

論文の内容の要旨

Analysis of the functional associations between Niemann-Pick C2 and cholesterol transporters in the biliary secretion of cholesterol

(コレステロールの胆汁排泄における
Niemann-Pick C2 とコレステロール輸送担体群との機能連関の解析)

山梨 義英

【背景・目的】

生体内におけるコレステロールの恒常性維持は主に、肝臓での生合成、胆汁酸への異化、胆汁排泄、消化管吸収のバランスによって担われている。胆汁排泄は生体内からコレステロールを排出する主要経路であり、その促進は血中コレステロール値低下の一要因となることから、高脂血症の発症・治療という点からも重要と考えられる。胆汁中のコレステロール量は、肝臓の毛細胆管膜に発現するコレステロール輸送担体群の発現・活性のバランスで制御されており、肝細胞から胆汁中へのコレステロール排出には ATP-binding cassette G5・G8 のヘテロダイマー(ABCG5/G8)が、胆汁中から肝細胞へのコレステロール再吸収には Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) が重要な役割を果たしている。コレステロールは脂溶性が極めて高く、胆汁中ではほとんどがミセル中に存在する。そのため、その細胞膜輸送活性には輸送担体の発現だけではなく、輸送担体からミセルへのコレステロールの引き抜き、または受け渡しに関わることで活性を制御する可能性のある胆汁中液性因子が注目されており、これまでに胆汁酸やリン脂質などの胆汁脂質について解析が進んでいる。しかし、肝臓から分泌される胆汁蛋白質が上記輸送担体群の活性ならびにコレステロールの胆汁排泄に与える影響は明らかとなっていない。

本研究では、そのような活性制御因子の候補として Niemann-Pick C2 (NPC2) に注目した。NPC2 は強いコレステロール結合能を有しており、NPC1L1 の類縁分子である Niemann-Pick C1 (NPC1) と協調して、リソソームから他のオルガネラや細胞膜への細胞内におけるコレステロール輸送に関与すること

が知られるが、一方で NPC2 は肝臓から胆汁中にも分泌されており、その胆汁中における機能は全く不明であった。そこで私は、NPC1L1 と NPC1 の類似性に着目して、NPC1L1 と NPC2 との分子間共役について検討を行うとともに(第一章)、分泌型 NPC2 が NPC1L1 と ABCG5/G8 の活性ならびにコレステロールの胆汁排泄に及ぼす影響を検討することにより(第二章)、その生理機能の解明を試みた。

【方法・結果】

第一章 NPC1L1 と NPC2 の分子間共役

(1) NPC1L1 は NPC2 の発現量・分泌量を負に制御する

NPC1L1 と NPC2 の分子間共役を検証するために、CHO-K1 細胞にアデノウィルスを用いて両遺伝子を一過性導入し、免疫沈降実験を行った。その結果、両蛋白質の共沈が確認され分子間会合が示唆された。次にこの分子間相互作用の役割を検討するために、両蛋白質を内因性に発現する HepG2 細胞に NPC1L1 を標的とした siRNA を一過性導入したところ、NPC1L1 の発現量低下とともに NPC2 の蛋白質発現量・分泌量の上昇が観察された(Fig. 1)。この上昇は、NPC2 の mRNA 量の変動を伴っていないことから、NPC1L1 が NPC2 の発現量ならびに分泌量を翻訳以降の段階で負に制御していることが示唆された。

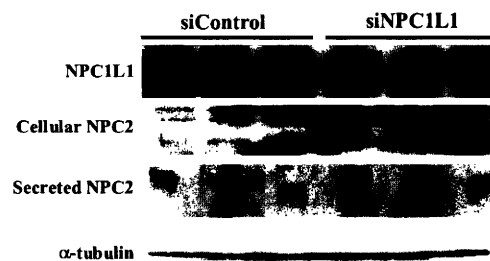


Fig. 1 NPC1L1によるNPC2の発現・分泌抑制

(2) ヒト肝臓において NPC1L1 と NPC2 の蛋白質発現量は負に相関する

NPC1L1 ならびに NPC2 はヒトにおいて肝臓に発現していることが報告されている。そこで、ヒト肝臓検体における各蛋白質の発現量を解析したところ、mRNA レベルでは相関関係は見出されなかったが、蛋白質レベルで有意な負の相関関係が認められた。この結果は、*in vitro* で見出された NPC1L1 による NPC2 の蛋白質発現制御機構により説明可能であると考えられた。

