

令和 6 年 5 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04100

研究課題名(和文) 食事由来脂質の吸収/排泄バランスによる生体防御システムの理解と疾患治療への応用

研究課題名(英文) Understanding the biological defense system by absorption/excretion balance of dietary lipids and its application to disease treatment

研究代表者

山梨 義英 (Yamanashi, Yoshihide)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20582018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はコレステロール吸収輸送体であるNPC1L1とコレステロール排出輸送体であるABCG5/G8の活性の違いによる食事由来脂質の吸収/排泄バランスを明らかにするとともに、このバランス制御がNAFLDの発症・進行に及ぼす病態生理学的意義を明らかにすべく計画された。NPC1L1高発現細胞を用いたin vitro輸送実験やNPC1L1遺伝子改変マウスを用いたin vivo実験により、様々な酸化ステロールの消化管吸収および胆汁からの再吸収にNPC1L1が関わるということが明らかとなった。また、NPC1L1により制御される特定の酸化ステロールがNAFLDの病態進行に影響を及ぼすことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまで未解明であったいくつかの食事由来脂質の消化管吸収および胆汁排泄経路について、コレステロール輸送体が関わるということが明らかとなり、生理学的・栄養学的に重要な成果が得られた。また、NAFLDの発症・進行に関わりうる新たな脂質を見出すことにも成功した。この発見は、将来、NAFLDの新たな予防法や治療法の開発ならびに、NAFLDの発症・進行リスクの新規バイオマーカーの開発にも繋がる可能性を秘めており、基礎のみならず臨床的にも重要な成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the absorption/excretion balance of dietary lipids due to differences in the activities of NPC1L1, a cholesterol importer, and ABCG5/G8, a cholesterol exporter, and the pathophysiological significance of the regulation of this balance in the onset and/or progression of NAFLD. In vitro uptake assays using NPC1L1-overexpressing cells and in vivo experiments using NPC1L1 gene-modified mice have revealed that NPC1L1 is involved in the intestinal absorption and biliary reabsorption of various kinds of oxysterols. In addition, specific oxysterols regulated by NPC1L1 were found to affect the progression of NAFLD.

研究分野：脂質動態学

キーワード：脂質トランスポーター 消化管吸収 胆汁排泄 非アルコール性脂肪性肝疾患 トランスレーショナルリサーチ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

食生活の欧米化は、日本人が摂取する脂質の「質」や「量」を大きく変え、様々な脂質関連疾患の発症率上昇に関わるとされている。実際、本邦における非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) の患者数は戦後大きく増加しており、その成人有病率は約3割とまで報告されている。NAFLDは肝硬変や肝癌へと繋がりうる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) へと進行するほか、心血管系疾患のリスクファクターであることも報告されており、健康長寿社会の実現を目指す上で、その予防・克服は喫緊の課題である。しかし、NAFLDの発症・進行に関わる具体的な食事成分やその分子機構については未だ明らかでなく、効果的な予防法や治療薬の開発、発症・進行リスクを予測するバイオマーカーの同定には至っていない。

申請者らは、コレステロール吸収阻害剤エゼチミブ (脂質異常症治療薬として臨床で広く使用されている) の標的蛋白質であり、消化管や肝臓において、ステロールの吸収を担う、Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1: 吸収輸送体) と、その逆方向の輸送を担う ATP-binding cassette transporter G5 と G8 のヘテロダイマー (ABCG5/G8: 排出輸送体) (図1) について研究を進めている。これまでに、両輸送体がコレステロールのみならず、 $\alpha$ -トコフェロール (ビタミンEの主成分) やビタミン K<sub>1</sub> といった脂溶性ビタミンの消化管吸収にも関わることを明らかとしてきた。これら基質の化学構造は大きく異なることから、現在では様々な食事由来脂質が両輸送体により吸収/排泄制御を受けると考えている。

