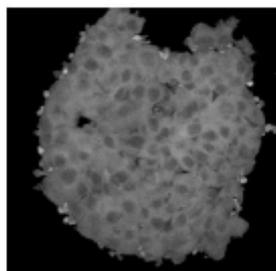


(2) HepG2 細胞 spheroid 培養系の確立とその応用

肝臓は、その一つ一つの細胞が、胆管側・ジヌソイド側という polarity を有する臓器である。しかし、研究に通常用いられている培養細胞系は単層培養であるため未分化状態であり、生体内の肝臓細胞の機能を反映していないという欠点を有する。我々は、HepG2 細胞をアルジネートビーズの中で立体的に球状に培養する系を確立した(図 4)。この spheroid HepG2 細胞(S-Hep)は単層培養の HepG2 細胞(M-Hep)と比較して、培養日数の経過とともにアルブミンの分泌が亢進し、分化した肝細胞になることが確認できた(図 5)。アルブミンの分泌の亢進とともにアポ蛋白 E やアポ蛋白 B、およびアポ蛋白 AI の分泌能が亢進することも確認された。さらに、LXR を含めた核内受容体の発現も亢進しており、LXR アゴニストである T0901317 にて処理することで、アポ E の分泌が亢進し、さらに VLDL 分泌も亢進することが確認できた。

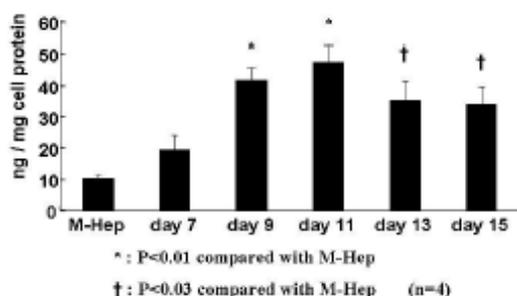
次に、hG5 と GFP, iG5 と YFP, G8 と RFP の融合蛋白を発現するアデノウイルスを作成し、M-Hep に感染させてその蛋白局在を検討したところ、図 6 に示す通り、単層培養系では、どの蛋白も小胞体に存在するパターンを示した。そこで、S-Hep での検討を行ったが、残念ながらアデノウイルスは S-Hep に感染させることができなかった。今後、stable に

[図 4]



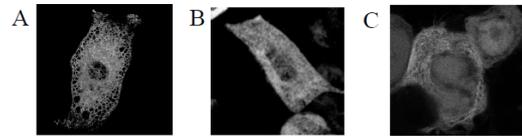
HepG2 spheroids (day 11), fixed with 10% formalin solution, were examined with confocal microscopy

[図 5]



これら遺伝子を発現する細胞を確立して、細胞内局在の検討を行う予定である。

[図 6]



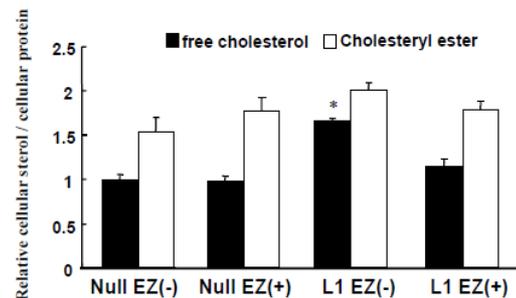
A: iG5-YFP B: hG5-GFP C: G8-RFP

(3) NPC1L1 の肝臓での性質・役割

我々は、ヒト NPC1L1 をコードするアデノウイルス (Ad-L1) を作成し、NPC1L1 の肝臓における働きを、in vitro および in vivo にて検討した。

まず、単層 HepG2 細胞に NPC1L1 を過剰発現させると、リン脂質・胆汁酸とともに混和して作成した胆汁ミセル内のコレステロールが細胞に取り込まれるかどうかについて検討した。図 7 に示すとおり、NPC1L1 を発現した HepG2 細胞は、胆汁ミセル内のコレステロールを取り込み、その取り込みは NPC1L1 の阻害剤エゼチミブにより抑制された。

[図 7]

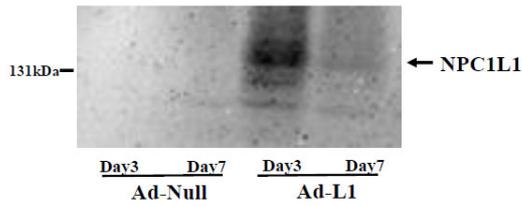


In vivo における肝臓 NPC1L1 の働きを調べるため、元来 NPC1L1 を肝臓に発現していない C57BL/6 マウスに Ad-L1 を感染させて NPC1L1 を発現させ、感染 5 日後に NPC1L1 発現による効果を解析した。対照群としては、何もコードしないアデノウイルス (Ad-Null) を感染させた。

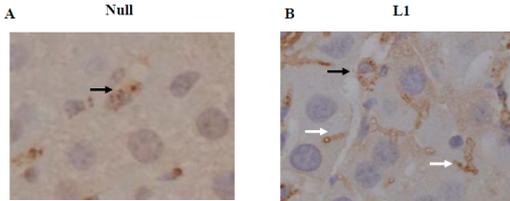
まず、Ad-L1 を投与すると、目的とする蛋白 NPC1L1 がマウス肝臓に発現すること(図 8)、そして、肝臓の免疫組織染色により、強発現させた NPC1L1 の肝臓内での局在が、正常ヒトと同様に、毛細胆管に沿っていることを確認した(図 9)。

次に、肝臓での NPC1L1 の作用を調べる目的で、NPC1L1 を発現させたマウスから胆汁を採取し、胆汁中のコレステロール、胆汁酸濃

[図 8]

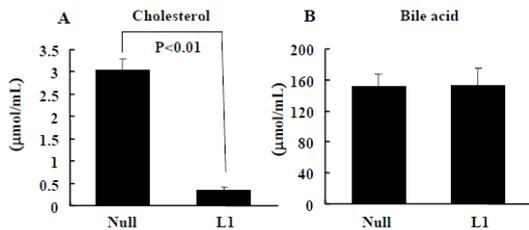


[図 9]



白→; 毛細胆管にNPC1L1が発現している  
 黒→; Kupffer cell (artifactと考える)

[図 10]

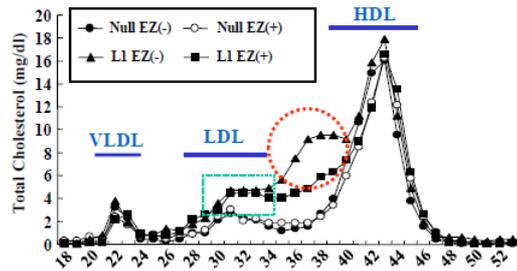


度について解析した。図 10 に示すように、胆汁中の胆汁酸濃度には両群間で相違はなかったが、胆汁中コレステロール濃度は、Ad-Null 群と比較して Ad-L1 群において著明に低下していた。以上より、肝臓の NPC1L1 は胆汁からコレステロールを再吸収する機能を有することが確認された。

血清脂質の解析では、肝臓での NPC1L1 発現は血清総コレステロール値を増加させ (Null 96 mg/dl vs L1 155 mg/dl,  $P<0.01$ )、その増加はエゼチミブ投与により部分的に抑制されることがわかった。この血清コレステロール値の増加が、どのリポ蛋白の増加に起因するのかを検討する目的で FPLC を用いてリポ蛋白に分離して解析したところ、LDL 分画 (図 11 の緑四角) でのコレステロール増加、そしてそのサイズが LDL と HDL の間である、通常の血清では認めないリポ蛋白分画 (図 11 の赤丸) でのコレステロール増加によるものであることが判明した (図 11)。

この新規に出現したリポ蛋白は、遊離コレステロールに富んでおり (総コレステロールの約 50%)、また HDL とほぼ同じ程度の割合のリン脂質も含有していた。ウエスタンブロッ

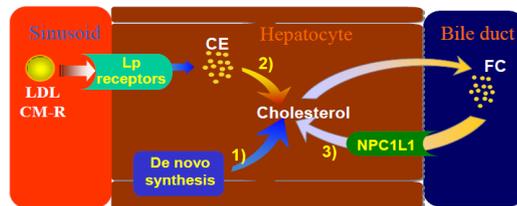
[図 11]



