

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：23903  
研究種目：基盤研究(C)  
研究期間：2011～2014  
課題番号：23591338  
研究課題名(和文)ステロール代謝平衡における小腸細胞の役割の解明

研究課題名(英文)Studies of TICE and intestinal SR-BI

## 研究代表者

辻田 麻紀(Tsujita, Maki)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10253262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：TICEは小腸を介するコレステロールの搬出機構であり、近年注目されている肝臓を介さないコレステロール排出経路である。我々はマウス尾側静脈より<sup>3</sup>Hコレステリルエステルを含むマウスHDLを注入した。SR-BIはHDLコレステロールの受容体であるが、この受容体欠損マウスでは肝臓や副腎だけでなく小腸の放射標識も野生型マウスと比較して有意に低下した。更にマウス小腸吸収上皮細胞を4%PFAにて固定化し、免疫組織蛍光法でSR-BIの局在を確認した。共焦点顕微鏡を用いた観察では小腸吸収上皮細胞の先端と基底膜が染色され、小腸に局在するSR-BIのHDLコレステリルエステル排出への関与が推察される結果が得られた。

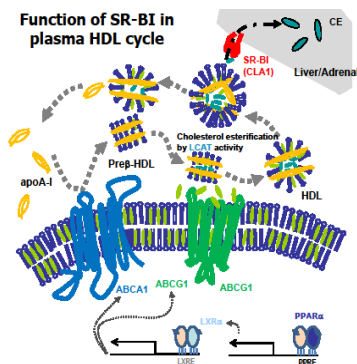
研究成果の概要(英文)：Transintestinal cholesterol efflux (TICE) is the alternative cholesterol secretion pathway which has been focus for some years. To evaluate the fate of HDL-cholesterol in mice plasma, we injected <sup>3</sup>H-labeled cholesterylether in HDL. SR-BI is known for HDL-cholesterylester receptor. In SR-BI null mice, the uptake of chosteryleter from injected HDL was significantly reduced liver and adrenalas well as in small intestine. Next, wild type mouse was perfused with PBS followed by the fixation solution (4%PFA/0.1M PB).SR-BI was detected by primary antibody and streptavidin bound Alexa Fluor594. The Nikon A1RS1 confocal microscope system was used for detection. SR-BI was stained at basolateral surface of some small intestinal absorptive epithelial cells. As control, intestinal cholesterol receptor, NPC1L1 was localized only in the apical surface in this experimental condition. This result suggests plasma HDL-cholesterol may uptake into small intestinal cells through SR-BI in mice.

研究分野：生化学・リポタンパク質

キーワード：マウス 小腸 HDL TICE

## 1. 研究開始当初の背景

血漿 HDL は生体内逆コレステロール輸送を担うリポタンパク質であり、冠動脈疾患をはじめとする心血管疾患発症と逆相関を示す。血漿 HDL は近年逆コレステロール輸送の役割以外に S1P をはじめとする生理活性脂質の細胞への運搬・抗炎症作用などが報告され、血管内皮細胞における細胞障害の改善を行う。HDL 新生反応は肝実質細胞並びに小腸上皮細胞にて分泌される apoA-I と細胞表面の ABCA1 トランスポーターとの相互作用により初期の Disk 状 HDL が産生され、その後 ABCG1 や LCAT の作用により HDL 中の cholesterylester が増加し、成熟型の Spherical な HDL となり更に大型化する。HDL の代謝はスカベンジャー受容体 SR-BI を高く発現している肝臓と副腎皮質細胞へコレステロールエステルを運搬することで小型化し、HDL 表面から apoA-I が剥離して新たな pre HDL 新生へと利用されると考えられている。



