

肝臓におけるコレステロール制御分子の
HDL代謝/機能に及ぼす影響に関する検討

あら かわ じゅん こ
荒 川 純 子

(循環器病学専攻)

防衛医科大学校

令和2年度

目 次

第 1 章	緒言	1 頁
第 2 章	マウス肝臓における CYP27A1 の HDL 代謝および RCT に及ぼす影響についての検討	
	第 1 節 背景	4 頁
	第 2 節 材料と方法	6 頁
	第 3 節 結果	10 頁
	第 4 節 考察および小括	11 頁
第 3 章	マウス肝臓における NPC2 の HDL 代謝および RCT に及ぼす影響についての検討	
	第 1 節 背景	12 頁
	第 2 節 材料と方法	13 頁
	第 3 節 結果	18 頁
	第 4 節 考察および小括	23 頁
第 4 章	総括	27 頁
第 5 章	結論	28 頁
	謝辞	28 頁

単語・略語説明	29頁
引用文献	31頁
図表	36頁

第1章 緒言

動脈硬化性疾患、特に心血管疾患 (cardiovascular diseases, CVD) は先進国における死因の主たる原因であり、わが国においても生活様式の欧米化に伴い増加の一途をたどっている。数多くの疫学調査により血中低比重リポ蛋白コレステロール (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C) 濃度の高値と動脈硬化性疾患罹患率は正の相関を示すことが示され、HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (スタチン) による LDL-C 低下療法が心血管イベントを抑制することは多くの大規模臨床試験により証明されてきた (1)。最近では作用機序の異なる LDL-C 低下療法による心血管イベント低減効果が示され (2, 3)、LDL が動脈硬化性疾患治療の一義的な標的であることは疑いない事実である。しかしその一方で、スタチンによる心血管イベントの軽減は約 30% 程度にしか過ぎず、いまだ 70% のリスクが残存しており (4)、この残余リスクの解明とそれを標的とした創薬が喫緊の課題である。こうした背景から、残余リスク軽減の治療標的として高比重リポ蛋白 (high-density lipoprotein, HDL) が注目されており、多くの知見が集積しつつある。

血中のコレステロールはリポ蛋白粒子中に存在するが、リポ蛋白はそのサイズにより遠心法で分離され、HDL は比重が 1.063~1.210g/ml のリポ蛋白と定義される。直径は約 7-10 nm とリポ蛋白中で最も小さい粒子で、いくつかのアポリポ蛋白 (A-I、A-II、E など) と、コレステロール、リン脂質、トリグリセライド (TG) などの脂質成分から成る。国内外の疫学調査により、血中 HDL-C 濃度は CVD の負の危険因子であることが報告されている (5-10)。また近年、LDL-C を十分に低下させた患者においても、HDL-C 濃度に比例して CVD 発症がさらに低下することも報告された (11)。このように HDL は抗動脈硬化作用をもつり

ポ蛋白と考えられ、HDL 増加および機能促進を介した動脈硬化性疾患の新たな治療戦略の創出が注目されてきた。一方で、今日まで HDL-C を増加させることで CVD を抑制するという試みは成功していない。

LDL が末梢組織にコレステロールを供給する担体としての役割を有するのと対照的に、HDL は末梢組織に過剰に蓄積したコレステロールを搬出し肝臓へ運搬する役割を有する (図 1)。コレステロールは生体内では多くの段階を経て合成される一方、一度作られたコレステロール骨格を異化する経路はなく、唯一の体外に排出される経路は胆汁を介した糞便への排泄である。HDL により搬出された末梢組織細胞のコレステロールは直接あるいは間接的に肝臓まで搬送され、最終的に胆汁酸として、あるいはコレステロールそのものとして胆汁中/腸管へ排出される。この経路はコレステロール逆転送 (Reverse Cholesterol Transport, RCT) (図 1) と呼ばれ、多面的な HDL の抗動脈硬化作用のうち最も重要な機能と考えられている (12)。HDL の主要な担体蛋白であるアポリポ蛋白 A-I (アポ A-I) は肝臓および小腸で産生・分泌される (図 1①)。分泌されたアポ A-I は細胞膜に存在するトランスポーターである ATP 結合カセットトランスポーター A1 (ABCA1) を介しリン脂質やコレステロールを得て、円盤状の原始 HDL を形成する (図 1②)。原始 HDL は、ABCA1 や ABCG1、スカベンジャー受容体クラス B タイプ I (Scavenger receptor Class B Type I, SR-BI) を介してさらに細胞のコレステロールを搬出し (図 1③)、HDL 粒子中に存在するレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (lecithin cholesterol acyltransferase, LCAT) の作用によりコレステリルエステル (cholesteryl ester, CE) をその中心に蓄積した球状の HDL へと成熟する (図 1④)。HDL の CE の大部分は CE 転送蛋白 (Cholesteryl Ester Transfer Protein, CETP) を介し VLDL や LDL に転送され (図 1⑤)、LDL 受容体 (LDLR) により肝臓に取り込ま

れる (図 1⑥)。また HDL 粒子中のコレステロールは、主に SR-BI を介し肝臓に取り込まれ (図 1⑦)、LDLR 経由のものも併せて最終的に胆汁/腸管に排泄される (図 1⑧) ことで RCT 経路が完結し、HDL の抗動脈硬化作用が発揮されるものと考えられている。

