博士論文（要約）

コレステロール・胆汁酸代謝制御を介した生活習慣病治療薬開発のための基礎研究

杉本　佳奈美

論文題目　　コレステロール・胆汁酸代謝制御を介した
生活習慣病治療薬開発のための基礎研究

氏名　　杉本　佳奈美

虚血性心疾患をはじめとする動脈硬化性疾患は欧米諸国における死因の第1位であり，動脈硬化性疾患およびその基盤疾患である代謝性疾患（糖尿病，肥満，脂質異常症等）を含む生活習慣病の予防及び治療法の確立は必須の課題である．本研究では動脈硬化性疾患の発症や治療に深く関与するコレステロール逆転送系に着目し，その制御を介した生活習慣病予防薬・治療薬創製の可能性を検討した．コレステロール逆転送系は末梢組織（動脈壁）に蓄積した過剰なコレステロールを肝臓に戻し，胆汁酸に変換して体外へ排泄するシステムである．動脈硬化壁マクロファージ細胞内に存在するフリーコレステロール（FC）は細胞膜表面の ATP-binding cassette A1 (ABCA1) トランスポーターを介して，apolipoprotein A-I (apoA-I) により細胞外へ引き抜かれ，新生 HDL となる．血中においてより粒子径の大きな HDL へと成熟し，成熟 HDL は肝臓へと取り込まれた後，胆汁酸へと変換され胆汁および体外へ排泄される．本研究ではこのコレステロール逆転送系における最初と最後のステップである「マクロファージからの脂質引き抜き」および「肝臓からの脂質排泄」に着目し，生活習慣病治療薬の開発を目指した基礎研究を行った．

第1章ではコレステロール逆転送系の最初のステップであるマクロファージからの脂質引き抜き作用に着目し，本作用に与える細胞内コレステロール代謝の影響を検討した．HDLによるコレステロール引き抜き反応には異なる二つの機構が存在する．一つは細胞膜とHDL粒子間の濃度勾配によって生じる非特異的拡散によるもの，もう一つはHDL上に存在するアポリポタンパクであるapoA-Iによる特異的な引き抜き機構である．後者については細胞膜上の結合部位や細胞内FCプールから細胞膜表面への特異的輸送の関与が示唆されていたが詳細な研究は進んでいなかった．本研究では，細胞内FCを増加させた際に，この特異的引き抜き経路がどのように変化するかについて検討した．マクロファージ細胞内FC濃度はコレステロールのエステル化酵素であるacyl CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) により制御されていることから，細胞内FCを増加させるツールとしてACAT阻害剤MCC-147 を使用した．マウスより腹腔内マクロファージを採取し，アセチルLDL添加により細胞内にコレステロールを蓄積させ泡沫化マクロファージを形成し，実験に供した．MCC-147 のACAT阻害IC_{50}値は約 0.1μMであり，MCC-147 処理により泡沫化マクロファージ内のコレステリルエステル（CE）が減少し，FCが増加することを確認した．その条件下でapoA-IによるFC，リン脂質（PL）の特異的引き抜き作用を検討したところ，FC，PLともに引き抜きが増強されることが明らかとなった．一方，MCC-147により細胞内FCを増加させてもマイクロエマルジョンによる非特異的FC引き

抜きに対しては増強作用を示さなかったことから，ACAT阻害による細胞内FC増加はapoA-Iによる特異的引き抜き経路のみを増強させることが明らかとなった．^{125}I-apoA-Iの結合実験において，MCC-147 により^{125}I-apoA-Iの細胞への結合も促進されたことから，次に，細胞膜上のapoA-Iとの相互作用部位であるABCA1 の発現について検討した. 定量PCRおよびウェスタンブロッティングを用いてABCA1 発現について評価したところ，MCC-147 による細胞内FC増加によりABCA1 のmRNA・タンパクともに発現が増加していることを見出した．コレステロールを蓄積していない非泡沫化マクロファージではACAT阻害による細胞内FC増加は認められず, ABCA1 のmRNA・タンパク発現やapoA-IによるFC引き抜きも変化しなかった．以上より，ACATを阻害して泡沫化マクロファージ内FCを増加させると，非特異的FC引き抜き機構には影響を与えず，apoA-IによるFCおよびPLの特異的引き抜き機構のみが増強されることが明らかとなった．ACAT阻害による細胞内FC増加に伴ってABCA1 の発現が増加し，apoA-IとABCA1 との相互作用が増強されることで, 特異的引き抜き経路のみが選択的に増強したと考えられる．以上より，泡沫化マクロファージ内FCを増加させる薬剤は，コレステロール逆転送系の初期段階を賦活化し，動脈硬化に対する治療薬となりうることが示唆された.

