

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659068

研究課題名(和文) 消化管からのウイルス侵入経路の探索

研究課題名(英文) Search for key molecules for intestinal virus entry

研究代表者

高田 龍平 (Takada, Tappei)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90376468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：近年、コレステロールの消化管吸収を担い脂質異常症治療薬エゼチミブの薬効標的である NPC1L1に関する研究が進み、コレステロール輸送以外の多彩な生理機能が明らかになりつつある。本研究は、「NPC1L1をはじめとする消化管の脂溶性栄養物質トランスポーターが、消化管からのウイルス侵入における細胞膜受容体として働く」という仮説を実証することを目的として立案された。本研究により、消化管モデル細胞系および動物モデルを用いたウイルス感染経路の探索を行うための準備が整い、今後の研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, NPC1L1, which mediates the intestinal cholesterol absorption and is a molecular target of ezetimibe for dyslipidemia, is actively studied and several important physiological functions other than cholesterol transport have been revealed. The aim of this study was to prove the hypothesis that intestinal transporters such as NPC1L1 are important for virus entry. Since in vitro and in vivo models for the experiments of intestinal virus entry are arranged, key molecules for virus entry from the small intestine should be revealed in the near future.

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：薬理学 生理学 脂質 トランスレショナルリサーチ トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

近年、数多くのトランスポーター分子が見い出され、未解明であった多くの膜輸送過程に関わるトランスポーターの分子実態が明らかとなった。細胞膜成分と物性の近い脂溶性栄養物質は受動拡散により細胞膜を通過するという考え方が主流であったが、HDL 形成に関わる ATP-binding cassette A1 (ABCA1) や ABCG5/ABCG8 ヘテロダイマー(後述)、Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) (後述)などの相次ぐ発見により、「脂溶性栄養物質を輸送するトランスポーター」という言葉が一般的に使用されるようになった。

また、トランスポーター機能を有するタンパク質の中には、トランスポーター以外の他の生理機能を有するものも存在し、Gタンパク質共役型受容体として分類されている G protein-coupled receptor 172B (GPR172B) が riboflavin transporter 1 (RFT1) として同定されたのもその一例である (*Am J Physiol Cell Physiol* (2008))。NPC1L1 に関しても、コレステロールや脂溶性ビタミントランスポーター以外の機能として、ABCG5/G8 によるコレステロール胆汁排泄の促進因子である NPC2 タンパク質の分解促進作用を有することが示された (*Hepatology* (2012))。本研究で扱うウイルス感染に関しても、生体側がウイルスのために専用の受容体を用意しているとは考えにくく、他の生理機能を有するトランスポーターなどの膜タンパク質を感染の入口として利用することは十分に考えられた。

研究代表者らは脂溶性栄養物質のトランスポーターを介した輸送機構に着目し、特にコレステロールの消化管吸収を担い脂質異常症治療薬エゼチミブの薬効標的である NPC1L1 (*Science* (2004)) とその逆方向の輸送を担う ABCG5/G8 (*Science* (2000); *Nat*

Genet (2001)) を中心に研究を行っている。研究の過程で NPC1L1 や ABCG5/G8 を発現するためのアデノウィルスベクターを構築し、培養細胞へのウィルス感染により高発現細胞株を作成することに成功した。ABCG5/G8 については高発現に伴うコレステロール輸送活性の上昇を見出したが (*Gastroenterology* (2011))、NPC1L1 に関しては何故か機能変化が検出されなかった。このような状況の中、NPC1L1 の類縁分子である NPC1 がエボラウィルスの細胞内への侵入に必要であるとの報告がなされたことから (*Nature* (2011); *Nature* (2011))、NPC1L1 をはじめとする脂溶性栄養物質の消化管トランスポーターがウィルスの生体内侵入経路になりうるのではないかと考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究で取り組む、「消化管の脂溶性栄養物質トランスポーターからのウィルス侵入仮説」は、(1)脂溶性物質トランスポーターの類縁分子である NPC1 とエボラウィルス感染に関する報告 (*Nature* (2011); *Nature* (2011))、(2) NPC1L1 のトランスポーター機能がアデノウィルス存在下において検出されないこと、を発想のきっかけとしているが、その他にも(3) NPC1L1 がエンドサイトーシスを介した細胞内局在制御を受けること、(4) NPC1L1 は消化管上皮細胞刷子縁膜にきわめて高発現していること、なども理由として挙げられる。(3)については、ウィルスの細胞内侵入はウィルス受容体の内在化を伴うという一般的な事実と一致しており、コレステロール依存的な NPC1L1 の内在化 (*Cell Metab* (2008)) と類似した機序でウィルス侵入が行われている