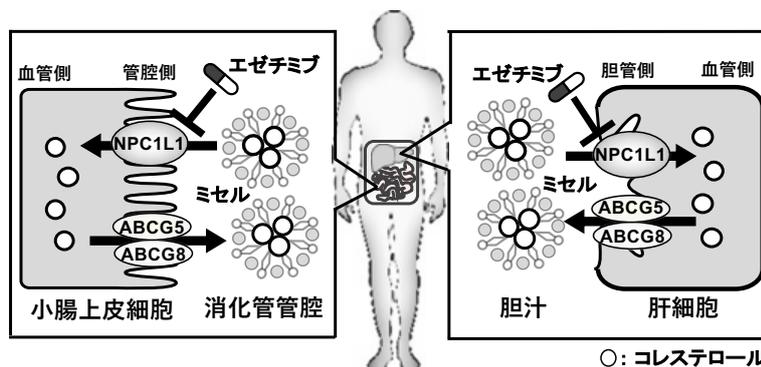


図1. NPC1L1とABCG5/G8によるコレステロールの消化管吸収と胆汁排泄制御

また、遺伝子改変マウスを用いた検討から両輸送体の機能変動 (破綻) が NAFLD の発症・進行に関わることが明らかとなってきたが、その詳細は明らかでない。特に、両輸送体の基質認識の広さを考慮した研究はほとんどなされていない。

### 2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、本研究は以下の2つを目的に企画された。

- (1) NPC1L1 と ABCG5/G8 の生理的基質を網羅的に探索・同定し、その輸送活性バランスを明らかにすることで、脂質の吸収/排泄における合目的制御機構の包括的かつ体系的な理解を目指す。
- (2) 輸送活性バランスに大きな偏りが認められた脂質について、NAFLD の発症・進行に及ぼす影響を明らかにし、脂質の「吸収/排泄効率」と「生理活性」を考慮した、生理的に影響力が大きい新たな治療 (予防) 標的脂質を見出す。

### 3. 研究の方法

- (1) 両輸送体の遺伝子改変マウスと野生型マウスから採取した血液をメタボローム解析に供し、基質候補を網羅的に探索する。各基質候補に対して、両輸送体の *in vitro*、*in vivo* 機能評価系を用いて、輸送能を評価するとともに、そのバランスについて解析を行う。
- (2) 得られた輸送活性バランスや消化管吸収効率・胆汁排泄効率のデータを指標に、生理的に影響力の大きい新たな機能性脂質の候補を探索し、各候補が NAFLD の発症・進行に及ぼす影響とその作用機構を動物モデルを用いて解明する。

#### 4. 研究成果

##### (1) NPC1L1 と ABCG5/G8 の生理的基質の探索・同定

NPC1L1 の *in vitro* 機能評価系を用いた検討により、NPC1L1 がスフィンゴ脂質の1つであるスフィンゴミエリンの取り込み活性を有し、その活性はエゼチミブ感受的であることが見出された。また、NPC1L1 遺伝子欠損マウスを用いた消化管吸収実験により、スフィンゴミエリンの消化管吸収の50%以上がエゼチミブ感受的かつNPC1L1 依存的事であることが明らかとなった (Yamanashi *et al.*, *Nutrients*. 2020)。

ABCG5/G8 についても、*in vitro* 機能評価系を用いた検討により、ビタミン K<sub>1</sub> の排出活性を有することを見出した。また、ABCG5/G8 遺伝子欠損マウスを用いた検討により、生理的にも ABCG5/G8 がビタミン K<sub>1</sub> の胆汁排泄に関わりうることが示唆された (Matsuo *et al.*, *Nutrients*. 2023)。

また、コレステロールの酸化物である酸化ステロールの吸収/排泄動態を検討した結果、一部の酸化ステロールが両輸送体による制御を受けることが見出された (Yamanashi *et al.*, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022)。

このように、本研究を通じて、NPC1L1 ならびに ABCG5/G8 の生理的基質を複数見出すことに成功し、食事由来脂質の消化管吸収および胆汁排泄制御機構について、生理学的・栄養学的に重要な知見が得られた。