小腸上皮細胞は cholesterol 輸送の点で肝実質細胞と多くの共通点を有し、基底膜側での ABCA1 トランスポーターの発現 {Ohama, 2002 *Biochem Biophys Res Commun*}, apoA-I の分泌、そして尖端側には ABCG5/ABCG8 が局在し phytosterol 並びに free cholesterol の体外排出を担っている。更に小腸上皮細胞には腸腔から生体への cholesterol の取り込みを担う NPC1L1 が高く発現し、一方、肝実質細胞では細胞内で合成された胆汁酸排出を司る ABCB11 が胆管側に存在し、それに加えてその生合成の出発物質となる cholesterol を血漿 HDL 中から取り込む SR-BI を基底側に有することが明らかにされている。

## 2. 研究の目的

本課題ではステロール代謝平衡における HDL 由来 cholesterol 排出の新規経路を探索するものである。HDL-cholesterylester の選択的受容体 SR-BI は小腸にも発現していることが報告されているが、その生理的役割に関する検討は全く行われていない。我々は実験動物を用いて標識 HDL を追跡することで血中から消化管へ向けたステロール排出を明らかにすることを目的としている。新たなステロールの体外への排出経路の解明は cholesterol 吸収阻害剤とは別の治療戦

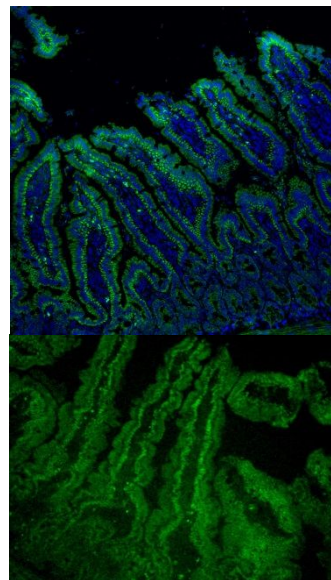
略創案の可能性を高めることとなる。

## 3. 研究の方法

本課題の目的はマウス小腸における血中 HDL 由来の cholesterol 排出経路の検討である。HDL-cholesterylester の選択的受容体の SR-BI に焦点を絞って、小腸細胞での局在並びに本経路を介した放射標識 cholesteryl oleyl ether の血中から小腸細胞への輸送を検証する。

マウス小腸組織における SR-BI の局在の同定・小腸組織の免疫染色[実験 1]。実験動物を用いた血中 HDL-cholesterylester の小腸細胞への輸送の検討・野生型マウスでの血中放射標識 HDL2 の小腸への搬入[実験 2]。SR-BI 欠損マウスを用いた小腸への放射標識 HDL2 搬入の検討[実験 2]。apoA-I 含有 HDL と apoA-II を構成蛋白質に有する HDL のステロール輸送効率の比較[実験 3]。apoA-I 発現低下マウスを用いた放射標識 HDL2 の小腸へのコレステロール搬入の検討[実験 4]。

## 4. 研究成果



肝-胆管を経由する cholesterol/胆汁酸の経路の過剰な促進は cholesterol 結晶形成と胆管閉塞などを誘発し、更に腸管循環経路の為、体外排出経路としては効率的でない。新規の排出経路の候補として腸管を介する排出経路の可能性が示されてきた {Brown, 2008 *J Biol Chem*;

*Temel, 2010 Cell Metab*}. スカベンジャー受容体 SR-BI は肝実質細胞並びにステロイド産生臓器へ HDL 中の cholesterylester (CE) を選択的に細胞内へ transport する。今回我々は古典的な肝-胆管-小腸への排出経路を介さない小腸を経由する HDL コレステロール排出経路の有無を肝 SR-BI 欠損マウスを用いて検討した(上図)。共焦点レーザー顕微鏡(NIKON A1RSi)並びに NIKON 蛍光顕微鏡システムを用いた検討により小腸吸収上皮細胞基底膜を免疫蛍光組織染色すると主に基底膜側に SR-BI が検出された(緑: SR-BI, 青:核)。対照として小腸吸収上皮細胞の尖端側に発現してい

ることが知られている cholesterol のトランスporterである NPC1L1 の局在を検討したが、これは尖端側のみ染色された。

次に SR-BI の血中 HDL の小腸における役割を確認する為に、我々は放射標識 HDL をマウス尾側静脈より注入 3 時間後のマウスにおいて主要臓器へ蓄積した血中 HDL 由来の CE を測定した。標識は CE と物理化学的性質を有するコレステリルエーテル (CEt) を HDL 粒子内に導入し、この CEt の組織への移行を検討した。

