

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890033

研究課題名（和文）脂質異常症の個別化医療を指向した消化管コレステロール吸収の性差と
その分子機構の解明研究課題名（英文）Investigation of the gender difference in the intestinal cholesterol
absorption for the development of personalized therapy in dyslipidemia

研究代表者

山梨 義英 (YAMANASHI YOSHIHIDE)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20582018

研究成果の概要（和文）：

本研究により、消化管コレステロール吸収および胆汁中からのコレステロール再吸収を担う Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) の mRNA 発現量が、エストロゲン受容体 α (ER α) 発現細胞において、女性ホルモン(エストロゲン) 負荷により上昇することが明らかとなった。また、NPC1L1 の新規機能として、細胞内コレステロール輸送やコレステロール胆汁排泄の促進因子として働く Niemann-Pick C2 (NPC2) の発現・分泌量を負に制御することを見出した。これらの成果は、NPC1L1 発現量の性差と脂質異常症に対する治療効果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 play an important role in the intestinal cholesterol absorption and biliary cholesterol re-absorption. In the present study, we revealed that mRNA expression of NPC1L1 is increased by female hormone (estrogen) in estrogen receptor α (ER α)-expressing cells. In addition, we found the novel function of NPC1L1 as a negative regulator of protein expression and secretion of Niemann-Pick C2 (NPC2), which controls intracellular cholesterol trafficking and promotes biliary cholesterol secretion. These results would be important to consider the relationship between the gender difference in the expression level of NPC1L1 and the benefit of treatment for dyslipidemia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医療系薬学

キーワード：発現制御・消化管吸収・胆汁

1. 研究開始当初の背景

生体内でのコレステロール恒常性は体内での合成、異化、消化管からの吸収そして胆汁中への排泄のバランスの上に成り立っている。このうちコレステロールの消化管吸収ならびに胆汁排泄については、その分子機構について不明な点が多かったが、近年、種々の脂質輸送担体が相次いで同定されたことで研究が大きく進展した。

小腸上皮細胞の管腔側膜に発現する Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) は、その遺伝子改変マウスを用いた解析や *in vitro* 機能解析から、コレステロール・植物ステロール・ α -トコフェロールの胆汁ミセルからの吸収に働くと考えられ、消化管コレステロール吸収を阻害する新規脂質異常症治療薬エゼチミブの薬効標的であるとされている。また、ヒトにおいてはラットやマウスと異なり、肝細胞毛細胆管側膜においても高発現しており、胆汁から肝細胞へのコレステロール再吸収に関与することが示唆されている。

現在までに、ヒトにおける NPC1L1 の遺伝子変異や多型も報告されており、いくつかの変異は NPC1L1 の発現量低下や機能活性の低下をもたらすことが示唆されている。このことから消化管コレステロール吸収やコレステロール胆汁排泄の個人差、ならびにエゼチミブの薬理効果の個人差を規定する重要なファクターの1つとして、NPC1L1 の発現量および機能活性の個人差が考えられた。

2. 研究の目的

上記背景のもと、申請者らは、日本人における NPC1L1 の遺伝子変異と消化管コレステロール吸収効率の関連性について研究を進めてきた。解析を進める中で、消化管コレステロール吸収効率の指標である血漿中の Campesterol と Lathosterol の比率 (Ca:L ratio) に有意な性差が存在し、男性に比べて女性で約 1.6 倍高いことを見出した。また、ヒト肝臓切片を用いた解析により、NPC1L1 の蛋白質発現量は男性に比べて女性で高い傾向が観察された。このことから、NPC1L1 の発現量に男女差が存在し、消化管コレステロール吸収やコレステロールの胆汁排泄に性差をもたらす可能性が考えられた。さらに、加齢に伴い、女性の Ca:L ratio の低下する傾向が観察されたことから、この性差の原因は女性ホルモンであると考えられた。

そこで本研究では、NPC1L1 の発現量に及ぼす女性ホルモンの影響について検討を行い、NPC1L1 発現量の新規制御機構の解明を目指すとともに、コレステロール吸収阻害剤であ

るエゼチミブの薬効に及ぼす女性ホルモンの影響を解析し、性別と年齢を考慮したエゼチミブの適正使用ならびに個々人に応じた脂質異常症治療薬の薬剤選択に新たな分子基盤を与えることを目的とした。

3. 研究の方法

女性ホルモンが NPC1L1 の発現量に及ぼす影響について、女性ホルモンを生理的リガンドとする核内受容体で消化管や肝臓における発現が確認されている estrogen receptor α (ER α) の発現条件下で解析することとした。まず、ヒト ER α を発現するアデノウィルスを作製し、内因性に NPC1L1 が発現しているヒト肝臓由来の HepG2 細胞に感染させることで ER α 高発現細胞を得た。構築した ER α 発現細胞を用いて、女性ホルモン添加による NPC1L1 発現量の変化を定量的 PCR により解析した。また、女性ホルモンが NPC1L1 の転写活性に及ぼす影響を検討するために、ヒト NPC1L1 遺伝子の 5' -上流域 (約 1300bp) を組み込んだレポーターベクターをヒト ER α 発現ベクターとともに HepG2 細胞に共導入し、女性ホルモン添加による転写活性の変動をルシフェラーゼアッセイにより解析した。