トによる解析では、このリポ蛋白はアポ蛋白 E に富んでいること、アポ蛋白 B は認められないこと、さらに、アガロース電気泳動では -位に泳動されること、などより、HDL に分類される ERL (apoE rich lipoprotein) であると考えられた。

NPC1L1 をアポ E 欠損マウスに発現させた検討では、この LDL と HDL の間に出現したリポ蛋白は出現せず、ERL はアポ E の存在がその出現には必須であると考えられた。また、NPC1L1 は胆汁中からのコレステロールを吸収して肝臓内のコレステロール量を増加させるが、それ以外の機構で肝臓内コレステロールを増加させるモデルとして、コレステロール新生に關与する酵素の一つである LSS (Lanosterol synthase) を過剰発現させる手法での検討を行った。LSS をマウス肝臓に過剰発現させると、NPC1L1 の発現の場合と同様に肝臓内のコレステロール含量は増加したが、NPC1L1 で認められたような血中での ERL 出現は認めなかった。よって、ERL は、NPC1L1 により胆汁中からコレステロールが再吸収された場合に出現する特徴的なリポ蛋白であると考えられた。

[図 12]



このように、ヒトに特徴的であると考えられる肝臓 NPC1L1 は、単に胆汁中からコレステロールを再吸収することにより体内のコレステロールプールを維持するのみでなく、他の肝臓におけるコレステロール増加経路には認められない特徴的な役割を有することが考えられた。今後、この特徴的な役割を

解析し、また、肝臓内でのコレステロール合成による肝臓でのコレステロール増加経路（図 12 の 1）の経路）、LDL 受容体などにより血中からの吸収による肝臓におけるコレステロール増加経路（図 12 の 2）の経路）、と比較検討し、動脈硬化性疾患の予防のため、どのコレステロール増加経路を治療のターゲットとすることがもっとも望ましいかを含め、様々な側面から解明していく予定である(図 12)。

#### 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)

Kurano M, Iso-O N, Hara M, Noiri E, Koike K, Kadowaki T, Tsukamoto K. Plant Sterols Increased IL-6 and TNF- $\alpha$  Secretion from Macrophages, but to a Lesser Extent than Cholesterol. J Atheroscler Thromb, 査読有, 2011 Jan 22. [Epub ahead of print]

Togo M, Hashimoto Y, Iso-O N, Kurano M, Hara M, Kadowaki T, Koike K, Tsukamoto K. Identification of a novel mutation for phytosterolemia. Genetic analyses of 2 cases. 査読有, Clin Chim Acta. 2009 Mar;401(1-2):165-9. Epub 2008 Nov 5

[学会発表](計 7 件)

Kurano M., Tsukamoto K, et al. Modulation of Lipoprotein and Glucose Metabolism with the Over-expression of Niemann-pick C1 Like 1 Protein (NPC1L1) In Mice Liver. American Heart Association 2010 Scientific Sessions. 2010/11/16 Chicago, IL, USA

Kurano M., Tsukamoto K, et al. LXR Agonist Increases ApoE Secretion from HepG2 Spheroid Together with Increased Production of VLDL and ApoE-Rich Large HDL. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010 Scientific Sessions. 2010/04/10. San Francisco, CA, USA.

Kurano M., Tsukamoto K, et al. Plant Sterols Increased Il-6 and TNF- $\alpha$  Secretion from Macrophages but to a Lesser Extent than Cholesterol. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2010 Scientific Sessions. 2010/04/09. San Francisco, CA, USA.

蔵野信、塚本和久 et al. HepG2 スフェ

ロイドの in vitro 脂質代謝研究における有用性 第 44 回 日本成人病(生活習慣病)学会 2010 年 1 月 9 日 東京

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

塚本 和久 (TSUKAMOTO KAZUHISA)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：20251233

##### (2)研究分担者

磯尾 直之 (ISO-O NAOYUKI)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：80420214  
森屋 恭爾 (MORIYA KYOUJI)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：00272550  
藤江 肇 (FUJIE HAJIME)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90332517

##### (3)連携研究者

該当なし