CEt は細胞内で酵素的に代謝分解されず、含有量がすなわち取り込み量を反映していると考えられる。その結果で特筆すべき事は、SR-BI 欠損マウスでは肝臓や副腎の他に小腸への CE の輸送が野生型マウスと比較して有意に減少したことである(右図)。

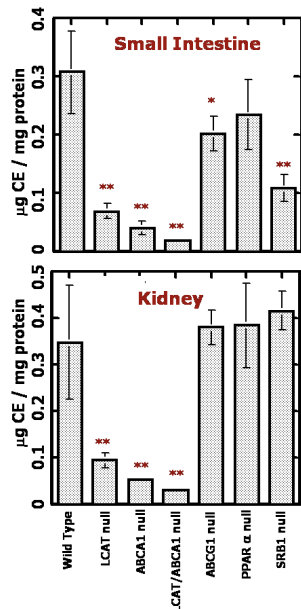


図 2 血漿HDL由来CEの小腸・腎臓での取り込み (ABCG1null並びにSR-BI nullは未発表結果)

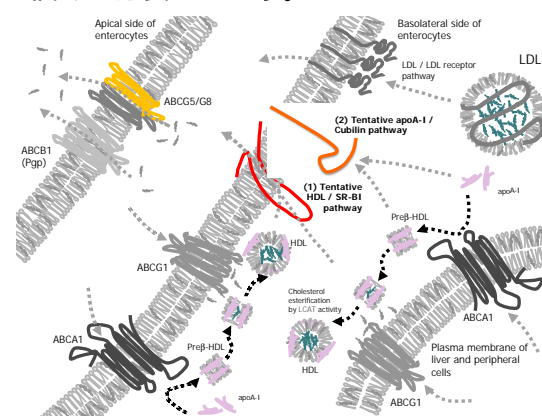
これらの結果は小腸 SR-BI の HDL-CE 輸送における何からの役割を示唆する結果であると推測できる。生体内では cholesterol を物質代謝の出発物質として生合成量を遥かに上回る量が必要な肝実質細胞やステロイド産生臓器にこの SR-BI が高く発現している。この HDL 受容体が小腸で cholesterol の細胞内への transport に関わるのか、また細胞でのその局在に関する結果は十分に整理されておらず多くの検討課題が残されている。

HDL 上の apoA-I の本経路への寄与についての検討は SR-BI との HDL-タンパク質の相互作用について更なる詳細な情報を提供することになり、今後の検討が必要な事項であると考えられる。

血漿コレステロールの小腸を直接介する搬出経路 Transintestinal cholesterol efflux(TICE)は近年注目されているコレステロール排出経路であり、欧州の研究グループでは LDL を介する経路についての検討が展開されている。それに対して我々は血中 HDL の寄与をその候補としている。

小腸吸収上皮細胞は周囲の他の組織と比較しても細胞自身の半減期が非常に短く、尖端側の排出に関わる ABCG5/G8 の機能

以外にも取り込んだ cholesterol を保持したまま腸管内へと剥離することが期待される。リポ蛋白として循環中の LDL または HDL-cholesterol の基底膜からの小腸吸収上皮細胞中への取込みを促進させることであるいは cholesterol の小腸での吸収も低下させることが出来るかもしれない。赤血球を除く全身の細胞は cholesterol の生合成能を有し、またオルガネラや細胞膜を適切な強度やカベオラのような特定の環境に膜を保持する為に強固な調節機構が装備されている。細胞内の過剰な cholesterol は速やかにエステル化されて脂質粒子へと運搬され、更に複数のトランスporterにより細胞外へと排出される。またその不足時においては miR33 が SREBP2 と同時に転写され、これが SREBP1 を阻害し、脂質合成を制限して細胞内のアセチル CoA を cholesterol 生合成へ優先的に供給する機構が近年明らかにされている [Horie, 2013 Nat Commun]。cholesterol の細胞内での排出経路の促進には細胞内での様々な律速段階が存在している。小腸への取込みの促進、そして細胞内 ACAT の活性化による脂質粒子形成促進などの複数の経路を同時に刺激活性化させる試みが必要であろう。