##### (2) NAFLD の発症・進行に影響を及ぼす食事由来脂質の探索・同定とそのメカニズム解析

(1) の研究成果および、脂肪肝患者において一部の酸化ステロールの血中濃度が高値を示すことが報告されていることから、酸化ステロールと NAFLD の関連性について検討を進めた。具体的には、コレステロールを加熱して得られる酸化ステロール混合物 (加熱コレステロール) が脂肪肝の発症・進行に及ぼす影響を検討した。また、ヒトと同様に消化管と肝臓で NPC1L1 を高発現する肝臓特異的 NPC1L1 トランスジェニックマウス (NPC1L1 TG マウス) をヒトモデルとして検討に用いた。その結果、加熱コレステロールを与えた NPC1L1 TG マウスでは、野生型マウスとは異なり、高脂肪食誘導性の NAFLD の増悪が認められた (図 2)。この増悪は NPC1L1 阻害剤であるエゼチミブの投与により消失した。以上の結果から、加熱コレステロールは肝臓に発現している NPC1L1 依存的に NAFLD を増悪させることが示唆された。

つづいて、加熱コレステロールによる NAFLD 増悪のメカニズムを検討するために、酸化ステロールが種々の核内受容体のリガンドとして作用することに着目して、様々な核内受容体のアンタゴニスト投与実験を行った。その結果、LXR $\alpha$  および ROR $\gamma$  のアンタゴニストを NPC1L1 TG マウスに投与することで、加熱コレステロールによる NAFLD の増悪が抑制された。また、両アンタゴニストの併用で、NAFLD の増悪はほぼ消失した。以上の結果から、NPC1L1 TG マウスで認められる加熱コレステロール依存的な NAFLD 増悪に LXR $\alpha$  および ROR $\gamma$  が関わることを示唆された。

加熱コレステロールを与えた各マウスの肝臓中酸化ステロールレベルを解析した結果、(1) の検討で、NPC1L1 の基質であることが明らかとなった酸化ステロール分子種は、野生型マウスと比べて、NPC1L1 TG マウスの肝臓でエゼチミブ感受的に増加しており、胆汁中に排泄された酸化ステロールが NPC1L1 により肝臓へと再吸収されることが示唆された。そこで NPC1L1 により再吸収された各酸化ステロールの NAFLD 発症に対する影響を評価す

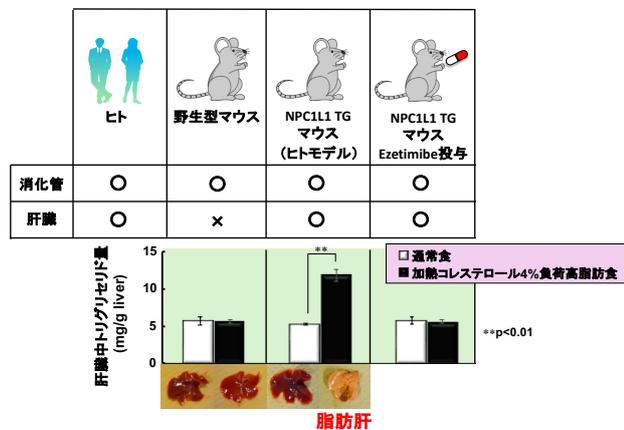


図2. 加熱コレステロールによるエゼチミブ感受的かつ肝臓NPC1L1依存的な NAFLDの発症と増悪

るために、マウス肝臓由来の Hepa1-6 細胞を用いた *in vitro* 脂肪肝モデルを用いて実験を行った。各酸化ステロールの存在下で培養したのち、遊離脂肪酸を添加することで Hepa1-6 細胞の脂肪化を誘導した。このときの細胞内トリグリセリド量を測定したところ、22R-ヒドロキシコレステロール (22R-OHC) または 25-ヒドロキシコレステロール (25-OHC) で処理した場合、対照群に比べて細胞内トリグリセリド量は有意に増加した (図 3)。また、核内受容体のアンタゴニストを用いて検討を行ったところ、22R-OHC は LXR $\alpha$  依存的に、25-OHC は ROR $\gamma$  依存的に細胞内トリグリセリドを増加させることが明らかとなった。

上記 *In vitro* 脂肪肝モデルで候補に挙げられた 22R-OHC および 25-OHC が、加熱コレステロールによる NPC1L1 依存的な NAFLD 増悪に関わっているのか検証するために、両酸化ステロールを個別に負荷した高脂肪食を NPC1L1 TG マウスに与えた結果、NAFLD の増悪が認められた。また、両酸化ステロールを混ぜて高脂肪食に添加した場合は、加熱コレステロール添加時と同程度まで NAFLD の増悪が認められた。以上の結果から、加熱コレステロール中の 22R-OHC および 25-OHC が NPC1L1 依存的な NAFLD 増悪に主に関わっていることが示唆された (図 4)。

