

論文の内容の要旨

NPC1L1 を介したリポタンパク質の質的制御が 動脈硬化症に与える影響の解析

山本 英明

<序論>

Niemann-Pick C1-like1 (NPC1L1) は食事からのコレステロール吸収や胆汁からのコレステロール再吸収を担うコレステロールトランスポーターであり、脂質異常症治療薬として広く臨床使用されているエゼチミブの標的タンパク質である。近年、コレステロール以外にビタミン E やビタミン K などの脂溶性ビタミンも NPC1L1 の基質となることが解明され、現在では NPC1L1 は様々な脂溶性化合物の吸収に関わる可能性が考えられている。NPC1L1 と疾患との関連にも注目が集まっており、NPC1L1 の不活性型遺伝子変異を有するヒトでは、心血管系イベントの発症頻度と LDL-コレステロール値が有意に低いことがと報告されている (*NEJM*, 2014)。しかしながら、NPC1L1 により吸収された脂溶性化合物がどのようなリポタンパク質に組み込まれて体内循環するのか、NPC1L1 経路由来のリポタンパク質は心血管系イベントの原因となる動脈硬化症の発症・進行にどのような影響を及ぼすのか、という点については明らかとなっていない。そこで本研究では、新規 NPC1L1 基質の解明も念頭に置きつつ、NPC1L1 を介したリポタンパク質の質的制御と動脈硬化症の関連性を解析した。

<方法・結果>

1. NPC1L1 が動脈硬化症に及ぼす影響を評価する新規モデルマウスの作出

NPC1L1 の発現分布には種差が報告されており、ヒトでは小腸・肝臓に主に発現している一方で、マウスでは小腸のみに発現している (*Science*, 2004)。そこで、小腸・肝臓における NPC1L1 の生理機能を区別して評価可能な動物モデルとして、NPC1L1 ノックアウトマウス (NPC1L1 KO)、小腸・肝臓ともに NPC1L1 を発現する肝細胞特異的 NPC1L1 トランスジェニックマウス (NPC1L1 Tg)、肝臓のみに NPC1L1

を発現する NPC1L1 Tg×NPC1L1 KO マウスを作出した。次に、各種マウスの動脈硬化巣形成レベルを評価するため、動脈硬化症モデルマウスとして汎用されている LDL 受容体 (LDLR) 機能欠

NPC1L1発現分布一覧

	小腸	肝臓
MT	○	×
MT/KO	×	×
MT/Tg	○	○
MT/Tg/KO	×	○
ヒト(参考)	○	○

図1: 動脈硬化症モデルマウスの作出

損マウス (MT) と上記 NPC1L1 遺伝子改変マウスを交配させ、各組織の NPC1L1 が動脈硬化症に及ぼす影響を解析可能な新規動脈硬化症モデルマウスとして MT×NPC1L1 KO (MT/KO)、MT×NPC1L1 Tg (MT/Tg)、MT×NPC1L1 Tg×NPC1L1 KO (MT/Tg/KO) マウスを作出した (図 1)。

2. 小腸・肝臓 NPC1L1 は共に動脈硬化症の増悪因子である

作出した各種マウスにおける動脈硬化症発症リスクを評価するため、各マウスを高脂肪食 (0.21% コレステロール+41% kcal fat) 摂取条件下で 20 週間飼育し、腹部大動脈における動脈硬化巣の形成を Oil red O 染色により解析した (図 2A)。その結果、MT マウスと比べて、MT/Tg マウスでは動脈硬化巣の有意な拡大を認め、肝臓 NPC1L1 が動脈硬化症の増悪因子である可能性が明らかとなった (図 2B)。一方、MT/KO マウス、MT/Tg/KO マウスでは動脈硬化巣の形成がほとんど認められなかったことから、小腸 NPC1L1 が動脈硬化症の発症に特に重要であることが明らかとなった (図 2B)。また、血漿中総コレステロール値を測定した結果、動脈硬化巣の面積と対応して、MT/Tg マウスでは MT マウスと比べて有意な総コレステロール値の上昇が認められる一方で、小腸 NPC1L1 を発現していないマウス (MT/KO、MT/Tg/KO) では有意に低かった (図 2C)。これらの結果を踏まえ、以後の解析では、動脈硬化症発症における重要性が明らかとなった小腸 NPC1L1 に焦点を絞り、小腸 NPC1L1 経路で吸収された NPC1L1 基質がどのようなリポタンパク質 (NPC1L1 経路由来リポタンパク質) に分布しているのか、そしてその NPC1L1 基質がどのような生理活性を有しているのかに着目し、解析を進めた。