このような疫学および基礎医学における知見の集積を受けて、血中 HDL-C 濃度を増加させることにより動脈硬化性疾患を治療/予防しようという検討が精力的になされてきたが、現時点でその試みはうまくいっていない。特に CETP を阻害することにより HDL-C 濃度を増加させる治療は複数の薬剤による介入試験で CVD 発症を抑制できないことが示され (13, 14)、LDL-C とは対照的に HDL-C 濃度を増減させることが動脈硬化性疾患の発症に直接反映されるわけではないことは、近年のメンデルランダム化による疫学的検討 (15) が HDL-C 濃度と CVD 発症との関連性を証明できないこととも符合する。このように HDL-C 濃度に介入する治療がいまだ有望なものとならない理由として、その介入点により血中 HDL-C 濃度増加が必ずしも RCT の活性化を伴わない点が挙げられる。

従来 RCT を評価することは困難であったが、マウスを用いた手法 (in vivo RCT アッセイ) の確立により、HDL の RCT における役割についての理解が大きく進展した。遺伝子改変マウスなどを用いた検討により、RCT 活性化は動脈硬化発症・進展抑制につながることで、血中 HDL-C 濃度増加は必ずしも RCT の活性化・抗動脈硬化作用に結びつかないことが明らかになってきた。たとえば上述の CETP を活性化することは HDL-C 濃度の低下をもたらすものの RCT を促進すること (16)、肝臓 SR-BI 欠損では HDL-C 濃度が増加する一方で RCT が抑制され動脈硬化形成が促進すること、逆に肝臓 SR-BI の過剰発現により HDL-C 濃度は低下するものの RCT は活性化され (17)、動脈硬化発症は抑制される (18) ことなどが報告され、我々も内皮リパーゼの過剰発現で HDL-C は著明に低下するもの

の RCT 機能は保持されことを報告した(19)。このように、in vivo RCT アッセイを用いた検討が HDL-RCT 研究に新たな理解をもたらし、HDL 濃度よりもその機能が重要であるという認識が高まっている。

RCT における最も重要なステップは、動脈硬化巣マクロファージにおけるコレステロールの搬出反応であるとされる。アポ A-I 欠損症や ABCA1 欠損症であるタンジール病ではこの反応が著しく障害され、低 HDL-C 血症に加え早発動脈硬化を発症する点もコレステロール搬出反応の重要性を支持する(20)。次に重要なステップは肝臓であり、上述のように HDL/LDL コレステロールがどの程度肝臓に取り込まれるか、そのコレステロールがどのように形を変え、いかなる経路で胆汁/腸管へ排泄されるかにより RCT が制御される。これまで ABCA1、SR-BI などの細胞膜に局在する HDL 代謝制御分子の肝臓における役割についての知見は十分であるが、胆汁酸合成や細胞内コレステロール輸送をつかさどる分子の RCT 制御への影響はいまだ明らかでない。

当研究室ではマウス肝臓特異的に遺伝子発現を増減させるアデノウィルスベクター発現系を構築し、数多くの検討を行ってきた(19, 21)。そこで本研究ではこの実験系を用い、肝臓において胆汁酸合成を制御するコレステロール 27 α -ヒドロキシラーゼ (CYP27A1)、および細胞内小器官の間のコレステロール輸送に関わる Niemann-Pick C2 (NPC2) に注目し (図 2)、マウスを用いて脂質代謝および RCT に及ぼす影響について検討した。

第 2 章 マウス肝臓における CYP27A1 の HDL 代謝および RCT に及ぼす影響についての検討

第 1 節 背景

CYP27A1 は肝臓において胆汁酸合成に関わる酵素であり、ミトコンドリアに発現しコレステロールの 27 位を水酸化し 27-ヒドロキシコレステロールを生成する (図 2)。ヒト CYP27A1 欠損症、脳腱黄色腫では胆汁酸合成不全による遷延性黄疸、胆汁うっ滞を認めることに加え、末梢組織細胞にコレステロールおよびコレスタノールが蓄積し、精神発達障害等の中樞神経障害、早発性冠動脈疾患を合併することが知られている (22)。

胆汁酸合成には 2 つの経路があり、一つは古典的経路といわれるコレステロール 7 α -ヒドロキシラーゼ (CYP7A1) により促される反応で、もう一つは CYP27A1 が担う代替経路である (23) (図 3)。共に、腸管への胆汁酸排泄を増加させ、それに伴い小腸からのコレステロールなどの脂質吸収を促進する (24)。

胆汁酸はコレステロールの代謝産物として肝臓から胆汁中に分泌されるといっただけでなく、その中間代謝産物である 27-ヒドロキシコレステロールは内因性のオキシステロールとして転写因子 Liver X receptor (LXR) のリガンドとなり (25-27)、活性化させることにより種々のコレステロール代謝関連分子の遺伝子発現を促進する。特に肝臓における ABCA1 の発現は血中 HDL-C 濃度増加をもたらす (28, 29)、RCT に影響を与えること (30, 31) が知られる。また、胆汁および腸管へのコレステロール排泄を促す ABCG5 および ABCG8 は LXR 活性化によりその発現が促進され、それらの発現増大は RCT を活性化する (32) ことが報告されている。また脳腱黄色腫の表現系が肝臓以外の臓器に認められることから、多くの臓器で CYP27A1 が重要な役割を果たすことが示唆され、特に早発動脈硬化 (33) および腱黄色腫 (34) をきたす機序は、マクロファージからのコレステロール搬出反応の減弱と考えられている。事実いくつかの報告が、マクロファージにおいて CYP27A1 がコレステロールの搬出反応を促進し (35)、RCT を活性化する可能性 (36) を示唆している。