第 2 章では，コレステロール逆転送系の最終ステップである肝臓における胆汁酸への変換及び体外への排泄に着目し，胆汁酸排泄促進による糖・脂質代謝への影響およびその作用機序について解析を加えた．脂質低下薬として臨床使用されている胆汁酸吸着剤（BAS）は腸管において胆汁酸を吸着し，体外への排泄を促進することにより，コレステロール逆転送系の最終ステップである肝臓における胆汁酸への変換及び排泄を賦活化する．近年BASは 2 型糖尿病や肥満を併発した高脂血症患者において脂質だけでなく血糖や体重も低下させることが報告されてきており，その新規薬効及び作用機序に注目が集まっている．BASがこれらの代謝疾患を改善する作用機序については詳細に解明されておらず様々な説が提唱されている．そこで本研究では胆汁酸吸着剤コレスチランを用いてコレステロールや胆汁酸代謝を制御した際に，糖・エネルギー代謝に与える影響をモデル動物を用いて検討し，その作用機序について解析した．高脂血症およびインスリン抵抗性を発症したモデルとして高脂肪食負荷apoE3-leiden transgenic（E3L）マウスを使用した．高脂肪食を 12 週間負荷した後，コレスチラン 1.5%を 8 週間混餌投与し，評価に用いた．コレスチラン投与により胆汁酸排泄が促進されると，体重増加が抑制され，脂肪重量が低下した一方，摂餌量は増加した．血漿中コレステロール・中性脂肪だけでなく，血糖値およびインスリン値も低下することを見出した．グルコースクランプ法により，全身のインスリン感受性，特に末梢組織におけるインスリン感受性が増加していることが明らかとなった．自発運動量・エネルギー代謝はむしろ減少しており，体重増加抑制作用のメカニズムを説明しうるものではなかった．呼吸商が増加していたことから，エネルギー源としての糖利用増加が示唆され，末梢組織の糖取り込み増加作用とも合致する結果であった．糞中への各種脂質排

泄が促進していたが，肝臓中脂質含量には変化がなかったことから肝臓中脂質合成の増加が示唆された．肝臓での脂質合成増加および胆汁への排泄促進という仮説を検証するため，^{3}H-脂肪酸infusion試験を実施した．胆管カニュレーションを施したマウスに^{3}H-脂肪酸を静脈からinfusionして胆汁を採取し，胆汁中の^{3}Hラベル脂質を測定したところ，コレスチラン投与群において胆汁中の^{3}H-コレステロール, ^{3}H-リン脂質が顕著に増加した．よって，肝臓における脂肪酸を基質としたコレステロール・リン脂質の合成増加および胆汁への排泄増加が強く示唆された．更に作用機序解析を進めるため，マイクロアレイによる遺伝子発現解析を肝臓・脂肪・筋肉で実施したところ，肝臓における脂肪酸，胆汁酸，リン脂質およびコレステロール合成関連遺伝子の発現が増加していた．血糖低下・体重低下の推定作用機序として，胆汁酸吸着剤は腸管内で胆汁酸を吸着して糞中排泄を促進することにより，肝臓での胆汁酸・コレステロール・リン脂質の合成が増加し，その原料となる脂肪酸がおそらくは内臓脂肪から動員された結果，内臓脂肪の重量が低下し，体重も低下したと考えられる．体重低下に伴い，骨格筋や脂肪など末梢組織でのインスリン抵抗性が改善し，血糖低下作用を示したと推測される．以上より，コレステロール逆転送系の最終ステップを賦活化させる胆汁酸吸着剤は脂質低下だけでなく，新規作用機序により血糖低下，インスリン抵抗性改善，体重低下という新たな薬効を示すことを見出した．

コレステロールおよび胆汁酸の代謝調節を介して，コレステロール逆転送系を賦活化させることにより，動脈硬化・高脂血症のみならず 2 型糖尿病や肥満症も改善することが示唆された．本研究を通して，生活習慣病に対する予防薬あるいは治療薬の開発につながることが期待される．