コレステロール胆汁排泄の個人差を考える上で重要なファクターとなる胆汁中 Niemann-Pick C2 (NPC2) の生理機能ならびに NPC1L1 と NPC2 の機能連関を明らかにするために、アデノウィルスによる遺伝子導入システムを用いて、各蛋白質の発現量を人為的に変動させたマウスならびに HepG2 細胞を作出し、それらを種々の生化学的手法により解析した。

4. 研究成果

(1) エストラジオールによる NPC1L1 の mRNA 発現量の上昇

ヒト ER α を高発現した HepG2 細胞において、女性ホルモンの1つであるエストラジオールを細胞培養液中に添加することで、内因性 NPC1L1 の mRNA 量の上昇が観察された。これは NPC1L1 の発現量が女性ホルモンにより正に制御されることを示唆するものであり、消化管コレステロール吸収効率の男女差 (女性 > 男性) を説明し得る重要な知見である。次いで、この NPC1L1 mRNA 量上昇の分子メカニズムを明らかにする為に、ルシフェラーゼアッセイにより、NPC1L1 の転写活性に及ぼすエストラジオールの影響を解析した。その結果、エストラジオールの添加により、ルシフェラーゼ活性の上昇は観察されたものの、こ

の活性上昇は NPC1L1 の上流配列を含まないコントロールベクターでも同程度に観察されたことから、NPC1L1 上流配列に特異的な転写活性の上昇は見出されなかった。用いたレポーターベクター自体に女性ホルモン応答性の配列が含まれている可能性があり、異なる種類のレポーターベクターを用いて改めて解析を行うべく実験系を構築中である。また、女性ホルモンによる NPC1L1 mRNA の安定化といった、転写活性化以外のメカニズムに関しても検証中である。

(2) NPC1L1 によるコレステロール胆汁排泄促進因子 NPC2 の発現・分泌制御

コレステロールの胆汁排泄に関する新たな知見として、コレステロール結合蛋白質 NPC2 による制御機構を見出した。これまで、胆汁中に分泌された NPC2 の生理機能に関しては未解明であったが、アデノウイルスによる遺伝子導入システムを用いて作出した肝臓特異的 NPC2 ノックダウンマウスや NPC2 高発現マウスの胆汁脂質解析により、胆汁中 NPC2 がコレステロールの胆汁排泄を正に制御していることが明らかとなった。この制御機構はコレステロール排出トランスポーターである ATP-binding cassette G5 (ABCG5) と G8 (ABCG8) を欠損したマウスでは認められないことから、NPC2 が ABCG5/G8 依存的にコレステロール輸送活性を制御することが示唆された。

そこで、NPC2 分泌量に関しても、その制御機構ならびに性差の有無に関して検討を行った。HepG2 細胞を用いた解析の結果、NPC1L1 の発現量変動に伴って、NPC2 の発現量ならびに分泌量が NPC1L1 とは逆方向に変動することが明らかとなった。NPC2 mRNA 量には変化が認められないことから、NPC1L1 が転写以降の段階で NPC2 の発現量および分泌量を負に制御していることが示唆された。さらに、種々の分子生物学的解析により、小胞体において NPC1L1 が NPC2 の成熟過程を阻害し、NPC2 の分泌ならびに蛋白質の安定性を低下させることが明らかとなった。これらの結果は、NPC1L1 の新規機能を明らかにし、NPC2 の新たな分泌制御機構を見出した点で生理学的に非常に意義が大きいといえる。エストロゲンによる NPC1L1 の発現量上昇の結果を考え合わせると、胆汁中 NPC2 量ならびにコレステロールの胆汁排泄量に関しても NPC1L1 を介した性差が存在する可能性が考えられた。

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 2 件、全て査読あり)

(1) Yamanashi Y, Takada T, Shoda J and Suzuki H. Novel function of Niemann-Pick C1-like 1 as a negative regulator of Niemann-Pick C2 protein. **Hepatology**. 55(3), 953-64 (2012), DOI:10.1002/hep.24772

(2) Yamanashi Y, Takada T, Yoshikado T, Shoda J and Suzuki H. NPC2 regulates biliary cholesterol secretion via stimulation of ABCG5/G8-mediated cholesterol transport. **Gastroenterology**. 140(5), 1664-74 (2011), DOI: 10.1053/j.gastro.2011.01.050

[学会発表] (計 5 件)

(1) 山梨義英、高田龍平、鈴木洋史 コレステロール結合蛋白質 NPC2 による ABCG5/G8 依存的なコレステロール胆汁排泄促進作用 第 53 回日本脂質生化学会 東京 2011 年 5 月 12 日～13 日

(2) 山梨義英、高田龍平、吉門崇、鈴木洋史 Stimulatory effect of biliary NPC2 on ABCG5/G8-mediated cholesterol secretion. 第 25 回日本薬物動態学会年会 大宮 2010 年 10 月 7 日～9 日

(3) 山梨義英、高田龍平、吉門崇、鈴木洋史 コレステロール排出トランスポーター ABCG5/G8 と胆汁中蛋白質 NPC2 の機能連関の解析 第 5 回トランスポーター研究会 東京 2010 年 7 月 10 日～11 日

(4) 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 第 18 回肝病態生理研究会 山形 2010 年 5 月 26 日

(5) 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

[図書] (計 3 件)

(1) 高田龍平、山梨義英、鈴木洋史 コレステロールの胆汁排泄におけるトランスポー トソーム 日本薬理学雑誌 139(2), 56-60 (2012).

(2) 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).

(3) 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).

[その他]

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山梨 義英 (YAMANASHI YOSHIHIDE)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：20582018

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし