

博士論文

**PFIC1 の確定診断法の確立を指向した
ヒト単球由来マクロファージにおける
ATP8B1 の機能解析**

直井 壯太郎

目次

略語.....	3
背景.....	5
要旨.....	26
序論.....	29
方法.....	33
結果.....	51
考察.....	66
結論及び今後の展望.....	71
図表.....	76
謝辞.....	94
参考文献.....	97

略語

ABC: ATP binding cassette

ATP8B1: ATPase, class I, type 8B, member 1

ABCA1: ATP-binding cassette, sub-family A, member 1

ApoA1: Apolipoprotein A1

BSA: Bovine serum albumin

BSEP: Bile salt export pump

ER: Endoplasmic reticulum

FACS: Fluorescence activated cell sorting

FSC: Forward scatter

FXR: Farnesoid X receptor

γ -GTP: Gamma-glutamyl transpeptidase

HDL: High density lipoprotein

IFN- γ : Interferon gamma

IL-4: Interleukin 10

IL-10: Interleukin 4

LDL: Low density lipoprotein

LXR: Liver X receptor

M-CSF: Macrophage colony stimulating factor

MDM: Human monocyte derived macrophage

MFI: Mean fluorescence intensity

mRNA: messenger RNA

PBS: Phosphate buffered saline

PFIC: Progressive familial intrahepatic cholestasis

PS: Phosphatidylserine

qPCR: Quantitative real time polymerase chain reaction

RCT: Reverse cholesterol transport

siRNA: Small interference RNA

SR-B1: Scavenger receptor class B member 1

SSC: Side scatter

VLDL: Very low density lipoprotein

背景

コレステロールのホメオスタシス

細胞において、コレステロールはリン脂質と共に細胞膜を構成する脂質であり、膜の流動性や、安定性を制御しており、ひいては細胞内膜小胞を介したオルガネラ間の物質輸送、膜タンパク質の機能制御、またラフトと呼ばれる界面活性剤に不溶性の細胞膜ドメインの形成に寄与し、細胞膜を介したシグナル伝達においても重要な役割を果たしていることが今日までの精力的な研究から明らかにされている (1)。したがって、コレステロールの細胞内、および個体内での動態制御は、これらの機能を正常に保つのに非常に重要であることが推察される。実際に、コレステロールは臓器間、また細胞内オルガネラ間においても含有量が大きく異なっており、このような分布を維持するために非常に複雑な機構が存在する (コレステロールホメオスタシス) (2)。その中で、体内に摂取したコレステロールの臓器間での分配過程においては、循環器系を介したリポタンパク質による輸送が主要な役割を担っており、一方、体外へのコレステロール排出には、代謝産物である胆汁酸の胆汁排泄過程が主要な役割を担う。細胞内のコレステロール動態については、細胞内外の輸送、細胞内オルガネラ間の輸送、de novo 合成経路、代謝経路という素過程が考えられ、それぞれに寄与す

る特異なタンパク質群が同定されてきている。

個体内のコレステロール動態制御

体内へのコレステロール供給源となるのは食事によるものが全体の 2 ~ 3 割であり、体内での生合成が 7 ~ 8 割を占める。体内のコレステロールは、トリグリセリド、リン脂質、そしてアポリポタンパク質と共に、粒子状の構造のリポタンパク質として、リンパ管、血管を通り、臓器間を輸送される。小腸上皮細胞から吸収されたコレステロールは、大型でトリグリセリドが豊富なりポタンパク質であるカイロミクロンとして、リンパ管を経由して循環血中に放出され、末梢のリポタンパク質リパーゼ (LPL) によりトリグリセリドが分解されることでカイロミクロンレムナントとなり、これがアポリポタンパク質 APOB48、APOE と受容体の相互作用を介して肝臓に取り込まれる。肝臓は全身のコレステロール動態において中心的な役割を担う臓器であり、取り込んだコレステロールや、生合成されたコレステロールを、トリグリセリドに富んだ超低密度リポタンパク質 (VLDL) として分泌することで、肝臓から末梢臓器へと分配する役割を持つ。VLDL 中のトリグリセリドが末梢臓器や血管内皮細胞表面に存在する LPL、肝性トリグリセリドリパーゼ (HTGL) により分解を受けることで、VLDL から中間比重リポタンパク質 (IDL)、低比重リポタンパク質 (LDL) とな

るが、LDLはアポリポタンパク質 APOB100、APOE と LDL receptor (LDLR) の相互作用を介して細胞内に効率的に取り込まれるため、末梢臓器へのコレステロールの供給源となる (3)。一方で、末梢臓器から余剰なコレステロールを肝臓へと逆転送する経路も存在することが明らかとなっており、これは高比重リポタンパク質 (HDL) によって担われている (4)。HDL は、末梢臓器、また動脈壁のマクロファージからのコレステロール排出促進に寄与するが、この作用は特に、動脈硬化の発生要因となる血管内皮下でのマクロファージの泡沫化に対して抑制的に働くことから、HDL の抗動脈硬化作用として知られている。またコレステロール排出促進以外にも、血管内皮細胞において、HDL は炎症性サイトカインである TNF α や IL-1 による細胞膜上の ICAM、VCAM といった接着因子の誘導を抑える働きがあり、これにより単球の内皮細胞への接着、そしてそれに続く、内皮下への移動が起こりにくくなると考えられている (5)。さらに HDL が Scavenger receptor B 1 (SR-B1) を介して endothelial NO synthase (eNOS) を活性化して NO 産生を促すことも報告されており、この効果は血管壁の弛緩をもたらすため、抗動脈硬化作用の一役を担っていると考えられる (6)。近年の大規模な臨床研究では、血中 HDL コレステロール濃度が動脈硬化のリスクと逆相関することが示されており、それ以前には、血中総コレステロール値、LDL コレステロール値が高いことが、脳血管・心血管疾患の危険因子として取

り上げられていたが、現在では低 HDL コレステロール血症 (< 40mg/dl) も脂質異常症の一つとして認知されるようになった (7,8)。

細胞内のコレステロール動態制御

コレステロールは細胞内においても複雑な制御機構により、コレステロール量、細胞内コンパートメントにおける分布を一定に保っている (9)。細胞内のコレステロール量を維持するために、細胞内のコレステロール量を感知し、多い場合は、合成・取り込みを減らし、排出を増やすレスポンス、一方で少ない場合は、合成、取り込みを増やし、排出を減らすレスポンスが必要であるが、それぞれに関わる遺伝子の発現を mRNA レベルで調節することで可能にする機構が存在する。ER に局在する膜タンパク質である Sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) は、ER におけるコレステロール量が少ない場合、SCAP と結合し、2 量体としてゴルジ体へと移行し、S1P、S2P というプロテアーゼによる切断を受け核内に移行し、転写因子として働くことで HMG-CoA reductase や、LDLR など細胞内コレステロールを増やす遺伝子の転写を促進し、ABCA1 などコレステロール排出に関与する遺伝子の転写は抑制する (10,11)。反対に、ER におけるコレステロール量が多い場合、SCAP のコレステロールセンシングドメインとコレステロールの結合により、SCAP の構造変化

が起こり、INSIGによりSCAPが認識され、SREBP2・SCAP・INSIGの三量体が形成されることで、ゴルジ体への輸送が抑制され、核内への移行は起こらない。この制御機構は極めて厳密であり、ERにおける少量のコレステロール量変化にも応答することが明らかとなっている(12)。細胞はコレステロールの供給源としてLDLを、LDLRを介したエンドサイトーシスにより取り込むが、取り込んだLDLは初期エンドソーム、後期エンドソームと輸送され、Lysosome acid lipaseによりコレステロールエステルは加水分解されて遊離コレステロールとなり、その後様々なコンパートメントに輸送される(2)。定常状態において細胞内のコレステロールは細胞膜にもっとも多く、リソソームにおけるコレステロール量は少ないことから、この輸送は効率的に行われていることが推測される。リソソームからのコレステロールの輸送にはNiemann Pick disease type C1 (NPC1)、type C2 (NPC2)が関与しており、この遺伝子変異はリソソームにコレステロールが蓄積するNiemann Pick diseaseとなることが知られているが、取り込まれたコレステロールがどのようにERに輸送され、SREBPに感知されるのかについては不明な点が多い(13)。

コレステロールトランスポーター

コレステロールの細胞内外輸送に関わる膜タンパク質は、遺伝子クローニン

グならびに遺伝子改変動物を用いた解析から明らかにされており、動脈硬化との関連から近年盛んに研究されている。Niemann-pick type C1 Like 1 (NPC1L1) は血中コレステロールを下げる目的で処方されるエゼチミブによって阻害される標的タンパク質として同定され、小腸上皮細胞の刷子縁膜側に発現し、食事、胆汁由来のコレステロールの取り込みに寄与することが明らかとなっている (14)。ABCG5、ABCG8 はヘテロダイマーとして機能するトランスポーターで、肝細胞の毛細胆管側、小腸刷子縁膜側に発現し、植物ステロールの排出に働き、この機能欠損によりシトステロール血症となることが知られている (15)。細胞内コレステロールの細胞外への排出には主に ABCA1、ABCG1、SR-B1 が関与することが明らかとなっている。ABCA1 は肝実質細胞、小腸上皮細胞の基底膜側、マクロファージなどユビキタスに発現し、Apolipoprotein A1 (ApoA1) との相互作用を介して、細胞内から細胞外へとコレステロールを排出し、HDL 形成の初期段階を担うトランスポーターである (16)。各臓器における ABCA1 の機能を解析するため、これまで臓器特異的なノックアウトマウスが作出されているが、肝臓特異的ノックアウトマウスにおいて血中 HDL コレステロール濃度が 70% 低下することから、肝臓における ABCA1 が HDL 形成における主要な役割を担っていると考えられており (17)、小腸特異的ノックアウトマウスにおいても血中 HDL コレステロール濃度が 30% 低下することから小腸にお

ける ABCA1 の寄与も示されている (18)。また肝臓、小腸のダブルノックアウトマウスでは 90%低下することから、他の臓器における ABCA1 の HDL 形成に対する寄与は低いと考えられている。実際にマクロファージ特異的なノックアウトマウスでは血中 HDL コレステロール濃度の減少は見られていない (19)。

しかしながら、³H 標識コレステロールを負荷したマクロファージをマウスの腹腔内に注射して、その後マクロファージから排出された ³H 標識コレステロールが、循環血を通り、肝臓に取り込まれ、胆汁として糞中へ排出されることを想定した、RCT アッセイという実験系において、ABCA1 がノックアウトされたマクロファージを用いるとコントロールの場合と比較して糞中への排出が減少する結果が得られており、末梢のマクロファージから肝臓へのコレステロール転送には、マクロファージの ABCA1 が寄与していると考えられている (20)。

ABCA1 のヒトにおける重要性は、ABCA1 をコードする *ABCA1* 遺伝子の機能欠損により、血中 HDL コレステロールがほぼゼロレベルになり、動脈硬化を発症しやすい Tangier 病となることから明確である (21-23)。コレステロールの排出に関わる ABC トランスポーターとしてもう一つあげられるのが ABCG1 で、ABCG1 は副腎、肺、膵臓などに発現する他、マクロファージにも発現しており、細胞内のコレステロール排出に促進的に働くことが、過剰発現系において HDL やアルブミンに対するコレステロール排出が上昇することから明らかとなって

いる (24)。ABCG1 のノックアウトマウスから回収したマクロファージを用いた RCT アッセイにおいて、ABCA1 ノックアウトと同様に糞中へのコレステロール排出の減少が見られていることから、コレステロールの逆転送に寄与していると考えられているが (20)、ABCA1 のように特異的なアクセプターを持たないことから、ABCG1 は、ABCA1 の働きにより形成されたコレステロールエステル含有量の少ない HDL (HDL₃) に対して、コレステロール排出する働きがあり、成熟した HDL (HDL₂) の形成に働くと考えられている。SR-B1 はスカベンジャーレセプターファミリーのうちの一つであり、HDL 中のコレステロールの取り込み、細胞内コレステロールの排出の双方向に輸送する働きがあるということが報告されており、発現臓器によりその役割が異なっていると考えられている (25)。肝臓における SR-B1 は HDL のコレステロールを取り込む方向に働き、末梢において HDL に対して排出されたコレステロールを回収する段階を担っていると考えられている (26)。一方マクロファージにおける SR-B1 は余剰なコレステロールを HDL に受け渡す働きがあると推定されているが、SR-B1 は細胞内コレステロールレベルが上昇すると発現量が減少することが報告されていることや、SR-B1 のノックアウトマウスのマクロファージにおいて WT マウスのマクロファージと比較して RCT アッセイで差が見られないことなどから、マクロファージの泡沫化抑制、RCT の促進に貢献するというエビデンスは乏し

い (20)。

胆汁酸としてのコレステロールの体外排出

RCTにより末梢から肝臓へ輸送されたコレステロールは、代謝を経て最終的に胆汁酸として胆汁中へ排泄される。肝細胞内での **cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1)** による **27-ヒドロキシ-コレステロール**への代謝反応が胆汁酸合成の初期段階となっており、その後複数の代謝、抱合反応により胆汁酸に合成される。胆汁中の主要成分である胆汁酸はステロイド骨格を持つ両親媒性の有機アニオンである。肝細胞での合成後は、胆汁中へと排出されるが、その大部分は腸管で再吸収を受け、門脈血を介して再び肝細胞内に取り込まれる (27)。この小腸と肝臓の間を循環する腸肝循環と称される過程の中で、胆汁酸は種々の重要な機能を担っている。肝臓や小腸においては、胆汁酸を基質とする核内レセプターである **Farnesoid X receptor (FXR)** を介し、胆汁酸自身の生成や代謝、腸管循環時における輸送に関わるタンパク質をコードする遺伝子を調節している (28)。また、肝臓から毛細胆管内への胆汁酸の排出は、細胞間隙を介してカウンターイオンであるナトリウムイオンの類洞から毛細胆管への移動を促す。その際に生じた浸透圧差は、毛細胆管内へ水を流入させ、胆汁流の駆動力となることが知られている。更に、腸管へと分泌された胆汁酸は、脂溶性ビタミン

であるビタミン A、D、K やコレステロール、少量のトリグリセリドや脂肪酸と共にミセルを形成し、消化管における吸収を促進することが知られている。このように胆汁酸は、生体内で重要な機能を担っているが、その一方で、ステロイド骨格に由来する界面活性作用、あるいは疎水性の性質により、細胞内では毒性を持つことも知られている (29)。生体は正常時には、これらの毒性に対して、細胞膜に含まれるコレステロールや、スフィンゴミエリン、フォスファチジルコリンなどにより、胆汁酸を水和、アルカリ化、ムチン化することで対応している (30)。また胆汁流の存在も、胆汁酸が膜に接触する時間を制限するとともに、胆汁圧力を正常に保ち、胆汁に含まれる固形物の沈着形成を防ぐことにより、胆汁酸の細胞毒性からの防御に一役を担っている (30,31)。したがって腸肝循環における胆汁酸輸送や、胆汁や細胞膜の構成成分が変化することにより、毒性のある胆汁が形成され、結果的に、肝細胞や胆管を傷つけることとなる。胆汁酸の胆汁中への排泄、腸管循環についても種々のトランスポーターの関与が明らかになっている。肝細胞内への取り込み過程は、 Na^+ -dependent co-transporting polypeptide (NTCP/SLC10A1) (32) と Na^+ 非依存的な organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLC21A) (33) 肝細胞から毛細胆管への排出過程においては、taurocholate, glycocholate といった一価の電荷を持つ胆汁酸に関しては Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) (34) 、硫酸抱合さ

れた胆汁酸や二価の電荷を持つ胆汁酸に関しては multidrug resistance associated protein 2 (MRP2) (35)、腸管上皮細胞内への取り込み過程は、apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT/SIC10A2) (36)、腸管上皮細胞から門脈血への排出過程は、organic solute transporter α (OST α) と organic solute transporter β (OST β) のヘテロダイマーによることが報告されている (37)。

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2, 3 型 (PFIC2, PFIC3)

胆汁酸輸送に関与する輸送担体の生体システムにおける重要性は、ABC トランスポーターファミリーに属する BSEP、ABCB4 の機能低下により、肝疾患が発症することから垣間見ることができる。BSEP 遺伝子の変異による先天性な機能不全は、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型 (Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2; PFIC2) の発症原因となる。PFIC2 患者では、胆汁中への胆汁酸排泄が低下するため、胆汁うっ滞が惹起されるとともに、肝内に過剰な胆汁酸が蓄積するため、重篤な肝機能障害が生じ、慢性化する結果、思春期前に肝硬変へと進行し、死に至る (38,39)。ABCB4 の遺伝子変異による先天性な機能欠損も、胆汁中へのフォスファチジルコリンの排泄が低下する結果、胆汁酸の毒性を軽減できないため、特に胆管系の細胞に障害が生じ、進行

性家族性肝内胆汁うっ滞症 3 型 (Progressive familial intrahepatic cholestasis type 3; PFIC3)という致死性の疾患の発症につながる (40-42)。

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 1 型 (PFIC1)

一方でABCトランスポーターファミリーに属さない遺伝子の変異による遺伝性肝内胆汁うっ滞も知られている。進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 1 型 (Progressive familial intrahepatic cholestasis type 1; PFIC1)は、乳児期に肝内胆汁うっ滞を発症し、思春期前に肝硬変、肝不全へと進行し、死に至る疾患であり、PFIC2 と非常に似た症状を示すことが知られている (43,44)。PFIC1 は P4-type ATPase ファミリーに属する ATP8B1 の遺伝子変異が原因であるが、ATP8B1 自身は胆汁酸輸送を担うトランスポーターではないと考えられている (45)。P4-type ATPase ファミリーはアミノリン脂質を脂質二重膜の細胞外側から細胞質側の膜へと輸送するフリッパーゼ活性を有する膜タンパク質をコードする遺伝子群と考えられており、その活性により、脂質二重膜の内外膜におけるリン脂質、コレステロール、スフィンゴミエリンなど脂質の非対称な配置の保持に寄与していると推察されている (46)。ATP8B1 は BSEP、ABCB4 と同様に、肝実質細胞の毛細胆管側膜に発現していることが報告されているが、ATP8B1 機能欠損マウスの胆汁成分の解析では、野生型マウスでは見られない

フォスファチジルセリンが検出され、また胆汁中のコレステロール量が多い (47)。そして、膜ベシクルで BSEP の機能を評価する系において、膜のコレステロール量が減少すると BSEP の機能低下が起こるという報告 (48) がされており、これらを合わせて、ATP8B1 の機能不全により、脂質二重膜の非対称性が損なわれ、コレステロール含量が減少し、間接的に BSEP の機能が低下することで肝内胆汁うっ滞が惹起されるという仮説が提唱されている (49)。一方で、ATP8B1 の機能欠損により、FXR のダウンレギュレーション、核内移行の抑制が起こることで、FXR により遺伝子発現制御を受けている BSEP の発現低下、ASBT の発現上昇が起こるという仮説も他のグループから提唱されているが (50)、培養細胞を用いた RNA 干渉による ATP8B1 のノックダウンにより、FXR の発現量減少や活性化の抑制が見られないこと (51)、ATP8B1 機能欠損マウスにおいて同様に変化が見られないこと (52)、PFIC1 患者の肝組織においても BSEP の正常な発現・局在が見られる場合があること (53) から否定的に見られている。PFIC1 患者では、頻度は高くないものの、肝臓外の症状として肺炎、膵炎、難聴が報告されており、これらは PFIC2 患者では見られていない (54)。これは、ATP8B1 は比較的にユビキタスに発現するタンパク質であることから、各臓器における ATP8B1 の機能欠損によるものと考えられている。難聴については ATP8B1 の変異により、進行性ではないが発作的な胆汁うっ滞を呈する

BRIC1 患者、また ATP8B1 の機能欠損マウスにおいて、音の振動を神経に伝える役割を担う内耳の有毛細胞が変性していることが観察されており、ATP8B1 が有毛細胞の維持に重要であることが示唆されている (55)。しかしながら ATP8B1 の生理学的機能が十分に明らかとなっておらず、それぞれの症状がどのようにして引き起こされるのか、分子メカニズムは未解明である。

新生児・乳児期の胆汁うっ滞における PFIC の鑑別

先に述べた PFIC1、PFIC2、PFIC3 に加え、新生児・乳児期に胆汁うっ滞を発症する疾患が他にも複数知られており、適切な治療方針の決定にはこれらを早期に診断・鑑別することが重要である。血液検査より、血清中の胆汁酸、直接ビリルビン、AST/ALT について高値が見られ、超音波検査により胆道の異常が見られない場合に PFIC が疑われ、さらに血清 γ -GTP 活性の高い患者が PFIC3、正常値である場合 PFIC1、PFIC2 の可能性が考えられる。しかしこの段階においては、その他の疾患の可能性も考えられるため、さらなる検査が行われている。肝生検サンプルを用いた、組織学的検査は、PFIC と肝組織に異常をきたす他の疾患とを区別するのに必要である。PFIC3 疑いと診断され、肝組織の観察から胆道上皮の増殖が見られた場合 PFIC3 の疑いはより強まり、Alagille 症候群や、嚢胞性線維症、 α 1-antitrypsin 欠損症などの可能性を除くことができる

(56)。しかしながら PFIC1 と PFIC2 に非常によく似た症状を示す TJP2、BAAT 欠損症など、通常の検査では判別できない疾患も存在する (57)。そこで各疾患の責任遺伝子の産物であるタンパク質の発現を免疫染色により調べる方法が取られており、染色が見られない場合、当該遺伝子の変異によって発現量が著しく減弱していることを推察することができる。ただしコントロールを厳密に取れないため、明確な判定基準を設けられないことや、変異により機能のみが低下する場合に鑑別できないことから万能でない。以上のような検査を経て、なお PFIC が強く疑われる場合には、確定診断に至るために末梢血白血球からゲノムを調製し PFIC の各責任遺伝子の配列を解析することになる。PFIC1、2、3 の各責任遺伝子である *ATP8B1*、*BSEP*、*ABCB4* はそれぞれ 28 のエクソンから成るため、それぞれのエクソンを挟むプライマーセットで PCR により増幅した産物の塩基配列を解析することで、各遺伝子のエクソン、またはエクソン-イントロンの境界領域について変異の有無を調べることができる。そして、解析の結果、高度に保存されたスプライシングに必須の塩基や、病因となることが過去の報告や、変異の性質から明らかな部位（フレームシフト、ナンセンス）において変異がホモ、あるいは複合ヘテロで同定された場合は確定診断に至ることとなる。しかしながら遺伝子解析によっても診断が困難なケースが存在する（これについては序論において記述する）。

P4-type ATPase ファミリーの生理学的機能

P4-type ATPase ファミリーはアミノリン脂質のフリッパーゼであることから、脂質二重膜の性質を変化させることによって様々な細胞機能を担っていることが線虫や酵母を用いた研究により示唆されている (58)。その中でも細胞内小胞輸送への関与が明らかになっている。酵母を用いた研究では、一つの遺伝子を欠損しても死に至らない場合、もう一つの遺伝子を同時に欠損させることで、死に至るかどうかを検討する、合成致死性を用いた手法から、機能的に関連する遺伝子をスクリーニングされている。それにより、酵母の P4-type ATPase である、DRS2 や NEO1 との関連遺伝子としてあげられる遺伝子には様々な細胞内小胞輸送に関わる遺伝子が含まれ (59)、それらの変異株の表現型解析から、エンドサイトーシス、ゴルジ体からの分泌、ER からゴルジ体への小胞輸送など種々の輸送経路への異常が観察されている (49)。また線虫の P4-type ATPase である TAT-1 の機能欠損により外因性に発現させたヒト Transferrin receptor、ヒト GLUT1 のリサイクリングが阻害されることが報告されている (60)。哺乳類の P4-type ATPase についても、機能解析が進められてきており、フリッパーゼ活性とそれに伴う細胞機能のリンクがいくつか報告されている。Caco-2 細胞を用いた ATP8B1 の定常的ノックダウン細胞では、アピカル膜に発現する複数のタンパク質のトラフィッキングに異常が見られており、異常が見られるタン

パク質に選択性があることから、小胞輸送が部分的に破綻していて、その経路にのるタンパク質に影響が出ていると推察されている (61,62)。ATP8A1 は ATP8B1 と同様、哺乳類の P4-type ATPase の一つであるが、リサイクリングエンドソームと細胞膜に局在し、フォスファチジルエタノールアミンの取り込みを促進すること、そしてそのノックダウンにより、細胞遊走が抑制されることが報告されている (63)。フォスファチジルセリンのフリッパーゼ活性が明らかとなっている ATP11C については、赤血球の形態維持に寄与していること (64)、B 細胞の分化に関与すること (65,66)、そしてアポトーシスの際に分解されることでフォスファチジルセリンの細胞外露出を促進すること (67) など、様々な細胞機能への関連が示されてきている。これらのことから、P4-type ATPase が、フリッパーゼ活性を持つことにより細胞膜のダイナミクスに寄与していることが伺える。