可能性を示唆する。(4)は論文で報告されたプロテオーム解析の結果であるが (*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2011)), NPC1L1 は "Transporters and Channels" のカテゴリー内で、Na⁺-K⁺-ATPase などと同様にきわめて高い発現が観察されている。

このような背景のもと、NPC1L1 とともに脂溶性栄養物質の消化管吸収に関与し、輸送特性や組織局在における類似性の高い scavenger receptor class B type I (SR-BI) および CD36 をウイルス受容体候補分子に含め、本研究は企画された。

3. 研究の方法

消化管モデル細胞系を用いたアデノウイルス感染経路の探索

研究代表者らは、消化管からのコレステロール吸収を担う NPC1L1 の機能評価系として、ヒト消化管由来の Caco-2 細胞を用いた消化管吸収モデルの構築に成功しており (*J Pharmacol Exp Ther* (2007)), 本研究においてもこの実験系を用いて解析を行う。

消化管からの脂溶性栄養物質吸収経路として知られる SR-BI、CD36 の両分子についても、同様の検討を行う。SR-BI の発現ベクターは作成済みであったが、CD36 については遺伝子クローンを保有していなかったため、PCR により cDNA を得たのち、高発現細胞株を構築し、実験に用いることになる。

アデノウイルス感染効率の評価は、GFP 発現アデノウイルスを用いて行う。過去の申請者らの研究により GFP 発現アデノウイルスは構築済みであり (*Mol Pharmacol* (2011)), 細胞を GFP 発現ウイルス存在下で培養後、GFP タンパク質の発現量をウェスタンブロット解析により定量的に評価する。

動物モデルを用いたアデノウイルス侵入効率の評価

コレステロールや脂溶性ビタミンの消化管吸収に関して、申請者らは人工胆汁酸ミセルを用いた腸管吸収実験の技術を既に確立しているため (*Mol Pharmacol* (2008)), アデノウイルスの侵入効率の評価についても同様の手法により進める。

4. 研究成果

消化管モデル細胞系および動物モデルを用いたウイルス感染経路の探索を行うための準備を進めた。

本研究において研究対象としている脂溶性栄養物質トランスポーターの NPC1L1、SR-BI、CD36 のうち、NPC1L1 および SR-BI の発現ベクターは構築済みであった。そこで、CD36 の cDNA を PCR により増幅し、遺伝子組み換えにより、哺乳類細胞系への強制発現に用いる発現ベクターを構築した。これらの発現ベクターを培養細胞に導入し、ウェスタンブロットを行った結果、期待される分子量のバンドを検出することができた。現在、脂溶性栄養物質トランスポーターの高発現細胞に GFP 発現ウイルスを感染させ、細胞における GFP タンパク質の発現量を定量的に解析することにより、アデノウイルス感染効率の評価を行う実験を進めている。

動物モデルを用いた解析に関しては、NPC1L1 遺伝子欠損マウスの作成、および、NPC1L1 発現アデノウイルスを用いた肝臓特異的一過性トランスジェニックマウスの作成に成功した。現在は、NPC1L1 遺伝子の有無や阻害剤処理の有無による感染効率の違いに関する検討を進めている。

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 1 件)(査読有)

(1) Suzuki S, Shuto T, Sato T, Kaneko M, Takada T, Suico MA, Cyr DM, Suzuki H, Kai H. Inhibition of post-translational N-glycosylation by HRD1 that controls the fate of ABCG5/8 transporter. *Sci Rep*. 2014 Mar 3;4:4258. doi: 10.1038/srep04258.