第二章 胆汁中 NPC2 の生理機能

(1) NPC2 は ABCG5/G8 によるコレステロール排出を促進する

分泌型 NPC2 がコレステロール輸送担体である NPC1L1 および ABCG5/G8 の活性に及ぼす影響を調べるために、NPC1L1 または ABCG5/G8 を培養細胞に高発現させた *in vitro* 機能評価系を用いて検討を行った。なお、各評価系におけるコレステロールの可溶化には、生理的条件を考慮して胆汁酸ミセルを使用した。その結果、精製した NPC2 蛋白質の

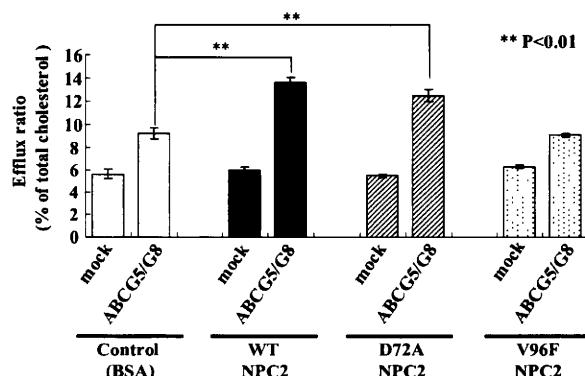


Fig. 2 NPC2によるABCG5/G8のコレステロール排出活性の亢進

添加は、NPC1L1 のコレステロール取り込み活性に影響を及ぼさなかった一方で、ABCG5/G8 のコレステロール排出活性を有意に上昇させた(Fig. 2)。これらの結果から、分泌型 NPC2 は ABCG5/G8 によるコレステロール排出の促進因子として機能しうることが示唆された。

次に、分泌型 NPC2 の機能の詳細を解析するために、細胞内コレステロール輸送活性が低いとされる 2 種の変異型 (D72A・V96F) NPC2 と野生型 NPC2 について、それぞれのコレステロール排出促進活性を上述の *in vitro* 機能評価系を用いて比較した。その結果、コレステロール結合能のある D72A NPC2 では野生型と同様にコレステロール排出の上昇が認められたものの、コレステロール結合能のない V96F NPC2 では活性が見出されなかった(Fig. 2)。以上の結果から、分泌型 NPC2 による ABCG5/G8 の活性亢進には NPC2 のコレステロール結合能が必要であることが示唆された。

(2) 胆汁中 NPC2 はコレステロールの胆汁排泄を促進する

生体内において胆汁中 NPC2 がコレステロールの胆汁排泄にどのような影響をもたらすかを調べるために、野生型 NPC2 を発現するアデノウイルスをマウスに感染させ、胆汁中コレステロール濃度を解析した。その結果、胆汁中 NPC2 の分泌量増加に伴い胆汁中コレステロール濃度の有意な上昇が認められた(Fig. 3)。また、上述の 2 種の変異型 NPC2 に関して同様の検討を行ったところ、*in vitro* における活性と一致して、D72A NPC2 においては胆汁中コレステロール濃度の上昇が観察された一方で、V96F NPC2 については変動が見出されなかった(Fig. 3)。細胞内コレステロール輸送活性の低い D72A 変異体でも野生型と同程度の胆汁中コレステロール濃度の上昇が観察されたことから(Fig. 3)、胆汁中 NPC2 は細胞内コレステロール輸送活性とは無関係に、コレステロール排出促進因子として生体内で機能しうることが示唆された。

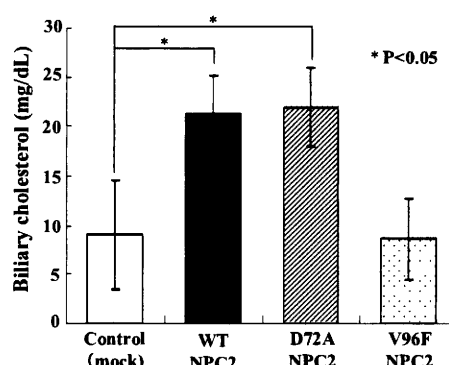


Fig. 3 マウス胆汁におけるNPC2分泌量増加によるコレステロール濃度の変化

(3) ヒト胆汁中において NPC2 発現量とコレステロール濃度は正の相関を示す

ヒト生体内における胆汁中 NPC2 分泌量と胆汁中コレステロール濃度の関係について、ヒト胆汁検体を用いて解析を行った。その結果、胆汁中コレステロール濃度は NPC2 分泌量と有意な正の相関を示すことが明らかとなり、ヒト生体内においても、上述の NPC1L1 による NPC2 の胆汁分泌抑制ならびに胆汁中 NPC2 の減少による ABCG5/G8 の活性低下といった相互連関がコレステロール胆汁排泄を制御している可能性が考えられた(Fig. 4)。

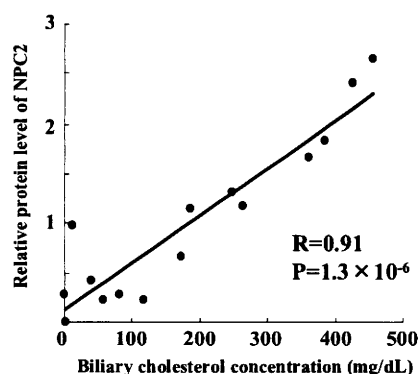


Fig. 4 ヒト胆汁中におけるNPC2分泌量とコレステロール濃度の相関関係

【まとめ・考察】

本研究により、NPC2 の発現量・分泌量が NPC1L1 により負に制御されるという新たな生理機構が見出された。また、細胞外に分泌された NPC2 は、NPC1L1 によるコレステロール取り込みには影響を及ぼさない一方で、ABCG5/G8 によるコレステロール排出を促進することが明らかとなり、細胞外においてコレステロールの胆汁排泄促進因子として機能することが示唆された。これらの結果から、肝臓に発現する NPC1L1 は胆汁中からのコレステロール再吸収に加えて、NPC2 の胆汁分泌を制御することで ABCG5/G8 の活性を間接的に抑制し、胆汁中コレステロール量の低下を担っている可能性が考えられた(Fig. 5)。

胆汁中コレステロール量の変化による胆汁脂質の組成変動は、胆石症や胆汁うっ滞などの肝胆道系疾患の発症に関わることが報告されており、今回見出された制御機構はこれら疾患の発症リスクの低減に役立っている可能性も考えられる。また、胆汁中コレステロール量の変動により血中のアポリポ蛋白質の組成が変動すること、NPC2 ならびに ABCG5/G8 がコレステロールに加えて植物性ステロールや幾つかの脂溶性物質に関して結合活性や排出活性を有していることから、上記制御機構はコレステロールを含む様々な脂溶性物質の全身動態を考える上でも重要な知見であると考えている。

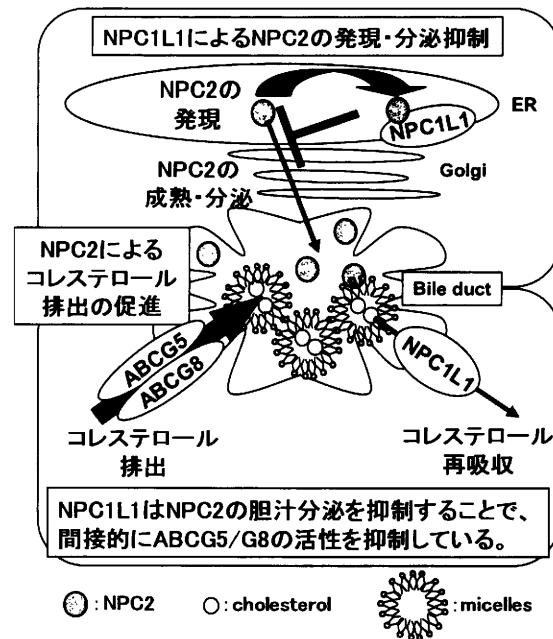


Fig. 5 NPC2分泌量制御による胆汁中コレステロール量の調節機構

【謝辞】

本研究における、ヒト肝臓組織ならびにヒト胆汁検体を用いた解析は、東京大学医学部倫理委員会ならびに筑波大学人間総合科学研究科倫理委員会の承認を得て行いました。検体を御提供頂きました、筑波大学人間総合科学研究科の正田純一先生に深謝いたします。