マクロファージの分類、極性化とサブタイプ

骨髄の前駆細胞から循環系に入った単球は、血管内皮下に浸潤し、各組織へ移行するとともにマクロファージへと分化する。マクロファージは各組織において異なる役割を担っていることから、解剖学的な部位の違いで分類がなされており、それぞれ破骨細胞 (骨)、ミクログリア (脳)、肺胞マクロファージ(肺)、

組織球（結合組織）、クッパー細胞（肝）など異なる名前では呼ばれている。マクロファージは自然免疫において重要な役割を担っており、病原体など異物の除去、抗原提示、そしてアポトーシスした自己細胞の除去まで、炎症の初期から終結までに関与しているが、炎症の各段階において、異なる性質、機能を持つことから、マクロファージは可塑性に富み、周囲の環境に応じて形態や遺伝子発現、機能を変化させることが明らかとなってきた。また、同じ炎症部位においても、異なる性質を持ったマクロファージが存在していることから、heterogeneous な細胞集団であると捉えられており、各性質を有するマクロファージを理解するために、機能や表面抗原の違いからサブタイプが分類されてきた (68)。そして異なる刺激により、各サブタイプの性質を獲得することが明らかとなっており、この過程には polarization（極性化）という表現が用いられる。特に、古くから研究され、LPS や IFN- γ といった刺激により極性化し、炎症に対して促進的に働く性質を持つサブタイプを classically activated, M1 サブタイプと呼び、IL-4、IL-13 によって極性化し、炎症に対して抑制的に働く性質を持つサブタイプを alternatively activated, M2 サブタイプと呼ぶ (69)。M1 サブタイプと M2 サブタイプの違いとして挙げられるのは NO の産生である。M1 では inducible NO synthase (iNOS) が誘導され、NO を産生するのに対し、M2 では arginase が誘導され、NO 産生に必要なアルギニンを代謝するため、

NO 産生は抑制される。また M1 サブタイプは reactive oxygen species (ROS) の産生も活発であり、NO と共に毒性を持つ分子として、外来微生物の除去に寄与している。M1 サブタイプによる炎症の惹起、異物の排除過程では、周囲の組織も傷害してしまうため、炎症の終結と共に、組織の修復が必要となるが、ここで M2 サブタイプの機能が重要となる。M2 サブタイプは組織修復に寄与する繊維芽細胞の増殖・分化を誘導する TGF- β 、PDGF や、血管新生を誘導する VEGF を分泌し、組織細胞の増殖、細胞外マトリックスの再構築の促進に働いている (70,71)。また近年、M2 マクロファージとして捉えられていたサブタイプのうち、抗炎症サイトカインである IL-10 や糖質コルチコイドにより極性化が誘導されるサブタイプについては、異なる性質を持つことから、IL-4、IL-13 により極性化するサブタイプを M2a、IL-10、糖質コルチコイドにより極性化するサブタイプを Regulatory, M2c サブタイプとした分類が提唱され、定着しつつあるのが現状である (72)。M2a サブタイプは Fluid-phase エンドサイトーシス、マンノース受容体を介したエンドサイトーシスが活発で (73)、MHC class II を高発現することから、取り込んだ抗原を提示する役割を担っており、ファゴサイトーシスでは除去されない寄生虫の抗原提示に寄与している。一方で M2c サブタイプではこれらの機能、MHC class II の発現は抑制されている。M2c サブタイプ特異的な機能としてはアポトーシス細胞のファゴサイトーシスがある (74)。こ

の機能によって、M2c サブタイプは炎症の終結時に、アポトーシスした自己細胞（好中球）を速やかにファゴサイトーシスして、自己抗原に対する免疫寛容に寄与している。実際に、アポトーシス細胞のファゴサイトーシス能の獲得に必要な核内受容体として明らかとなった LXR α/β 、PPAR δ をノックアウトしたマウスは、自己免疫性の病態を発症することが示されている (75,76)。

マクロファージサブタイプの極性化の制御

極性化の制御は先に記したとおり、サイトカインによる刺激により誘導される。M1 サブタイプの極性化を促す IFN- γ は、IFN- γ 受容体に結合すると JAK1、JAK2 がリクルートされ、STAT1 をリン酸化することで核内移行を促し、リン酸化 STAT1 が転写因子として機能することで、極性化に必要な遺伝子の発現を誘導する。また別の転写因子である IRF の核内移行も起こることが知られている。グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分である Lipopolysaccharide, LPS も M1 への極性化を誘導するが、主に Toll like receptor 4 (TLR4) によって受容されることで、MyD88、TIRAP を介してシグナルが伝達され、NF- κ B、AP-1、IRF といった転写因子群が活性化することで、遺伝子発現の調節が行われる。GM-CSF も M1 様のフェノタイプを誘導する因子として考えられるようになってきているが、STAT5、NF- κ B、IRF を活性化させることから、IFN- γ 、LPS

刺激と類似している。一方で、M2a サブタイプ、M2c サブタイプの極性を誘導する IL-4、IL-10 は、IFN- γ と同様な機構 (JAK-STAT pathway) でそれぞれ転写因子を活性化させる。IL-4 は STAT6、IL-10 は STAT3 を活性化させ、各サブタイプに特有な遺伝子発現を誘導する。糖質コルチコイドは IL-10 と同様に M2c サブタイプを誘導する因子であるが、ステロイド骨格を持つ脂溶性の高い分子であるため、細胞膜を容易に透過し、核内受容体である糖質コルチコイド受容体のリガンドとして作用し、抗炎症に働く遺伝子の転写を誘導する。また M2a、M2c サブタイプが抗炎症のサブタイプとして捉えられる所以として、IL-4、IL-10 の作用により、先に記した M1 サブタイプの極性化で上昇する IL-1、IL-6、IL-12 等の炎症性サイトカインを抑制されることが挙げられる。このように、極性化の過程では各転写因子による遺伝子発現の誘導、抑制がダイナミックに起こることにより、各サブタイプ特有な性質獲得が可能になっている (77)。

さらに、転写因子による遺伝子発現制御のみならず、様々な段階での制御が各サブタイプの極性化に影響していることが近年明らかとなっており、その例として miRNA による mRNA の翻訳抑制 (78,79) や、ヒストンのメチル化・アセチル化制御による epigenetic な遺伝子発現制御 (80) が挙げられる。

要旨

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 1 型、2 型 (PFIC1、2) は乳児期から肝内胆汁うっ滞を発症し、進行性で思春期までに肝不全へと至る常染色体劣性の遺伝性疾患である。PFIC1、PFIC2 は症状が酷似しており、臨床所見は酷似しているが、治療の過程では差異が認められ、特に肝移植の予後が大きく異なる。これまでに PFIC2 では予後が概ね良好であるのに対し、PFIC1 では脂肪性肝炎が高頻度に認められ、移植肝の機能喪失へと至ることが明らかとなってきた。そこで適切な治療方針を決定できるよう、PFIC1、PFIC2 を早期に鑑別する必要があるが、それぞれの責任遺伝子である *ATP8B1*、*ABCB11 (BSEP)* の各エクソン配列の解析を行っても、両アレルに病因として明らかな変異を同定できない事例も多く、イントロンやプロモーター領域における変異による mRNA 量の減少が想定されるようなケースも見られる。そのため、遺伝子解析単独では、PFIC 型の鑑別に不十分である。そこで本研究では、遺伝子産物であるタンパク質機能の評価が、より直接的な病因の特定につながると考え、*ATP8B1* の分子量機能評価をベースとした PFIC1 の診断法の確立を目的とした。*ATP8B1* が *BSEP* と異なり、肝臓以外にも発現することに着目し、ヒト全血から分離した各血球における発現を比較したところ、単球由来マクロファージ (MDM) にお

いてのみ発現が確認された。そこで ATP8B1 の欠損により MDM で見られるフェノタイプを探索し、その評価によって診断を可能にすることを旨し、まず siRNA により ATP8B1 をノックダウンした MDM、また PFIC1 患者 MDM におけるタンパク質発現を Western blotting により解析したところ、MDM のサブタイプ特異的なマーカーの発現量に変動が見られた。また、ドナーの異なる MDM 間における ATP8B1 の発現量変動と M2c サブタイプマーカー CD163 の発現量の相関を見出したことから、ATP8B1 が M2c サブタイプに高発現しており、ATP8B1 が発現しない PFIC1 患者 MDM では M2c サブタイプが少ないことを明らかとした。そこで、IL-10 処理により M2c サブタイプへの極性を誘導することで、ATP8B1 欠損のフェノタイプがより大きく見られることを期待して、ATP8B1 のノックダウン下で IL-10 処理を行い、M2c サブタイプへの極性の程度を、M2c マーカーの発現、アポトーシス細胞のファゴサイトーシス能、細胞の形態という 3 点について FACS を用いて検討することとした。その結果、ATP8B1 ノックダウン下において、M2c マーカーである CD163、CD14 の発現量が大きく低下したが (CD163: 75%, CD14: 53%)、一方で CD16 の発現量に影響はないこと、またアポトーシス細胞のファゴサイトーシス能は IL-10 処理により正常に誘導されていることが明らかとなった。部分的に M2c サブタイプへの極性が起こっていると考えられる CD16^{high} ポピュレーションの

ATP8B1 ノックダウンによる細胞形態の変化について検討したところ、SSC 値が有意に高くなることが観察され、これは脂肪滴蓄積の増大と対応することが明らかとなった。ATP8B1 のノックダウン下での IL-10 処理により見られたこれらのフェノタイプは、PFIC1 患者 MDM においても同様に観察され、このうち、脂肪滴蓄積の評価は、測定が容易であること、PFIC1 群とその他の群間で、約 2 倍程度の差が見られること、個人間変動が小さいこと（コントロール群の CV 値: 14%）、測定値を絶対値として評価できることから、診断として用いるには十分なフェノタイプであると考えられた。

序論

進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 PFIC (Progressive familial intrahepatic cholestasis) は乳児期より肝内胆汁うっ滞を発症し、思春期までに肝不全へと至る遺伝性疾患である。PFIC は、常染色体劣性の遺伝様式であり、その出生頻度は 50,000 から 100,000 に 1 人程度と推定されている。その責任遺伝子の違いにより PFIC1、PFIC2、PFIC3 に分類され、それぞれ *ATP8B1*、*ABCB11 (BSEP)*、*ABCB4 (MDR3)* が責任遺伝子として同定されており、これらはいずれも肝実質細胞の肝毛細胆管側膜に発現するトランスポーターである *ATP8B1*、*BSEP*、*ABCB4 (MDR3)* をコードしている (38)。PFIC は、乳児期に黄疸を呈する患者の中で、血液検査より血清中直接ビリルビン、総胆汁酸濃度の高値を認め、強い掻痒感があり、超音波検査により胆管に異常が見られなかった場合に疑われるが、さらに血清 γ -GTP 高値であれば PFIC3、正常値か低値であれば、PFIC1、PFIC2 が疑われることになる。PFIC1 と PFIC2 は、発症から病態がある程度進行するまでの間、症状や検査値での差が見られず、臨床所見を基にした早期の鑑別は困難である (54)。

しかしながらその治療に対するレスポンスは大きく異なり、早期に確定診断へと至ることは、PFIC1、PFIC2 の適切な治療方針を決定する上で重要である。

当研究室ではこれまで、尿素サイクル異常症治療薬である 4-phenylbutyrate (4PB) が胆汁酸排泄トランスポーターである BSEP の細胞膜における発現量を上昇させることを見出しており、その治療効果を実証するため、PFIC2 患者に対する探索的臨床試験を行った結果、BSEP の発現量が低下する変異を有する PFIC2 患者において、4PB 投与により、BSEP の発現量が部分的に回復するとともに、肝内胆汁うっ滞が改善し、肝障害が軽減されることを明らかとしてきた (81-83)。一方で PFIC1 において、ATP8B1 の機能欠損により、BSEP の機能低下が起こることが疾患メカニズムとして提唱されていたことから、4PB が奏功する可能性が考えられたが、臨床試験の結果、掻痒感の軽減が見られたが肝内胆汁うっ滞症状の改善は見られなかった (84)。また、PFIC1、PFIC2 は肝不全へと至る前に肝移植が検討され、現在までにその症例報告が蓄積されてきているが、PFIC2 患者は概ね予後が良好であるのに対し、PFIC1 患者は移植肝に脂肪性肝炎を発症し、肝硬変へと至ることが明らかとなってきた (85-87)。

そこで確定診断へと至るために、遺伝子配列の解析により、それぞれの責任遺伝子である *ATP8B1*、*ABCB11* に病因となる変異の有無が検討されるが、両責任遺伝子に変異が見つからない場合、片方のアレルにのみ変異が見つかる場合、新規の変異が同定され、その影響が未知である場合などが多々認められるため、必ずしも確定診断に至らないのが現状である。特に両遺伝子に変異が同

定されない患者は、PFIC 疑いとして遺伝子検査を受けた患者のうち 30%に上ることが報告されており (88)、その他の責任遺伝子の存在も示唆されている。このような背景より、PFIC1、PFIC2 の各責任遺伝子の遺伝子産物である ATP8B1、BSEP の発現量、機能を患者検体から評価する方法が必要とされている。

BSEP は ABC トランスポーターファミリーに属し、その発現は肝実質細胞の毛細胆管側膜に限局しており、胆汁酸を細胞内から毛細胆管側へ輸送する機能を有する。毛細胆管側膜における発現量が非常に高いことから、肝生検により得られた検体から、肝切片を作製し、抗 BSEP 抗体を用いて免疫染色をすることにより、確認することができ、染色が見られない場合や、毛細胆管側膜における局在に異常が見られる場合に PFIC2 であると鑑別される (89)。一方で、ATP8B1 も肝毛細胆管側膜に発現することが知られているが、その発現量は低く、免疫染色により ATP8B1 の発現の有無・局在を判別できるほどの精度のある実験系は確立されていない。また、ATP8B1 はアミノリン脂質のフリッパーゼとして推測されている P4-type ATPase ファミリーに属し、これまでに、脂質二重膜の細胞外側のフォスファチジルセリン (PS) をサイトゾル側へ輸送するフリッパーゼ活性を有することが報告されてきた (90,91) が、ATP8B1 を高発現する Caco-2 細胞において ATP8B1 をノックダウンしても、細胞の PS のフリッパーゼ活性に影響がないこと (62) や、過剰発現系においても PS のフリッパ

ーゼ活性は検出されず、それまでに報告されていなかったフォスファチジルコリン (PC) のフリッパーゼ活性が検出されたこと (92) が報告されており、現在でも議論の余地が残されているのが現状である。このような背景から PFIC1 の鑑別のため、ATP8B1 のフリッパーゼ活性自身を患者検体から測定することは困難であると考えられる。

本研究では、末梢血単球を分化させることで得られる単球由来マクロファージ (MDM) の中で、抗炎症作用を担うサブタイプである M2c サブタイプにおいて ATP8B1 が高発現することを見出したことから、M2c サブタイプへ極性を誘導した MDM において ATP8B1 欠損により見られるフェノタイプが PFIC1 の診断マーカーとして用いることができるという仮説をもとに検討を行った。その結果、ATP8B1 欠損により IL-10 処理による M2c サブタイプへの極性が正常に起こらないこと、脂肪滴蓄積が増大することを明らかとし、特に脂肪滴蓄積は検出が容易であること、そして測定した絶対値から PFIC1 の診断が可能であることから、診断マーカーとして有用であると考えられた。

方法

PFIC 患者とヒト検体

本研究は本学の倫理委員会、及び各医療機関における倫理委員会により承認を受けており、患者一人一人のインフォームド・コンセントのもとヒト検体の提供を受け、*in vitro* の実験に供した。コントロール検体の提供を受けるにあたっては、肝胆膵の疾患を持ち、PFIC 所見の無い、20 歳以下の患者を対象とした。黄疸（血清直接ビリルビン値上昇）、総胆汁酸値上昇及び掻痒感がある一方、血清 γ -GTP 活性の上昇、胆道閉鎖所見の見られない PFIC 疑いの患者の全血から Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) によりゲノムを抽出し、BigDye® Direct Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) と特異的なプライマーを用いて、*ABCB11* 及び *ATP8B1* の各 27 エクソンとエクソン-イントロン境界領域を含む箇所を増幅し Sequence を解析した。*ATP8B1* は AF038007、*BSEP* は NM_003742 を Reference sequence として比較し、両アレルに変異が同定された場合、既に PFIC の病因となることが報告されていれば PFIC1、PFIC2 それぞれについて確定診断とした。一塩基多型と変異の区別はデータベース (www.ncbi.nlm.nih.gov) をもとに行った。一部の患者では、肝生検を行い、肝臓における *BSEP*、*ATP8B1* の発現量を Western blotting により調べており、

その結果も含め診断が行われた。図表: Table 1. に各患者 Pt. 1 ~ 9 に同定した *ATP8B1*、*BSEP* の変異部位を示した。Pt. 9 については結論 (診断法としての有用性について) において詳細を記述した。Genome sequencing に用いた各箇所プライマーを以下の Table. A に示す。

Table. A Primer sets for genome sequencing		
Primer sets for ATP8B1		
Exon	Forward primer 5' to 3'	Reverse primer 5' to 3'
2a	tgtaaaacgacggccagtcctatgcaggcagattcaac	caggaaacagctatgacctgcttcctgttgactcgg
2b	tgtaaaacgacggccagtcagcctaatacgaagtgg	caggaaacagctatgaccatcatcttggcacgtgtgg
3	tgtaaaacgacggccagtgggatggaggttaggactt	caggaaacagctatgaccaggcaggtgtagcatgaagg
4	tgtaaaacgacggccagttgtcactgtaagctgtggg	caggaaacagctatgacctacagcttaaatgttatcgag
5+6	tgtaaaacgacggccagttggacacacacataagcct	caggaaacagctatgaccgaatgtgtttctagccagag
7+8	tgtaaaacgacggccagtgcatcttctctgtgacttgc	caggaaacagctatgaccagcctctggtccacaatgc
9	tgtaaaacgacggccagtgcttcatgtccaggtatggc	caggaaacagctatgaccaataggaattgaaccaagc
10	tgtaaaacgacggccagtggtgcttggttcaattccta	caggaaacagctatgaccaggacagaaaagcaatcccc
11	tgtaaaacgacggccagttggtgagctagtgaattgat	caggaaacagctatgaccatgagagatctactgagatg
12a	tgtaaaacgacggccagtggttggaatccatcttcag	caggaaacagctatgacctgtatcgtcttctccatca
12b	tgtaaaacgacggccagtttatgggaagcacaggtgg	caggaaacagctatgaccatggtgggagaaggtacaac
13	tgtaaaacgacggccagttatcgagctctctacggaaa	caggaaacagctatgaccaggagacaggtatagtcca
14	tgtaaaacgacggccagtagcctgtccaggccgtatat	caggaaacagctatgaccggcaacgaaaagcttccc
15a	tgtaaaacgacggccagtaccttgccttgaagaaaagtt	caggaaacagctatgacctgtcgtacttctggtctct
15b	tgtaaaacgacggccagtgctgatgggaagcttgcaat	caggaaacagctatgaccaacctggtctctaagcctg
16a	tgtaaaacgacggccagtagcagaggcctcaacaatga	caggaaacagctatgaccgcaagaacattgtaagtc
16b	tgtaaaacgacggccagtgaccagaacacatcac	caggaaacagctatgaccgggcacaagcaacatctaaa
17	tgtaaaacgacggccagttgacccgatactgaactgctgc	caggaaacagctatgaccagacagcatcagagagtaag
18a	tgtaaaacgacggccagttctattcttgcattgggtgatt	caggaaacagctatgaccttatccagagctcgtccc
18b	tgtaaaacgacggccagtcctatgccttctgctacaag	caggaaacagctatgacctaaccttcttccattgtgcc

19	tgtaaacgacggccagtagcagccttcctggt	caggaaacagctatgaccgcaaaggaaacggcagctat
20	tgtaaacgacggccagtagcagcaggaatgacattgac	caggaaacagctatgaccccaagtgcacatcgtaac
21	tgtaaacgacggccagttctcagagtcaggccctat	caggaaacagctatgaccggcagttaacatgtgaaagc
22a	tgtaaacgacggccagtagcagcaggaatggactcctg	caggaaacagctatgaccgatgactgcgtgcactc
22b	tgtaaacgacggccagtagcagcggcagaaaaacttg	caggaaacagctatgaccgacagctgggctcactg
23a	tgtaaacgacggccagttttgctcaacaatcgggt	caggaaacagctatgacctatcgttagaactgcacatc
23b	tgtaaacgacggccagtagaggctactgctggatc	caggaaacagctatgaccgtaaggagacacagcccaa
24	tgtaaacgacggccagttttggtgacatggagc	caggaaacagctatgaccagttgcttgggactctc
25	tgtaaacgacggccagttatctctgactccttgacc	caggaaacagctatgaccgacctgaatacgccaatg
26	tgtaaacgacggccagttccccaaatgagtctct	caggaaacagctatgaccactgtcccagccattcca
27	tgtaaacgacggccagttccacacctggcgaatatta	caggaaacagctatgaccagcttggtttctgtgagg
28a	tgtaaacgacggccagttcctcctggtgtgatct	caggaaacagctatgaccgatggcatcaagcggcgag
28b	tgtaaacgacggccagttgctacggcactcatctc	caggaaacagctatgaccacacaaagtctgagagtc

Primer sets for BSEP

Exon	Forward primer 5' to 3'	Reverse primer 5' to 3'
1	tgtaaacgacggccagttccactctgctcaattgctc	caggaaacagctatgacctgtgaaatcattaatgcatcctgtaag
2	tgtaaacgacggccagtttctctctgcttggctactttg	caggaaacagctatgacccttgaaactgaccagctgtcc
3	tgtaaacgacggccagtttaatgactgcttgcattttgctc	caggaaacagctatgaccctctgctttgcttctgatatg
4	tgtaaacgacggccagttctataaaatcaccacctaggag	caggaaacagctatgaccactcccctcatgatctaaacaat
5	tgtaaacgacggccagtagtaactaaattaagtagtctcc	caggaaacagctatgaccgccagtaaaatcccctctatacat
6	tgtaaacgacggccagttccacaatgtaactctggtggc	caggaaacagctatgaccgtggcaacacattgcatctcattg
7	tgtaaacgacggccagttccccctttctcaactggttattg	caggaaacagctatgaccgcatgcccacatgaaagcccaa
8	tgtaaacgacggccagttgaaagactgagacttccagcaagata	caggaaacagctatgaccctgtttatgaaggcaaatgtcttc
9	tgtaaacgacggccagttctgcaatgatgttacagtgagaatc	caggaaacagctatgaccctcttgaacaagtactctctctg
10	tgtaaacgacggccagttttctcctgaagctgctctgtgtt	caggaaacagctatgaccctgtttccacagacagactccata
11	tgtaaacgacggccagttgataactctctgcttacaatgga	caggaaacagctatgaccaactttaaggtaaatcttcaggagtt
12	tgtaaacgacggccagttacaattgattgagttgtgcatc	caggaaacagctatgaccgaaatgagcaatttgggttatg
13	tgtaaacgacggccagttcacaagcatctgcactgtagcc	caggaaacagctatgaccgttgatcaatatactgccatttg
14	tgtaaacgacggccagttgttccattagaatcttattggcctc	caggaaacagctatgaccttcagatgaaaggaaacactcattgta

15	tgtaaaacgacggccagtagaggaatatttacacagcccagt	caggaaacagctatgaccgcacaagcatttccacatggacctgta
16	tgtaaaacgacggccagttcagtgctcagctctgtctcacagt	caggaaacagctatgaccaaccgtaaacactatagacatt
17	tgtaaaacgacggccagtgattctacttgatattggtct	caggaaacagctatgaccgagatattctctgaggattaggac
18	tgtaaaacgacggccagctctggacaccagttgatcctg	caggaaacagctatgacctagtctgacttgaaacactgctag
19	tgtaaaacgacggccagttcataactaatcaaatatgactc	caggaaacagctatgaccgagctaaatacatgaaaacaaga
20	tgtaaaacgacggccagttcattatcacagatccacagcttac	caggaaacagctatgaccatgaagaggagatgtagag
21	tgtaaaacgacggccagtgattttttcagtaagtgatt	caggaaacagctatgacctgcagtgattgtcagaatgctcta
22	tgtaaaacgacggccagtgactgtgtctctgagacgggtgat	caggaaacagctatgaccgtgggctgacagcttctctcag
23	tgtaaaacgacggccagtcagatgatgattctctgatttg	caggaaacagctatgacccaagcttgggatggttgctaag
24	tgtaaaacgacggccagtaagtctgaagtgacttgetcaagg	caggaaacagctatgaccttatgagtgagaacatgtggtg
25	tgtaaaacgacggccagttatactttgactttggcagcatgg	caggaaacagctatgaccgaagcagcaaatgactgggactgg
26	tgtaaaacgacggccagtaagcaaaccaaatgtcctgcataaac	caggaaacagctatgaccagattaggatgctcaacctgta
27	tgtaaaacgacggccagtttcttaagtggatttgacatctccat	caggaaacagctatgaccaatcttatataaatcacttgcctag
28	tgtaaaacgacggccagtgccgtcaagtataggattgttattcagg	caggaaacagctatgaccgctgagctgccacttgacattgg

試薬類

hM-CSF は Peprotech 社 (#300-25) より購入した。hIL-10, hIL-4, hIFN- γ は Biologend 社 (#571002, #574002, #57202) より購入した。Human AB serum は Lonza 社 (#14-490E) より購入した。Oil Red O は Sigma Aldrich 社 (#O0625) より購入した。Nile Red は WAKO 社 (#144-08811) より購入した。Dexamethasone は WAKO 社 (#041-18861) より購入した。Dil-LDL は Biomedical Technologies 社 (#BT-904) より購入した。Affinity purified rabbit anti-ATP8B1 抗体は bio synthesis 社に作成を依頼し購入した (抗原ペプチド peptide 2; 1171-1190 Cys-WPSESDKIQKHRKRLKAEEQ)。その他の抗体は以

下のものを使用した: mouse monoclonal anti-ABCA1 antibody (Abcam, #66217), mouse anti-Na⁺ K⁺ ATPase α -1 subunit antibody (Abcam, #ab7671), anti- β -actin antibody (MP biomedical, #69100)。Alexa-labeled secondary antibody は全て Molecular Probes より購入した。

ヒト単球由来マクロファージ (MDM)

ヒト単球は EDTA2K 採血管に採血した末梢血から Monocyte enrichment cocktail (STEMCELL Technologies, #15068) を用いて密度勾配遠心法により単離した。まず末梢血に 50 μ l/ml 血液の Monocyte enrichment cocktail を加え転倒混和後、20 分間静置し、血液と等量の PBS (-) + 1mM EDTA2Na + 2% human AB serum (Lonza, 14-490E) を加え、転倒混和した。これを、Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences , #17-1440-02) の上から重層し、室温 1200 g で 20 min 遠心した後、Ficoll 層と血漿層の界面を回収した。その後、赤血球溶解液 (1.7 mM Tris HCl + 140 mM NH₄Cl, pH7.5) による溶血処理、PBS (-) による 2 回の Wash 操作を行い、得た細胞の細胞数は血球計数盤を用いてカウントし、Culture medium (RPMI-1640 + 10 % human AB serum + 1 % Penstrep + 10 ng/ml M-CSF) で 0.6 x 10⁶ cells/ml になるよう調製してプレートに播種した。Culture medium は 2-3 days に一度交換し (day 3,

6) 、 Assay の 16 hour 前 (day 8) には PBS (-) で一度 wash し、 Serum free medium (RPMI + 0.02 % Fatty acid free albumin + 2.5 μ M TO901317 + 10 ng/ml M-CSF) に交換した。

ヒト末梢血血球細胞の分離

ヒト末梢血単球、及び単球由来マクロファージの単離は上記 (方法: ヒト単球由来マクロファージ (MDM)) に即して行い、単球由来マクロファージは Cell scraper (IWAKI) で剥離後、遠心することにより得た。その他の血球の分離は以下のように行った。まず、ヒト全血に 1/25 量の 15 % Dextran 生理食塩水溶液、1/50 量の 500 mM EDTA2Na (pH 8.0) を加えた。40 min 静置後、下層を 1.5 mL tube に回収し、4 °C 400 g 5 min で遠心後、上清を除き、赤血球分画を得た。白血球分画である上層は 15 ml 遠沈管に移し、PBS (-) を回収した量と等量加え混和後、15 ml 遠沈管に予め分注しておいた 4 ml の Ficoll-Paque PLUS に重層し、室温で 400 g 30 min 遠心した。単核球分画である Ficoll 層と血漿層の境界部分、顆粒球分画であるペレットをそれぞれ回収し、5 ml PBS (-) で懸濁して 4 °C 400 g 5 min 遠心した。ペレットを 4 ml の赤血球溶解液 (方法: ヒト単球由来マクロファージ (MDM)) で溶血処理後 PBS (-) で Wash し、ペレットとして顆粒球分画を得た。溶血処理した単核球分画は、RPMI + 10 % FBS +

1 % PenStrep で懸濁し 3.0×10^6 cells/ml に調製して、10 cm シャーレに播種した。1.5 hours 後、リンパ球分画として非接着細胞を回収した。各血球分画は Lysate を調製するまで -80°C で保存した。

siRNA を用いた ATP8B1 のノックダウン

hATP8B1 を選択的にノックダウンする siRNA の配列は以下のものを用いた：hATP8B1 siRNA (sense : 5'- GGATGTGCAAGTTCCTACGdTdT -3' and antisense : 5'- CGTAGGAACTTGCACATCCdTdT -3')。またコントロールには、Control siRNA, Negative control (コスモバイオ, #S20C-0600) を使用した。12 well plate の 1 well あたり (1ml の培養液あたり)、60 pmol の siRNA、4 μL の Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, #13778150)、200 μL の OPTIMEM を混合して Premix を作成し、15 min 後に培養液に 180 μL 滴下した。Plate が異なる場合には、培養液の体積に比例して Premix を作成し、終濃度が等しくなるようにした。

Whole cell lysate の調製

PBS (-) で細胞を洗浄し、細胞を回収した。回収した細胞は cell lysis buffer

(Cell Signaling, #9803) + 1 % protease inhibitor cocktail for use with mammalian cell and tissue extracts (Sigma Aldrich, #P8340) を用いて on ice で 1 hour のインキュベーションにより可溶化し、20000 g 4 °C 10 min の遠心後の上清を Whole cell lysate として用いた。BCA 法により Whole cell lysate 中タンパク量を測定した後、タンパク量が一定になるように cell lysis buffer で希釈後、3× SDS sample buffer (New England BioLabs, #B7709) を 1/3 量、2-mercaptoethanol を 1/30 量になるように調製した。このサンプルを 60°C で 5 min インキュベーションした後、on ice で 2 min 置き、室温に戻したサンプルを Western blotting に供した。

RT-PCR

24-well plate に 1 well あたり 0.3×10^6 個のヒト単球を播き、上記（方法：ヒト単球由来マクロファージ (MDM)）の通り分化させた MDM の Culture medium を除去後、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて Total RNA を抽出した。RNA 量は吸光度測定により決定し (260 nm)、各サンプルの RNA 量を一定に調製して ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) により逆転写を行い、cDNA を作成した。cDNA を鋳型として KOD FX (TOYOBO) を用いて PCR (Denature: 98 °C 2 min, Annealing: 55 °C 30 sec, Elongation:

68 °C 20 sec, Cycles.: 35) を行い、PCR 産物を 100 bp マーカーと共に 3 %ア
 ガロースゲル (Biotium 社の GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain を含む) で 100
 V 15 min 泳動し、蛍光を検出した。以下の Table. B に各遺伝子の mRNA 検出
 に用いたプライマー配列を示す。

Table. B 1 Primer sets for RT-PCR				
Gene Name	Region (bp)	Amplicon Size (bp)	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
GAPDH	466-876	411	ggggagccaaaagggtcatcatct	gacgcctgcttcaccaccttcttg
CDC50A	496-672	177	aaaccaattgctccttgtgg	ttccaggttgctctcctccag
CDC50B	149-367	219	gcctgggcctctactactcc	gccggttgctctggtagaag
ATP8A1	1860-2062	203	ggagtggcgagcagtctatc	tgccccctgtaaggatccag
ATP8A2	2539-2703	165	accaacaactcggattacgc	tccattaacaaaggcgaacc
ATP8B1	2297-2504	207	atgcaaggatggaaaaccag	cgcacccgtctttcttcttc
ATP8B2	234-457	224	gcctgtcaacctctttgagc	tgatcagcacctgagactgg
ATP8B3	2025-2234	210	aatggaattgccacagagg	acaccgtcctggagtctgtc
ATP8B4	2809-3025	216	tgteccagctctacaaacc	gcacactgaccacaatgacc
ATP9A	1431-1658	227	tgtgactgatcaggctgagg	atgccatacgtttgcttc
ATP9B	1863-2030	168	ggtcctcagcttctgcattc	cactcctcttcagccagtc
ATP10A	486-619	134	aatccacgtgggagactttg	tcaggttggtctctccatcc
ATP10B	1490-1693	204	gaagccaaaagggtgctcag	acaaggttccaaccacagg
ATP10D	153-299	145	gattgttgttccccacatcc	ttggcagctctgtgaaattg
ATP11A	3142-3343	202	ctctggggaggagtgatctg	ggcactggctcttagtctgg
ATP11B	3350-3502	153	tggactccatgtgctgttcc	tcaagatgctcctgtcgttg
ATP11C	2850-3064	215	caatgcatgctacagttgg	tccagaatcgggtatccaag

定量的 real-time PCR (qPCR)

作成した cDNA を鋳型とし、PCR 酵素に THUNDERBIRD® SYBR® qPCR

Mix (TOYOBO) を用い、LightCycler 480 system II (Roche) で目的遺伝子を増幅させた。PCR は、95 °C 1 min の 酵素活性化処理後、95 °C・10 sec、55 °C・15 sec、72°C・45 sec の Cycle を 40 cycle という条件で行った。定量的 PCR のプライマーは以下の Table. C に示したものを用い、hATP8B1 及び hCD163 の発現量はハウスキーピング遺伝子である hGAPDH で標準化し、相対的な発現量を示した。

Table. C Primer sets for Quantitative real-time PCR		
Gene Name	Forward 5' to 3'	Reverse 5' to 3'
hATP8B1	atgcaaggatggaaaaccag	cgcacccgtctttcttcttc
hCD163	ttgccagcagcttaaattgtg	aggacagtgtttgggactgg
hGAPDH	ggggagccaaaagggtcatcatct	gacgctgcttcaccaccttcttg

Western blotting

サンプルは、SDS-PAGE により 140 V で 80 min 分離した (3.75 % stacking gel / 8 % running gel を使用)。分子量は Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad) を同時に泳動することにより決定した。電気泳動後のゲルより、ブロッター (Mini-PROTEAN Tetra System, Bio-Rad) を用いて 100 V で 70 min 電圧をかけることにより、polyvinylidene difluoride メンブレン (Pall) へと転写した。メンブレンは室温 1 hour ブロッキングし、その後、メンブレンを一次抗体溶液と 4°C overnight で振とうした。一次抗体反応後、メンブレンを wash

し、HRP 標識二次抗体 horseradish peroxidase-labeled IgG antibody (Amersham Pharmacia Biotech) 溶液と室温で 40 min 振とうした。抗体と標的タンパク質との結合は ECL Prime Western Blotting Detection Kit もしくは ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences) を用いて、化学発光を LAS3000mini (Fuji Film Corp.) により検出した。Band density は Multi Gauge software Ver 2.0 (Fujifilm) を用いて定量し、各タンパク質の発現量は β -actin の発現量で normalize し、相対量で示した。用いたブロッキング溶液、一次抗体、二次抗体の詳細な条件を以下の Table. C に示す。

Table. C Antibodies for Western blotting				
Anti-	Company	Cat. No.	Blocking	Buffer, Dilution
ABCA1	Abcam	ab66217	CGS blocking	CGS, 2000 倍
ATP8B1	Bio synthesis	Peptide 2 Lot.2	5% skim milk /TTBS	CGS, 500 倍
Na ⁺ K ⁺ -ATPase α 1 subunit	Abcam	ab7671	CGS blocking	CGS, 2000 倍
SR-B1	Abcam	ab52629	5% skim milk /TTBS	CGS, 1000 倍
β -actin	MP biomedical	69100	CGS blocking	CGS, 5000 倍
ABCG1	Protein Tech Group	13578-1-AP	5% skim milk /TTBS	CGS, 1000 倍
CD163	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc33559	5% skim milk /TTBS	CGS, 500 倍
CD23	Abcam	ab92495	5% skim milk /TTBS	CGS, 500 倍

CD16	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc20052	5% skim milk /TTBS	CGS, 250 倍
CD93	R&D systems	AF2379	5% skim milk /TTBS	CGS, 250 倍
MerTK	R&D systems	AF891	5% skim milk /TTBS	CGS, 500 倍

CGS: Can Get Signal®immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO)

CGS blocking: PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal® (TOYOBO)

免疫染色

12 well plate (BD Falcon) に入れた Culture cover (Matsunami Glass Ind. LTD) 上に培養した MDM に対して、-20 °C の Methanol で 10 min 固定、-20 °C の Acetone に 30 sec 浸し膜透過処理、もしくは 4 % paraformaldehyde で室温 10 min の固定を行い (図表の legend に記載の通り)、5%FBS/PBS (-) で室温 30 min ブロッキングを行い、5 % FBS/PBS (-) で希釈した一次抗体と室温で 1 hour 反応させた。その後、PBS (-) で 3 回洗浄後、遮光下において 5 % FBS/PBS (-) で 250 倍希釈した蛍光標識された二次抗体と室温で 1 hour 時間反応させた。核の染色には TOPRO®-3 Iodide (642/661) - 1 mM Solution in DMSO (Invitrogen) を二次抗体反応時に反応液に 1000 倍希釈で添加することで行った。二次抗体反応終了後、VECTASHIELD Mounting Medium H-1000 (Vector

Laboratories) にて封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP5, Leica Microsystems) を用いて観察した。用いた一次抗体と、それぞれの条件を以下の Table. D に示す。二次抗体は Molecular Probes で購入し、Alexa Fluor 色素標識された各一次抗体の Host に対応するものを用いた。3 重染色には蛍光色素として Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 647 を用いた。

Table. D Antibodies for Immunostaining				
Anti-	Company	Cat. No.	Dilution	Host
CD163	BD Pharmingen	556017	50	Mouse
CD93	R&D Systems	AF2379	50	Rabbit
25F9	eBiosciences	14-0115-82	50	Mouse

Oil Red O 染色

12 well plate (BD Falcon) に入れた Culture cover (Matsunami Glass Ind. LTD) 上に培養した MDM (0.3×10^6 cells/well) を、PBS (-) で 10 倍希釈したホルマリンにより室温で 15 min 固定し、milli Q で 3 回 wash した。次に 60 % イソプロパノールを加え 1 min 後、飽和 Oil Red O 60 % イソプロパノール溶液を加え、室温 10 min インキュベートし、milli Q で 3 回 wash した後、culture cover をプレパラートに 90 % glycerol を用いて封入し、光学顕微鏡 (LEICA DM 3000, Leica Microsystems) により観察した。照明の強度は 131、対物レンズは 20x を用いた。1 サンプルにつき少なくとも 4 枚の画像を取得し、各画像における染

色領域の面積、細胞数は WinROOF (MITANI Corporation) を用いて定量した。染色領域は RGB 値を設定し、画像から自動で選択した (R: 57-255, G: 0-160, B: 0-233)。染色領域の面積を細胞数で除することで、細胞あたりの染色領域の面積を算出し、4 枚の画像から算出した値の平均値を各サンプルのデータとして用いた。

Nile Red 染色

CELLview グラスボトムシャーレ 4 分画 35×10mm TC 処理 (greiner #627870) に播種した MDM (0.36×10^6 cells/well) を PBS (-) で 2 回 Wash し、5 μ g/ml Nile Red PBS (-) 溶液を加え 37°C 10 min インキュベートした後、PBS (-) で 3 回 Wash し、Culture medium (方法: ヒト単球由来マクロファージ (MDM)) を加え、37°C 1 hour 後から共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP5, Leica Microsystems) を用いて観察した。FACS の解析における Nile Red staining は、下 (方法: FACS による解析) に記した。

FACS による解析

RepCell 3.5 cm dish (Cellseed #CS1003) に播種した MDM (1.8×10^6

cells/dish) を on ice で 3 ml の PBS (-) + 1 mM EDTA2Na + 0.1% Sodium Azide で 2 回 Wash し、再度 1 ml の同バッファーを加え、on ice で 15 min 静置した。その後ピペッティングによりディッシュに接着した細胞をはがして 15 ml 遠沈管に回収した。さらに 1 ml の同バッファーを用いた回収操作を 2 度繰り返した後、4 °C 400 g 5 min 遠心 (以降の遠心は全てこの条件で行った) し、ペレットを 1ml の同バッファーで懸濁して 1.5 ml tube に移して再度遠心を行った。ペレットを 200 μ L の FACS 用バッファー (PBS (-) + 5 % FBS + 1 mM EDTA2Na + 0.1 % Sodium Azide) で懸濁し、10 μ L Human BD Fc block (BD Biosciences #564220) を加え、ピペッティングにより混和後 on ice で 15 min 静置した。その後 250 μ L の FACS 用バッファーを加え懸濁後、50 μ l ずつ 1.5 ml tube に分注し、それぞれに蛍光標識された抗体を添加し、on ice で 1.5 hour 静置した。反応後、700 μ L の FACS 用バッファーを加えピペッティングにより懸濁し、遠心して上清を 50 μ L 残して除去するという Wash 操作を 3 回繰り返した後、150 μ L の FACS 用バッファーを加えて懸濁し、FACSAria II (BD Biosciences) により FSC, SSC, 各蛍光強度を検出した。Nile Red による Lipid droplet の染色は、RepCell 3.5 cm dish から回収した細胞を、5 μ g/ml Nile Red PBS (-) 溶液で懸濁し 37°C 10 min 静置することで行い、染色後、FACS 用バッファーで 3 回 Wash 操作を繰り返し、150 μ L の FACS 用バッファーにより懸濁して

FACSAria II による解析を行った。Nile Red の蛍光取得には、Texas Red-PE の検出プロトコルを用いた。データの解析、散布図・ヒストグラムの作成には FlowJo_V10 (FlowJo, LLC) を用いた。以下の Table. E に Flow Cytometry に用いた蛍光標識された抗体を示す。

Table. E Antibodies for flow cytometry					
Anti-	Fluorescence	Company	Cat. No.	Host	Dilution
CD14	APC	Biolegend	325602	Mouse	20
CD16	PE	Biolegend	302008	Mouse	20
CD163	FITC	Biolegend	333618	Mouse	20
CD163	APC	Biolegend	333610	Mouse	20
MerTK	PE	R&D Systems	FAB8912P	Mouse	10
Ctrl mouse IgGκ	FITC	Biolegend	400108	Mouse	20
Ctrl mouse IgGκ	PE	Biolegend	400112	Mouse	20
Ctrl mouse IgGκ	APC	Biolegend	400120	Mouse	20

Phagocytosis の評価

Assay の前日に上記 (方法: ヒト末梢血血球細胞の分離) に即してヒト全血から顆粒球を分離し、RPMI + 10 % FBS + 1 % Penstrep で 1×10^6 cells/ml の懸濁液を調製して 20 hour 培養することで自発的なアポトーシスを誘導した。培養後、細胞を 15 ml 遠沈管に回収し、室温で 400 g 5 min 遠心し、ペレットを 10 ml の RPMI で懸濁し、再度室温で 400 g 5 min 遠心した。ペレットを終濃

度 2.5 μ M で Cell Tracker Green (Invitrogen, #C2925) を加えた RPMI で懸濁し、シャーレで 37 $^{\circ}$ C 40 min 培養することで、顆粒球の染色を行った。染色後の顆粒球は、室温 400 g 5 min 遠心し、ペレットを RPMI で懸濁して懸濁液を RepCell 3.5 cm ディッシュに培養し、13 hour 前に培養液を Serum free medium (方法: ヒト単球由来マクロファージ (MDM)) に交換した MDM に添加して 37 $^{\circ}$ C 3 hour インキュベーションした。その後上記 (方法:FACS による解析) の項にあるように、細胞を回収、蛍光標識された抗体との反応を行い、FACSAria II を用いて FSC、SSC、各蛍光高度を検出した。解析には、FSC、SSC を両軸とした散布図より phagocytosis されていない顆粒球は除き、MDM の中で Cell Tracker Green 陽性の細胞を phagocytosis した細胞としてその割合 (%) を評価した。

統計解析

すべての実験は少なくとも 2 度の再現性を確認した (詳細は図表 legend に記載)。定量データのグラフの作成、及び統計学的有意差の検定は Prism software (GraphPad Software, Inc.) を用いて行った。グラフ内の値は means \pm S.E. で示した。2 群間の比較の場合、まず F 検定を行い、有意差が無く等分散を仮定できる場合は student's t-test により 95%信頼水準で評価し、F 検定に有意差があ

る場合、Welch's correction を含んだ student's t-test により評価した。3 群以上の比較の場合、One way ANOVA により 95%信頼水準で評価した後に、有意な差があれば各 2 群間を Bonferroni 法により検定した。

結果

ATP8B1 はヒト末梢血単球由来マクロファージに発現する。

本研究では、ヒト検体での ATP8B1 欠損の細胞レベルでのフェノタイプを評価することを目的としており、侵襲性の低さ、解析の容易さから、血球を対象とした検討を行った。また、本研究において検体を提供いただいた PFIC1、PFIC2 患者は、*ATP8B1*、*BSEP* に変異を同定し、その変異が発現量低下を引き起こすこと、もしくは肝生検サンプルを用いた Western blotting において ATP8B1、BSEP が検出されないことを確認している (Table. 1.)。ヒト血球における ATP8B1 の発現についての情報が乏しかったため、まず、血球における ATP8B1 の発現の有無、また各血球での発現量の比較を行うこととした。私はこれまでに ATP8B1 がマウス腹腔マクロファージにおいて発現していることを確認していたことから、単球からマクロファージへと分化させた単球由来マクロファージ (MDM) における ATP8B1 の発現も検討することとした。MDM は単球を播種してから市販の血清、及び M-CSF を含む培養液を用いて培養することにより得ており、培養日数に応じて形態変化が起こり、9 日後には細胞の形態が定常になることを確認している (Figure 1. C)。また、播種 1 日後には単球マーカー CD93 が全ての細胞で発現が見られるがマクロファージマーカー 25F9 の

発現は見られない一方、9日後には CD93 の発現が見られず 25F9 の発現が全ての細胞で確認されたことから、マクロファージへの分化が起こっていることが担保された (Figure 1. B)。血液検体から分離した赤血球、顆粒球、リンパ球、単球、そして MDM の whole cell lysate をそれぞれ調製し、Western blotting により ATP8B1 のタンパク質発現について検討したところ、MDM においてのみ ATP8B1 の分子量に当たる 140kDa の位置にバンドが検出された (Figure 1. A)。単球から MDM の分化過程において、ATP8B1 の発現が誘導されると考えられたため、培養日数を変えて RNA の発現量を qPCR により測定したところ、播種前の単球 (day 0)、及び播種から 1 日目 (day 1) には、*ATP8B1* の mRNA 量は検出限界以下であったが、3 日目以降からは検出された (Figure 1. D)。これは単球を播種して球状の形態から紡錘状の形態へと変化していくのが見られるのと同時期である。次に、MDM における P4-type ATPase family の発現についての体系的な情報が無かったため、RT-PCR により各メンバーの mRNA の発現量を評価したところ、*ATP8A2*、*ATP8B3*、*ATP10B* は特異的な PCR 産物は検出されなかったが、その他については目的のサイズの PCR 産物が認められた。検出されなかった遺伝子のうち、*ATP8A2* が脳、光受容細胞 (93,94)、*ATP8B3* が精巣特異的に発現していること (95) が報告されており、MDM においては発現していないと考えられる。また、ATP8B1 を含む P4-type ATPase

family のシャペロンタンパク質として、その細胞内局在、機能に必要である CDC50A、CDC50B についてもその発現を解析したところ、CDC50A の方が dominant に発現していた (Figure 1. E)。

ATP8B1 欠損 MDM ではコレステロール排出トランスポーターABCA1 の発現量が低い

ATP8B1 が血球において MDM に特異的に発現していることから、MDM における ATP8B1 欠損のフェノタイプを探索することとした。そのために MDM に対して siRNA による ATP8B1 のノックダウンを行い、ATP8B1 欠損のモデルとして用いることとした。ATP8B1 のノックダウンは mRNA、protein での減少をそれぞれ qPCR、Western blotting により確認し、mRNA では 90%の低下、protein は特異的なバンドの消失が見られたことから、ほぼ完全に ATP8B1 のノックダウンができていることを確認できた (Figure 2. A, B)。これまでに、PFIC1 患者において血清リポタンパク質の変動・アテローム性動脈硬化の所見が見られること (96)、また細胞内コレステロール量の減少に応じて誘導される miR-33 により、ATP8B1 がコレステロール排出トランスポーターと共に制御を受けるという報告 (97) があることから、ATP8B1 欠損によりコレステロール動態に影響があることが考えられた。そこでまず、MDM で ATP8B1 のノックダ