〔学会発表〕(計 12 件)

(1) 高田龍平、山本英明、増尾友佑、山梨義英、鈴木洋史．胆汁中へのコレステロール分泌におけるトランスポートソーム．第7回トランスporter研究会 京都 2012年6月9日～10日 シンポジウム講演

(2) Tappei Takada, Yoshihide Yamanashi, Hiroshi Suzuki. NPC1L1 as a negative regulator of NPC2 protein. 第44回日本動脈硬化学会総会・学術集会 福岡 2012年7月19日～20日(高得点ポスターセッションにノミネート)

(3) 高田龍平、鈴木洋史．脂溶性ビタミンの消化管吸収機構．第15回 Vitamin E Update Forum 東京 2012年8月26日 招待講演

(4) 高田龍平、鈴木洋史．Lifestyle-related diseases and transporters．第27回日本薬物動態学会年会 東京 2012年11月20日～22日 シンポジウム講演

(5) 高田龍平．コレステロールの胆汁分泌制御におけるトランスporter群の相互制御・機能関連．生理学研究所研究会 細胞センサーの分子機構・相互関連・ネットワーク研究会 岡崎 2012年11月29日～30日 招待講演

(6) 高田龍平．コレステロール・脂溶性ビタミンの腸管吸収機構．第91回日本栄養・食糧学会関東支部大会シンポジウム 東京 2013年2月16日 招待講演

(7) 高田龍平、鈴木洋史．脂質異常症治療薬の薬効標的：コレステロールトランスporter-NPC1L1. 第31回日本ヒト細胞学会学術集会 所沢 2013年8月10日～11日 招待講演

(8) 高田龍平．生活習慣病とトランスporterに関する研究．西日本薬剤学研究会 第38回九重セミナー 熊本 2013年8月23日～24日 招待講演

(9) 高田龍平．コレステロール・脂溶性ビタミンの消化管吸収について．第4回機能油脂懇話会/第15回 CLA 懇話会 東京 2013年11月2日 招待講演

(10) 高田龍平、小西健太郎、山梨義英、山本英明、増尾友佑、豊田優、山本武人、鈴木洋史．ビタミンKの消化管吸収阻害を介したエゼチミブとワルファリンの薬物間相互作用に関する研究. 第35回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 東京 2013年11月21日～22日 シンポジウム講演

(11) 高田龍平．トランスporterによる生活習慣病関連物質の体内動態制御．第9回平成の会学術講演会 東京 2013年11月28日 特別講演

(12) 高田龍平、鈴木洋史 . コレステロールおよび脂溶性ビタミンの腸管吸収 . 日本農芸化学会 2014 年度大会 東京 2014 年 3 月 27 日 ~ 30 日 招待講演

〔図書〕(計 6 件)

(1) 高田龍平、山本英明、増尾友佑、山梨義英、鈴木洋史 . コレステロールの消化管吸収・胆汁排泄と NPC1L1・ABCG5/G8 . The Lipid (メディカルレビュー社) 2012 年 7 月 23(3), 238-44.

(2) 高田龍平 . 生活習慣病とトランスポーター . 薬事日報 (薬事日報社) 2012 年 12 月 17 日 4 面.

(3) 高田龍平 . トランスポーターによる生活習慣病関連物質の体内動態制御機構の解明 . Drug Delivery System (日本 DDS 学会) 2013 年 3 月 28(2), 154-5.

(4) 高田龍平 . 生活習慣病関連物質のトランスポーターによる体内動態制御に関する研究 . 薬学雑誌 (日本薬学会) 2013 年 4 月 1 日 133(4), 451-61.

(5) 豊田優、高田龍平 . 生活習慣病とトランスポーター - コレステロール動態を中心に . 医学のあゆみ (医歯薬出版) 2013 年 4 月 6 日 245(1), 23-9

(6) 高田龍平 . ビタミン E とリポタンパク質関連因子およびスカベンジャー受容体の遺伝子多型 . ビタミン (日本ビタミン学会) 2013 年 7 月 20 日 87(7), 396-8.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

自己紹介 (研究室ホームページ内)

http://plaza.umin.ac.jp/~todaiyak/t_takada.php

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高田 龍平 (TAKADA, Tappei)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 9 0 3 7 6 4 6 8

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし