

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790152

研究課題名(和文) 高コレステロール血症個別化治療を指向したコレステロールの小腸上皮細胞内動態解析

研究課題名(英文) Analysis of intestinal cholesterol absorption for the personalized medicine against hypercholesterolemia

研究代表者

渡邊 博志(WATANABE HIROSHI)

熊本大学・薬学部・講師

研究者番号：70398220

研究成果の概要(和文)：LDL由来のコレステロールのエンドソームから小胞体までの輸送は trans-Golgi network(TGN) を経由していること、また、その過程には VAMP4/syntaxin6/syntaxin16/Vtila から成る soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex が関与する膜小胞輸送が寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We show that, when parental Chinese hamster ovary (CHO) cells are briefly exposed to ³H-cholesteryl linoleate (CL) labeled-LDL, newly liberated ³H-LDL-CHOL appears in membranes rich in trans-Golgi network (TGN) long before it becomes available for re-esterification at the endoplasmic reticulum (ER) or for efflux at the plasma membrane. In mutant cells lacking NPC1, the appearance of newly liberated ³H-LDL-CHOL in the TGN-rich fractions is much reduced. We demonstrate that knockdown by RNAi of 3 TGN-specific SNAREs (VAMP4, syntaxin 6, and syntaxin 16) reduces >/=50% of the LDL-CHOL transport in intact cells and in vitro.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：コレステロール、トランスポータ、代謝酵素、体内動態、腎不全

1. 研究開始当初の背景

過去の臨床試験において、Sudhop らはエゼチミブ投与後のコレステロール吸収の割合並びに血中 LDL-コレステロール低下率に有意な個人間変動があることを突き止めた

(Sudhop T et al. *Circulation* 2002)。これを受けて、Simon らは SNP ジェノタイピング解析の結果、エゼチミブによく反応してコレステロールが低下した人と、そうでなかった人の間では NPC1L1 のいくつかの

SNP の頻度に差があることを確認した (Simon JS et al. *Genomics* 2005)。これらの結果は、エゼチミブの効果は NPC1L1 バリエーション間で異なることを示唆する。また、SEAS 試験(シンバスタチンとエゼチミブ併用臨床試験)の結果、エゼチミブ投与群ではプラセボ群に比べて癌の診断及び癌による死亡の割合が多く観察された (Richard P et al. *N Engl J Med* 2008)。すなわち、今後の高コレステロール血症に対する個別化治療の進展には新しい作用機序を持つコレステロール吸収阻害薬の開発が急務の課題となっている。

小腸におけるコレステロール吸収・排泄メカニズムに関しては、国内外で熾烈な研究競争が行われている。近年の報告から、小腸上皮細胞で NPC1L1 に結合し、エンドサイトーシスにより細胞内に吸収されたコレステロールの一部は、ABCG5/G8 により再度排泄されるが、ほとんどは細胞内で Acyl-CoA cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) によりコレステロールエステルに変換されてカイロミクロンとなりリンパ管に送り出される。(Chang TY et al. *Cell Metabolism* 2008) しかしながら、その全貌を解明するには至っていない。

2. 研究の目的

(1) コレステロールの消化管吸収機序の解明のため、培養細胞系を用いた生化学的・免疫学的手法を用いて精査し、個別化治療を指向した新規コレステロール吸収阻害薬開発の基盤確立に有用な情報を得る。

(2) 腎疾患時における薬物や脂質関連分子の腎外クリアランス変動の機序解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いて、LDL-コレステロールの pulse-chase 実験を行い、OptiPrep™ 密度勾配遠心法を用いた細胞分画に加え、細胞内の各小器官特異的蛋白に対する特異抗体

を用いた免疫沈降並びに RNAi 等の手法を組み合わせることでコレステロールの細胞内動態を把握する。

(2) ラット初代培養肝細胞を用いる。培養液中に、10%健常人及び腎不全患者血清を添加後、トランスポーター群 (OATP, PGT, NTCP, OCT, P-gp, MRP, BSEP, BCRP)、CYP 分子種 (3A4, 2C19, 2C19, 2, 2D6, 2E1, 1A2) 及び抱合酵素 (NAT, UGT, SULT) などの発現変動を確認する。加えて、5/6 腎臓摘出ラット (慢性腎不全モデルラット: CRF ラット) を作製し、肝薬物・脂質動態制御タンパク質の発現と活性について精査する。