ウンを行い、コレステロール排出に関わるトランスポーターの発現量を調べる
こととした。その結果、ABCG1、SR-B1 の発現量に変化は無かったが、ABCA1
のタンパク質発現量が 40%程度減少することが見られた (Figure 1. B, C)。続い
て、見られた変化が ATP8B1 を欠損する PFIC1 患者においても見られるかを検
討するために、PFIC1 患者、PFIC 以外の肝疾患を有するコントロール患者の
血液検体からそれぞれ MDM を調製し、Western blotting によりタンパク質発
現量を比較した。その結果、以前に行った肝生検サンプルでの検討 (84) と同様、
PFIC1 患者 (Table 1. Pt. 1, Pt. 2) の MDM では ATP8B1 のバンドは検出され
なかった。また、PFIC1 患者 MDM で ABCA1 の発現量が低い傾向が見られた
ことから、ABCA1 の機能である ApoA1 依存的なコレステロール排出を測定す
ることにより、PFIC1 患者 MDM と PFIC2 患者、コントロールの MDM で差
が見られ、診断の指標として使用できると考えたが、見られる差に対する実験
的なバラつきが大きく (PFIC1 群と PFIC2 群の差: 40 %, CV 値 20%)、実用性
の観点から難しいと考えられた (data not shown)。そこで、ATP8B1 の欠損に
より ABCA1 の発現量低下が起こるメカニズムを探ることから、より変化を捉
えやすいフェノタイプを探索することとした。ABCA1 の発現量がマクロファ
ージのサブタイプにより異なるという知見 (98)、M-CSF で分化誘導した MDM に
おいて異なるサブタイプの存在を示唆する知見 (99)、そして、ATP8B1 が分化

により発現上昇し、コントロール患者 MDM においても個人間差があるという本結果より、ATP8B1 の欠損が MDM のサブタイプに影響を与えるという仮説を立て、これを検証することとした。マクロファージはその性質の違いから、大きく M1、M2 サブタイプにより分類されており、特に Human MDM では M2 がさらに M2a、M2c サブタイプと分類され、それぞれの性質が特徴づけられてきている (72)。そこで、M1、M2a、M2c サブタイプそれぞれのマーカータンパク質として用いられている、CD80、CD23、CD163 (100) を PFIC1 患者 MDM、コントロール患者 MDM で比較したところ、PFIC1 患者 MDM において、CD23 の発現が高く、CD163 の発現が低いことが観察された。また、興味深いことに、ATP8B1 の発現量の個人間での変動と、CD163 の発現量の変動が正の相関を示し、CD23 の変動とは負の相関を示していた (Figure 2. D)。この結果は、ATP8B1 とマクロファージサブタイプ、特に M2c サブタイプとの関連をより強く示唆するものであったため、次に、M-CSF に加えて、サイトカインを用いることで各サブタイプへの極性化を誘導し、ATP8B1 の発現量が変化するか検討することとした。

ATP8B1 は IL-10 により極性化誘導される CD163^{high} マクロファージに高発現する

M-CSF に加えて IFN- γ 、IL-4、IL-10 をサイトカインとして用いて培養し、それぞれ M1、M2a、M2c サブタイプへの極性を誘導した MDM を用いて、ATP8B1、コレステロール排出トランスポーターの発現量の検討を行った。各処理における極性の誘導は、各サブタイプに特異的なマーカータンパク質の発現上昇を Western blotting 及び免疫染色で確認することにより行った (M1: CD80 Figure 3. B, M2a: CD23, M2c: CD163 Figure 3. A)。ATP8B1 のタンパク質発現量は予期していた通り、IL-4 処理により減少し (検出限界以下)、反対に、IL-10 処理により上昇した (3 倍程度)。またこの変化は ATP8B1 の mRNA の量と対応していた (Figure 3. C)。一方、IFN- γ 処理では ATP8B1 のタンパク質発現量に変化は見られなかった。また ABCA1 の発現量は、ATP8B1 と同様に IL-4 処理で低下し、IL-10 処理で上昇することから、Figure 2. D で示した PFIC1 患者 MDM では、M2c 様のサブタイプの割合が少なく、M2a 様のサブタイプが多くなることにより、集団全体として ABCA1 の発現量が低くなっていることが推察された。続いて、ATP8B1 が、IL-10 処理により極性誘導される M2c サブタイプに enrich されているかを検討するため、M2c マーカー CD163 を指標として、低発現 (CD163^{low})、高発現 (CD163^{high}) のポピュレーションを FACS により分取し (閾値は便宜的に M-CSF 処理群、+IL-10 処理群でそれぞれ異なる値を用いた。M-CSF: 600; +IL-10: 4000)、どちらの集団に ATP8B1 が発現

しているか Western blotting により検討した。その結果、ATP8B1 は IL-10 処理により誘導される CD163^{high} ポピュレーションに特に強く発現することが確認された (Figure 3. D)。IL-10 処理によって Tyrosine Kinase である MerTK が上昇し、これを介した初期アポトーシス細胞の phagocytosis 能が誘導されるが、これは Glucocorticoid によっても同様に誘導されることが知られている (101)。そこで、Glucocorticoid 処理によっても、ATP8B1 の発現量上昇が見られるかを検討したところ Dexamethasone 処理によって、CD163、MerTK は発現量が上昇するのに対し、ATP8B1 の発現量は変化しなかった (Figure. 3 D)。このことから ATP8B1 は抗炎症性のサブタイプでも、特に IL-10 処理によって極性化誘導されるサブタイプにおいて重要であることが示唆された。

ATP8B1 のノックダウン下において IL-10 処理による M2c サブタイプマーカーの発現量上昇が正常に起こらない

Figure 2, 3.の結果より、ATP8B1 が IL-10 処理により極性化誘導される M2c サブタイプに高発現し、その欠損が M2c サブタイプへの極性化誘導に影響を及ぼすと考えられたことから、これを検証するため、siRNA により ATP8B1 のノックダウンを行った MDM に対して IL-10 処理を行い、M2c マーカーの発現量、apoptosis 細胞の phagocytosis 能、細胞の形態について調べることにした

(Figure 4. A)。IL-10 処理を開始する時点で ATP8B1 がほぼ完全にノックダウンできていること (data not shown)、そして各アッセイを行う時点において Ctrl siRNA 処理群で、IL-10 処理後に ATP8B1 の発現量が上昇していること、ATP8B1 siRNA 処理群では IL-10 処理にかかわらず ATP8B1 のノックダウンが行えていることを確認した (Figure 4. B)。M2c マーカーについては、これまでの検討に用いていた CD163 に加え、CD14、CD16 が M2c サブタイプに高発現することが報告されていた (101) ことから、この 3 つのマーカータンパク質の細胞膜発現量を FACS により解析したところ、Ctrl siRNA 処理群においては、IL-10 処理により CD163、CD14、CD16 の発現量が上昇し (平均蛍光強度 MFI の変化 CD163: 10.4 倍, CD14: 6.7 倍, CD16: 2.8 倍)、CD163^{high}/CD16^{high}、CD14^{high}/CD16^{high} ポピュレーションが大部分を示す (69.7%, 63%) のに対して、ATP8B1 siRNA 処理群では同ポピュレーションの割合が低くなり (38.5%, 45.8%)、CD163^{low}/CD16^{high}、CD14^{low}/CD16^{high} ポピュレーションの割合が高くなっていった (Figure 4. C)。各マーカーの MFI を定量したところ、CD16 は ATP8B1 siRNA 処理群で Ctrl siRNA 処理群よりもやや高い (1.4 倍) が、CD163、CD14 については ATP8B1 siRNA 処理群において有意に低くなっていた (CD163: 0.25 倍, CD14: 0.47 倍) (Figure 4. D)。各マーカーの発現量に対して閾値を設定し、高発現するポピュレーション (CD163^{high}、CD14^{high}、CD16^{high})

の割合 (%) を定量した結果についても同様の変化が見られている (CD163: 63 %減, CD14: 28 %減, CD16: 20%増) (Figure 4. E)。

ATP8B1 ノックダウン下において IL-10 処理により誘導される初期 apoptosis 細胞の phagocytosis 能に影響は見られない

次に、M2c サブタイプの細胞機能として特徴づけられている、初期 apoptosis 細胞の phagocytosis 能 (74) に対する ATP8B1 のノックダウンの影響を調べることにした。実験に用いた apoptosis 細胞としては、ヒト血液から分離した顆粒球を用い、20 時間の培養後に PI、Annexin V による染色より自発的な apoptosis が引き起こされており、60 ~ 70 %の細胞が Annexin V 陽性、PI 陰性という初期 apoptosis にあたる状態であることを確認した (Figure 5. A)。これを蛍光色素 Cell tracker green により染色した後、MDM の培養液中に添加して、MDM によって phagocytosis されると、MDM 内に Cell tracker green の蛍光が観察される (Figure 5. B)。この原理により、apoptosis 細胞の添加 3 時間後に、MDM をプレートからはがし、M2c マーカー、MerTK の抗体で MDM を染色して FACS により解析することにより、phagocytosis した MDM の割合、および、phagocytosis した細胞における各マーカータンパク質の発現量について解析を行った。その結果、Ctrl siRNA 処理群において、IL-10 処理により、CD163、

CD14、CD16、MerTK それぞれが高発現した細胞において phagocytosis が起こっており（全体の 15 ~ 16%）、本実験系により M2c サブタイプに特徴的な細胞機能が評価できていることが担保できた。一方で、ATP8B1 siRNA 処理群でも、IL-10 処理により phagocytosis 能が上昇しており、CD16、MerTK については高発現細胞のみが phagocytosis していたが、CD163、CD14 については発現量の低い細胞についても phagocytosis は起こっていた (Figure 5. C)。また、細胞全体に対する phagocytosis した細胞の割合は Ctrl siRNA 処理群と ATP8B1 siRNA 処理群で変化は無かった (Ctrl siRNA: 15.3 %, ATP8B1 siRNA: 14.2 %) (Figure 5. D)。この結果は、ATP8B1 のノックダウン下においても、MerTK を含む apoptosis 細胞の phagocytosis に必要十分な因子については IL-10 処理により誘導が起こっていることを示唆するものであり、M2c サブタイプへの極性化が一部は正常に起こっていると考えられた (Figure 5. E)。

ATP8B1 のノックダウン下において IL-10 処理により誘導される CD16^{high} 細胞の形態が異なる

ATP8B1 のノックダウン下においても CD16 の発現量は IL-10 処理により Ctrl siRNA 処理群と同様に上昇する (Figure 6. A) ことから、CD16^{high} ポピュレーションにおいて、M2c サブタイプへの極性化の一部は起こっていると考え、

CD163、CD14 といった M2c マーカーの発現量以外に ATP8B1 のノックダウンの影響が及ぶパラメータについて検討を行うこととした。そこで、それまでに PFIC1 患者 MDM の顕微鏡での観察から、細胞の形態が丸みを帯び、接着面が小さい細胞が多いことを見出していた (data not shown) ことから、細胞の形態に着目して解析を行うこととした。FACS での解析において、主に細胞の種類の判別を目的に用いられる FSC (Forward scatter : 前方散乱)、SSC (Side scatter : 側方散乱) はそれぞれ、細胞の大きさ、細胞内の複雑性を反映するパラメータである。これらに対する ATP8B1 のノックダウンの影響を見たところ、IL-10 処理した CD16^{high} ポピュレーションにおいて FSC・SSC の散布図 (等高線により表示) において分布の変化が見られた (Figure 6. B)。FSC、SSC の各ヒストグラムを見ると、FSC 値については高い細胞 (FSC > 100000 ~ 150000) が減少し、SSC 値については最頻値が高くシフトしており (Ctrl siRNA; 35000, ATP8B1 siRNA; 68000)、平均 FSC、SSC 値を算出したところ、有意な変化が見られた (Figure 6. D)。続いて、ATP8B1 のノックダウン下で見られた FSC、SSC 値の変化と、M2c マーカーの発現量変化の関連について解析するため、それぞれを Y 軸、X 軸にとった散布図を作成したところ、コントロール群において、FSC 値が高いポピュレーション (FSC > 150000) は CD16 を高発現していた (Figure 6. E)。さらに、CD16^{high} ポピュレーションにおいて、FSC 値が高

いポピュレーション (FSC > 150000) は CD163、CD14 をともに高発現していることが明らかとなった。即ち、Figure 6. C において、Ctrl siRNA 処理群で見られるが、ATP8B1 siRNA 処理群では見られない FSC 値が高いポピュレーション (FSC > 150000) は M2c サブタイプマーカーを高発現することが示された。また、CD16 の発現量は SSC 値に依らない (Figure 6. E) が、CD16^{high} ポピュレーションにおいて、CD163、CD14^{high} ポピュレーションでは、SSC 値が低い細胞の割合が増えていたが、ATP8B1 ノックダウン群ではその傾向が見られなかった (Figure 6. F)。

ATP8B1 ノックダウン下において脂肪滴蓄積が増加する

ATP8B1 のノックダウンにより、SSC 値の上昇がヒストグラムで最頻値の変化として見られたことから、MDM における ATP8B1 の general な機能の低下を反映していると推測され、この原因を探ることが、ATP8B1 のより直接的な機能を反映するフェノタイプの同定につながると考えた。そこで SSC 値の変化が細胞内の何に由来するかを検討することとしたが、これまでマクロファージにおける SSC 値と対応するパラメータの情報は報告されていなかった。肝実質細胞においては SSC 値と脂肪滴染色強度が相関することが報告されていた (102) ことから、マクロファージも肝実質細胞同様に、細胞内に脂肪滴を蓄積さ

せることから類推して、MDM内の脂肪滴量を調べることにした。脂肪滴染色に汎用される蛍光色素である Nile Red を用いて、その染色強度と、FSC、SSC 値それぞれとの対応を見たところ、Nile Red の蛍光強度と SSC 値が強い相関 ($R = 0.11$ (Nile Red V.S. FSC)、 $R = 0.78$ (Nile Red V.S. SSC)) を示すことが明らかとなった (Figure 7. A)。そこで ATP8B1 のノックダウン下において IL-10 処理を行い、Nile Red による染色を行ったところ、SSC 値の上昇と一致して、染色強度の上昇が確認された (Figure 7. B)。脂肪滴を赤色に染色する色素である Oil Red O を用いて同様に染色を行い、染色領域を画像解析のソフトウェアを用いて赤い色調の部位として選択し、選択面積を定量することで、細胞あたりの染色面積を算出したところ、ATP8B1 のノックダウン下において有意に大きくなっていることが示された (Figure 7. C, D)。

ATP8B1 のノックダウンは LDL 取り込みに影響を与えない

ATP8B1 のノックダウン下で IL-10 処理した MDM において脂肪滴蓄積が増大した原因として、細胞内脂質の細胞外への排出の減少、そして脂質の取り込みの上昇が可能性として考えられるが、コレステロールの排出については ABCA1 の減少が見られているため、これが一因を担っていると考えられる。そこで、取り込みについて検討するためには、培養に用いている血清に含まれる

血清リポタンパク質由来の脂質の取り込みを評価する必要があると考え、蛍光標識された LDL を用いてその取り込みを共焦点顕微鏡により検討したところ、IL-10 処理により取り込みが上昇するが、コントロール群、ATP8B1 ノックダウン群で差は見られなかった (Figure 8.)。

PFIC1 患者 MDM において IL-10 処理による M2c サブタイプへの極性化が正常に起こらない

最後に ATP8B1 のノックダウン下で IL-10 処理を行った検討から観察された複数のフェノタイプについて、IL-10 処理した PFIC1 患者 MDM においても同様に見られるか確認した。M2c マーカーの発現量を FACS により解析したところ、PFIC1 患者 MDM では、PFIC2 患者 MDM に比して CD163、CD14 を高発現する細胞の割合が顕著に少なく、CD16、MerTK の発現量に差異は見られなかった (Figure 9. A)。また、FSC、SSC 値の比較を行ったところ、PFIC1 患者 MDM において、SSC 値が大きい細胞がより多く見られた (Figure 9. B)。さらに Oil Red O 染色により脂肪滴の蓄積を評価したところ、PFIC1 患者 MDM において顕著な脂肪滴量の増大が観察された (Figure 9. C)。Oil Red O 染色領域の定量では面積の絶対値を算出することから、測定日の違いに影響されないため、異なる日に調製し、撮影したサンプル間の比較が可能であると考え、複

数日にわたって得られたデータをまとめて PFIC1、PFIC2、コントロールの 3 群での比較を行ったところ、PFIC1 群と PFIC2 群間、PFIC1 群とコントロール群間のそれぞれで有意な差があり、平均値は PFIC1 群において他の群の 2 倍程度であった (Figure 9. D)。また診断法として用いるには個人間の値のばらつきが重要となるため、CV 値を算出したところ、コントロール群における CV 値は 14%であった。以上の IL-10 処理を行った PFIC1 患者 MDM で見られた実験結果は、ATP8B1 のノックダウン下で IL-10 処理した結果と一致しており、これらは ATP8B1 欠損に起因するフェノタイプであると考えられた。

考察

ATP8B1 のマクロファージにおける発現について

これまで、ATP8B1 は肝実質細胞をはじめ、腸上皮細胞 (103,104)、肺上皮細胞 (105)、蝸牛の感覚上皮細胞 (55) といった上皮細胞のアピカル膜における発現が報告されていたが、本研究において初めて ATP8B1 が MDM に発現すること、そして MDM のうち炎症寛解に寄与する M2c サブタイプに特に発現が高く、反対に M2a サブタイプには低いことが明らかとなった。また、単球においては ATP8B1 の mRNA の発現は定量限界以下であったことから、マクロファージへ分化する過程で発現が誘導されていると考えられる。これまでに ATP8B1 の発現量の調節機構としては、胆汁酸との関連が報告されており、マウスの成長段階において、胆汁酸の腸管循環が成立し、体内の胆汁酸プールが上昇する 3 週齢から小腸上皮細胞における ATP8B1 の発現量が上昇すること (103)、またコール酸付加食を与えたマウスにおいて ATP8B1 の発現量が小腸、肝臓において上昇する (106) ことから胆汁酸をリガンドとする核内受容体である FXR による ATP8B1 の発現制御が推測されるが、FXR のノックアウト、及び FXR アゴニスト処理によっても ATP8B1 の発現量に変化が無いことから否定されている (97,107)。また、ヒト大腸ガン由来の培養細胞である Caco-2 細胞に

においては、培養日数に応じて上皮様に分化するにしたいが、*ATP8B1* の mRNA は変化しないが、タンパク質発現量が上昇することから、転写後の制御の存在も示唆されている (62)。一方、マクロファージへの分化誘導過程においては *ATP8B1* の mRNA 量が増加しているため、転写による制御であると考えられる。マクロファージへの分化はヒト血清と M-CSF を添加した培地で培養することで行っているため、血清成分か、M-CSF によるシグナルにより転写誘導されていると推測され、血清成分の寄与は血清成分を除いた培養系において *ATP8B1* の発現誘導に差異があるかを検討することにより、検証できると考えられる。本研究では、興味深いことに、M-CSF に加え、IL-10 を処理することにより *ATP8B1* の発現量が上昇し、反対に IL-4 を加えると減少することが明らかとなった。この変化は *ABCA1* の変化と対応していることから、これらの制御因子として最も関連性が高いと考えられるのは、*ABCA1* と *ATP8B1* の両方の発現制御に関与することが知られている、miR-33a が挙げられる。miR-33a は小胞体におけるステロール量の減少により活性化する転写因子である SREBP2 のイントロン領域から生成される miRNA であり (108)、*ABCA1* に加え、*ABCB11* (*BSEP*)、*ATP8B1* の mRNA の 3'UTR を標的とし、発現を抑制することが知られている (97)。MDM の各サブタイプへの極性化において、細胞内のコレステロール量の変動が起きるため、細胞内のステロール量に応じて miR-33a の発現

が増減し、標的となる遺伝子発現を制御している可能性が考えられる。

ATP8B1 欠損により見られたフェノタイプ同士の関連について

ABCA1 が脂肪滴由来のコレステロールの排出に寄与するという報告 (109)、また ABCA1 を欠損する Tangier 病患者 MDM において脂肪滴蓄積が見られるという報告 (19,110) があることから、始めに見出した ATP8B1 欠損による ABCA1 の発現量低下と、脂肪滴蓄積の増大には関連性がある。マウスマクロファージにおいては、IL-10 はコレステロールの排出とともに取り込みを上昇させることが報告されており (111)、本研究においても ATP8B1 のノックダウンに依らず LDL の取り込みが上昇することが見られている (Figure 8.)。したがって、ATP8B1 のノックダウン下では、IL-10 処理によりコレステロールの取り込みは増加するが、ABCA1 による排出の増加の程度が低いため、両者のバランスに偏りが生じ、余剰のコレステロールが細胞内に脂肪滴として蓄積されるというメカニズムが考えられる。

脂肪滴蓄積の増大と M2c マーカー CD163、CD14 の発現低下との関連については、FACS による解析から脂肪滴と SSC 値の相関を明らかとしているため、SSC 値と各マーカーの対応を見ることで検討できると考えられる。そこでコントロール群における SSC 値と CD163、SSC 値と CD14 の関係性を見たところ、

CD163、CD14 の発現量が高い集団では SSC 値が低い細胞の割合が高くなる傾向にあった (Figure 6. F)。一方で ATP8B1 のノックダウンの影響を受けなかった CD16 と MerTK については、これらの発現の高低に依らず SSC 値の高い細胞、低い細胞の割合はほぼ一定であった (CD16: Figure 6. E, MerTK: data not shown)。このことから、一つ目の仮説として IL-10 処理により、CD16、MerTK の発現が誘導される細胞が一定割合存在し、その中でさらに CD163、CD14 の発現量が大きく上昇する細胞が一定数あり、そのような細胞では SSC 値の低下が起こるといふこと、二つ目の仮説として、SSC 値の低い細胞では IL-10 処理により CD163、CD14 の発現が誘導されやすいが、SSC 値の高い細胞では誘導されにくいということが考えられる。そこで、ATP8B1 のノックダウン下における SSC 値と CD163、CD14 の対応を見ると、CD163、CD14 の発現が高い細胞群と、低い細胞群で、SSC 値の高い細胞、低い細胞の割合はほとんど変化していなかった (Figure 6. F)。したがって、一つ目の仮説の方が有力であり、ATP8B1 のノックダウン下では、IL-10 処理による CD163、CD14 の発現の大きな上昇、SSC 値の減少という変化が起きていないと考えられる。以上より、ATP8B1 のノックダウン、及び PFIC1 患者 MDM では ABCA1 の低下を一因として脂肪滴蓄積が増大しやすく、IL-10 処理による CD163、CD14 の発現誘導に伴う脂肪滴の減少が起こりにくいという一連の流れが推測される (Figure. 10)。

マクロファージにおける ATP8B1 の機能欠損と病態の関連について

本研究において、ATP8B1 欠損により、炎症寛解に寄与するマクロファージサブタイプである M2c サブタイプへの極性化が部分的に阻害されることが明らかとなったことから、PFIC1 患者において見られる、炎症を伴う症状との関連が考えられる。PFIC1 患者で見られる炎症と関連する症状のうち高頻度で認められるものとして、肝移植後の脂肪性肝炎 (86,87)、アテローム性動脈硬化の所見 (96)、そして低頻度ではあるが報告されているものとして肺炎、膵炎があり、これらは PFIC2 患者では見られないため、肝外の ATP8B1 の欠損に起因すると考えられる (54)。ATP8B1 欠損によりこれらが生じるメカニズムの詳細は明らかとなっていないが、M2c サブタイプへの極性化異常により、炎症の寛解が正常に機能しないことが一因となっている可能性が考えられる。特に動脈硬化の進行という病態において、PFIC1 患者 MDM において抗動脈硬化に働く M2c サブタイプの極性化に異常があり、また脂肪滴蓄積が増大していたことから、個体においても血管内皮化でマクロファージの泡沫化が進行しやすく、アテローム性動脈硬化の原因となっていると推測される。今後さらに、ATP8B1 のノックアウトマウスを用いた解析や、PFIC1 患者の組織におけるマクロファージを解析することで、今回見られた MDM のフェノタイプが *in vivo* においてどう対応するかが明らかとなると期待している。

結論および今後の展望

MDM を用いた診断法の有用性について

本研究により見出した、IL-10 処理した MDM において ATP8B1 が高発現すること、また ATP8B1 欠損により、Oil Red O による染色領域が増大することから、PFIC 疑いとされた患者が PFIC1 であるか鑑別するスキームが考えられた (Figure 11.)。さらに、MDM における M2c サブタイプマーカー CD163、CD14 の発現量の減少というフェノタイプも合わせて解析することで、鑑別結果をよりサポートできると考えている。これまで、PFIC1 の診断を目的に患者検体を用いて ATP8B1 のタンパク質発現量を検討するためには、肝生検を行い、Western blotting により検出する必要があったが、肝生検は、患者の全身麻酔が必要であること、乳児早期から行える施設は限られていることから気軽に行える検査ではない。本研究では MDM における ATP8B1 の発現を明らかとしたことから、採血により ATP8B1 の発現量の有無を検出することが可能になったことは、検査の侵襲性を低め、コンプライアンスを向上させるという観点で優位性がある。また、MDM の Oil Red O 染色については、Figure 9 D の結果より、 $450 \mu\text{m}^2/\text{cell}$ を目安に、それ以上を高値として、PFIC1 を他の群と分けることができる。この閾値については、今後 PFIC 患者、コントロールともに例

数を増やしていくことで、過誤が起こりにくい値を設定できると考えられる。

そのために、遺伝子解析と変異体解析は患者 MDM の解析と並行して行い、両者を比較しながら PFIC1 を確定診断できるか、検討していく必要がある。ナンセンス変異、フレームシフトを引き起こす変異、または PFIC1 の病因となることが示されているミスセンス変異をホモや複合ヘテロで持つ場合は、PFIC1 の確定診断は遺伝子解析のみで可能である。しかしながら、新規のミスセンス変異が同定された場合、もしくは、片方のアレルにしか変異を同定できなかった場合 (Table 1. Pt. 1, 2, 8 など) には確定診断には至らない。また、ATP8B1 の発現量の解析のみでは、機能低下は起こるが発現量低下は起こらない変異が病因となっている場合に検出できず、このような変異と、mRNA 量を低下させるイントロンもしくはプロモーター領域の変異を複合ヘテロで持つ場合には、ATP8B1 の発現量が半分程度で、かつエクソンにアミノ酸置換を伴う変異が一つしか見つからないということで、診断は困難である。また、PFIC1 患者では、頻度の高い変異部位が無く、今後も新規の変異が見つってくると予測され、その影響について変異体を作成して検討する必要性も出てくると考えられるが、ATP8B1 の機能を定量的に評価する実験系は未だ確立していない。したがって、本研究で ATP8B1 の機能を反映したフェノタイプを、患者由来の MDM を用いて評価可能にしたことは、臨床上非常に重要である。実際に、本研究を遂行す

る中で、*ATP8B1* にアミノ酸置換を起こす変異が同定されたが、典型的な *PFIC1* とは異なる症状を呈することから、*PFIC1* ではないと考えられるケースが認められた。当該患者 (Table 1. Pt.9) は、*PFIC* が疑われるが、通常の子患者で見られる黄疸、肝障害の進行が見られておらず、確定診断ができていなかった。そこで遺伝子解析を行ったところ、*ATP8B1* にアミノ酸置換を伴う SNPs (アレル頻度: 約 5%) を二つ、及び新規の変異を一つ持つことが明らかとなったが、機能に直結する ATPase 活性部位における変異では無く、これら SNPs、変異が *ATP8B1* に及ぼす影響は不明であった。これを検討するために、変異体を作成して解析した結果、発現量、細胞内局在は正常であった (84)。即ち、本患者においては、*ATP8B1* のタンパク質に何らかの影響を及ぼし得るアミノ酸置換が存在するが、その影響を解析することはできていない。また本患者が示す症状は他の *PFIC1* 患者に比べて重篤でないことから、そのアミノ酸置換により *ATP8B1* の機能が完全に無くなることは考えられないため、機能の一部が障害されて *PFIC* 様の症状が出ているか、全く別の遺伝子が影響している可能性も考えられる。本患者については MDM の Oil Red O 染色を行っているが、染色面積は Control 群と差のない値であり (Figure 9. D *PFIC1*?)、M2c マーカーの発現も正常に見られた (data not shown)。したがって、本研究で提案する MDM のフェノタイプを用いたスクリーニングでは、*PFIC1* 様の症状を示すが、

PFIC1 程重篤でない患者と、典型的な PFIC1 患者群を分けられていると考えられる。臨床の現場で、PFIC は雑多な疾患を含む症候群として存在しており、本研究成果から、前向きに PFIC1 患者を鑑別できるようになったことで、早期に確定診断をつけた後に治療を開始できるようになり、今後の PFIC1 治療の研究、及び PFIC 様症状を示す疾患に対する診断の研究に貢献できると考えている。

さらに ATP8B1 の機能欠損により、MDM で見られるフェノタイプと、肝内胆汁うっ滞症状、肝障害・線維化の進行との対応が明らかとなっていけば、MDM を用いた解析から予後の予測、そして治療方針の決定が可能になると期待している。

診断法としての改良点について

今回見出された、MDM における脂肪滴蓄積の増大という PFIC1 患者特異なフェノタイプは、Oil Red O 染色による測定が容易であり、染色領域を解析ソフトにより自動的に算出することが可能であることから、一般的な病理診断と比べても、恣意性が入らない分、優れていると言える。診断法として、ATP8B1 のタンパク質発現量を Western blotting により検出する実験系と比較しても、実験自体の操作が簡便であり、測定値の絶対値で判定できることから、厳密なコントロールを置かなくとも判別が可能であることから、実用性の観点で優位

である。問題点としては、単球の分離、MDM への分化という工程が必要であることから、サンプルを得るまでの作業が煩雑で時間を要することである。そこで、使用するサイトカイン量を最適化し、分化日数を短くすることができれば、さらに簡便化を図ることができると考えている。また、本実験系では市販のヒト血清を用いて培養しており、Lot 差による脂質含有量の差や、サイトカイン量の差等により、MDM の分化や脂肪滴量に影響を与えることが考えられるため、まず血清を含有しない培地で培養し、MDM の分化後に一定量のリポタンパク質を添加することで脂肪滴蓄積を誘導し、これを観察することで、より精度が高い実験系になると想定される。

図表

Patient No.	Diagnosis	Gender	Age	Genome sequencing			
				<i>ATP8B1</i>		<i>BSEP</i>	
				mutation1	mutation2	mutation1	mutation2
Pt. 1	PFIC1	M	2y	c.3033-34del (FS)	?	-	-
Pt. 2	PFIC1	M	6y	c.1585-87del (F529del)	?	-	-
Pt. 3	PFIC1	F	8y	c.1371del (G457FS)	c.2941G>A (E981K)	-	-
Pt. 4	PFIC1	F	1y	c.916T>C (C306R)	c.2854C>T (R952X)	-	-
Pt. 5	PFIC2	F	2y			c.3692G>A (R1231Q)	c.3692G>A (R1231Q)
Pt. 6	PFIC2	F	2y			c.386G>A (C129Y)	c.1460G>A (R487H)
Pt. 7	PFIC2	F	1y			c.386G>A (C129Y)	c.386G>A (C129Y)
Pt. 8	PFIC2	F	9m	-	-	c.386G>A (C129Y)	?
Pt. 9	PFIC1?	M	17y	c.2021T>C (M674T) c.234C>G (H78Q)*	c.1729A>G (I577V)*	-	-

Table 1. *ATP8B1* and *BSEP* mutations in PFIC patients

All exons and exon-intron boundaries of *ATP8B1* and *BSEP* gene were screened by direct cycle sequencing as described in 方法 (PFIC患者とヒト検体). Mutations with asterisks are reported as SNPs (Allele frequency of c.234C>G: 5 % in Japanese; c.1729A>G: 5% in Japanese). (?): Another mutation in intron or promoter region is expected because *ATP8B1* mRNA levels were low in liver specimens of Pt. 1 and Pt. 2 and because Pt. 8 showed very severe cholestasis and liver damages (Liver transplantation was done for Pt. 8 after this study). (-): Screened but not detected. Space: Not screened.

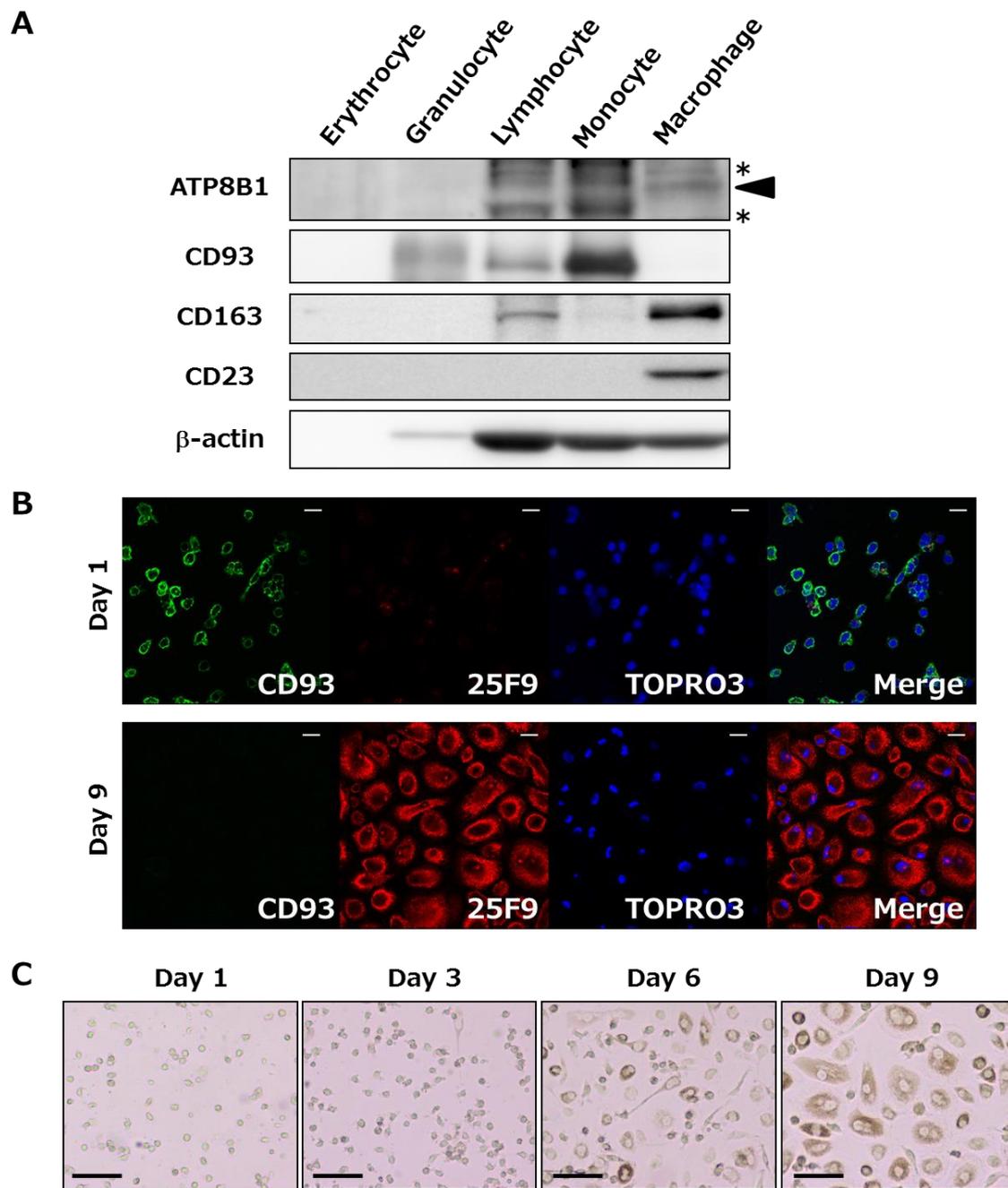


Figure 1. ATP8B1 is expressed in MDMs.

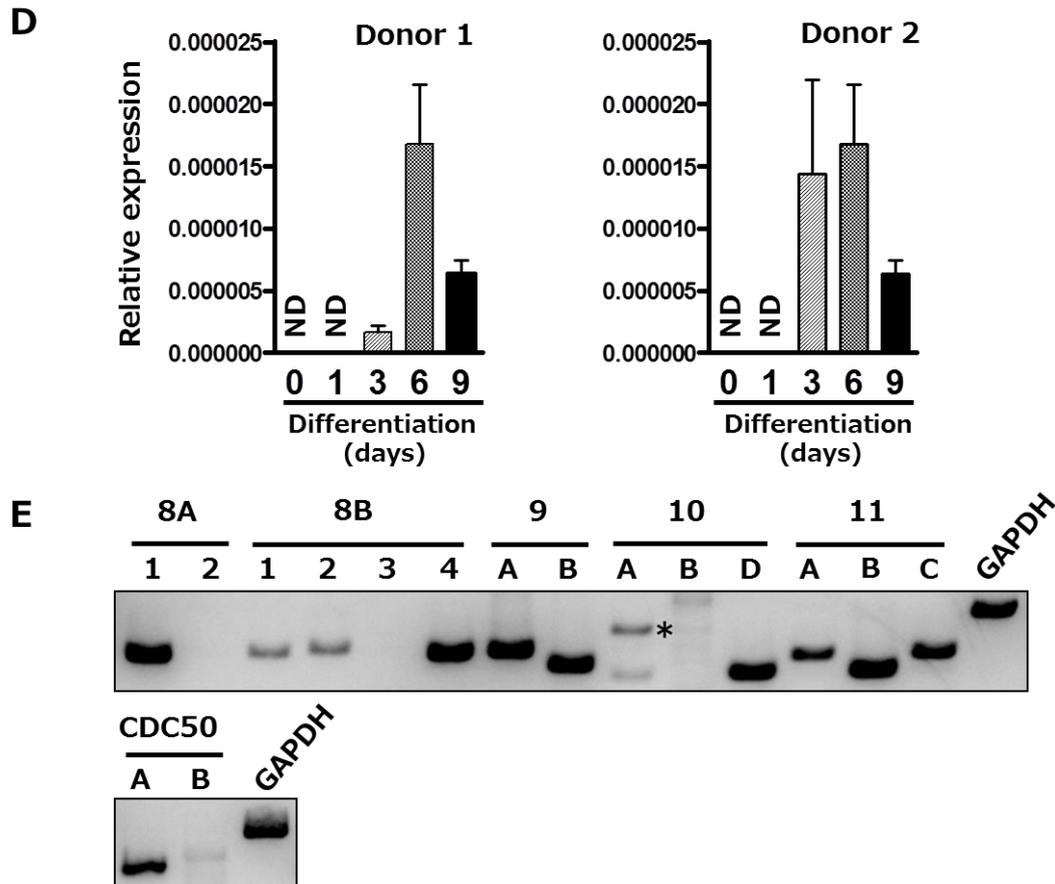


Figure 1. (Continued)

(A) Whole cell lysates of erythrocytes, granulocytes, lymphocytes, monocytes, and MDMs prepared from peripheral blood of control volunteers were subjected to western blotting with anti-ATP8B1 antibody and anti- β -actin antibody. Expression of monocyte marker CD93 and macrophage marker CD163 and CD23 were reprobbed with anti-CD93, anti-CD163 and anti-CD23 antibodies after stripping. Arrow head indicates ATP8B1 (140 kDa). Asterisks represent non-specific bands. (B) 1 or 9 days after seeding monocytes, they were fixed and subjected to immunostaining with anti-CD93 or 25F9 antibodies. TOPRO3 was used to stain nuclei. Scale bar: 20 μ m. (C) Photomicrographs show representative morphological change 1, 3, 6, 9 days after seeding monocytes. Scale bar: 50 μ m (D) Expressions of ATP8B1 mRNA during differentiation from monocytes to macrophages were determined by qPCR. Representative data from 2 donors were shown. ND, not detected. (E) mRNA expression levels of 14 members of P4-type ATPases and 2 members of CDC50 family in MDMs were assessed by RT-PCR. Band with asterisk is non-specific PCR product.

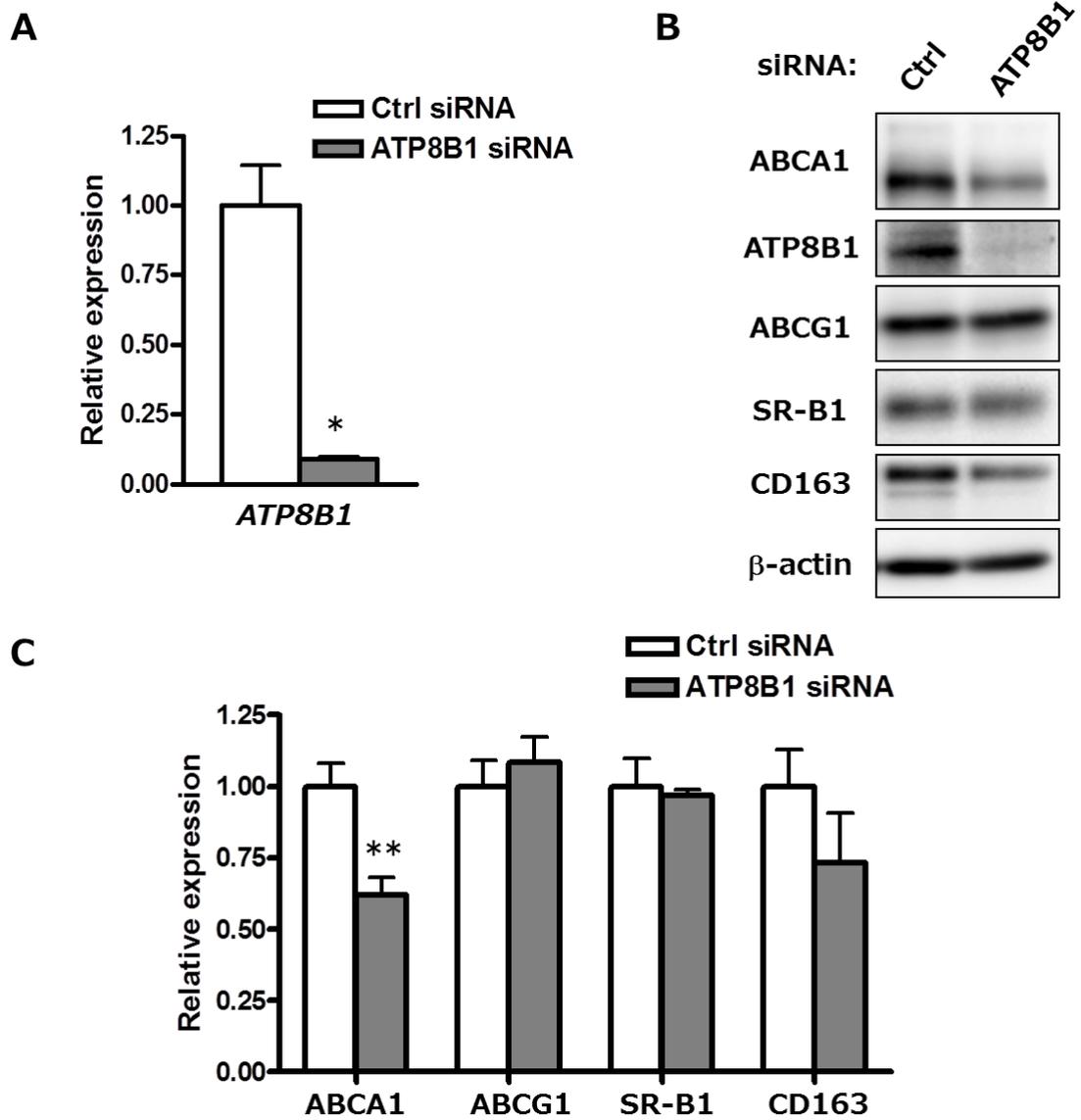
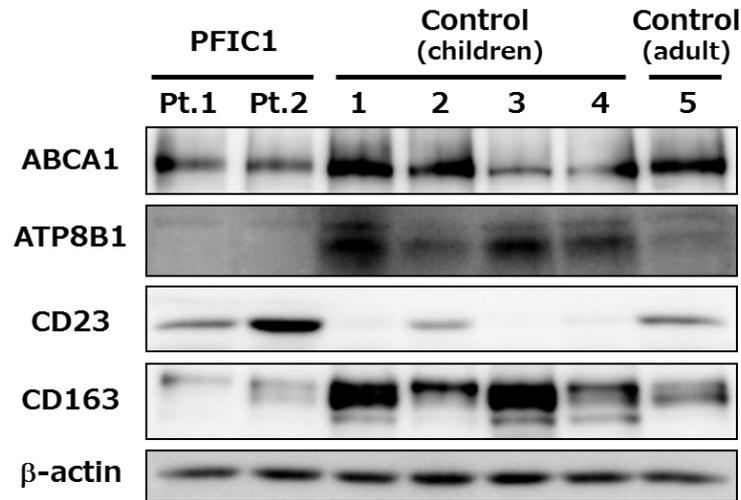


Figure 2. ATP8B1 deficiency causes down-regulation of ABCA1

D**Figure 2. (Continued)**

(A-C) MDMs from control volunteers were transfected with negative control (Ctrl) and ATP8B1 siRNA. 3 days later, cells were harvested and used for cDNA synthesis from total RNA (A) or for preparing whole cell lysate. (B, C). (A) Expression of ATP8B1 mRNA was determined by qPCR. Values are means \pm SE of $n = 4$, expressed as relative expression compared with Ctrl siRNA treated cells. (B) Expression of ATP8B1, other cholesterol transporters, and CD163 protein were examined by western blotting. Representative results of three independent results are shown. (C) Band densities in (B) were quantified using Multi Gauge V2.11. Values are means \pm SE of $n = 4$, expressed as relative expression compared with Ctrl siRNA treated cells. (D) Whole cell lysates of MDMs prepared from PFIC1 (Pt.1 and Pt.2 shown in Table. 1), Control children and adult patients were subjected to western blotting. Statistically significant difference * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

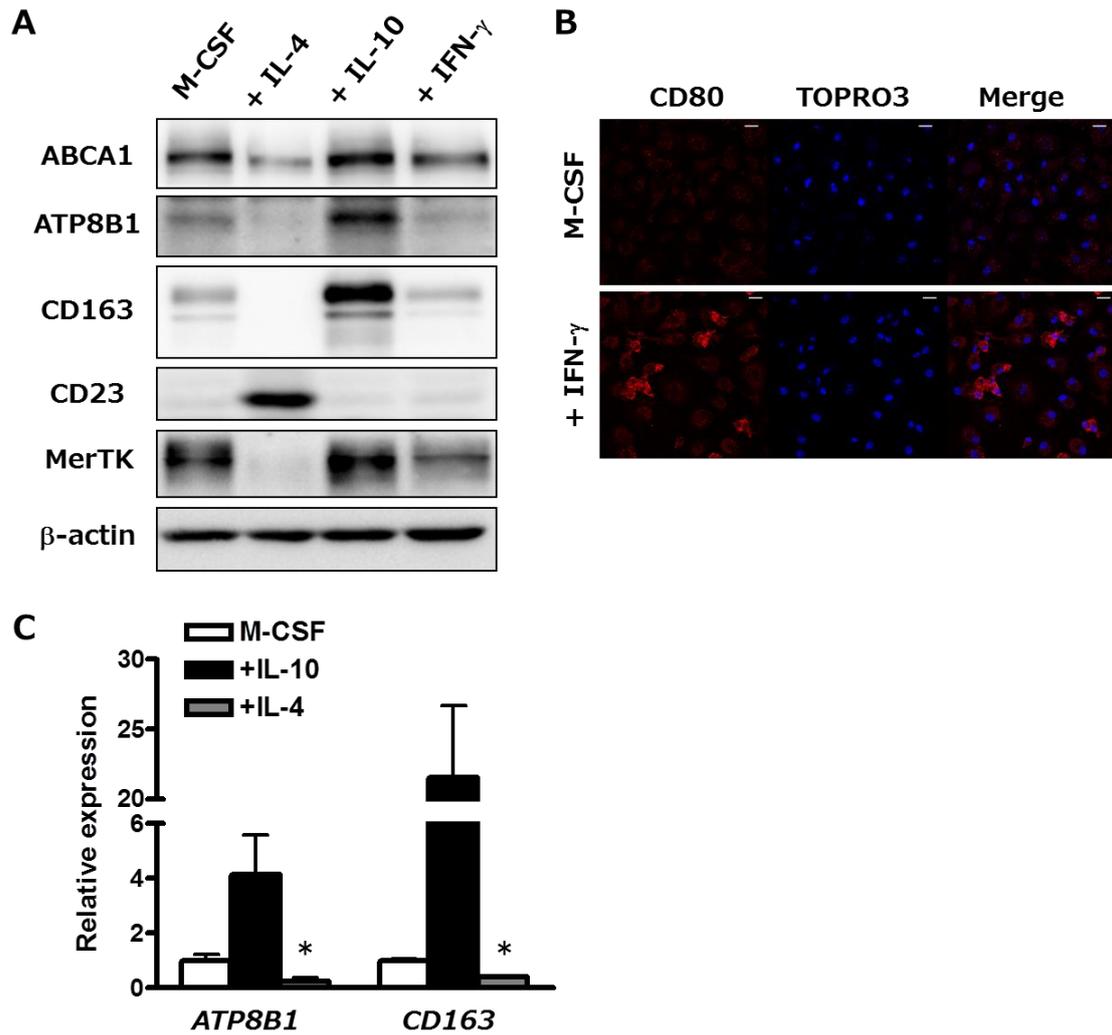


Figure 3. ATP8B1 is predominantly expressed in IL-10 induced CD163^{high} subpopulation (M2c subtype)

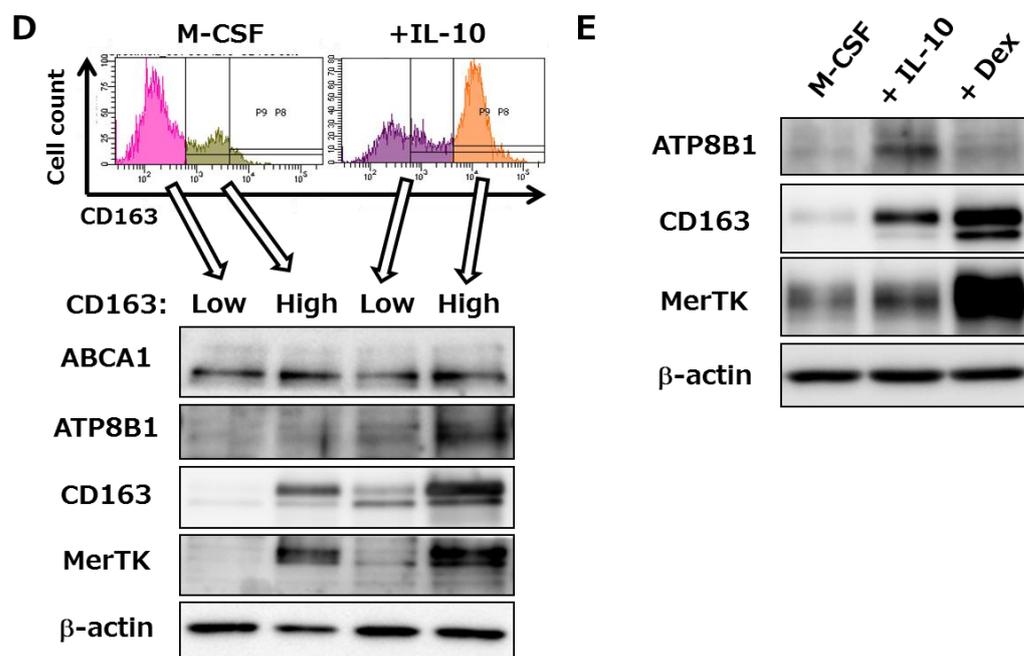


Figure 3. (Continued)

MDMs from control volunteers were treated only with 10ng/ml M-CSF (A-E) or with 20ng/ml IL-4 (A, C), 40 ng/ml IL-10 (A, C, D) and 40 ng/ml IFN- γ (A, B) in addition to 10 ng/ml M-CSF for 6 days to induce polarization of M2a, M2c, and M1 subtype respectively. Cells were harvested for preparing whole cell lysate (A) or for cDNA synthesis from total RNA (C) or fixed, then subjected to immunostaining (B). (A) Protein expression levels of ABCA1, ATP8B1, β -actin and subtype specific markers; CD23 (M2a), CD163, MerTK (M2c) were determined by western blotting. Representative results of three independent results are shown. (B) Expression of M1 marker, CD80 was assessed by immunostaining. Scale bars: 20 μ m. (C) mRNA expression levels of *ATP8B1* and *CD163* were determined by qPCR. Values are means \pm SE of n = 3, expressed as relative expression. Representative results of three independent results are shown. Statistically significant difference *p < 0.05 (D) Cells were stained with FITC labeled anti-CD163 antibody and sorted by FACS into 2 populations with high or low expression levels of CD163 as shown in histograms (Top). Whole cell lysate of each population was subjected to western blotting. Representative results of two independent results are shown. (E) Whole cell lysates of MDMs treated only with 10 ng/ml M-CSF or with 40 ng/ml IL-10 or 100 nM Dexamethasone for 3 days were subjected to western blotting. Representative results of three independent results are shown.

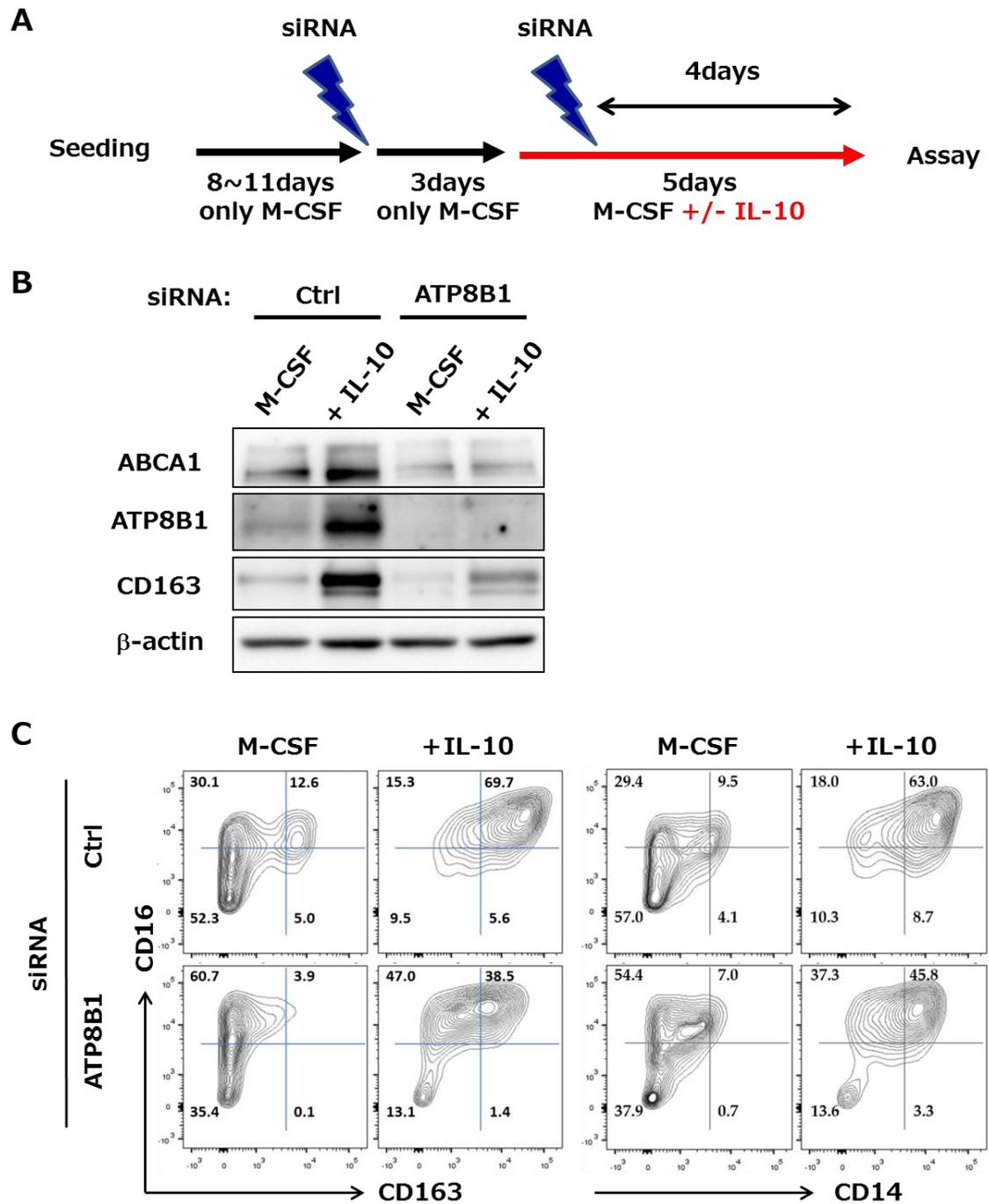


Figure 4. ATP8B1 knockdown affects polarization of MDMs by IL-10

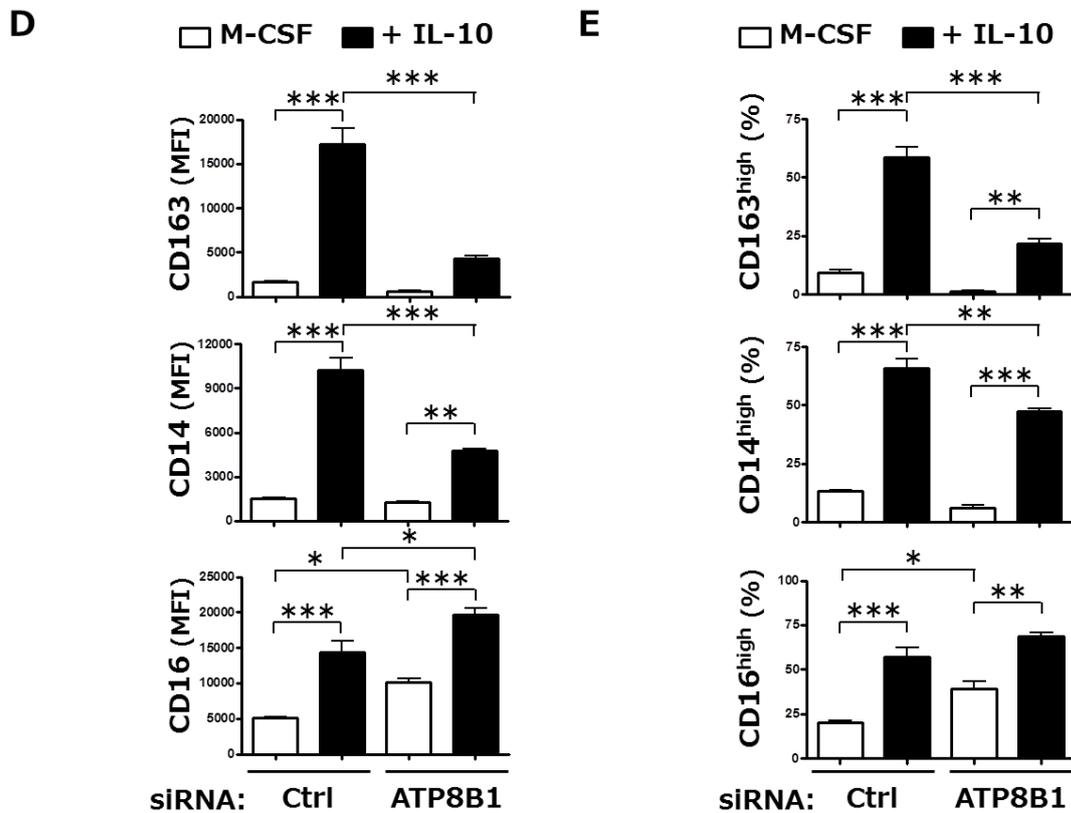


Figure 4. (Continued)

(A-D) To assess the effect of ATP8B1 knockdown on IL-10 mediated polarization of macrophages, MDMs differentiated with 10 ng/ml M-CSF for 8 ~11 days were transfected with siRNA (Ctrl, ATP8B1) and 3 days after transfection, cells were cultured with 10 ng/ml M-CSF with (closed bars) or without (open bars) 40 ng/ml IL-10 for 5 days. 2nd siRNA transfection was performed 4 days before assay to keep knockdown condition until assay. (A) Schematic procedures are shown. (B) Whole cell lysate of each sample was subjected to western blotting. (C-E) Cells were stained with fluorescence labeled anti-CD16 and anti-CD163, or anti-CD14 antibodies and analyzed by FACS. The data were analyzed by Frowjo_V10. (C) Representative data were shown as contour plot. (D) Mean fluorescence intensities (MFIs) of CD163, CD14 and CD16 were determined. Values are means \pm SE of n = 3. Representative results of four independent results are shown. (E) CD163^{high}, CD14^{high} and CD16^{high} cell percentages were shown. Values are means \pm SE of n = 3. Representative results of four independent results are shown. Statistically significant difference *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

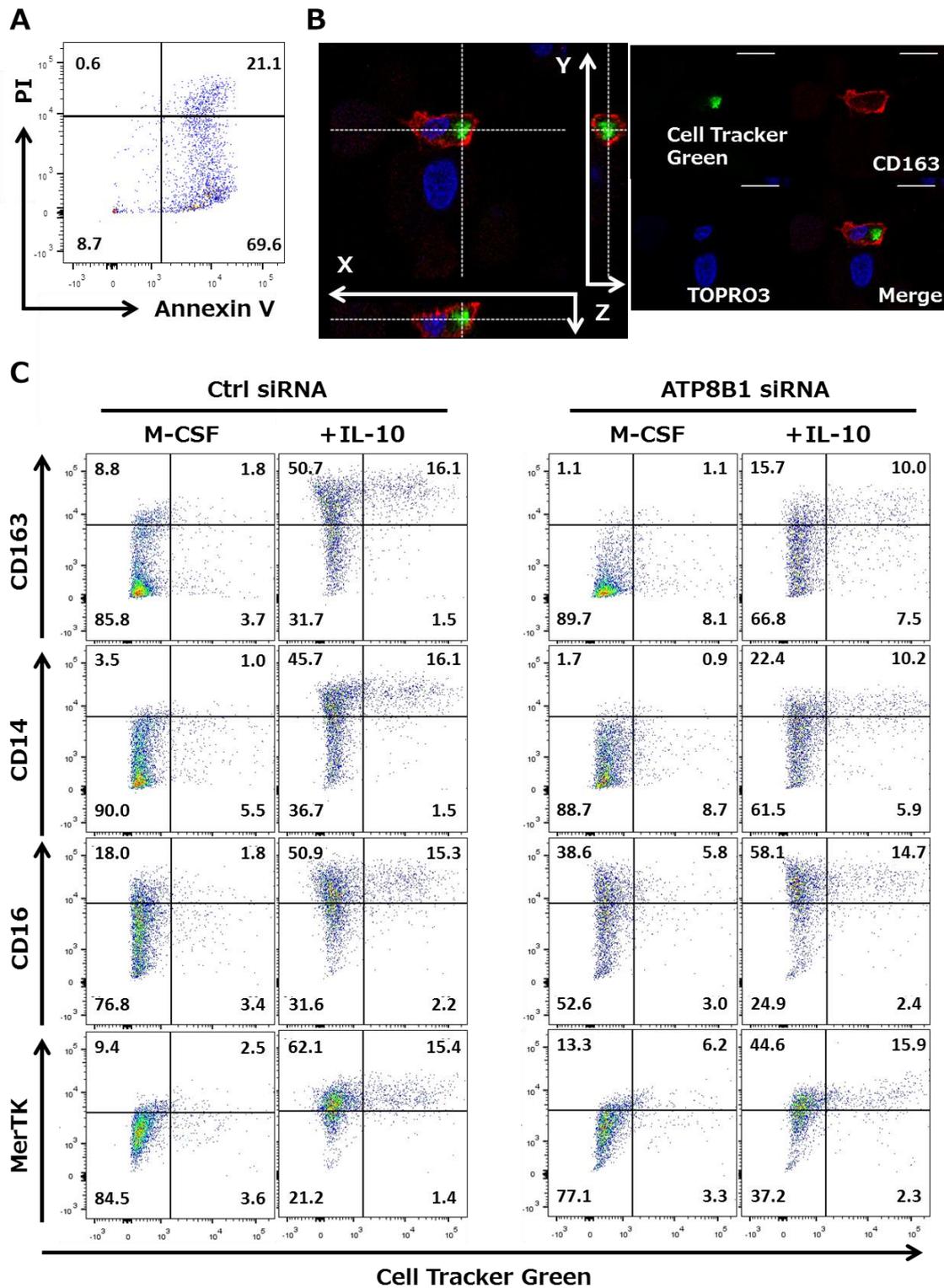


Figure 5. ATP8B1 knockdown does not affect IL-10-induced phagocytosis of early apoptotic cells

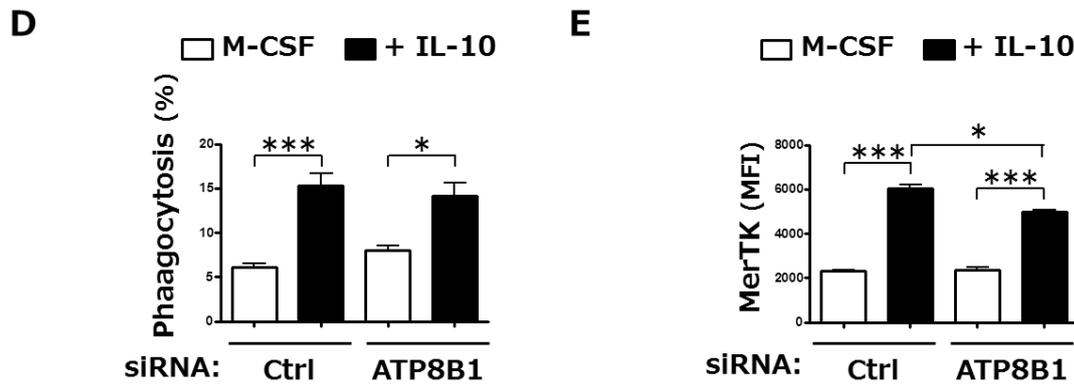


Figure 5. (Continued)

(A) Early apoptotic cells were obtained by incubating human granulocytes, isolated from peripheral blood of control volunteers, in 10% FBS RPMI for 20 hours. According to Annexin V and propidium iodide (PI) staining, 60-70 % of granulocytes show early apoptotic status (Annexin V+, PI-). (B-E) To assess the effect of ATP8B1 knockdown on IL-10 mediated induction of phagocytosis of early apoptotic cells, MDMs from control volunteers were treated as described in Fig.4 A and then incubated for 3 h with early apoptotic cells stained with cell tracker green. Cells were stained with fluorescence labeled anti-CD163 (B, C), anti-CD14 (C), anti-CD16 (C) or anti-MerTK (C, E) antibodies and analyzed by immunostaining (B) or FACS (C-E). (B) Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and immunostained with anti-CD163 antibody without membrane permeabilization. Representative data is shown as XY, XZ, and YZ plane of merged figure (left) and each staining figure (right). Scale bars: 20 μ m. (C) FACS data were analyzed by Frowjo_V10. MDMs were gated using FSC and SSC values and free granulocytes (not phagocytosed) were excluded. Representative data were shown as pseudocolor plot. (D) Phagocytosis of early apoptotic cells were determined as percentage of cell tracker green positive MDMs. Values are means \pm SE of n = 3. Representative results of two independent results are shown. (E) Expression levels of MerTK protein were determined as MFIs. Statistically significant difference *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001

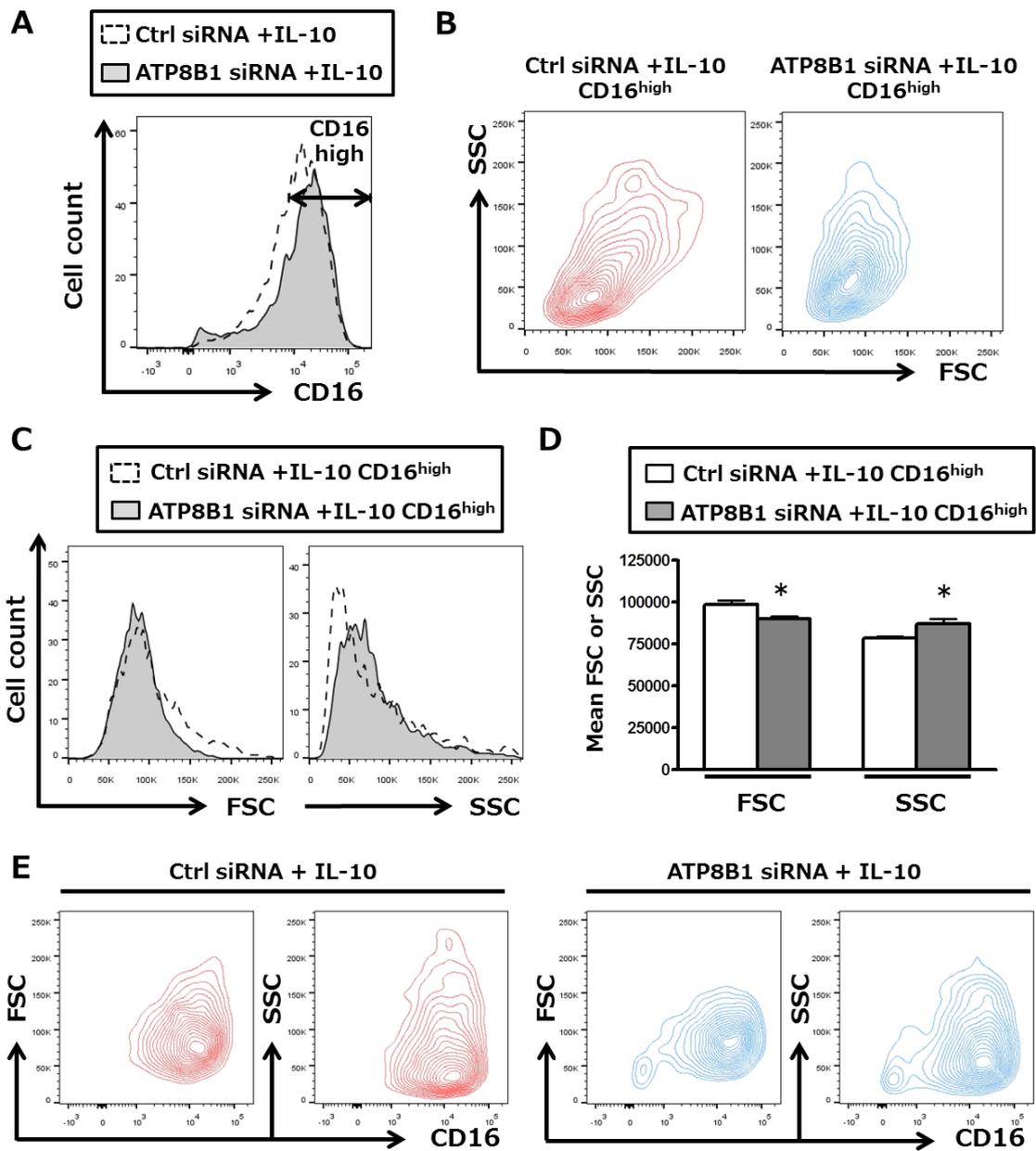


Figure 6. MDMs with ATP8B1 deficiency show morphological abnormality.

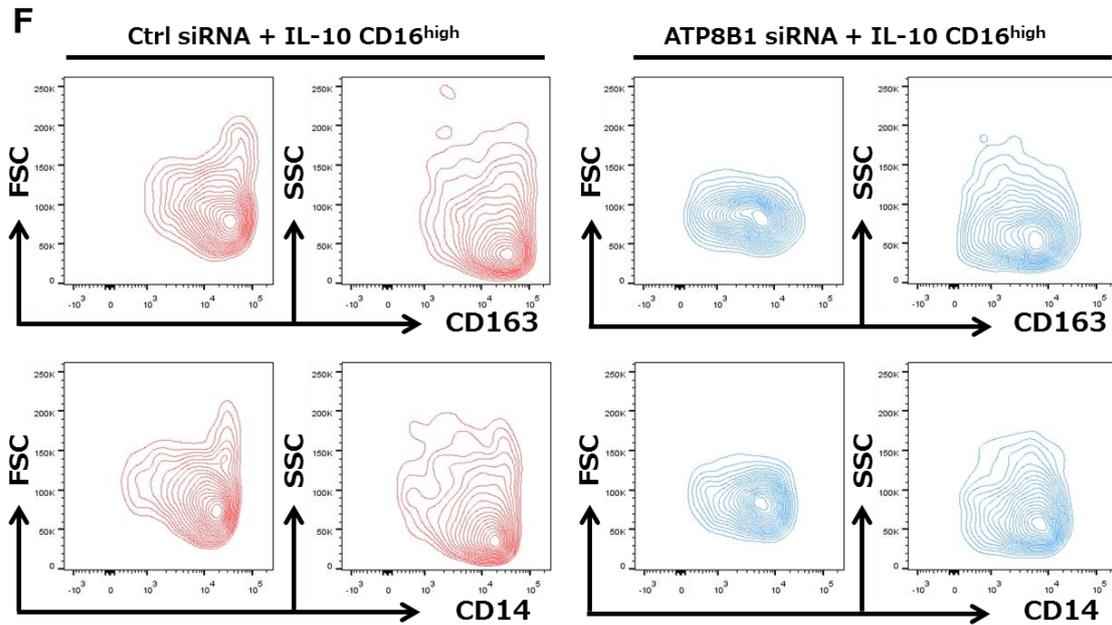


Figure 6. (Continued)

(A-F) To analyze the effect of ATP8B1 knockdown on cell morphologies of MDMs treated with IL-10, MDMs from control volunteers were treated as described in Fig.4 A, stained with fluorescence labeled anti-CD16 and anti-CD163 or anti-CD14, and applied to FACS. FACS data were analyzed by Frowjo_V10. (A) Expression levels of CD16 were not altered by ATP8B1 knockdown. Ctrl siRNA, histogram with dotted line; ATP8B1 siRNA, gray histogram. CD16^{high} populations (indicated by double-headed arrow) were analyzed for ATP8B1 knockdown effect on cell morphologies. (B, C) Morphological difference of CD16^{high} populations between Ctrl siRNA and ATP8B1 siRNA treated MDMs are shown as contour plots with FSC and SSC (B) or histograms of them (C). (D) Bars represent means \pm SE of FSC and SSC (n =3). Statistically significant difference *p < 0.05 (E, F) Relationships between values associated with cell morphologies and M2c markers, CD16 (E), CD163 and CD14 (F) were examined by making contour plot with them (Ctrl siRNA; red, ATP8B1 siRNA; blue). (F) For CD163 and CD14, CD16^{high} populations were analyzed.

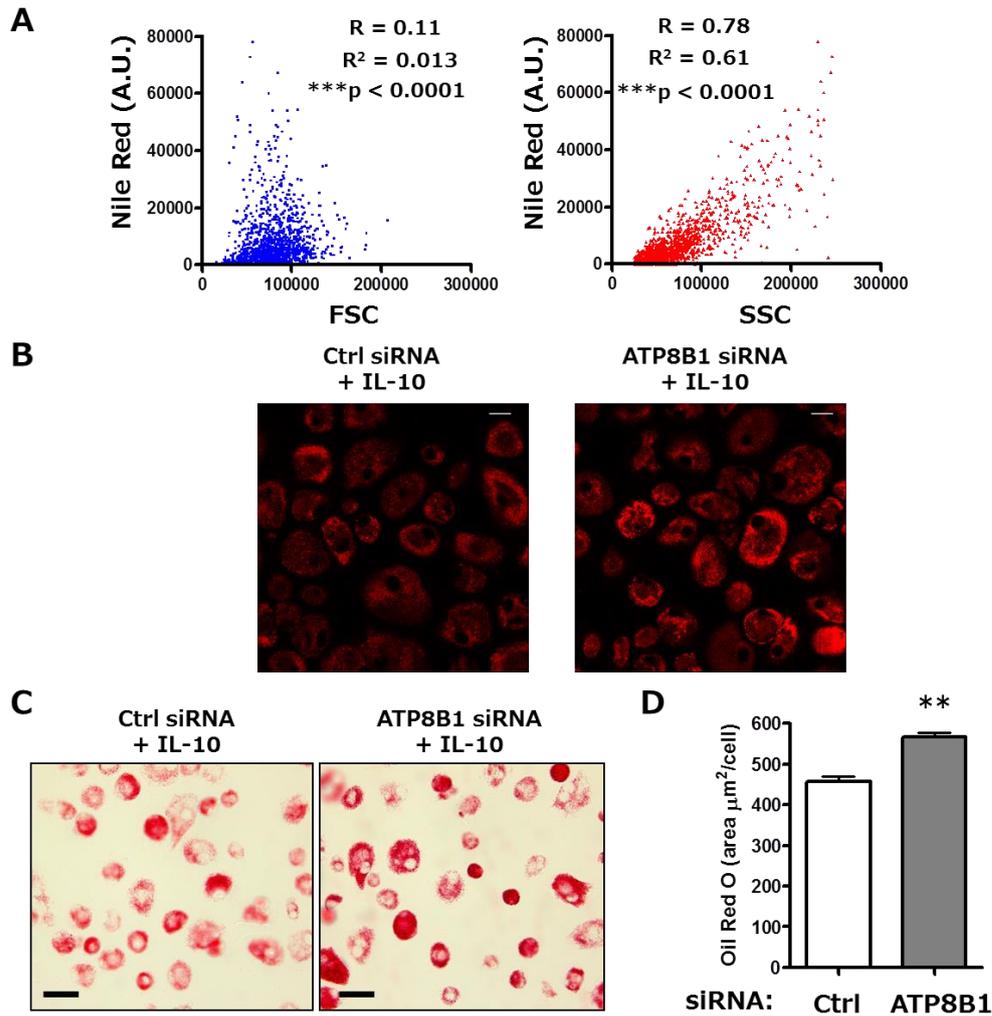


Figure 7. ATP8B1 knockdown induces lipid droplet accumulation.

(A-D) To evaluate the effect of ATP8B1 knockdown on lipid droplet accumulation in MDMs treated with IL-10, MDMs from control volunteers were treated as described in Fig.4 A, stained with Nile Red (A, B) or Oil Red O (C, D) and analyzed by FACS (A), confocal microscopy (B), or light microscopy (C, D). (A) Correlation between values associated with cell morphologies and lipid droplet amount was examined. Pearson's correlation coefficient R values between fluorescence of Nile Red and FSC or SSC were calculated. (B) Representative images of Nile Red staining are shown. Scale bar: 20 μm . (C) Representative images of Oil Red O staining are shown. Scale bar: 50 μm . (D) Areas of Oil Red O staining per cell were calculated using WinROOF. Bars represent means \pm SE of n =4. Statistically significant difference **p < 0.001, ***p < 0.001.

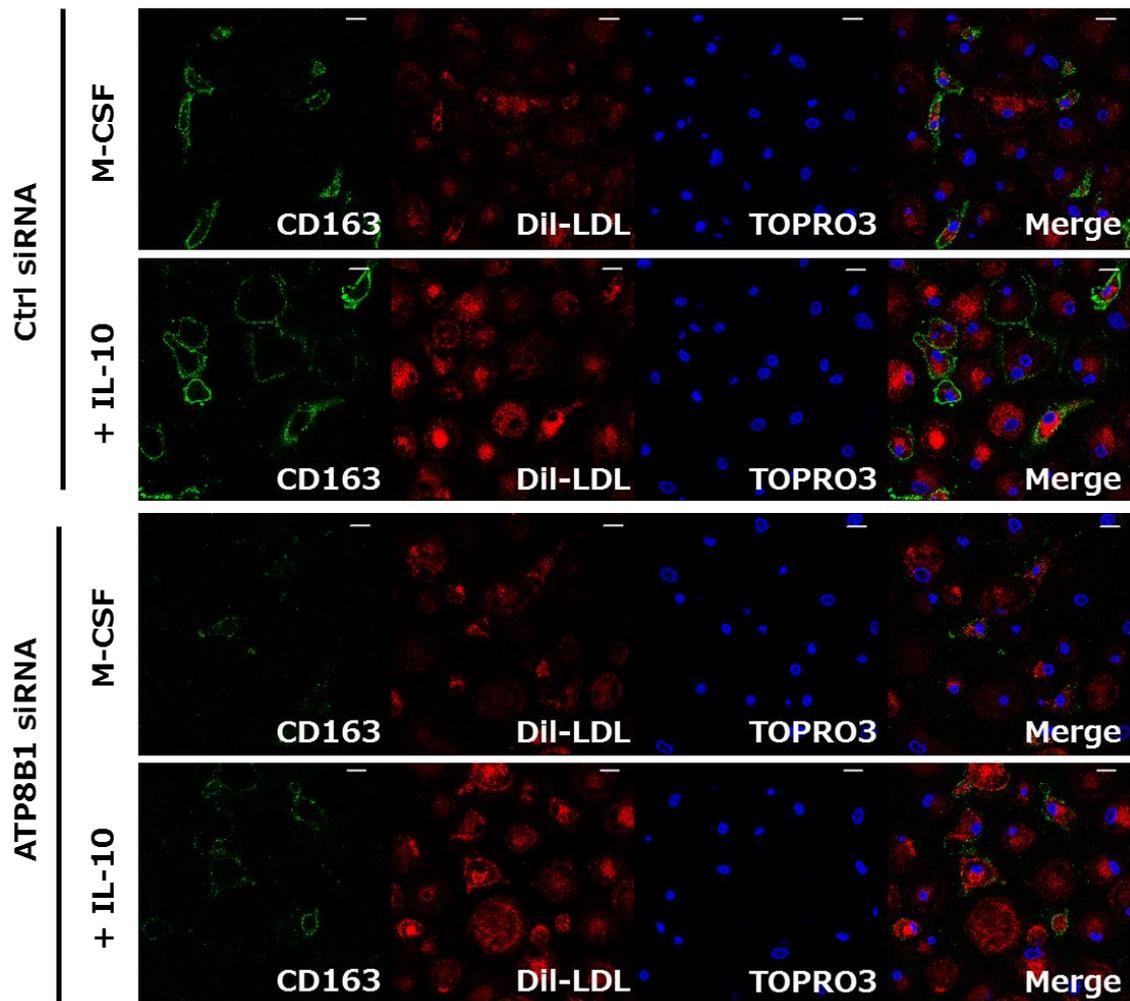


Figure 8. ATP8B1 knockdown does not affect IL-10-induced LDL uptake.

To examine the effect of ATP8B1 knockdown on LDL uptake of MDMs treated with IL-10, MDMs from control volunteers were treated as described in Fig.4 A, incubated with 10 μ g/ml Dil-LDL for 45 min, fixed with 4% paraformaldehyde, followed by immunostaining with anti-CD163 antibody without membrane permeabilization. TOPRO3 was used to stain nuclei. Representative images taken by confocal microscopy are shown. Scale bar: 20 μ m.

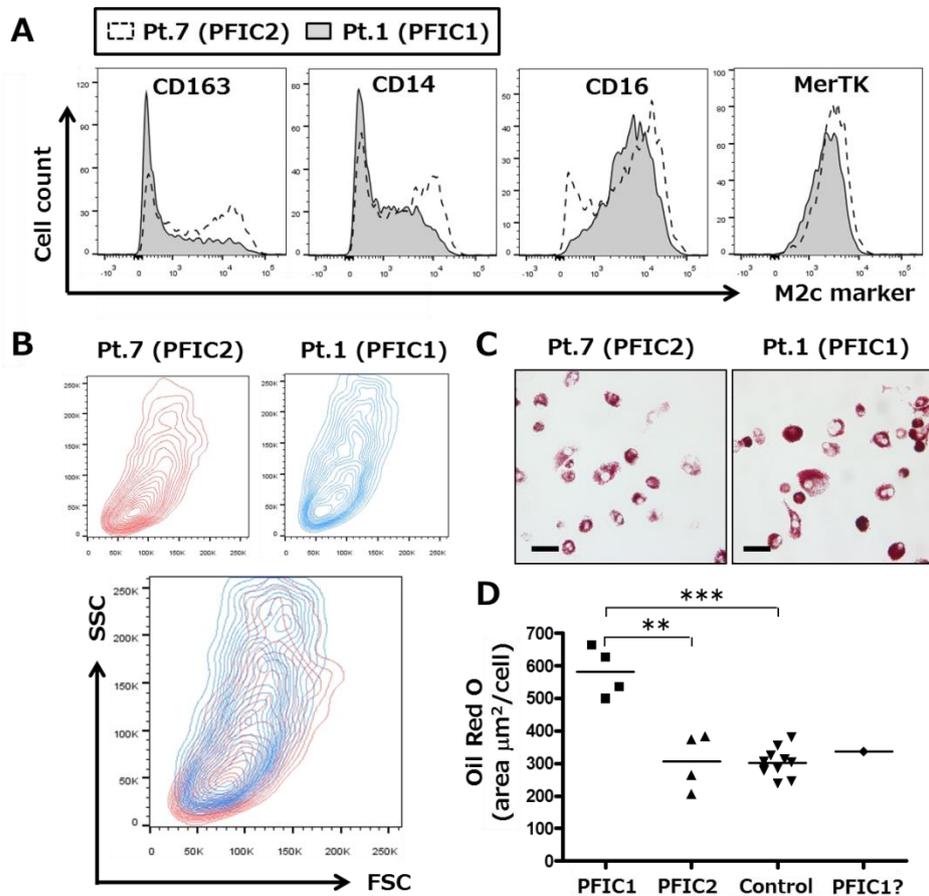


Figure 9. Abnormal polarization and evident lipid droplet accumulation are observed in PFIC1 patients-derived MDMs treated with IL-10.

(A-D) MDMs from PFIC1 and PFIC2 patients were treated with 40 ng/ml IL-10 in addition to 10 ng/ml M-CSF for 6 days, and then subjected to FACS analysis (A, B) or Oil Red O staining (C, D). Results from a representative pair of PFIC1 and PFIC2 patients (Pt.1 and Pt.7) are shown (A-C). Comparable results were obtained from other 3 pairs of PFIC1 and PFIC2 patients. (A) Expression levels of M2c markers, CD163, CD14, CD16 and MerTK were determined. PFIC2, histogram with dotted line; PFIC1, gray histogram. (B) Morphological difference between MDMs of PFIC1 (blue) and PFIC2 (red) are shown as contour plots with FSC and SSC. (C) Representative images of Oil Red O staining are shown. Scale bar: 50 μ m. Areas of Oil Red O staining per cell were calculated using WinROOF. PFIC1, n = 4 (Pt.1, 2, 3, 4 described in Table. 1); PFIC2, n = 4 (Pt.5, 6, 7, 8); Control, n = 11; PFIC1? (Pt.9). Statistically significant difference **p < 0.01, ***p < 0.001.

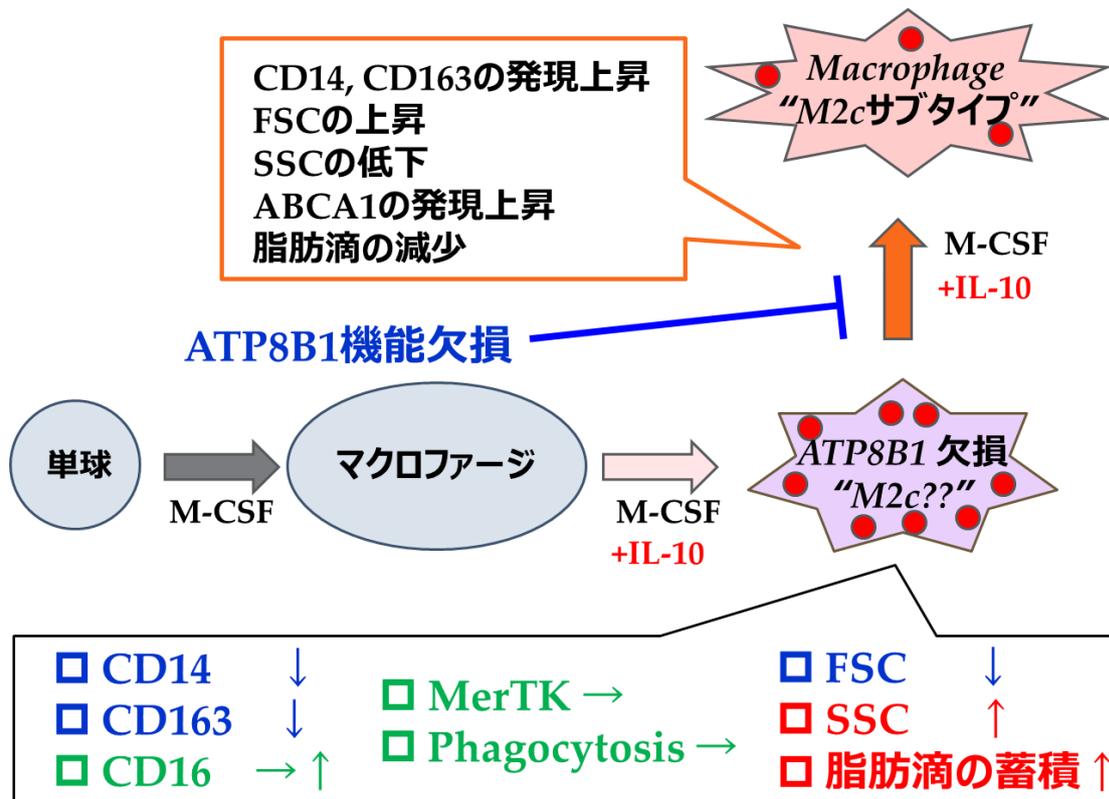


Figure 10. Phenotypes of MDMs polarized by IL-10 under ATP8B1 deficient condition.

ATP8B1 deficiency causes downregulation of M2c markers (CD14 and CD163), cholesterol efflux transporter (ABCA1), morphological abnormality, and enhanced lipid droplet accumulation. On the other hand, phagocytosis of apoptotic cells, which is a M2c subtype-specific function, was not affected by ATP8B1 knockdown. Induction of ATP8B1 expression during differentiation from monocytes into macrophages might be essential for acquiring specific properties of M2c subtype by IL-10.

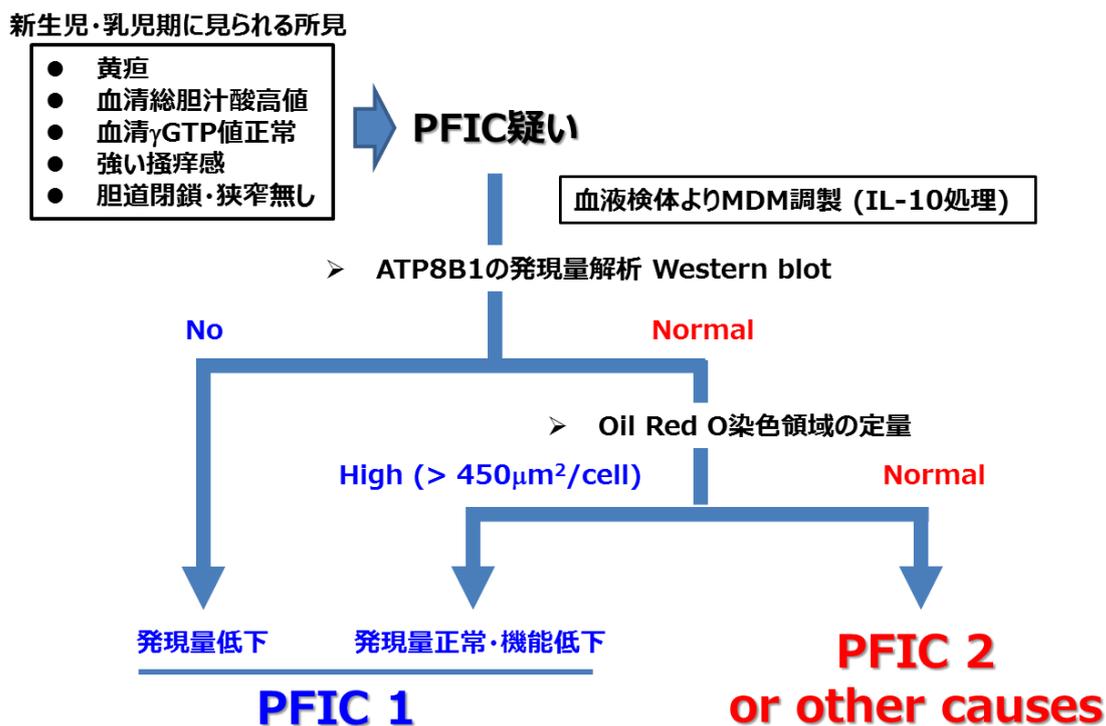


Figure 11. Scheme for discriminating PFIC1 patients from patients with PFIC-like cholestatic diseases.

If bile duct obstruction is not detected by ultrasound scan in infants with jaundice, high serum bile acid level, normal serum γ -GTP level and intractable itch, it is probable that they are PFIC patients (PFIC1, PFIC2, or other PFIC-like cholestatic diseases). The present study revealed that PFIC1 patients can be discriminated from such patients by measuring expression level of ATP8B1 and area of Oil Red O staining region using MDMs treated with IL-10. Threshold of Oil Red O staining area is set at 450 $\mu\text{m}^2/\text{cell}$ according to the data in Figure 9 D.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、血液検体を御供与いただいた PFIC 患者様、コントロールの患者様方、また、検体の提供にご協力いただきました各医療機関の以下の先生方に深く感謝いたします。

大阪大学大学院医学系研究科 近藤宏樹先生、長谷川泰浩先生

順天堂大学医学部附属病院 鈴木光幸先生、齋藤暢知先生、成高中之先生

済生会横浜市東部病院 乾あやの先生

獨協医科大学越谷病院 井上建先生

名古屋市立大学大学院医学研究科 杉浦時雄先生

帝京大学医学部 滝川一先生

京都大学医学部附属病院 上本伸二先生、岡本晋哉先生

熊本大学医学部附属病院 猪俣裕紀洋先生

国立成育医療研究センター 笠原群生先生、新井勝大先生、工藤豊一郎先生

福田晃也先生

東京大学医学部附属病院 磯島豪先生

大阪市立総合医療センター 依藤亨先生

医療法人社団桜緑会八重洲さくら通りクリニック 東孝先先生

東京女子医科大学 江川裕人先生

岩手医科大学附属病院 佐々木美香先生

宮城県立こども病院 虻川大樹先生

京都府立医科大学 岡島英明先生

これまで熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました以下の先生方に深く感謝いたします。

学部四年生から修士課程まで、研究遂行における基礎的な考え方について熱心にご指導いただいた杉山雄一教授 (現・理化学研究所)

博士課程において、的確なご指導ご鞭撻を賜り、研究遂行に有益な議論の場を作って下さいました楠原洋之教授

研究室の発表の場において、暖かい励ましや有益なコメントを下さり、研究室を和ませて下さいました前田和哉講師

学部四年生から博士課程に渡って、担当教官として研究の進行状況を気にかけて、頻繁にディスカッションに応じて下さり、時には強く背中を押していただいて本研究の完成に導いて下さいました林久允助教

一つ上の先輩として、いつも快くディスカッションに応じて下さり、研究の進め方や実験の仕方など、細かいところまで教えて下さいました水野忠快特任助教

博士課程における研究遂行、また研究生生活をサポートしていただきました日本学術振興会に深く感謝いたします。

研究室での研究生生活を、日々楽しく、かけがいの無いものにしてくれた研究室の先輩方、同期、後輩の皆様に深く感謝いたします。

最後に、これまでの長い学生生活を暖かく見守り、支えて下さった家族と友

人に深く感謝いたします。

参考文献

1. Maxfield, F. R., and Tabas, I. (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612-621
2. Chang, T. Y., Chang, C. C., Ohgami, N., and Yamauchi, Y. (2006) Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 129-157
3. Rader, D. J., Cohen, J., and Hobbs, H. H. (2003) Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest* 111, 1795-1803
4. Ikonen, E. (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 125-138
5. Cockerill, G. W., Rye, K. A., Gamble, J. R., Vadas, M. A., and Barter, P. J. (1995) High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1987-1994
6. Yuhanna, I. S., Zhu, Y., Cox, B. E., Hahner, L. D., Osborne-Lawrence, S., Lu, P., Marcel, Y. L., Anderson, R. G., Mendelsohn, M. E., Hobbs, H. H., and Shaul, P. W. (2001) High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 7, 853-857
7. Assmann, G., and Schulte, H. (1987) The Prospective Cardiovascular Münster Study: prevalence and prognostic significance of hyperlipidemia in men with systemic hypertension. *Am J Cardiol* 59, 9G-17G
8. Assmann, G., and Schulte, H. (1992) Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Münster study. *Am J Cardiol* 70, 733-737
9. Ridgway, N. D. (2000) Interactions between metabolism and intracellular distribution of cholesterol and sphingomyelin. *Biochim Biophys Acta* 1484, 129-141
10. Rawson, R. B., Zelenski, N. G., Nijhawan, D., Ye, J., Sakai, J., Hasan, M. T., Chang, T. Y., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1997) Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs. *Mol Cell* 1, 47-57

11. Yang, T., Espenshade, P. J., Wright, M. E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2002) Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110, 489-500
12. Radhakrishnan, A., Goldstein, J. L., McDonald, J. G., and Brown, M. S. (2008) Switch-like control of SREBP-2 transport triggered by small changes in ER cholesterol: a delicate balance. *Cell Metab* 8, 512-521
13. Carstea, E. D., Morris, J. A., Coleman, K. G., Loftus, S. K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M. A., Pavan, W. J., Krizman, D. B., Nagle, J., Polymeropoulos, M. H., Sturley, S. L., Ioannou, Y. A., Higgins, M. E., Comly, M., Cooney, A., Brown, A., Kaneski, C. R., Blanchette-Mackie, E. J., Dwyer, N. K., Neufeld, E. B., Chang, T. Y., Liscum, L., Strauss, J. F., Ohno, K., Zeigler, M., Carmi, R., Sokol, J., Markie, D., O'Neill, R. R., van Diggelen, O. P., Elleder, M., Patterson, M. C., Brady, R. O., Vanier, M. T., Pentchev, P. G., and Tagle, D. A. (1997) Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277, 228-231
14. Altmann, S. W., Davis, H. R., Zhu, L. J., Yao, X., Hoos, L. M., Tetzloff, G., Iyer, S. P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., and Graziano, M. P. (2004) Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303, 1201-1204
15. Wang, D. Q. (2007) Regulation of intestinal cholesterol absorption. *Annu Rev Physiol* 69, 221-248
16. Tall, A. R. (2003) Role of ABCA1 in cellular cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 710-711
17. Timmins, J. M., Lee, J. Y., Boudyguina, E., Kluckman, K. D., Brunham, L. R., Mulya, A., Gebre, A. K., Coutinho, J. M., Colvin, P. L., Smith, T. L., Hayden, M. R., Maeda, N., and Parks, J. S. (2005) Targeted inactivation of hepatic Abca1 causes profound hypoalphalipoproteinemia and kidney hypercatabolism of apoA-I. *J Clin Invest* 115, 1333-1342
18. Brunham, L. R., Kruit, J. K., Iqbal, J., Fievet, C., Timmins, J. M., Pape, T. D., Coburn, B. A., Bissada, N., Staels, B., Groen, A. K., Hussain, M. M., Parks, J. S., Kuipers, F., and Hayden, M. R. (2006) Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest* 116, 1052-1062
19. Koseki, M., Hirano, K., Masuda, D., Ikegami, C., Tanaka, M., Ota, A., Sandoval, J. C., Nakagawa-Toyama, Y., Sato, S. B., Kobayashi, T., Shimada, Y., Ohno-Iwashita, Y., Matsuura, F., Shimomura, I., and Yamashita, S.

- (2007) Increased lipid rafts and accelerated lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha secretion in Abca1-deficient macrophages. *J Lipid Res* 48, 299-306
20. Wang, X., Collins, H. L., Ranalletta, M., Fuki, I. V., Billheimer, J. T., Rothblat, G. H., Tall, A. R., and Rader, D. J. (2007) Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 117, 2216-2224
 21. Bodzioch, M., Orsó, E., Klucken, J., Langmann, T., Böttcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Büchler, C., Porsch-Ozcürümez, M., Kaminski, W. E., Hahmann, H. W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K. J., and Schmitz, G. (1999) The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet* 22, 347-351
 22. Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S. M., Zhang, L. H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J. A., Molhuizen, H. O., Loubser, O., Ouelette, B. F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K. J., Sensen, C. W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J. J., Genest, J., and Hayden, M. R. (1999) Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet* 22, 336-345
 23. Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J. C., Deleuze, J. F., Brewer, H. B., Duverger, N., Denèfle, P., and Assmann, G. (1999) Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet* 22, 352-355
 24. Klucken, J., Büchler, C., Orsó, E., Kaminski, W. E., Porsch-Ozcürümez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., Allikmets, R., and Schmitz, G. (2000) ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 817-822
 25. de La Llera-Moya, M., Connelly, M. A., Drazul, D., Klein, S. M., Favari, E., Yancey, P. G., Williams, D. L., and Rothblat, G. H. (2001) Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *J Lipid Res* 42, 1969-1978
 26. Silver, D. L., Wang, N., Xiao, X., and Tall, A. R. (2001) High density lipoprotein (HDL) particle uptake mediated by scavenger receptor class B type 1 results in selective sorting of HDL cholesterol from protein and polarized cholesterol secretion. *J Biol Chem* 276, 25287-25293

27. Trauner, M., and Boyer, J. L. (2003) Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev* 83, 633-671
28. Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., Hull, M. V., Lustig, K. D., Mangelsdorf, D. J., and Shan, B. (1999) Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* 284, 1362-1365
29. Trauner, M., Fickert, P., Halilbasic, E., and Moustafa, T. (2008) Lessons from the toxic bile concept for the pathogenesis and treatment of cholestatic liver diseases. *Wien Med Wochenschr* 158, 542-548
30. Hofmann, A. F. (1995) Bile acids as drugs: principles, mechanisms of action and formulations. *Ital J Gastroenterol* 27, 106-113
31. Hofmann, A. F. (1999) The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 159, 2647-2658
32. Abe, T., Kakyo, M., Tokui, T., Nakagomi, R., Nishio, T., Nakai, D., Nomura, H., Unno, M., Suzuki, M., Naitoh, T., Matsuno, S., and Yawo, H. (1999) Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem* 274, 17159-17163
33. Stieger, B., Fattinger, K., Madon, J., Kullak-Ublick, G. A., and Meier, P. J. (2000) Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 118, 422-430
34. Gerloff, T., Stieger, B., Hagenbuch, B., Madon, J., Landmann, L., Roth, J., Hofmann, A. F., and Meier, P. J. (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273, 10046-10050
35. Keitel, V., Nies, A. T., Brom, M., Hummel-Eisenbeiss, J., Spring, H., and Keppler, D. (2003) A common Dubin-Johnson syndrome mutation impairs protein maturation and transport activity of MRP2 (ABCC2). *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284, G165-174
36. Craddock, A. L., Love, M. W., Daniel, R. W., Kirby, L. C., Walters, H. C., Wong, M. H., and Dawson, P. A. (1998) Expression and transport properties of the human ileal and renal sodium-dependent bile acid transporter. *Am J Physiol* 274, G157-169
37. Dawson, P. A., Hubbert, M., Haywood, J., Craddock, A. L., Zerangue, N., Christian, W. V., and Ballatori, N. (2005) The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem* 280, 6960-6968

38. Oude Elferink, R. P., Paulusma, C. C., and Groen, A. K. (2006) Hepatocanicular transport defects: pathophysiologic mechanisms of rare diseases. *Gastroenterology* 130, 908-925
39. Suchy, F. J., and Ananthanarayanan, M. (2006) Bile salt excretory pump: biology and pathobiology. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43 Suppl 1, S10-16
40. Jacquemin, E., De Vree, J. M., Cresteil, D., Sokal, E. M., Sturm, E., Dumont, M., Scheffer, G. L., Paul, M., Burdelski, M., Bosma, P. J., Bernard, O., Hadchouel, M., and Elferink, R. P. (2001) The wide spectrum of multidrug resistance 3 deficiency: from neonatal cholestasis to cirrhosis of adulthood. *Gastroenterology* 120, 1448-1458
41. Jansen, P. L., and Sturm, E. (2003) Genetic cholestasis, causes and consequences for hepatobiliary transport. *Liver Int* 23, 315-322
42. Trauner, M., Fickert, P., and Wagner, M. (2007) MDR3 (ABCB4) defects: a paradigm for the genetics of adult cholestatic syndromes. *Semin Liver Dis* 27, 77-98
43. Bull, L. N., van Eijk, M. J., Pawlikowska, L., DeYoung, J. A., Juijn, J. A., Liao, M., Klomp, L. W., Lomri, N., Berger, R., Scharschmidt, B. F., Knisely, A. S., Houwen, R. H., and Freimer, N. B. (1998) A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet* 18, 219-224
44. Klomp, L. W., Vargas, J. C., van Mil, S. W., Pawlikowska, L., Strautnieks, S. S., van Eijk, M. J., Juijn, J. A., Pabón-Peña, C., Smith, L. B., DeYoung, J. A., Byrne, J. A., Gombert, J., van der Brugge, G., Berger, R., Jankowska, I., Pawlowska, J., Villa, E., Knisely, A. S., Thompson, R. J., Freimer, N. B., Houwen, R. H., and Bull, L. N. (2004) Characterization of mutations in ATP8B1 associated with hereditary cholestasis. *Hepatology* 40, 27-38
45. Harris, M. J., Kagawa, T., Dawson, P. A., and Arias, I. M. (2004) Taurocholate transport by hepatic and intestinal bile acid transporters is independent of FIC1 overexpression in Madin-Darby canine kidney cells. *J Gastroenterol Hepatol* 19, 819-825
46. Daleke, D. L. (2003) Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res* 44, 233-242
47. Paulusma, C. C., Groen, A., Kunne, C., Ho-Mok, K. S., Spijkerboer, A. L., Rudi de Waart, D., Hoek, F. J., Vreeling, H., Hoeben, K. A., van Marle, J., Pawlikowska, L., Bull, L. N., Hofmann, A. F., Knisely, A. S., and Oude Elferink, R. P. (2006) Atp8b1 deficiency in mice reduces resistance of the

- canalicular membrane to hydrophobic bile salts and impairs bile salt transport. *Hepatology* 44, 195-204
48. Paulusma, C. C., de Waart, D. R., Kunne, C., Mok, K. S., and Elferink, R. P. (2009) Activity of the bile salt export pump (ABCB11) is critically dependent on canalicular membrane cholesterol content. *J Biol Chem* 284, 9947-9954
 49. Folmer, D. E., Elferink, R. P., and Paulusma, C. C. (2009) P4 ATPases - lipid flippases and their role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1791, 628-635
 50. Frankenberg, T., Miloh, T., Chen, F. Y., Ananthanarayanan, M., Sun, A. Q., Balasubramanian, N., Arias, I., Setchell, K. D., Suchy, F. J., and Shneider, B. L. (2008) The membrane protein ATPase class I type 8B member 1 signals through protein kinase C zeta to activate the farnesoid X receptor. *Hepatology* 48, 1896-1905
 51. Cai, S. Y., Gautam, S., Nguyen, T., Soroka, C. J., Rahner, C., and Boyer, J. L. (2009) ATP8B1 deficiency disrupts the bile canalicular membrane bilayer structure in hepatocytes, but FXR expression and activity are maintained. *Gastroenterology* 136, 1060-1069
 52. Groen, A., Kunne, C., Paulusma, C. C., Kramer, W., Agellon, L. B., Bull, L. N., and Oude Elferink, R. P. (2007) Intestinal bile salt absorption in *Atp8b1* deficient mice. *J Hepatol* 47, 114-122
 53. Deng, B. C., Lv, S., Cui, W., Zhao, R., Lu, X., Wu, J., and Liu, P. (2012) Novel ATP8B1 mutation in an adult male with progressive familial intrahepatic cholestasis. *World J Gastroenterol* 18, 6504-6509
 54. Pawlikowska, L., Strautnieks, S., Jankowska, I., Czubkowski, P., Emerick, K., Antoniou, A., Wanty, C., Fischler, B., Jacquemin, E., Wali, S., Blanchard, S., Nielsen, I. M., Bourke, B., McQuaid, S., Lacaille, F., Byrne, J. A., van Eerde, A. M., Kolho, K. L., Klomp, L., Houwen, R., Bacchetti, P., Lobritto, S., Hupertz, V., McClean, P., Mieli-Vergani, G., Shneider, B., Nemeth, A., Sokal, E., Freimer, N. B., Knisely, A. S., Rosenthal, P., Whittington, P. F., Pawlowska, J., Thompson, R. J., and Bull, L. N. (2010) Differences in presentation and progression between severe FIC1 and BSEP deficiencies. *J Hepatol* 53, 170-178
 55. Stapelbroek, J. M., Peters, T. A., van Beurden, D. H., Curfs, J. H., Joosten, A., Beynon, A. J., van Leeuwen, B. M., van der Velden, L. M., Bull, L., Oude Elferink, R. P., van Zanten, B. A., Klomp, L. W., and Houwen, R. H. (2009) ATP8B1 is essential for maintaining normal hearing. *Proc Natl Acad Sci U S*

A 106, 9709-9714

56. Davit-Spraul, A., Gonzales, E., Baussan, C., and Jacquemin, E. (2009) Progressive familial intrahepatic cholestasis. *Orphanet J Rare Dis* 4, 1
57. Carlton, V. E., Harris, B. Z., Puffenberger, E. G., Batta, A. K., Knisely, A. S., Robinson, D. L., Strauss, K. A., Shneider, B. L., Lim, W. A., Salen, G., Morton, D. H., and Bull, L. N. (2003) Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nat Genet* 34, 91-96
58. van der Velden, L. M., van de Graaf, S. F., and Klomp, L. W. (2010) Biochemical and cellular functions of P4 ATPases. *Biochem J* 431, 1-11
59. Tanaka, K., Fujimura-Kamada, K., and Yamamoto, T. (2011) Functions of phospholipid flippases. *J Biochem* 149, 131-143
60. Chen, B., Jiang, Y., Zeng, S., Yan, J., Li, X., Zhang, Y., Zou, W., and Wang, X. (2010) Endocytic sorting and recycling require membrane phosphatidylserine asymmetry maintained by TAT-1/CHAT-1. *PLoS Genet* 6, e1001235
61. van der Mark, V. A., de Waart, D. R., Ho-Mok, K. S., Tabbers, M. M., Voogt, H. W., Oude Elferink, R. P., Knisely, A. S., and Paulusma, C. C. (2014) The lipid flippase heterodimer ATP8B1-CDC50A is essential for surface expression of the apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2/ASBT) in intestinal Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta* 1842, 2378-2386
62. Verhulst, P. M., van der Velden, L. M., Oorschot, V., van Faassen, E. E., Klumperman, J., Houwen, R. H., Pomorski, T. G., Holthuis, J. C., and Klomp, L. W. (2010) A flippase-independent function of ATP8B1, the protein affected in familial intrahepatic cholestasis type 1, is required for apical protein expression and microvillus formation in polarized epithelial cells. *Hepatology* 51, 2049-2060
63. Kato, U., Inadome, H., Yamamoto, M., Emoto, K., Kobayashi, T., and Umeda, M. (2013) Role for phospholipid flippase complex of ATP8A1 and CDC50A proteins in cell migration. *J Biol Chem* 288, 4922-4934
64. Yabas, M., Coupland, L. A., Cromer, D., Winterberg, M., Teoh, N. C., D'Rozario, J., Kirk, K., Bröer, S., Parish, C. R., and Enders, A. (2014) Mice deficient in the putative phospholipid flippase ATP11C exhibit altered erythrocyte shape, anemia, and reduced erythrocyte life span. *J Biol Chem* 289, 19531-19537

65. Siggs, O. M., Arnold, C. N., Huber, C., Pirie, E., Xia, Y., Lin, P., Nemazee, D., and Beutler, B. (2011) The P4-type ATPase ATP11C is essential for B lymphopoiesis in adult bone marrow. *Nat Immunol* 12, 434-440
66. Yabas, M., Teh, C. E., Frankenreiter, S., Lal, D., Roots, C. M., Whittle, B., Andrews, D. T., Zhang, Y., Teoh, N. C., Sprent, J., Tze, L. E., Kucharska, E. M., Kofler, J., Farrell, G. C., Bröer, S., Goodnow, C. C., and Enders, A. (2011) ATP11C is critical for the internalization of phosphatidylserine and differentiation of B lymphocytes. *Nat Immunol* 12, 441-449
67. Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T. R., Matsuda, F., and Nagata, S. (2014) Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science* 344, 1164-1168
68. Gordon, S., and Taylor, P. R. (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964
69. Gordon, S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35
70. Murray, P. J., and Wynn, T. A. (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11, 723-737
71. Ortega-Gómez, A., Perretti, M., and Soehnlein, O. (2013) Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med* 5, 661-674
72. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686
73. Montaner, L. J., da Silva, R. P., Sun, J., Sutterwala, S., Hollinshead, M., Vaux, D., and Gordon, S. (1999) Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 162, 4606-4613
74. Xu, W., Roos, A., Schlagwein, N., Woltman, A. M., Daha, M. R., and van Kooten, C. (2006) IL-10-producing macrophages preferentially clear early apoptotic cells. *Blood* 107, 4930-4937
75. A-Gonzalez, N., Bensinger, S. J., Hong, C., Beceiro, S., Bradley, M. N., Zelcer, N., Deniz, J., Ramirez, C., Díaz, M., Gallardo, G., de Galarreta, C. R., Salazar, J., Lopez, F., Edwards, P., Parks, J., Andujar, M., Tontonoz, P., and Castrillo, A. (2009) Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. *Immunity* 31, 245-258
76. Mukundan, L., Odegaard, J. I., Morel, C. R., Heredia, J. E., Mwangi, J. W.,

- Ricardo-Gonzalez, R. R., Goh, Y. P., Eagle, A. R., Dunn, S. E., Awakuni, J. U., Nguyen, K. D., Steinman, L., Michie, S. A., and Chawla, A. (2009) PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nat Med* 15, 1266-1272
77. Martinez, F. O., Helming, L., and Gordon, S. (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27, 451-483
78. Graff, J. W., Dickson, A. M., Clay, G., McCaffrey, A. P., and Wilson, M. E. (2012) Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes. *J Biol Chem* 287, 21816-21825
79. Das, A., Ganesh, K., Khanna, S., Sen, C. K., and Roy, S. (2014) Engulfment of apoptotic cells by macrophages: a role of microRNA-21 in the resolution of wound inflammation. *J Immunol* 192, 1120-1129
80. Ivashkiy, L. B. (2013) Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends Immunol* 34, 216-223
81. Hayashi, H., and Sugiyama, Y. (2007) 4-phenylbutyrate enhances the cell surface expression and the transport capacity of wild-type and mutated bile salt export pumps. *Hepatology* 45, 1506-1516
82. Nagasaka, H., Yorifuji, T., Kobayashi, K., Takikawa, H., Komatsu, H., Inui, A., Fujisawa, T., Miida, T., Tsukahara, H., Takatani, T., and Hayashi, H. (2010) Favorable effect of 4-phenylacetate on liver functions attributable to enhanced bile salt export pump expression in ornithine transcarbamylase-deficient children. *Mol Genet Metab* 100, 123-128
83. Naoi, S., Hayashi, H., Inoue, T., Tanikawa, K., Igarashi, K., Nagasaka, H., Kage, M., Takikawa, H., Sugiyama, Y., Inui, A., Nagai, T., and Kusuhara, H. (2014) Improved liver function and relieved pruritus after 4-phenylbutyrate therapy in a patient with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *J Pediatr* 164, 1219-1227.e1213
84. Hasegawa, Y., Hayashi, H., Naoi, S., Kondou, H., Bessho, K., Igarashi, K., Hanada, K., Nakao, K., Kimura, T., Konishi, A., Nagasaka, H., Miyoshi, Y., Ozono, K., and Kusuhara, H. (2014) Intractable itch relieved by 4-phenylbutyrate therapy in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 1. *Orphanet J Rare Dis* 9, 89
85. Hori, T., Egawa, H., Miyagawa-Hayashino, A., Yorifuji, T., Yonekawa, Y., Nguyen, J. H., and Uemoto, S. (2011) Living-donor liver transplantation for progressive familial intrahepatic cholestasis. *World J Surg* 35, 393-402

86. Hori, T., Egawa, H., Takada, Y., Ueda, M., Oike, F., Ogura, Y., Sakamoto, S., Kasahara, M., Ogawa, K., Miyagawa-Hayashino, A., Yonekawa, Y., Yorifuji, T., Watanabe, K., Doi, H., Nguyen, J. H., Chen, F., Baine, A. M., Gardner, L. B., and Uemoto, S. (2011) Progressive familial intrahepatic cholestasis: a single-center experience of living-donor liver transplantation during two decades in Japan. *Clin Transplant* 25, 776-785
87. Lykavieris, P., van Mil, S., Cresteil, D., Fabre, M., Hadchouel, M., Klomp, L., Bernard, O., and Jacquemin, E. (2003) Progressive familial intrahepatic cholestasis type 1 and extrahepatic features: no catch-up of stature growth, exacerbation of diarrhea, and appearance of liver steatosis after liver transplantation. *J Hepatol* 39, 447-452
88. Davit-Spraul, A., Fabre, M., Branchereau, S., Baussan, C., Gonzales, E., Stieger, B., Bernard, O., and Jacquemin, E. (2010) ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history. *Hepatology* 51, 1645-1655
89. Jansen, P. L., Strautnieks, S. S., Jacquemin, E., Hadchouel, M., Sokal, E. M., Hooiveld, G. J., Koning, J. H., De Jager-Krikken, A., Kuipers, F., Stellaard, F., Bijleveld, C. M., Gouw, A., Van Goor, H., Thompson, R. J., and Müller, M. (1999) Hepatocanalicular bile salt export pump deficiency in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 117, 1370-1379
90. Paulusma, C. C., Folmer, D. E., Ho-Mok, K. S., de Waart, D. R., Hilarius, P. M., Verhoeven, A. J., and Oude Elferink, R. P. (2008) ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity. *Hepatology* 47, 268-278
91. Ujhazy, P., Ortiz, D., Misra, S., Li, S., Moseley, J., Jones, H., and Arias, I. M. (2001) Familial intrahepatic cholestasis 1: studies of localization and function. *Hepatology* 34, 768-775
92. Takatsu, H., Tanaka, G., Segawa, K., Suzuki, J., Nagata, S., Nakayama, K., and Shin, H. W. (2014) Phospholipid Flippase Activities and Substrate Specificities of Human Type IV P-type ATPases Localized to the Plasma Membrane. *J Biol Chem* 289, 33543-33556
93. Coleman, J. A., Kwok, M. C., and Molday, R. S. (2009) Localization, purification, and functional reconstitution of the P4-ATPase Atp8a2, a phosphatidylserine flippase in photoreceptor disc membranes. *J Biol Chem*

284, 32670-32679

94. Coleman, J. A., Zhu, X., Djajadi, H. R., Molday, L. L., Smith, R. S., Libby, R. T., John, S. W., and Molday, R. S. (2014) Phospholipid flippase ATP8A2 is required for normal visual and auditory function and photoreceptor and spiral ganglion cell survival. *J Cell Sci* 127, 1138-1149
95. Gong, E. Y., Park, E., Lee, H. J., and Lee, K. (2009) Expression of Atp8b3 in murine testis and its characterization as a testis specific P-type ATPase. *Reproduction* 137, 345-351
96. Nagasaka, H., Yorifuji, T., Egawa, H., Yanai, H., Fujisawa, T., Kosugiyama, K., Matsui, A., Hasegawa, M., Okada, T., Takayanagi, M., Chiba, H., and Kobayashi, K. (2005) Evaluation of risk for atherosclerosis in Alagille syndrome and progressive familial intrahepatic cholestasis: two congenital cholestatic diseases with different lipoprotein metabolisms. *J Pediatr* 146, 329-335
97. Allen, R. M., Marquart, T. J., Albert, C. J., Suchy, F. J., Wang, D. Q., Ananthanarayanan, M., Ford, D. A., and Baldán, A. (2012) miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin- and diet-induced hepatotoxicity. *EMBO Mol Med* 4, 882-895
98. McLaren, J. E., Michael, D. R., Ashlin, T. G., and Ramji, D. P. (2011) Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Prog Lipid Res* 50, 331-347
99. Eligini, S., Crisci, M., Bono, E., Songia, P., Tremoli, E., Colombo, G. I., and Colli, S. (2013) Human monocyte-derived macrophages spontaneously differentiated in vitro show distinct phenotypes. *J Cell Physiol* 228, 1464-1472
100. Rey-Giraud, F., Hafner, M., and Ries, C. H. (2012) In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One* 7, e42656
101. Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M., and Cohen, P. L. (2012) Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. *J Immunol* 189, 3508-3520
102. Herms, A., Bosch, M., Ariotti, N., Reddy, B. J., Fajardo, A., Fernández-Vidal, A., Alvarez-Guaita, A., Fernández-Rojo, M. A., Rentero, C., Tebar, F., Enrich, C., Geli, M. I., Parton, R. G., Gross, S. P., and Pol, A. (2013) Cell-to-cell heterogeneity in lipid droplets suggests a mechanism to reduce lipotoxicity. *Curr Biol* 23, 1489-1496

103. van Mil, S. W., van Oort, M. M., van den Berg, I. E., Berger, R., Houwen, R. H., and Klomp, L. W. (2004) Fic1 is expressed at apical membranes of different epithelial cells in the digestive tract and is induced in the small intestine during postnatal development of mice. *Pediatr Res* 56, 981-987
104. Halleck, M. S., Lawler JF, J. R., Blackshaw, S., Gao, L., Nagarajan, P., Hacker, C., Pyle, S., Newman, J. T., Nakanishi, Y., Ando, H., Weinstock, D., Williamson, P., and Schlegel, R. A. (1999) Differential expression of putative transbilayer amphipath transporters. *Physiol Genomics* 1, 139-150
105. Ray, N. B., Durairaj, L., Chen, B. B., McVerry, B. J., Ryan, A. J., Donahoe, M., Waltenbaugh, A. K., O'Donnell, C. P., Henderson, F. C., Etscheidt, C. A., McCoy, D. M., Agassandian, M., Hayes-Rowan, E. C., Coon, T. A., Butler, P. L., Gakhar, L., Mathur, S. N., Sieren, J. C., Tyurina, Y. Y., Kagan, V. E., McLennan, G., and Mallampalli, R. K. (2010) Dynamic regulation of cardiolipin by the lipid pump Atp8b1 determines the severity of lung injury in experimental pneumonia. *Nat Med* 16, 1120-1127
106. Pawlikowska, L., Groen, A., Eppens, E. F., Kunne, C., Ottenhoff, R., Looije, N., Knisely, A. S., Killeen, N. P., Bull, L. N., Elferink, R. P., and Freimer, N. B. (2004) A mouse genetic model for familial cholestasis caused by ATP8B1 mutations reveals perturbed bile salt homeostasis but no impairment in bile secretion. *Hum Mol Genet* 13, 881-892
107. Kok, T., Hulzebos, C. V., Wolters, H., Havinga, R., Agellon, L. B., Stellaard, F., Shan, B., Schwarz, M., and Kuipers, F. (2003) Enterohepatic circulation of bile salts in farnesoid X receptor-deficient mice: efficient intestinal bile salt absorption in the absence of ileal bile acid-binding protein. *J Biol Chem* 278, 41930-41937
108. Rayner, K. J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M. L., Tamehiro, N., Fisher, E. A., Moore, K. J., and Fernández-Hernando, C. (2010) MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science* 328, 1570-1573
109. Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I., and Marcel, Y. L. (2011) Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab* 13, 655-667
110. Schmitz, G., Fischer, H., Beuck, M., Hoecker, K. P., and Robenek, H. (1990) Dysregulation of lipid metabolism in Tangier monocyte-derived macrophages. *Arteriosclerosis* 10, 1010-1019
111. Han, X., Kitamoto, S., Lian, Q., and Boisvert, W. A. (2009) Interleukin-10

**facilitates both cholesterol uptake and efflux in macrophages. *J Biol Chem*
284, 32950-32958**