その一方、マクロファージに比べ、肝臓における CYP27A1 の HDL 代謝および RCT に及ぼす影響は明らかでない。肝臓の CYP7A1 および CYP27A1 のどちらかが欠損した場合、相補うことがなく各々が胆汁酸合成および小腸からのコレステロール吸収に重要であることが示されているが、血中脂質代謝および RCT に果たす役割についての理解は不十分である。そこで本研究では、マイクロ RNA (miR) 発現アデノウイルスベクターを用い、肝臓特異的 CYP27A1 発現抑制を行うことで肝臓 CYP27A1 の血清脂質および RCT に及ぼす影響について検討した。

第 2 節 材料と方法

(1) 細胞

理研細胞バンク (和光) より譲渡された HEK293 細胞、RAW264.7 細胞を、10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 培地により、5% CO₂、37°C で培養した。

(2) 試薬

[³H]-コレステロールは Perkin-Elmer (Massachusetts, USA) より購入した。HDL およびリポ蛋白除去血清 (Lipoprotein Deficient Serum, LPDS) は健康成人から採取した血清から超遠心法 (HDL: d=1.063-1.21、LPDS: d>1.21) により分離した。またアセチル LDL は Alfa Aesar (Lancashire, UK) より購入した。

(3) マウス CYP27A1 の miR 発現ベクターの構築

防衛医科大学校組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て (承認番号 2018-43)、防衛医科大学校組換え DNA 実験安全管理規則に従い、実験を行った。

表 1 に示すような miR CYP27A1 を含む一本鎖オリゴヌクレオチドをそれぞれアニーリングして、二本鎖オリゴヌクレオチドを作成した。作成したオリゴヌクレオチドと pcDNA6.2GW/EmGFP-miR をライゲーションさせて miR CYP27A1 を含むプラスミド DNA を作成した。2 種類の miR を組換えて直列に配列させ、これと pDONR221 で attB × attP 間を組換える BP 組換え反応を行い、エンタリークローンを得た (図 4)。

(4) miR CYP27A1 発現アデノウィルス(Ad-miR CYP27A1)の調製

Ad-miR CYP27A1 の作製は、Invitrogen 社 (Massachusetts, USA) の ViraPower Adenoviral Expression System を用いて行った。それぞれのエンタリークローンと、サイトメガロウィルス (CMV) プロモーターを持ち、ヒトアデノウィルス E1 遺伝子を欠失する pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen) とで attL × attR 間を組換える LR 組換え反応を行った産物を HEK293 細胞にトランスフェクションすることでリコンビナント E1 欠損アデノウィルス (Ad-miR CYP27A1) を得た (図 4)。対照として使用した β ガラクトシダーゼ (LacZ) に対する miR を発現するアデノウィルスベクター (Ad-miR LacZ) は米国国立衛生研究所 Santamarina-Fojo 博士から譲渡された。Fast Trap アデノウィルス精製・濃縮キット (Merck, Darmstadt, Germany) を用いて HEK293 細胞およびその溶解液からウィルス粒子を濃縮・調製した。その一部を用い、Adeno-X Rapid Titer kit (Clontech, California, USA) によりウィルス力価の測定を行い、残りを使用時まで -80°C に保存した。

(5) マウスにおける Ad-miR CYP27A1 投与および血清脂質測定

防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を得て (承認番号 18058)、防衛医科大学校動物実験規則に従い実験を行った。8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本エスエルシー (浜松) より購入し動物実験に用いた。8 週齢のマウス 15 匹

を、通常食下で飼育し 8.3×10^9 infectious unit (IFU) の Ad-miR LacZ を尾静脈から投与したもの、および Ad-miR CYP27A1 を投与したもの 2 群に分け、7 日後空腹時採血および肝臓/腹腔マクロファージの採取を行い、 -80°C で保存した。

血清脂質については、総コレステロールをコレステロール E-テストワコー（和光純薬工業、大阪）、HDL-C を HDL-コレステロール E-テストワコー（和光純薬工業）を用いて測定した。また、中高压液体クロマトグラフィー（Fast protein liquid chromatography、FPLC）を用いて、プール血清からリポ蛋白分画の分離を行い、コレステロール濃度を測定した。FPLC は Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) をカラムとして使用した。

（6）肝臓蛋白の調製

肝臓の組織切片 50 mg を 1% Protease Inhibitor Cocktails (Roche, Basel, Switzerland) を含む Mammalian Protein Extraction Reagent (M-PER, Thermo SCIENTIFIC, Massachusetts, USA) を用いてホモジナイズし、15,000 rpm、3 分間遠心し、上清を回収した。BCA Protein Assay kit (Thermo SCIENTIFIC) を用い、ウシ血清アルブミン (BSA) を標準蛋白として蛋白濃度を定量した後、使用時まで -80°C で保存した。

（7）SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析

XCell SureLock® Mini-Cell システムを使用し、電気泳動を行った。ゲルは NuPAGE® 4~12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) を使用し、泳動用緩衝液 (NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer, Invitrogen) 中で電気泳動した。電気泳動用の試料検体には肝臓については細胞タンパク 20 μg 相当、腹腔マクロファージについては 1 匹から採取された全量を用い、あらかじめサンプル用緩衝液 (NuPAGE®

Sample Reducing Agent、NuPAGE® LDS Sample Buffer) の等容量と混合した。電気泳動は 200V の定電圧で行い、その後 25V の定電圧で、XCell SureLock® Mini-Cell システムを用いて PDVF 膜 (Invitrolon™ PVDF/Filter Paper Sandwiches, Invitrogen) に転写した。転写後、この PDVF 膜を 3% BSA 含有 0.05% Tween 20-リン酸緩衝液 (T-PBS) を用いて 60 分間ブロッキングした。T-PBS で洗浄後、抗 CYP27A1 抗血清 (3% BSA 含有 T-PBS で 1000 倍希釈)、または抗 β -アクチン (β -actin) 抗体 (Abcam, Cambridge) を用いて 4°C、16 時間 1 次抗体反応を行った。T-PBS で洗浄後、さらに horseradish peroxidase (HRP) 結合抗ウサギ (NPC2) IgG 抗体 (Santa Cruz, Texas, USA) を用いて 1 時間 2 次抗体反応を行った。T-PBS で洗浄後、化学発光法 (ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare) を用いて蛋白発現を可視化し、Amersham Imager 600 (GE) で同定した。

(8) マウスにおける RCT の評価 (in vivo RCT アッセイ)

概要について図 5 に示す。10 cm プレートに播種した RAW264.7 細胞を 5 μ Ci/ml の [³H]-コレステロールおよび 10 μ g/ml のアセチル化 LDL (Alfa Aesar) を含む RPMI1640 培地で培養し、標識を行った。48 時間後 RAW264.7 細胞をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄し、0.5 ml の RPMI1640 培地に再懸濁した。

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 19 匹を 2 群に分け、10 匹に Ad-miR CYP27A1 を、残る 9 匹には Ad-miR LacZ を尾静脈から投与した。通常食を投与し、7 日後、これらのマウスに泡沫化したマクロファージとして再懸濁した RAW264.7 細胞 (0.5 ml RPMI1640 の中に平均 5.0×10^6 の細胞数で 8.3×10^6 dpm の [³H]放射活性を含む) を腹腔内投与した。腹腔内投与後 24 および 48 時間後に尾静脈から採血し血清を得た。4 時間の絶食期間をおき、投与後 48 時間に安楽死させ、肝臓および胆嚢を採取した。肝臓は PBS でホモジナイズした後に、クロロ

ホルム：メタノール（=2:1, Vol/Vol）を加え、1000 rpm、10 分間の後、クロロホルム層を回収した。窒素ガスで蒸散させた後、ヘキサン：イソプロピルアルコール（=3:2, Vol/Vol）で再溶解し、 $[^3\text{H}]$ の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。胆嚢は直接穿刺し、胆汁 4 μl の $[^3\text{H}]$ の放射活性を測定した。RAW264.7 細胞を腹腔内投与後 48 時間まで糞便を集め、便 100 mg 当たり 1 ml の水を加え 16 時間、4°C で浸漬した。同量のエタノールを加え、ホモジナイズし、便中に含まれる $[^3\text{H}]$ 放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

（9）統計学的手法

得られたデータは平均±標準誤差として表した。2 群間の差の検定は Student の t 検定を用いた。P 値 0.05 以下を有意な差とした。

第 3 節 結果

（1）肝臓特異的 CYP27A1 発現抑制

アデノウィルスベクターは組織特異的プロモーターを用いなくても全身投与によりほぼ 100%に近い肝臓特異的発現を誘導することができることが分かっている (37, 38)。マウスに Ad-miR CYP27A1 を経静脈投与後、得られた肝臓および腹腔マクロファージを用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、対照と比較し CYP27A1 発現量の低下が確認された (図 6)。一方、腹腔マクロファージのウェスタンブロットでは、残念ながら CYP27A1 のバンドを同定することはできなかった。

（2）肝臓特異的 CYP27A1 発現抑制が血清脂質に及ぼす影響

血清の総コレステロール濃度は Ad-miR CYP27A1 投与により、軽度だが有意に増加した (miR LacZ: 95.3 ± 2.5 mg/dL, miR CYP27A1: 107.8 ± 4.3 mg/dL,

p<0.05) (図 7A)。HDL-C 濃度に有意の変化はないものの (図 7B)、FPLC により分離したリポ蛋白分画の解析では、大粒子 HDL に含まれるコレステロールの増加がみられた (図 7C)。

(3) 肝臓特異的 CYP27A1 発現抑制が RCT に及ぼす影響

次に RCT の評価を *in vivo* RCT アッセイを用いて行った。Ad-miR CYP27A1 および Ad-miR LacZ の投与 7 日後この評価を行ったところ、肝臓 CYP27A1 発現抑制によるマクロファージ由来コレステロールの血中および肝臓移行、胆汁および糞便への排泄に有意な変化を認めなかった (図 8A~D)。マクロファージ由来 [³H] -コレステロールのリポ蛋白の局在について、FPLC 分画の放射活性を測定したところ、非放射性コレステロールの分布 (図 7C) と異なり、肝臓 CYP27A1 発現抑制による HDL 分画のマクロファージ由来コレステロールの分布は対照との差を認めなかった (図 8E)。

第 4 節 考察および小括

図 7B に示すように、マウスには CETP が欠損しているため、HDL 優位なコレステロール分布を示し、LDL/VLDL などのアポ B 含有リポ蛋白中のコレステロールは少ない。ヒトを念頭に置き HDL 代謝について検討を行うためには、ヒト同様にハムスターやウサギなどの CETP 発現を有する動物モデルの利用が理想的だが、アデノウイルス投与などを用いた遺伝子発現の操作モデルではやはりマウスの利用が簡便かつ効率的である。

本研究では miR 発現アデノウイルスベクターを用いて、肝臓における CYP27A1 発現の抑制に成功し、HDL 分画のコレステロール濃度のわずかな増加を認めた。一方、*in vivo* RCT アッセイでは血中リポタンパク分画、肝臓、胆嚢のマクロファージ由来コレステロールの分布には変化を認めず、RCT の最も

重要な指標である糞便中放射性コレステロールの排泄にも対照との差がなかった。肝臓 CYP27A1 発現抑制により HDL 中の非放射性コレステロールが増加し、放射性コレステロールには変化がないという乖離を説明することは難しいが、HDL コレステロールの大部分が肝臓由来であることから、比較するとわずかなマクロファージ由来コレステロールが血中へ分布する経路には、肝臓由来のそれと比べ、CYP27A1 の関与が少ない可能性がある。

miR 発現アデノウィルスを用いた実験系の確立には成功したものの、肝臓 CYP27A1 発現抑制は RCT への関与は低いことが示唆されたため、CYP27A1 に関するさらなる検討は実施しなかった。

第 3 章 マウス肝臓における NPC2 の HDL 代謝およびに及ぼす影響についての検討

第 1 節 背景

次に本研究では、細胞内小器官の間のコレステロール輸送に関わる NPC2 に注目した。NPC2 は後期エンドソーム/ライソソーム (LE/LY) に存在する可溶性コレステロール結合蛋白であり (39)、LE/LY の膜蛋白である Niemann-Pick C1 (NPC1) と協調し、細胞内コレステロール輸送に重要な役割を果たす (40) (図 9)。ヒト NPC1 および NPC2 遺伝子異常は Niemann-Pick 病 C 型を発症する (41)。LE/LY から細胞膜へのコレステロール輸送が低下するため、コレステロール異常蓄積による精神障害、運動障害などの中枢神経障害症状が現れる。黄疸や肝不全をきたす臨床病型も存在し、血中 HDL-C 濃度が低下することが知られる (42, 43)。その機序としては、細胞膜へのコレステロール輸送が低下するため ABCA1 が媒介するコレステロール搬出反応抑制に伴う HDL 新生反応が減弱

すること、さらに NPC2 機能異常により ABCA1 発現量が低下し、さらなる HDL 新生の抑制に拍車がかかることが報告されている(44)。さらに、NPC2 は ABCG5/G8 を介して肝臓からのコレステロール排泄を促進する(45)。以上のことから、NPC2 は血中 HDL 濃度および RCT を制御する可能性が示唆され、肝臓 NPC2 の機能増強は動脈硬化治療の新たな戦略となる可能性がある。そこで本研究では、第 2 章と同様にアデノウイルス発現系を用い、肝臓特異的 NPC2 の発現抑制/過剰発現の HDL 代謝および RCT に対する影響について検討した。

第 2 節 材料と方法

遺伝子組換え実験および動物実験は、第 2 章と同様に防衛医科大学校組み換え DNA 実験安全委員会（承認番号 2018-43）および動物実験倫理委員会（承認番号 18058）の承認を得て規則に従い実験を行った。

（1）miR NPC2 発現アデノウイルス(Ad-miR NPC2)の調製

第 2 章と同様に、表 2 に示すような 3 種の miR NPC2 を直列に配列した pcDNA6.2GW/EmGFP-miR と pDONR221 で BP 組換え反応を行い、エントリークローンを得た（図 4）後、第 2 章第 2 節で示す方法と同様に Ad-miR NPC2 を構築した。

（2）NPC2 過剰発現ウイルス(Ad-NPC2)作製

NPC2 のオープンリーディングフレームを含む cDNA クローン（Thermo Fisher Scientific (Waltham MA, USA) を鋳型として表 3 に示すような NPC2 特異的なプライマーと Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) を用い PCR 反応を行った。得られた PCR 産物を pENTR/D-TOPO クローニング kit (Invitrogen) を用いて、pENTR/D-TOPO にサブクローニングした（図 10）。得られたエントリークローンのシーケンス解析を行い、NCBI、Gene Bank から得たマウス NPC2 mRNA

配列 (Accession number: NM_023409) と比較し PCR 反応でのミスマッチがないことを確認した。以降、miR 発現アデノウィルスベクターと同様に Ad-NPC2 を調整した。

(3) 血清脂質の測定

血中脂質濃度測定およびFPLCを用いたリポ蛋白分画は第2章第2節と同様に行った。さらに得られた血清を高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC) で分画し、各分画のコレステロール濃度を測定した。

(4) 肝臓コレステロールおよびトリグリセライドの測定

肝臓の組織切片 50 mg を、PBS を用いてホモジナイズし、それぞれコレステロール濃度、トリグリセライド濃度を測定した。BSA を標準蛋白として蛋白濃度を定量した後、肝臓コレステロールおよびトリグリセライド (TG) 濃度を蛋白濃度で補正した。

(5) マウスにおける肝臓 NPC2 発現抑制

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 12 匹を、通常食下で飼育し 5.0×10^8 IFU の Ad-miR NPC2/LacZ を尾静脈から投与、7 日後空腹時採血、肝臓、胆嚢、小腸を採取し、 -80°C で保存した。

(6) マウスにおける肝臓 NPC2 過剰発現

同様に、8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 19 匹に 5.0×10^8 IFU の Ad-NPC2/Luc を尾静脈から投与し、7 日後空腹時採血、肝臓、胆嚢、小腸を採取し、 -80°C で保存した。

(7) 総 RNA 抽出およびリアルタイム RT-PCR による mRNA の分析

肝臓または小腸から総 RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR により mRNA の発現レベルを検討した。肝臓 50 mg または小腸 25 mg を 1 ml の TRI reagent

(Sigma) でホモジナイズし総 RNA の抽出を行い、これを鋳型として、TaqMan

Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems)を用いて逆転写反応により cDNA を得た。反応は 0.6 μg total RNA、5.0 mmol/L MgCl_2 、1.0 mmol/L each dNTP mixture、2.0 U/ μl RNase inhibitor、2.5 pmol/ μl primer (random hexamer) 、0.25 U/ μl reverse transcriptase を含む RNA PCR buffer 中で、30°C で 10 分間、42°C で 60 分間、70°C で 15 分間および 4°C で 10 分間行った。反応には Takara 社製サーマルサイクラーを用いた。リアルタイム PCR は TaqMan real-time PCR master mix (Applied Biosystems)を用いた。リアルタイム PCR による増幅反応には、ABI Prism 7900 (Applied Biosystems)を用い、サーマルサイクルとして 50°C で 2 分間、95°C で 10 分間の反応後、95°C で 15 秒間と 60°C で 60 秒間を 40 サイクルさせることで実行した。また、全反応後に cDNA の 2 本鎖の融解曲線を描くことで反応産物の特異性を確認した。最終的にすべて 18S リボソーム RNA に相対的な mRNA レベルとし、すべての反応はデュプリケートで行った。

(8) SDS-PAGE およびウェスタンブロット解析

第2章と同様にウェスタンブロット解析を行った。抗NPC2抗体 (Abcam)、抗 ABCA1抗血清 (中部大学横山信治博士より譲渡)、抗SREBP1抗体 (Abcam)、抗 SREBP2抗体 (Abcam) 、抗ABCG5抗体 (Santa Cruz)、抗ABCG8抗体 (Santa Cruz) 、抗LDLR抗体 (500倍希釈)、抗CYP7A1抗体 (Abcam) 、抗HMGCoAR抗体 (Abcam) 、抗PCSK9抗体 (Cayman chemical) 、抗SR-BI抗体 (Novus)、抗LXR α 抗体 (1000倍希釈) 、抗endothelial lipase (EL)抗体 (Novus) 、抗LCAT抗体 (Novus) 、抗アポA-I抗体 (Abcam) 、抗アポB抗体 (Novus)、抗 β -アクチン (β -actin)抗体 (Abcam) を用いて4°C、16時間1次抗体反応を行った。T-PBSで洗浄後、さらにHRP結合抗ラットIgG (Santa Cruz)、抗ウサギIgG抗体を用いて 1 時間2次抗体反応を行い、第2章と同様タンパク発現を可視化した。

(9) in vivo RCT アッセイ

第2章と同様に行った。

(10) マウスにおける HDL 代謝動態の評価

ア 放射性コレステロール標識 HDL の調整

VLDL、LDL、HDL およびリポ蛋白除去血清 (Lipoprotein Deficient Serum, LPDS) は健常成人から採取した血清から超遠心法 (VLDL : $d < 1.006$ 、LDL : $d = 1.006 - 1.063$ 、HDL : $d = 1.063 - 1.21$ 、LPDS : $d > 1.21$) により分離した。HDL 10 mg に対し、 $[^3\text{H}]$ -cholesteryl oleate (Perkin-Elmer) 500 μCi を混合した後、LPDS 200 mg を加え 37°C で 16 時間インキュベートした。標識された HDL ($[^3\text{H}]$ -CE-HDL) を超遠心法により分離・PBS で透析し、使用前に $0.45 \mu\text{m}$ の PVDF フィルターでろ過した。

イ HDL 代謝実験

概要について図 11 に示す。8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 10 匹を 2 群に分け、5 匹に Ad-NPC2 を、残る 5 匹には Ad-Luc を尾静脈から投与した。7 日後、 $[^3\text{H}]$ -CE-HDL (1×10^6 dpm) を経静脈投与し、投与後 2 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間、9 時間、24 および 48 時間後に採血し血清を得、 $[^3\text{H}]$ 放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。また、HDL の異化速度

(Fractional Catabolic Rate, FCR) は、SAAMII プログラム (SAAM Institute, Washington, USA) を用いた 2-exponential model を実際のデータにフィッティングさせて算出した。

(11) 培養肝細胞を用いたリポ蛋白産生の評価

図 12 に示すように、マウス肝細胞 Hepa1-6 (理研細胞バンクより譲渡) を 6 穴プレートに播種、10% FBS 含有 DMEM 培地下で 90~100% confluent に達したところで、Ad-Luc、Ad-NPC2 を 30 multiplicity of infection (MOI) 加えた。24 時

間後、PBSで洗浄し、5mg/dL BSAおよび5 μ Ci/mL [3 H]-コレステロール含有DMEMで標識した。さらに24時間後、培養液を吸引し、PBSで3回洗浄し、5mg/dL BSA含有DMEM培地で24時間培養した。24時間後、培地を回収、遠心式限外ろ過フィルター (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Units-10,000 NMWL) を用いて濃縮し、FPLCを用いてリポ蛋白分画の分離を行い、それぞれの分画の [3 H] の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

(1 2) マウスにおける LDL 代謝動態の評価

ア 放射性コレステロール標識 LDL の作成

超遠心法で分離したヒト LDL 4 mg に、 [3 H]-cholesteryl oleate 500 μ Ci を混合した後、LPDS 600 mg を加え、37°C で 16 時間インキュベートした。標識された LDL ([3 H]-CE-LDL) を超遠心法により分離・PBS で透析し、使用前に 0.45 μ m の PVDF フィルターでろ過した。

イ マウスでの LDL 代謝実験

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 11 匹を 2 群に分け、6 匹に Ad-NPC2 を、残る 5 匹には Ad-Luc を尾静脈から投与した。HDL 代謝実験と同様に、7 日後、 [3 H]-CE-LDL (1×10^6 dpm) を経静脈投与し、投与後 2 分、5 分、10 分、20 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間、および 24 時間後に採血し血清を得た。LDL の FCR は SAAMII プログラムを用いて算出した。

(1 3) マウスにおける VLDL 代謝動態の評価

ア 放射性 TG 標識 VLDL の作成

超遠心法で分離したヒト VLDL 3 mg に、 [14 C]-triolein 20 μ Ci を混合した後、LPDS 100 mg を加え、37°C 16 時間インキュベートした。LPDS は混合する直前に 55°C、10 分で不活化した。標識された VLDL ([14 C]-TO-VLDL) を超

遠心法により分離・PBS で透析し、使用前に 0.45 μm の PVDF フィルターでろ過した。

イ VLDL 代謝実験

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 11 匹を 2 群に分け、6 匹に Ad-NPC2 を、残る 5 匹には Ad-Luc を尾静脈から投与した。HDL 代謝実験と同様に、7 日後、 $[^{14}\text{C}]$ -T0-VLDL (1×10^6 dpm) を経静脈投与し。投与後 1 分、3 分、5 分、10 分、15 分、30 分、および 24 時間後に採血し血清を得た。VLDL の FCR は SAAMII プログラムを用いて算出した。

(14) マウスにおける VLDL 新生実験

8 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 10 匹を 2 群に分け、各 5 匹に Ad-NPC2 あるいは Ad-Luc を尾静脈から投与した。7 日後、これらのマウスにリポ蛋白リパーゼ (LPL) 阻害薬 Poloxamer 407 (Sigma-Aldrich) 7.5% 溶液 400 μL を腹腔内投与した。投与前、投与後 1 分、1 時間、2 時間、6 時間、および 24 時間後に採血し血清を得た。それぞれの血清中の TG 濃度をトリグリセライド E-ワコー (和光純薬工業) を用いて測定した。

(15) 統計学的手法

得られたデータは平均 \pm 標準誤差として表した。2 群間の差の検定は Student の t 検定を用いた。P 値 0.05 以下を有意な差とした。

第 3 節 結果

(1) 肝臓特異的 NPC2 発現抑制の血清脂質に及ぼす影響

第 2 章と同様に、Ad-miR NPC2 または Ad-miR LacZ を経静脈投与したマウスから肝臓を得て、リアルタイム PCR およびウェスタンブロット解析を行ったところ、Ad-miR NPC2 投与により NPC2 mRNA レベルが有意に抑制された (図

13A)。蛋白発現は抑制傾向を認めたものの、定量上、有意差を認めなかった (図 13B, Ad-miR LacZ: 0.72 ± 0.24 , Ad-miR NPC2: 0.32 ± 0.06 , $p=0.080$)。Ad-miR NPC2 を投与したマウスでは、対照と比較し血清総コレステロール、TG および HDL-C 濃度に変化を認めず NPC2 蛋白量を有意に抑制できなかった事実と符合する (図 14)。この結果を受けて、いくつかのマウス NPC2 miR 発現アデノウイルスベクターの作成を試みたものの、Ad-miR CYP27A1 ほどのノックダウン効率が得られなかった。

(2) 肝臓特異的 NPC2 過剰発現

Ad-NPC2 または Ad-Luc を経静脈投与したマウスから肝臓および小腸を得てリアルタイム PCR を行ったところ、Ad-NPC2 投与により小腸では NPC2 の mRNA レベルに変化を認めなかったのに対し、肝臓では mRNA レベルの増加を認め (図 15A)、さらにウェスタンブロット解析でも、図 15B 矢印で示すように Ad-NPC2 投与群において蛋白発現の増加を認めており (矢印より低分子のバンドは内因性 NPC2)、NPC2 の肝臓特異的過剰発現が確認された。

(3) 肝臓特異的 NPC2 過剰発現が血清脂質、肝臓中コレステロールおよび TG 含量に及ぼす影響

次に NPC2 過剰発現の *in vivo* での脂質代謝への影響を検討した。Ad-NPC2 投与 7 日後の血清脂質は、総コレステロール (Luc: 114.4 ± 2.2 mg/dL, NPC2: 168.0 ± 9.9 mg/dL, $p < 0.01$)、TG (Luc: 54.7 ± 2.9 mg/dL, NPC2: 72.5 ± 3.3 mg/dL, $p < 0.01$)、および HDL 以外のコレステロール (non HDL-C) 濃度 (Luc: 39.1 ± 8.2 mg/dL, NPC2: 114.9 ± 11.7 mg/dL, $p < 0.01$) で有意に増加し、HDL-C 濃度 (Luc: 75.3 ± 1.8 mg/dL, NPC2: 53.1 ± 4.5 mg/dL, $p < 0.01$) では有意に低下した (図 16)。次に、FPLC によるリポ蛋白分画を解析したところ、Ad-NPC2 投与により HDL 分画のコレステロール濃度の低下とアポ B 含有リポ蛋白である

VLDL/中間比重リポ蛋白 (intermediate density lipoprotein, IDL) /LDL 分画のコレステロールおよび TG 濃度の増加を認めた (図 17)。HDL はより大型粒子の濃度が低下する傾向を示した。さらに HPLC により分離したリポ蛋白分画のコレステロール濃度を測定したところ、上記の結果に一致して Ad-NPC2 投与により VLDL/IDL/LDL 分画のコレステロール濃度の増加が確認された (Luc: $15.7 \pm 2.7/5.4 \pm 1.1/44.6 \pm 2.1$ mg/dL, NPC2: $43.8 \pm 2.3, 17.0 \pm 1.7, 60.1 \pm 3.8$ mg/dL, $p < 0.01$) (図 18) もの、HDL-C 濃度の低下には統計学的有意差を認めなかった (Luc: 37.0 ± 5.9 mg/dL, NPC2: 33.5 ± 0.8 mg/dL, $p = 0.6$)。また、NPC2 過剰発現により肝臓のコレステロール含量は有意に増加し (Luc: 4.73 ± 0.08 mg/g liver, NPC2: 7.18 ± 0.29 mg/g liver, $p < 0.01$)、TG 含量も増加する傾向にあった (Luc: 11.8 ± 1.0 mg/g liver, NPC2: 15.2 ± 1.5 mg/g liver, $p = 0.095$) (図 19)。