4. 研究成果

CHO 細胞を用いた生化学的・免疫学的解析により、LDL に含まれるコレステロールエステルは LDL 受容体を介して細胞内に取り込まれた後、エンドソームの一部である Acid lipase コンパートメントにて加水分解を受けることでコレステロールを生成する。生成したコレステロールのエンドソームから小胞体までの輸送は trans-Golgi network (TGN) を経由していること、また、その過程には VAMP4/syntaxin6/syntaxin16/Vtila から成る soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) complex が関与する膜小胞輸送が大きく寄与していることを明らかにした。

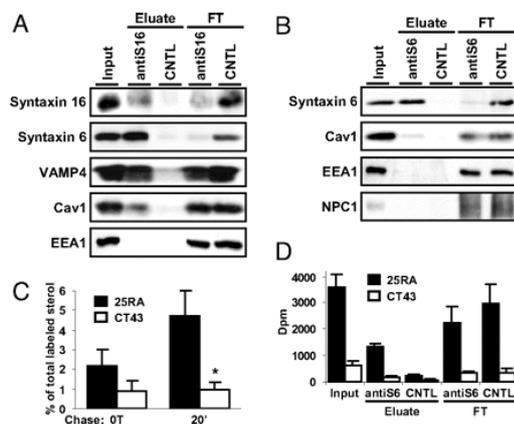


Fig.1 Association of ^3H -LDL-CHOL with syntaxin 6-rich and syntaxin 16-rich membranes in intact 25RA cells. The 25RA and CT43 cells were pulsed with ^3H -CL-LDL and chased in Medium A for 20 min. (A and C) The PNSs were immunoadsorbed with rabbit anti-syntaxin 16 (antiS16) antibodies or nonspecific rabbit antibodies (CNTL). (B and D) The PNSs were fractionated by OptiPrep density gradient ultracentrifugation; the syntaxin 6-rich fractions (fraction 5) were isolated and immunoadsorbed with rabbit anti-syntaxin 6 (antiS6) antibodies or nonspecific rabbit antibodies (CNTL). (A and B) Associated proteins were analyzed by immunoblot using appropriate antibodies as indicated. The 25RA cells were used. (C and D) ^3H -LDL-CHOL counts in the eluates were analyzed after lipid extraction and TLC. Values are presented as the percentage of total labeled sterol (C). The data are means \pm SD from 2 experiments. *, $P < 0.05$ by Student's t test.

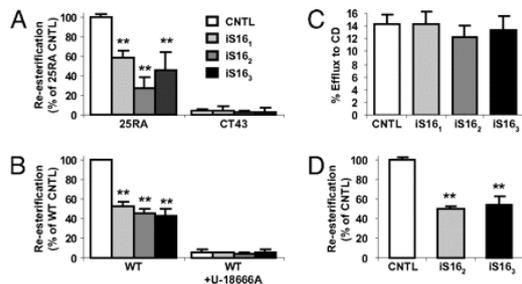


Fig.2 Syntaxin 16 KDs reduce ^3H -LDL-CHOL re-esterification in intact 25RA, WT cells, or reconstituted 25RA cell system. The 25RA, CT43, or WT cells were transfected with control (CNTL) or syntaxin 16 (iS16₁-iS16₃) siRNA and incubated for 72 h, then pulsed with ^3H -CL-LDL. (A) Re-esterification in the 25RA or CT43 cells; chase time, 3 h. Data are means \pm SD from 3 experiments. (B) Re-esterification in the WT cells treated with or without 0.3 μM U-18666A; chase time, 6 h. Data are means \pm SD from 2 experiments. (C) Efflux to CD in the 25RA cells; chase time, 3 h. Data are means \pm SD from 3 experiments. (D) Re-esterification in reconstituted 25RA cell system. Incubation time, 3 h. Data are

means \pm SD from 2 experiments. **, $P < 0.01$ by Student's t test.

次に、CRF ラットにおける肝臓に局在するトランスポータ、代謝酵素の mRNA 発現量評価を行った。その結果トランスポータについては MDR1a、MRP3 において mRNA 発現レベルの優位な上昇が見られた。CYP については CYP1A2 において有意な mRNA 発現量の上昇が、CYP3A2 において有意な mRNA 発現レベルの現象が見られた。抱合酵素については UGT1a1 において上昇傾向が見られた。

