

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25504013

研究課題名(和文) 腸管コレステロール吸収制御機構の新規パラダイムの提唱と検証

研究課題名(英文) Proposed model that integrates cholesterol bidirectional flux in the small intestine

研究代表者

中野 貴成 (Nakano, Takanari)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：20406474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：血中コレステロール(chol)上昇は動脈硬化を介した心疾患の主要リスク因子である。腸管からのchol吸収亢進はそのリスク増加に寄与するが、その量的制御機構は未解明のままである。我々はその吸収量を取り込まれたcholの一部を管腔内へ戻すこと(排出)により調節されているとする新たなモデルを提唱する。マウス腸管において、管腔内のcholが細胞膜に取り込まれた後、chol輸送膜タンパク質Niemann-PickC1-like 1(NPC1L1)により細胞内の膜輸送システムに渡されるか、もしくはABCG5/G8で管腔側へ排出されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Ezetimibe inhibits Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), thereby reduces intestinal cholesterol absorption. This treatment also increases extrahepatic reverse cholesterol transport via an undefined mechanism. To explore this, we employed a trans-intestinal cholesterol efflux (TICE) assay and found an increase of TICE by 45%. To examine whether such increase in efflux occurs at the intestinal brush border membrane(BBM)-level, we performed luminal perfusion assays, similar to TICE but the jejunal wall was labelled with orally-given ³H-cholesterol, and determined elevated BBM-to-lumen cholesterol efflux by 3.5-fold with ezetimibe. Such increased efflux probably promotes circulation-to-lumen cholesterol transit eventually; thus increases TICE.

研究分野：病態生化学

キーワード：コレステロール 小腸 吸収 コレステロール逆輸送

1. 研究開始当初の背景

飽食や高齢化により高脂血症の患者数は近年増加の一途をたどっている。従って腸管コレステロール吸収制御機構の解明は、高脂血症を対象とする臨床栄養学・予防医学の実用面での発展に不可欠な要素である。しかしながら、その制御システムは未解明のままとなっている。申請者はこれまでの研究の中で腸上皮細胞膜では、取り込まれたコレステロールの一部が直ちに管腔内へ戻ること(排出)により、吸収される量が抑制されるという興味深い現象を見いだした。

2. 研究の目的

コレステロール吸収に関するこれまでの実験結果、その解釈には矛盾があった。申請者は、それらの矛盾を解決できる新たな吸収制御システムを着想した。本研究は吸収と排出に関わる分子の動的な連携を証明し、提唱するシステムの検証を完成させることを目的とする。

3. 研究の方法

ABCG5/G8 が排出を介したコレステロール吸収制御因子であることを細胞とマウスを用いた二方向から検証する。

(1) HepG2 細胞に、NPC1L1 タンパク質を遺伝子導入により発現させる。その時のコレステロール吸収の変化、NPC1L1 阻害によるそれらへの影響を、コレステロールトレーサーを用いて測定する。

(2) 野生型マウスではコレステロールの管腔内から血中への移行効率と排出効率が逆相関した。コレステロール排出の機能分子である ABCG5/G8 欠損マウスでの排出の減弱を検証する。

(3) エゼチミブはコレステロールの腸管からの排出を促進した。この効果が腸管を経由したコレステロールの逆輸送系に關与するのかを検討するために、マウスを用い、循環血液 腸管管腔へのコレステロール輸送を検討した。

目的とするコレステロール輸送を評価するための灌流実験のおおまかな手順を下記に示す。

1. 絶食マウスに ^3H -コレステロール含トリオレインを投与する。
2. 3 時間後に麻酔下で開腹し、小腸上部をカニューレションする(図 1)。
3. 緩衝液で内腔を洗浄し、次いでリン脂質とタウロコール酸を含む溶液でコレステロール排出を誘導する。

4. 排出されたコレステロールトレーサー量と腸管に残存するものを比較することで排出効果を評価した。

図 1 . 灌流実験の例



4. 研究成果

(1) ^3H -コレステロールを用い、循環血液から管腔へのコレステロール輸送を評価したところ、エゼチミブ投与によってその輸送が増強することを認めた。

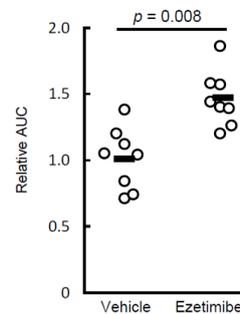


図 2 . エゼチミブによる腸管経由コレステロール逆輸送の促進。およそ 1.5 倍程度の促進効果を認めた。

(2) コレステロールの腸管を介した逆輸送の機序を解明すべく、エゼチミブ投与下における腸管コレステロールの排出を経口投与した ^3H -コレステロールを用いて評価した。その結果、エゼチミブ濃度依存的に排出が増加することを確認した。

