

論文の内容要旨

論文題目： 肝臓における Niemann-Pick C1 Like 1 Protein (NPC1L1)のリポ
蛋白・糖代謝における役割についての検討

指導教員 門脇 孝 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻（代謝・栄養病態学）

氏名 蔵野 信

要旨)

【背景】 近年、脂質異常症治療薬エゼチミブの標的蛋白として Niemann-pick C1 like 1 Protein (NPC1L1)が発見された。エゼチミブは LDL コレステロール低下効果のほか、中性脂肪低下効果、また、動物モデルからは、耐糖能改善効果がある可能性が考えられている。NPC1L1 は、ヒトでは、肝臓でも小腸と同程度の発現を認めるが、げっ歯類では肝臓ではほとんど発現が認められない。肝臓での NPC1L1 の働きは胆汁中からコレステロールを再吸収することと考え

られているが、再吸収されたコレステロールが脂質代謝・糖代謝に与える影響は不明である。肝細胞は毛細胆管側、類洞側と極性のある細胞であり、胆汁から吸収されたコレステロールと血中から吸収されたコレステロールが、肝細胞の代謝へ影響において、等価でない可能性がある。そこで私は肝臓での NPC1L1 の脂質・糖代謝に対する役割を明らかにするため、マウス肝臓にアデノウイルスベクターを用いて NPC1L1 を発現させ、脂質・糖代謝について解析した。

【方法および結果】 C57BL6 マウスに3週間エゼチミブあるいは vehicle を投与し、9 週齢にて NPC1L1(L1 群)あるいはコントロールアデノウイルス(Null 群)を感染させ、その5日後、解析を行った。アデノウイルスを用いて発現させた NPC1L1 は肝臓内にて毛細胆管に局在し、胆汁中のコレステロール濃度を減らすというヒト肝臓で想定されている作用を示した。次に、脂質代謝、糖代謝に関する解析を行ったところ、肝臓の NPC1L1 は、次の3つの主要な代謝系への影響があることが判明した。コレステロール代謝に関しては、L1 群では血中総コレステロールの上昇(Null 群 96 mg/dL vs L1 群 155 mg/dL, $P<0.01$)、血中 apoE の増加(1.7 倍, $P<0.01$)がみられ、特に FPLC 上、LDL と HDL の中間の大きさに、Null 群では認められないリポ蛋白が出現していた。このリポ蛋白はエゼチミブ投与群では約 50%抑制されていたことより、肝臓 NPC1L1 の

作用により出現したと考えられた。このリポ蛋白は、apoE, 遊離コレステロールに富み、apoE rich lipoprotein と考えられた。また、アガロースゲル電気泳動では、HDL と同様に β -mobility を示したことから HDL と似た性質を持つと考えられた。apoE rich lipoprotein の出現機序の検討では、ABCA1 蛋白量、apoE 産生量、LDL 受容体蛋白量といったリポ蛋白代謝関連蛋白質には変化が認められず、血中のコレステロールが増加しているのに関わらず、肝臓含有コレステロール量に変化が見られないことより、胆汁中から吸収されたコレステロールが肝細胞内でエステル化されて蓄積することなく、血中に apoE rich lipoprotein として放出されているのではないかと考えられた。中性脂肪代謝に関しては、L1 群では空腹時中性脂肪の有意な低下(Null 群 146 mg/dL vs L1 群 87mg/dL, $P<0.01$)がみられ、L1 群では、Tyloxapol を用いた VLDL 産生率を測定する実験においても、VLDL 産生率は有意に低下(-42%, $P<0.01$)していた。その機序として、L1 群では中性脂肪を apoB に付与する役割をしている Misosome TG Transfer Protein (MTP)mRNA が低下していた(-67%, $P<0.01$)ことが考えられた。糖代謝に関しては、L1 群にて空腹時血糖低下(Null 群 127 mg/dL vs L1 群 87 mg/dL, $P<0.01$)、またインスリン負荷テストにおいてインスリン感受性の上昇が観察された。その機序として、L1 群では、糖新生の重要酵素である Glucose 6-Phosphatase(G6Pase)mRNA が有意に低下(-59%,

P<0.01)していることが判明した。次に、MTP, G6Pase の発現量低下の機序を検討したところ、細胞内 FoxO1 蛋白量が抑制されていたことから、MTP, G6Pase 発現量低下は、FoxO1 蛋白量が抑制されていることによる、ということが考えられた。また、FoxO1 のリン酸化が増加していないことや、インスリンシグナルである Akt のリン酸化も増加していないことより、この FoxO1 蛋白量の低下は、インスリンに依存する既知の経路によるものではなく、未知の経路による可能性が考えられた。

また、これらの肝臓での NPC1L1 発現による胆汁中からのコレステロール吸収により引き起こされる代謝変化が、肝臓で合成されるコレステロールが増加することによっても引き起こされるか、ということについて次の 2 通りの実験にて検証した。アデノウイルスベクターにより肝臓にてラノステロールシンターゼを過剰発現させてコレステロール合成系を亢進させたマウスでは、apoE rich lipoprotein の出現、中性脂肪値の低下、FoxO1 蛋白量の低下、などといった NPC1L1 を過剰発現させた場合にみられた変化は認められなかった。

肝細胞系細胞株である HepG2 細胞を用いた in vitro の実験において、NPC1L1 によるミセル化したコレステロールの取り込みは FoxO1 蛋白量を抑制したが、pitavastatin によって内因性コレステロール合成を抑制した HepG2 細胞と pitavastatin にメバロン酸を投与して内因性コレステロール合成を抑制しない

HepG2 細胞を比較すると FoxO1 蛋白量には変化がみられなかった。 以上より、apoE rich lipoprotein の発現、FoxO1 の蛋白量低下は、NPC1L1 により胆汁中から吸収されたコレステロールによって生じる特異的な影響と考えられた。

【結論】 肝臓での NPC1L1 発現により、血中における apoE rich lipoprotein の出現、FoxO1 蛋白量抑制による MTP、G6Pase 発現低下による中性脂肪、空腹時血糖の低下をきたすことが判明した。また、これらの代謝変化は NPC1L1 を介した胆汁中から吸収されたコレステロールに特異的なものであるということが示唆された。