

[別紙2]

## 審査の結果の要旨

氏名 山梨 義英

コレステロールの胆汁排泄は、肝臓での生合成、胆汁酸等への異化、消化管吸収と並んで、コレステロールの恒常性維持を担う重要な要素の1つであるが、その分子メカニズムについては未解明な点が多い。胆汁中のコレステロール量は毛細胆管膜上に発現するコレステロール輸送担体群の発現、活性のバランスにより制御されており、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。また、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 - ミセル間でのコレステロール引き抜き・受渡しに関与する活性制御因子の存在が想定されている。本研究では、このような活性制御因子の候補として胆汁中液性因子の1つである Niemann-Pick C2 (NPC2) に注目している。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ているが、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。そこで本研究では、NPC1 と NPC1L1 の類似性に着目して、NPC1L1 と NPC2 との分子間共役について解析を行うとともに、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、これまで未知であった胆汁中 NPC2 の生理機能の解明を試みている。

第一章においては、ヒト NPC1L1 とヒト NPC2 の分子間相互作用について検証を行っている。両蛋白質の分子間会合を免疫沈降実験により確認するとともに、*in vitro* における解析から、ヒト NPC1L1 がヒト NPC2 の糖鎖付加・成熟過程を阻害することで、ヒト NPC2 の蛋白質発現量ならびに分泌量を負に制御することを見出している。ヒト肝臓検体においても、両蛋白質の発現量に負の相関関係が認められており、この相関関係は NPC1L1 による NPC2 の蛋白質発現制御機構により説明できると考えられる。また、ヒト NPC2 ならびにヒト NPC1L1 を発現するアデノウィルスに感染させたマウスを用いて、ヒト NPC1L1 を肝臓に高発現させることで、ヒト NPC2 の胆汁分泌量が減少することを *in vivo* においても確認

している。以上の結果は、NPC2 の分泌制御という NPC1L1 の新たな生理機能を示唆するものである。

第二章においては、NPC1L1 により分泌量が制御される胆汁中 NPC2 の生理機能について検討を行っている。まず、分泌型 NPC2 が NPC1L1 ならびに ABCG5/G8 のコレステロール輸送活性に及ぼす影響について、当研究室で構築した *in vitro* 評価系を用いて解析を行っており、NPC2 が NPC1L1 機能には影響を与えないものの、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されている。また、NPC2 発現アデノウィルスで感染させたマウスにおいては胆汁中コレステロール濃度が有意に上昇しており、細胞内コレステロール輸送能を欠損した変異型 NPC2 もこの作用を有することから、胆汁中 NPC2 が細胞内コレステロール輸送とは独立した機能としてコレステロール排出促進作用を持つことが示されている。さらに、ヒト胆汁検体を用いた解析から、胆汁中 NPC2 分泌量と胆汁中コレステロール濃度に有意な正の相関が見出されており、このことは、ヒト生体内においても NPC2 がコレステロールの胆汁排出促進因子として機能していることを示唆する結果であった。

以上、申請者の研究は、NPC2 の発現量・分泌量制御という NPC1L1 の新たな生理機能ならびに、コレステロールの胆汁排泄促進作用というこれまで未解明であった胆汁中 NPC2 の生理機能を見出しており、生理学的意義が非常に大きいといえる。また、今回見出された NPC2 と各コレステロール輸送担体との機能連関はコレステロールの胆汁排泄制御機構の解明に大きく貢献するものであり、コレステロールの恒常性維持を考える上で重要な知見を与えるものと思われる。また、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いることから、本研究により得られた知見は、これら疾患の発症リスク・新規創薬標的を考える上でも有用であると思われる。従って、申請者の業績は博士（薬学）の授与にふさわしいものと判断した。