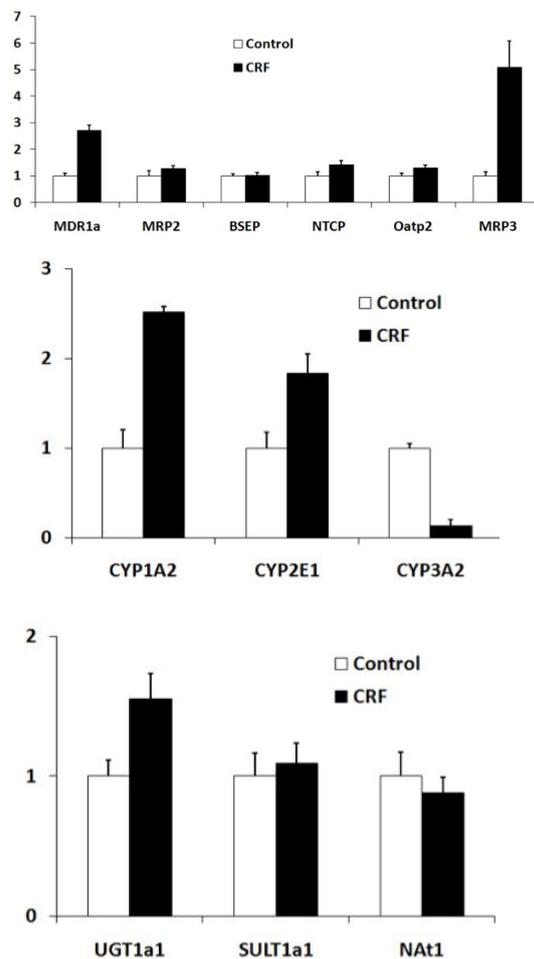


Fig. 3 Expression of hepatic transporters and metabolic enzymes in CRF rats. Expressions were determined by real-time RT PCR. **: $P < 0.01$ compared vs control. Values are expressed as mean \pm SE

さらに、血清クレアチニン濃度と mRNA 発

現レベルの変化について相関を調べてみたところ、MDR1a, MRP3, CYP1A2 について有意な正の相関が見られ、CYP3A2 について有意な負の相関が見られた。よって腎障害の程度と発現量の変化が関連しているということが示唆された。

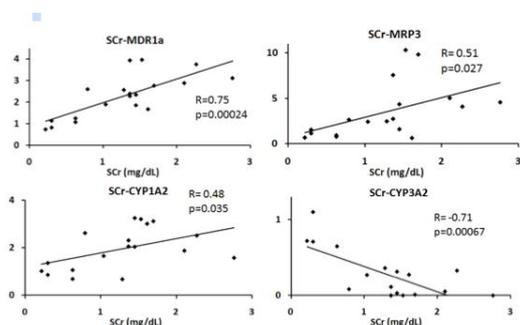


Fig. 4 Correlation between SCr and the expression of hepatic transporters or metabolic enzymes. Expressions were determined by real-time RT PCR.

腎不全時に血中に高濃度蓄積する尿毒症物質の中でも副甲状腺ホルモン (iPTH) に着目し、iPTH を過去の報告におけるヒトの最大血中濃度の C_{max} および尿症患者における平均血中濃度 C_u で 12 時間処理を行い、上述したタンパク質の発現量に及ぼす iPTH の影響について、ラット由来初代培養肝細胞を用いて検討を行った。その結果、各種肝トランスポータの発現量は全てのトランスポータ (MDR1a, MRP2, BSEP, NTCP, Oatp2 MRP3) について iPTH 濃度依存的な上昇傾向が観察された。同様の条件で各種 CYP について検討したところ CYP1A2, CYP3A2 について減少傾向が観察され、CYP2E1 については有意な差は観察されなかった。さらに、抱合酵素についても検討してみたところ、UGT1a1, SULT1a1 について濃度依存的な上昇傾向が観察され、Nat1 については有意な変化は観察されなかった。以上のように、腎不全時に体内に蓄積する iPTH がトランスポータや代謝酵素の発現量を変動させる因子であることを明らか

にした。

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 12 件)

1. Nishi K, Ono T, Nakamura T, Fukunaga N, Izumi M, Watanabe H, Suenaga A, Maruyama T, Yamagata Y, Curry S, Otagiri M. Structural insights into differences in drug binding selectivity between two forms of human $\{\alpha\}$ 1-acid glycoprotein genetic variants, the A and F1*S forms. J Biol Chem. 査読有(2011) in press
2. Miyamoto Y, Watanabe H, Noguchi T, Kotani S, Nakajima M, Kadowaki D, Otagiri M, Maruyama T. Organic anion transporters play an important role in the uptake of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney. Nephrol Dial Transplant. 査読有(2011) in press
3. Taguchi K, Ogaki S, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M. Fluid Resuscitation with Hemoglobin Vesicles Prevents Escherichia coli Growth via Complement Activation in a Hemorrhagic Shock Rat Model. J Pharmacol Exp Ther. 査読有(2011) 337: 201-8.
4. Tanaka M, Tokunaga K, Komaba H, Itoh K, Matsushita K, Watanabe H, Kadowaki D, Maruyama T, Otagiri M, Fukagawa M. Vitamin d receptor activator reduces oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. Ther Apher Dial. 査読有(2011) 15: 161-8.
5. Miyamoto Y, Watanabe H, Otagiri M, Maruyama T. New insight into the redox properties of uremic solute indoxyl sulfate as a pro- and anti-oxidant. Ther Apher Dial. 査読有(2011) 15:129-31.
6. Taguchi K, Iwao Y, Watanabe H,