今回我々が明らかにした SR-BI の小腸吸収細胞基底膜での局在は HDL による小腸からの cholesterol 排出機構の解明の一步を示すものである。HDL あるいは再構成 HDL、SLC112、apoA-I や apoA-Imiano などといった apoA-I 製剤により、アテローム性動脈硬化病変部からの cholesterol 搬出の活性化だけでなく cholesterol の体外への排出を促進できる可能性を秘めている研究成果である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

<sup>1</sup> Yokoyama S, Arakawa R, Wu C, Iwamoto N, Lu R, Tsujita M, and Abe-Dohmae S. Calpain-mediated ABCA1 degradation: Post-translational regulation of ABCA1 for HDL biogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1821, 547-51, 2012. doi:

10.1016/j.bbali.2011.07.017. PMID:21835264.

〔学会発表〕(計 14 件)

<sup>1</sup> Maki Tsujita, Nobukatsu Akita, M Anwar Hossain, Tomo Yokota, Alan T Remaley, Natsuko Kumamoto, Takashi Ueda, Shinya Ugawa, Shinji Yokoyama. ABCG1 null and SR-BI null mice reduced plasma HDL uptake by liver and small intestine. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2014 Scientific Sessions, 2014 Toronto, Ontario, Canada. **Conference proceedings** ATVB. 2014;34:A231.  
[http://atvb.ahajournals.org/content/34/Suppl\\_1/A231.short?related-urls=yes&legid=atvbaha:34/Suppl\\_1/A231](http://atvb.ahajournals.org/content/34/Suppl_1/A231.short?related-urls=yes&legid=atvbaha:34/Suppl_1/A231)

<sup>2</sup> Maki Tsujita, Nobukatsu Akita, Tomo Yokota, Takeshi Yamazaki, Shinji Yokoyama. Probuocol rescued reproduction of hypo-lipoproteinemia model mice. 5th FEBS Special Meeting, ATP-binding Cassette(ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases 2014, Innsbruck, Austria.

<sup>3</sup> Maki Tsujita, Nobukatsu Akita, Alan T Remaley, Takeshi Yamazaki, Shinji Yokoyama, Makoto Michikawa. Probuocol rescued reproduction of LCAT null male mice. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2013 Scientific Sessions, 2013 Lake Buena Vista, FL, USA. **Conference proceedings** ATVB. 2013;33:A108  
[http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/meeting\\_abstract/33/5\\_MeetingAbstracts/A108](http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/meeting_abstract/33/5_MeetingAbstracts/A108)

<sup>4</sup> Maki Tsujita, Nobukatsu Akita, M Anwar Hossain, Frank J Gonzalez, Shinji Yokoyama, and Makoto Michikawa. Stress-mediated acute corticosterone production is depending on plasma HDL level but not long-term stress response in mice. The 50th Anniversary Symposium on Cytochrome P450 in Fukuoka, 2012, Fukuoka, Japan.

<sup>5</sup> Okumura-Noji Kuniko, Cavigiolio Giorgio, Huang Rong, Davidson W Sean, Akita Nobukatsu, Okuhira Kei-ichiro, Yokoyama Shinji, Tsujita Maki. An anion-exchange chromatography isolated sub-fraction of mouse apolipoprotein A-I is unable to activate cellular cholesterol release from mouse peritoneal macrophage foam cells. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2012 Scientific Sessions, 2012 Chicago, IL, USA. **Conference proceedings** ATVB. 2012;32:A411  
[http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/meeting\\_abstract/32/5\\_MeetingAbstracts/A411](http://atvb.ahajournals.org/cgi/content/meeting_abstract/32/5_MeetingAbstracts/A411)

<sup>6</sup> Okumura-Noji K, Huang R, Akita N, Remaley AT, Gonzalez FJ, Yokoyama S, Davidson WS ,

Tsujita M. Heterogeneity of human and mouse apolipoprotein A-I fractionated revealed by ion-exchange chromatography. International Symposium on Atherosclerosis Satellite Symposium High Density Lipoproteins: biology and therapeutics, 2012 Cairns, TNQ, Australia.