ヒトモデルとして用いた NPC1L1 TG マウスで見出された上記知見が、ヒトにも当てはまりうるのかを検討するために、ヒト血液中の酸化ステロール濃度と脂肪肝検査値の 1 つである肝脂肪量測定値 (CAP 値) との相関解析を行った。その結果、解析した 14 種類の酸化ステロール分子種のうち、22R-OHC と 25-OHC の血液中濃度は CAP 値と有意な正の相関を認めた (22R-OHC:R=0.31, p=0.04; 25-OHC:R=0.38, p=0.01)。また、22R-OHC と 25-OHC の血液中濃度の合算値が CAP 値と最も強い正の相関 (R=0.43, p=0.005) を示した。以上の結果から、マウスで認められた知見がヒトにも当てはまりうる可能性が示唆された。

このように、本研究により NAFLD の増悪に関わる酸化ステロール分子種 (22R-OHC と 25-OHC) が明らかとなり、両酸化ステロールに着目した新たな NAFLD の予防・治療法の提案に繋がる事が期待される。

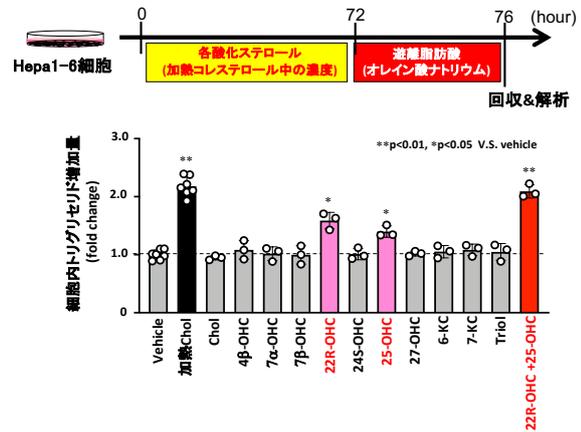


図3. *In vitro* 脂肪肝モデルを用いた各酸化ステロールの脂質蓄積活性

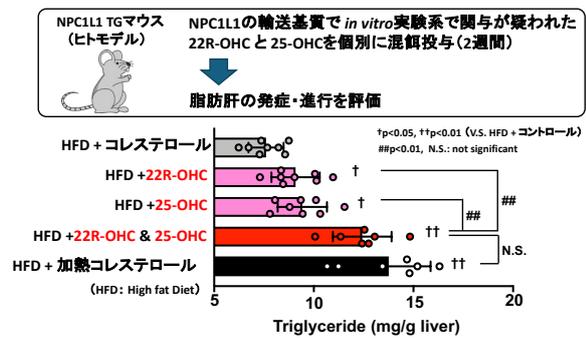


図4. NPC1L1 TGマウスにおける 22R-OHCと25-OHCによるNAFLDの増悪

## 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 Matsuo Michinori, Ogata Yutaka, Yamanashi Yoshihide, Takada Tappei	4. 巻 15
2. 論文標題 ABCG5 and ABCG8 Are Involved in Vitamin K Transport	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu15040998	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, Tanaka Yusuke, Ogata Yutaka, Toyoda Yu, Ito Sayo M., Kitani Maiko, Oshida Natsumi, Okada Kosuke, Shoda Junichi, Suzuki Hiroshi	4. 巻 156
2. 論文標題 Hepatic Niemann-Pick C1-Like 1 exacerbates non-alcoholic fatty liver disease by re-absorbing specific biliary oxysterols	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 113877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2022.113877	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 Ogura M, Toyoda Y, Sakiyama M, Kawamura Y, Nakayama A, Yamanashi Y, Takada T, Shimizu S, Higashino T, Nakajima M, Naito M, Hishida A, Kawai S, Okada R, Sasaki M, Ayaori M, Suzuki H, Takata K, Ikewaki K, Harada-Shiba M, Shinomiya N, Matsuo H	4. 巻 34
2. 論文標題 Increase of serum uric acid levels associated with APOE 2 haplotype: a clinico-genetic investigation and in vivo approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 1727 ~ 1733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-021-00609-w	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 ~ 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14件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 山梨 義英、高田 龍平、田中 悠介、緒方 裕、豊田 優、伊藤（松岡） 紗代、木谷 真依子、押田 夏海、岡田 浩介、正田 純一、鈴木 洋史
2. 発表標題 Niemann-Pick C1-Like 1による非アルコール性脂肪肝の発症・増悪に関わる酸化ステロールの胆汁排泄制御
3. 学会等名 第55回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yamanashi Y, Tanaka Y, Ogata Y, Toyoda Y, Ito S, Kitani M, Oshida N, Okada K, Shoda J, Suzuki H, Takada T
2. 発表標題 Hepatic NPC1L1 exacerbates NAFLD by suppressing biliary excretion of oxysterols