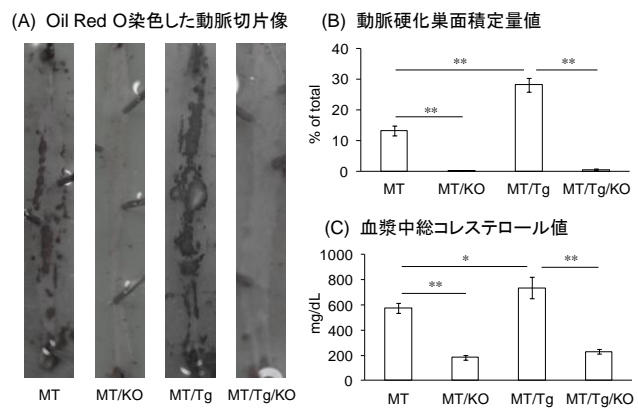


図2: 高脂肪食投与後の各種NPC1L1遺伝子改変マウスを用いた解析 (*p<0.05, **p<0.01)

3. 小腸 NPC1L1 経路由来リポタンパク質は VLDL 分画に存在する

小腸 NPC1L1 により特異的な制御を受けるリポタンパク質を明らかにするため、 $[^3\text{H}]$ コレステロールを経腸投与して 2 時間後のマウスの血漿を用いて、サイズ排除クロマトグラフィーによりリポタンパク質分離を行い、各分画中の $[^3\text{H}]$ コレステロールを測定した。その結果、NPC1L1 阻害薬であるエゼチミブの投与 (MT Eze (+)) 及び NPC1L1 の遺伝子欠損 (MT/KO) は共に VLDL 分画中の $[^3\text{H}]$ コレステロール含量を低下させた一方で、HDL 分画中の $[^3\text{H}]$ コレステロール含量には影響を及ぼさなかった (図 3)。VLDL の生体内での代謝を考慮すると、この結果は、NPC1L1 を介して消化管吸収されたコレステロールは、VLDL/LDL 分画に存在するリポタンパク質に分布して体内循環するという可能性を示唆するものであった。

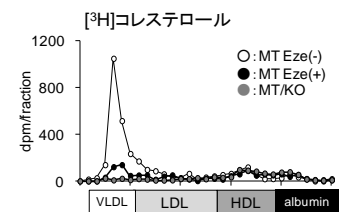


図3: 小腸NPC1L1経路由来リポタンパク質の同定

4. 小腸 NPC1L1 経路由来リポタンパク質はアポリポタンパク質 X (アポ X) を構成因子とし、脂質 Y を運搬する

次に、上記 VLDL 分画に含まれる小腸 NPC1L1 経路由来リポタンパク質のさらなる特性解明を目指して、マーカータンパク質の探索を行った。エゼチミブによる阻害又は NPC1L1 の遺伝子欠損によって VLDL 分画中存在量が低下するタンパク質をプロテオーム解析により網羅的に探索したところ、アポリポタンパク質の 1 つであるアポ X が見出された (図 4A)。

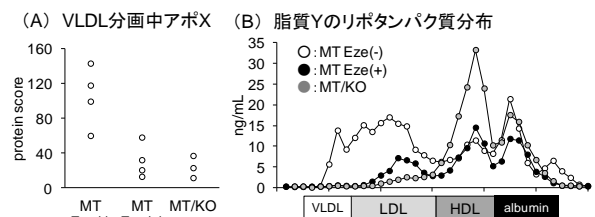


図4: 小腸NPC1L1経路由来リポタンパク質分画の特性解析

血液中においてアポ X は生理活性物質である脂質 Y の結合タンパク質として機能することが報告されていることから、アポ X 含有量と連動して、VLDL 分画中の脂質 Y 濃度も変動しうると考えられた。そこで、高脂肪食を 20 週間摂取したマウスの血漿リポタンパク質分画中脂質 Y 濃度を測定したところ、小腸 NPC1L1 が発現していない MT/KO マウスでは、血漿中の脂質 Y の多くは HDL 結合型 (HDL-Y)、アルブミン結合型の状態で存在していた (図 4B)。一方、小腸 NPC1L1 が発現する MT マウスでは、VLDL/LDL 分画中に高濃度で脂質 Y が検出された。さらに、この VLDL/LDL 結合型 Y (VLDL/LDL-Y) は、エゼチミブ投与に伴って低下することも明らかとなった (図 4B)。これらの結果から、小腸 NPC1L1 経路由来リポタンパク質が脂質 Y を運搬する可能性が示唆された。

5. 脂質 Y の前駆体である脂質 preY は NPC1L1 の基質である

体内において脂質 Y は動物性脂質に含まれる preY から生合成されることが知られている。これまでの結果と合わせて考えると、食事から摂取される preY が小腸 NPC1L1 を介して吸収された後、脂質 Y に変換され、VLDL/LDL-Y となって血液中に存在する可能性が考えられた。この点を検討すべく、NPC1L1 を高発現させた結腸癌由来 Caco-2 細胞 (NPC1L1 高発現細胞) を用いて preY の取り込み実験を行った。その結果、preY の取り込み活性は NPC1L1 高発現細胞において亢進しており、エゼチミブによる取り込み阻害も観察された (図 5A)。次に、preY を MT マウスまたは MT/KO マウスに経腸投与し、2 時間後の血漿・肝臓中の preY 由来化合物濃度を測定したところ、MT マウスと比べて MT/KO マウスでは有意に低値を示し (図 5B)、NPC1L1 が preY の消化管吸収に関わることが示唆された。また、エゼチミブの投与により MT マウスでは preY の吸収量が低下した一方で、MT/KO マウスでは変動が認められなかった (図 5B)。さらに、薄層クロマトグラフィーを用いた脂質組成解析の結果、吸収された preY を由来とする脂質 Y が血漿中で検出され、その量は preY の消化管吸収量とよく対応していた (図 5C)。以上の結果は、preY が NPC1L1 の基質であることを示すものであった。また、図 4B の結果と合わせて考えると、小腸 NPC1L1 を介して吸収された preY の一部は、体内において脂質 Y に代謝され、VLDL/LDL-Y として血液中に滞留している可能性が示唆された。

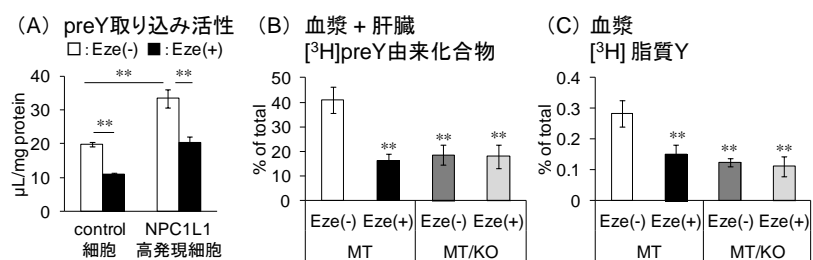


図5: preYがNPC1L1の基質となることを示す *in vitro*・*in vivo*実験 (**p<0.01)

次に、preY を MT マウスまたは MT/KO マウスに経腸投与し、2 時間後の血漿・肝臓中の preY 由来化合物濃度を測定したところ、MT マウスと比べて MT/KO マウスでは有意に低値を示し (図 5B)、NPC1L1 が preY の消化管吸収に関わることが示唆された。また、エゼチミブの投与により MT マウスでは preY の吸収量が低下した一方で、MT/KO マウスでは変動が認められなかった (図 5B)。さらに、薄層クロマトグラフィーを用いた脂質組成解析の結果、吸収された preY を由来とする脂質 Y が血漿中で検出され、その量は preY の消化管吸収量とよく対応していた (図 5C)。以上の結果は、preY が NPC1L1 の基質であることを示すものであった。また、図 4B の結果と合わせて考えると、小腸 NPC1L1 を介して吸収された preY の一部は、体内において脂質 Y に代謝され、VLDL/LDL-Y として血液中に滞留している可能性が示唆された。

6. VLDL-Y は炎症を惹起し、動脈硬化症を増悪させる

次に、見出された小腸 NPC1L1 経路由来の VLDL-Y が動脈硬化症の発症・増悪に及ぼす影響に着目した。脂質 Y と炎症反応との関わりが示唆されていたこと、動脈硬化症が慢性的な炎症性疾患であることを踏まえ、VLDL-Y が炎症惹起に与える影響について検討を行った。動脈硬化症研究で汎用されるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を炎症性サイトカインである TNF- α で刺激すると、炎症反応の起点となる血管内皮細胞の活性化に応じて、soluble ICAM-1 (sICAM-1) の分泌量が上昇することが知られている。そこで、この実験系を用いて各リポタンパク質に分布する脂質 Y の炎症惹起性を評価したところ、培養上清中の sICAM-1 濃度は HDL-Y の添加により低下する一方で、VLDL-Y の添加により有意に上昇した (図 6)。この結果は、分布するリポタンパク質によって脂質 Y の生理活性が異なることを示唆しており、非常に興味深い。現在、脂質 Y 受容体に対する阻害剤を用いた検討を中心に、VLDL-Y による炎症惹起メカニズムに関してさらなる検討を進めている。

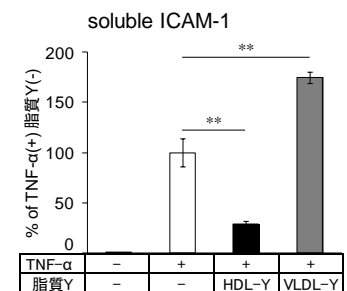


図6: VLDL-Yによる炎症惹起 (**p<0.01)

<結論・考察>

本研究において、小腸 NPC1L1・肝臓 NPC1L1 が動脈硬化症の増悪因子であることを見出した。さらに、小腸 NPC1L1 が動脈硬化症の増悪因子である分子機序として、コレステロール吸収亢進以外に、「食事成分である preY が小腸 NPC1L1 を介して吸収されること」、「小腸 NPC1L1 経路由来で生成された VLDL/LDL-Y が血管内皮細胞を介して炎症を惹起しうること」を見出し（図 7）、NPC1L1 がリポタンパク質の質的制御に関わることを示した。これらの発見は、preY の消化管吸収経路、VLDL/LDL-Y の生理活性に関して初めて見出された重要な知見である。

また、今回のモデル動物で見出された知見がヒトにも当てはまる可能性は高い。実際、家族性高コレステロール血症患者における血漿中 LDL 吸着療法の前後で、VLDL/LDL 分画中脂質 Y 濃度が大きく低下するという結果を得ており、ヒトでも VLDL/LDL-Y は存在していると考えられる。食生活の欧米化に伴い preY を含む動物性脂肪の摂取量が増加していることを鑑みると、ヒトにおける動脈硬化症発症にも小腸 NPC1L1 由来の VLDL/LDL-Y の関与は十分考えられる。本研究で得られた知見が、動脈硬化症の効果的な治療法や新規創薬標的の提唱に繋がることを期待している。

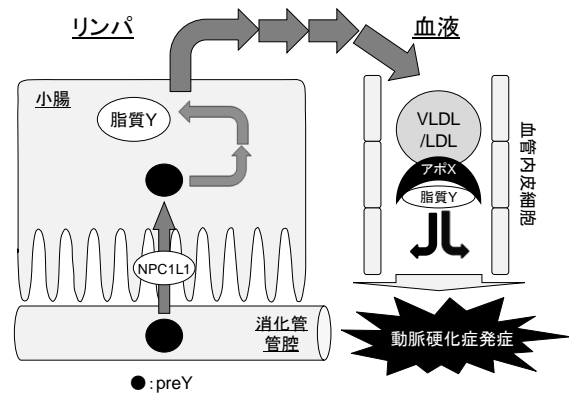


図7: NPC1L1・アポX・脂質Yと動脈硬化症に関するモデル図