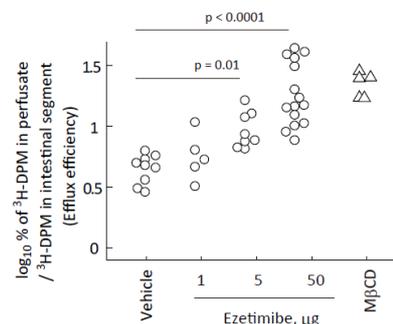


図 3 . エゼチミブによる微絨毛からのコレステロール排出促進。MβCD, methyl-β-cyclodextrin ; コレステロール吸着剤。

(3) (2)の現象は分離した小腸吸収上皮細胞においても確認された。

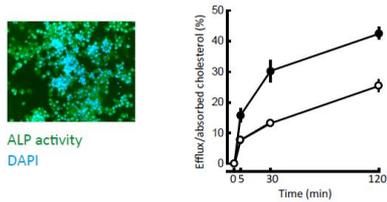


図4.(左)分離した小腸吸収上皮細胞。特異的マーカーであるアルカリホスファターゼ活性染色から純度の高い細胞分画が得られていることが確認できる。(右)エゼチミブ投与マウス由来の細胞(●)では、対照群(○)に比較し、2倍程度の排出効率の増加を認めた。

(4) ABCG5/G8 欠損マウスでは腸管コレステロールの排出は減弱していた。このことから、ABCG5/G8 は部分的にその排出に寄与していることが推察された。

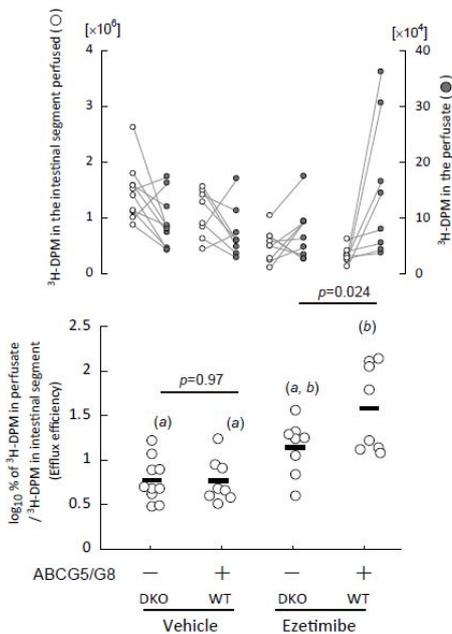


図5. ABCG5/G8 欠損マウス(DKO)では、エゼチミブによる排出促進効果が減弱している。(上)各群における腸管中のトレーサーカウントと排出されたものとの比較。(下)それらデータを比で示したものの。

その他の詳細な結果については発表論文に示してある(Nakano et al. Ezetimibe Promotes Brush Border Membrane-to-Lumen Cholesterol Efflux in the Small Intestine PLoS ONE. 2016;11:e0152207)。これら結果から予想されたモデルを示す。

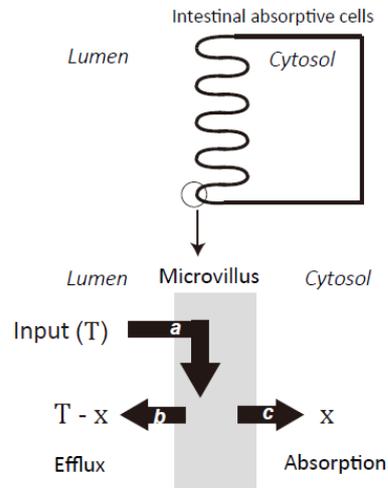


図6. 腸管内腔から取り込まれたコレステロールは、すべてが循環血液に送られるのではなく、腸管へ逆戻りする二方向性である。この二方向への流量の変化が吸収効率を規定する。

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)

Nakano Takanari, Inoue Ikuo, Takenaka Yasuhiro, Ono Hiraku, Katayama Shigehiro, Awata Takuya, Murakoshi Takayuki. Ezetimibe Promotes Brush Border Membrane-to-Lumen Cholesterol Efflux in the Small Intestine PLoS ONE. 2016;11:e0152207. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

1. 一元的システムによる小腸コレステロール吸収-排泄制御機構
平成27年7月 第47回日本動脈硬化学会総会・学術集会
中野貴成, 井上郁夫, 竹中康浩, 片山茂裕, 粟田卓也, 村越隆之

2. 腸管吸収におけるステロール種選別とABCG5/G8の役割
平成26年12月 第87回日本生化学会
中野貴成, 井上郁夫, 竹中康浩, 片山茂裕, 粟田卓也, 村越隆之

3. 腸管コレステロール吸収制御機構：その新規パラダイムの提唱と検証

平成26年7月 第46回日本動脈硬化学会(東京)

中野貴成、井上郁夫、竹中康浩、片山茂裕、
粟田卓也、村越隆之

4 .Ezetimibe による急性な食後脂質代謝改善の可能性

平成 25 年 5 月 第 56 回日本糖尿病学会年
次学術集会(熊本)

中野貴成、井上郁夫、竹中康浩、村越隆之、
片山茂裕、粟田卓也

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中野貴成 (NAKANO, Takanari)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：20406474

(2)研究分担者

竹中康浩 (TAKENAKA, Yasuhiro)

埼玉医科大学・医学部・研究員

研究者番号：20586789

平成 2 7 年 4 月 1 0 日削除

(3)連携研究者

()

研究者番号：