- Kadowaki D, Sakai H, Kobayashi K, Horinouchi H, Maruyama T, Otagiri M. Repeated injection of high doses of hemoglobin-encapsulated liposomes (hemoglobin vesicles) induces accelerated blood clearance in a hemorrhagic shock rat model. *Drug Metab Dispos.* 査読有(2011) 39:484-9.
7. Taguchi K, Miyasato M, Watanabe H, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, Otagiri M. Alteration in the pharmacokinetics of hemoglobin-vesicles in a rat model of chronic liver cirrhosis is associated with Kupffer cell phagocyte activity. *J Pharm Sci.* 査読有(2011) 100:775-83.
 8. Taguchi K, Urata Y, Anraku M, Watanabe H, Kawai K, Komatsu T, Tsuchida E, Maruyama T, Otagiri M. Superior plasma retention of a cross-linked human serum albumin dimer in nephrotic rats as a new type of plasma expander. *Drug Metab Dispos.* 査読有(2010) 38:2124-9.
 9. Taguchi K, Miyasato M, Ujihira H, Watanabe H, Kadowaki D, Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, Kobayashi K, Maruyama T, Otagiri M. Hepatically-metabolized and -excreted artificial oxygen carrier, hemoglobin vesicles, can be safely used under conditions of hepatic impairment. *Toxicol Appl Pharmacol.* 査読有(2010) 248:234-41.
 10. Ikuta S, Chuang VT, Ishima Y, Nakajou K, Furukawa M, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M. Albumin fusion of thioredoxin-the production and evaluation of its biological activity for potential therapeutic applications. *J Control Release.* 査読有(2010) 147:17-23.
 11. Miyamoto Y, Iwao Y, Tasaki Y, Sato K, Ishima Y, Watanabe H, Kadowaki D, Maruyama T, Otagiri M. The uremic solute indoxyl sulfate acts as an antioxidant against superoxide anion radicals under normal-physiological conditions. *FEBS Lett.* 査読有(2010) 584:2816-20.
 12. Hirata K, Maruyama T, Watanabe H, Maeda H, Nakajou K, Iwao Y, Ishima Y, Katsumi H, Hashida M, Otagiri M. Genetically engineered mannosylated-human serum albumin as a versatile carrier for liver-selective therapeutics. *J Control Release.* 査読有(2010) 145:9-16.
- [学会発表] (計 19 件)
1. 宮本洋平、岩尾康範、米良克美、渡邊博志、門脇大介、異島優、佐藤圭創、小田切優樹、丸山徹 尿毒症物質 CMPF の酸化ストレス誘発メカニズム 日本薬学会第 131 年会 (ツインメッセ静岡, 2011, 3/28-31)
 2. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、門脇大介、小田切優樹、丸山徹 一酸化炭素結合型赤血球による肝 CYP 保護効果. 日本薬学会第 131 年会 (静岡, グランシップ, 2011, 3/28-31)
 3. 田中遼大, 古川真斗, 異島優, 田中健一郎, 水島徹, 渡邊博志, 小田切優樹, 丸山徹. プレオマイシン誘発肺線維症に対するアルブミン-チオレドキシン融合体の有用性評価 日本薬学会第 131 年会 (静岡, グランシップ, 2011, 3/28-31)
 4. 南雲恒平, 杉森剛志, 窪田和幸, 山田尚之, 異島優, 渡邊博志, 田中基彦, 佐々木裕, 小田切優樹, 丸山徹. MS 解析を用いた慢性肝炎時におけるヒト血清アルブミンのレドックス解析と構造及び機能との関連性 日本薬学会大 131 年会 (静岡, グランシップ, 2011, 3/28-31)
 5. 本田大輔、宮本洋平、渡邊博志、門脇大介、丸山徹、小田切優樹 尿毒症物質 p-cresyl sulfate の酸化ストレスに及ぼす影響. 日本薬学会第 131 年会 (ツインメッセ静岡, 2011, 3/28-31)
 6. 南雲恒平, 杉森剛志, 田中基彦, 佐々木裕, 異島優, 渡邊博志, 窪田和幸, 山田尚之, 小田切優樹, 丸山徹. 肝疾患時におけるアルブミンの構造及び機能評価. 第 27 回日本薬学会九州支部大会 (長崎大学薬学部, 2010, 12/11-12)
 7. 田中遼大, 古川真斗, 異島優, 田中健一郎, 水島徹, 渡邊博志, 小田切優樹, 丸山徹. BLM 誘発肺線維症に対する

アルブミン-チオレドキシシン融合タンパク質の有用性評価 第27回日本薬学会九州支部大会(長崎大学薬学部, 2010, 12/11-12)

8. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹. 一酸化炭素を付加した赤血球は大量出血時における肝チトクロームP450を保護する. 第27回日本薬学会九州支部大会(長崎大学薬学部, 2010, 12/11-12)

9. 宮本洋平、岩尾康範、渡邊博志、門脇大介、佐藤圭創、小田切優樹、丸山徹 尿毒症物質CMPFの生体内レドックス特性 第27回臨床フリーラジカル会議(京都, 烟川, 2010, 12/3-4)

10. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹 出血性ショックモデルラットにおける一酸化炭素結合型赤血球の肝チトクロームP450保護効果. 第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム(富山国際会議場, 2010, 11/29-30)

11. Komori H, Watanabe H, Syuto T, Maruyama T, Otagiri M. l-acid glycoprotein enhances the expression of hemoglobin scavenge receptor CD163 through the activation of TLR4 signaling 第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(東京大学武田先端知ビル, 2010, 11/27-28)

12. Komori H, Uehara N, Nishi K, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M. Involvement of hemoglobin \cdot -chain on plasma membrane in uptake of human \cdot -l-acid glycoprotein into liver The Pharmaceutical Sciences World Congress 2010, 2010 11/14-18, Morial Convention Center, New Orleans, USA

13. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹 出血性ショックモデルラットにおける一酸化炭素結合型赤血球のチトクロームP450の保護効果. 第17回日本血液代替物学会(熊本国際交流会館, 2010, 10/18-19)

14. Kohei Nagumo, Tsuyoshi Sugimori, Motohiko Tanaka, Yutaka Sasaki, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Kazuyuki Kubota, Naoyuki Yamada, Masaki Otagiri and Toru Maruyama. CHARACTERIZATION OF STRUCTURE AND FUNCTION OF HUMAN SERUM ALBUMIN IN PATIENTS WITH LIVER DISEASE 日本薬物動態学会 第25回年会(大宮ソニックシティ,

2010, 10/7-9)

15. 田中遼大, 古川真斗, 異島優, 田中健一郎, 水島徹, 渡邊博志, 小田切優樹, 丸山徹. IMPROVED THERAPEUTIC EFFECT OF THIOREDOXIN BY FUSION TO HUMAN SERUM ALBUMIN AGAINST BLEOMYCIN-INDUCED PULMONARY FIBROSIS 日本薬物動態学会 第25回年会(大宮ソニックシティ, 2010, 10/7-9)

16. Komori H, Watanabe H, Syuto T, Maruyama T, Otagiri M. l-酸性糖タンパク質によるCD163の発現誘導 第35回西日本薬剤学研究会(大分, 九重共同研修所, 2010, 9/17-18)

17. Komori H, Uehara N, Nishi K, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M. Hepatic uptake of \cdot -l-acid glycoprotein through hemoglobin \cdot -chain-mediated endocytic pathway 9th International ISSX meeting, 2010 9/4-8, Istanbul Lutfi Kirdar Convention and Exhibition Center-Harbiye, Istanbul, Turkey

18. 宮本洋平、岩尾康範、渡邊博志、門脇大介、佐藤圭創、小田切優樹、丸山徹 尿毒症物質CMPFの酸化ストレス誘発機序解明 第25回日本薬剤学会(あわぎんホール 徳島県郷土文化会館, 2010, 5/11-14)

19. 大柿滋、田口和明、渡邊博志、小田切優樹、丸山徹 一酸化炭素結合型赤血球による肝チトクロームP450の保護効果. 第25回日本薬剤学会(あわぎんホール 徳島県郷土文化会館, 2010, 5/11-14)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/Yakuzai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 博志(WATANABE HIROSHI)

熊本大学・薬学部・講師

研究者番号: 70398220