<sup>7</sup> Tomo Yokota, Kuniko Okumura-Noji, Nobukatsu Akita, Giorgio Cavigiolio, Alan T Remaley, Maki Tsujita, Shinji Yokoyama. Plasma prebeta-HDL in hypo-, normal- and hyper-alphalipoproteinemia model mice. 4th FEBS Special Meeting, ATP-binding Cassette(ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases 2012, Innsbruck, Austria.

<sup>8</sup> Kuniko Okumura-Noji, Toshihiko Usami, Giorgio Cavigiolio, Rong Huang, W Sean Davidson, Shinji Yokoyama, Maki Tsujita. Characterization of ion-exchange column fractionated human and mouse apoA-I subfractions. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology 2011 Scientific Sessions, 2011 Chicago, IL, USA. **Conference proceedings** ATVB. 2011, A315

<sup>9</sup> Maki Tsujita, Tomo Yokota, Frank J Gonzalez, Shinya Ugawa, Shinji Yokoyama. SR-BI which locates at basolateral surface of small intestinal absorptive epithelial cells in mice may function as an alternative plasma HDL-cholesterol receptor. 血漿 HDL - コレステロールの小腸への搬出は SR-BI を介する 第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 15 日-18 日、国立京都国際会館、京都

<sup>10</sup> 辻田麻紀 高脂血症治療剤 Probuocol の HDL 新生反応阻害と低 HDL 血症モデル動物繁殖への有効性 第 15 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2014 年 5 月 23 日-24 日、名古屋市立大学大学院薬学研究科・宮田専治記念ホール、名古屋 (招待講演)

<sup>11</sup> Maki Tsujita, Denis Sviridov, Kuniko Okumura-Noji, W Sean Davidson, Alan T Remaley, Shinji Yokoyama. Novel mouse apoA-I subfraction abolished cellular ACAT accessible free cholesterol pool depletion and cellular cholesterol release. 第 86 回日本生化学会 2013 年 9 月 11 日-13 日、パシフィコ横浜、横浜 (一般演題口頭発表)

<sup>12</sup> Maki Tsujita, Nobukatsu Akita, Shigehiro Tomimoto, Frank J Gonzalez, and Shinji Yokoyama Acute glucocorticoid response via hypothalamic-pituitary-adrenal axis is depending on plasma HDL level but not long-term stress response in mice 第 45 回日本動脈硬化学会総会 2013 年 7 月 18 日-19 日、京王プラザホ

テル、東京

13 辻田麻紀、秋田展克、横山信治、野路久仁子、道川 誠 高グルコースにより誘発される低 HDL 産生の分子制御機構の解明 High D-glucose reduced apoA-I and HDL generation in liver cells. 第 85 回日本生化学会 2012 年 12 月 14 日-16 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡

14 辻田麻紀、宇佐美寿彦、秋田展克、Frank J Gonzalez、横山信治、野路久仁子 尿素ポリアクリルアミド電気泳動法を用いたヒト並びにマウス血漿 apoA-I の解析/ Analyses of human and mouse apo A-I in 6M Urea PAGE. 第 84 回日本生化学会 2011 年 9 月 21 日-24 日、国立京都国際会館、京都

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

辻田麻紀 ( TSUJITA, Maki )  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：10253262

##### (2)分担研究者

なし

##### (3)連携研究者

横山信治 ( YOKOYAMA, Shinji )  
中部大学・次世代食育センター・教授  
研究者番号：10142192

鵜川真也 ( UGAWA, Shinya )  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：20326135