3. 学会等名 2023 International Joint Meetings of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics in Shizuoka (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山梨 義英、緒方 裕、豊田 優、伊藤 紗代、高田 龍平
2. 発表標題 コレステロール吸収輸送体NPC1L1の病態生理学的役割
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山梨義英、高田龍平、田中悠介、緒方裕、豊田優、伊藤紗代、木谷真依子、押田夏海、岡田浩介、正田純一、鈴木洋史
2. 発表標題 肝臓のNPC1L1による酸化ステロールの胆汁排泄抑制と非アルコール性脂肪肝の増悪
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山梨義英、高田龍平、鈴木洋史
2. 発表標題 コレステロールトランスポーターによる脂溶性物質の体内動態制御と病態生理学的意義
3. 学会等名 第75回 日本栄養・食糧学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山梨義英
2. 発表標題 健康・疾患治療に影響する脂質の体内での動きとその制御メカニズム
3. 学会等名 第17回 摂大農学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊田優、高田龍平、梅澤雅和、山梨義英、武田健、鈴木洋史
2. 発表標題 新規NAFLD動物モデル：ヒトNPC1L1肝発現マウスを用いた脂肪肝増悪機序に関する研究
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊田 優, 高田 龍平, 山梨 義英, 鈴木 洋史
2. 発表標題 肝臓のNPC1L1依存的な高脂肪食性脂肪肝とVLDL分泌の低下
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田 龍平, 山梨 義英, 伊藤 紗代[松岡], 豊田 優, 山本 武人, 鈴木 洋史
2. 発表標題 消化吸収とトランスポーター 脂溶性ビタミンの消化吸収とトランスポーター
3. 学会等名 第51回日本消化吸収学会 (招待講演)
4. 発表年 2020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

1. 発表者名 Sayo M Ito, Yoshihide Yamanashi, Tappei Takada, Hiroshi Suzuki
2. 発表標題 Effect of co-administration of warfarin and prednisolone on anticoagulant therapy and its possible mechanism in relation to the Niemann-Pick C1-like 1-mediated pathway
3. 学会等名 7th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC2020 Virtual) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tappei Takada, Yu Toyoda, Yoshihide Yamanashi, Hiroshi Suzuki
2. 発表標題 Ezetimibe-mediated prevention and recovery of hepatic NPC1L1-dependent dietary steatosis in mice
3. 学会等名 7th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC2020 Virtual) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takehito Yamamoto, Tappei Takada, Jeng Kae Tan, Hiroshi Miyata, Yoshihide Yamanashi, Yu Toyoda, Hiroshi Suzuki
2. 発表標題 ABCG2 is a physiological exporter of indoxyl sulfate, and its dysfunction accelerates the progression of chronic kidney disease
3. 学会等名 7th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC2020 Virtual) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田 龍平, 豊田 優, 山梨 義英, 鈴木 洋史
2. 発表標題 脂肪肝増悪因子としてのコレステロールトランスポーターNPC1L1に関する研究
3. 学会等名 生理研研究会『上皮膜輸送の多様性・調和機構を基盤とする異分野融合研究の創出』(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担者	徳田 慶太  (Tokuda Keita)  (50762176)	順天堂大学・健康データサイエンス学部・講師   (32620)	
研究 分担者	豊田 優  (Toyoda Yu)  (80650340)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員   (12601)	

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