(4) 肝臓特異的 NPC2 過剰発現が血清中のアポ蛋白および脂質代謝関連因子に及ぼす影響

次に、リポ蛋白の構成アポ蛋白や脂質代謝関連因子への影響を検討した。図 20 に示すように、HDL の構成蛋白であるアポ A-I 量は HDL-C 濃度の低下を反映せず、Ad-NPC2 投与群で増加傾向、HDL 代謝に関わる LCAT および EL は NPC2 過剰発現により増加していた。VLDL/IDL/LDL の構成蛋白であるアポ B48/100 は増加、LDL 代謝に関わる PCSK9 蛋白量も増加した。さらに。アポ蛋白 A-I と B48 について、FPLC 解析でリポ蛋白分布を検討したところ、アポ A-I は HDL 中コレステロール濃度低下とは逆に大粒子 HDL で、アポ B48 含量は LDL 分画で増加を認めた (図 21)。

(5) 肝臓特異的 NPC2 過剰発現が肝臓のリポ蛋白代謝関連因子の蛋白発現に及ぼす影響

次にウェスタンブロット法により肝臓のリポ蛋白代謝に関与する因子の蛋白発現を評価したところ（図 22）、HDL 代謝関連因子の SR-BI は変化を認めず、LXR α は低下、その下流の ABCA1 については変化を認めなかった。LDL 代謝関連因子の SREBP2 および PCSK9 は発現量が低下したが、HMGCoA、LDLR については変化を認めなかった。胆汁酸合成関連因子の CYP7A1 は低下しており、中性ステロールの胆汁分泌に関連する ABCG8 は低下傾向、ABCG5 は顕著な低下を認めた。

（6）肝臓特異的 NPC2 過剰発現が RCT に及ぼす影響

次に、肝臓 NPC2 過剰発現によるマクロファージ由来のコレステロールの糞便への排泄を検討するため in vivo RCT アッセイを行った。対照と比較し、Ad-NPC2 投与群ではマクロファージ由来^[3H]-コレステロールの血中および肝臓移行は増加した（図 23A, C）。FPLC による血中^[3H]-コレステロールのリポ蛋白分布の検討では、HDL 分画では低下したものの、VLDL/IDL/LDL では増加し、後者の変化が前者を凌駕したため血清全体では^[3H]-コレステロール濃度が増加した（図 23B）。この変化は FPLC によるコレステロールのリポ蛋白分布（図 17A）とも一致するものであった。肝臓の^[3H]-コレステロール含量は増加した一方で、胆汁および糞便への排泄の低下（図 23D, E）は、NPC2 過剰発現により RCT が抑制されることを示しており、その機序として、マクロファージ由来のコレステロールの胆汁中への排泄が滞る可能性が示唆された。マクロファージ由来のコレステロールはコレステロールそのものとして、あるいは胆汁酸に変換され胆汁/糞便に排泄される。そこで糞便中のステロールを、中性ステロール分画と胆汁酸分画に分離して^[3H]放射活性を測定したところ、NPC2 過剰発現によるマクロファージ由来コレステロールの糞便排泄低下は主に胆汁酸排泄低下によるものであった（図 23F, G）。

(7) 肝臓特異的 NPC2 過剰発現が HDL 代謝および培養肝細胞におけるリポ蛋白新生に及ぼす影響

肝臓 NPC2 過剰発現による低 HDL-C 血症の機序を解明するため、 ^3H -CE-HDL を用いて HDL 代謝動態の検討を行った。 ^3H -CE-HDL の血中消失曲線 (図 24A) から算出される異化速度 (fractional catabolic rate, FCR) は Ad-NPC2 投与群と対照群で差を認めず (Luc: 0.096 ± 0.004 pools/h, NPC2: 0.085 ± 0.005 pools/h, $p=0.132$) (図 24B)、低 HDL-C 血症の機序は HDL の異化亢進でないことが示された。次に HDL 新生反応に及ぼす影響について検討した。HDL 新生は *in vivo* で検討することは困難なため、培養肝細胞を用いて行った。Ad-NPC2 および Ad-Luc をマウス肝細胞株 Hepa-16 に加え、 ^3H -コレステロールで細胞を標識、培地を洗浄・交換し、24 時間後回収した培地を濃縮、FPLC で分析し得られた分画の ^3H -コレステロールを測定したところ、対照群と比較し Ad-NPC2 添加群では HDL および VLDL 分画のカウントが低下した (図 25)。以上から、低 HDL-C 血症は HDL 新生 (産生) 低下によることが明らかになった。加えて、VLDL 新生も低下していたが、アポ B 含有リポ蛋白濃度は増加しており、産生亢進が原因ではないことが示された。

(8) 肝臓特異的 NPC2 過剰発現が LDL 代謝に及ぼす影響

次に肝臓 NPC2 過剰発現による高 LDL-C 血症の機序を解明するため、 ^3H -CE-LDL を用いて LDL 代謝動態の検討を行ったところ、 ^3H -CE-LDL の血中消失曲線に明らかな差はなく (図 26A)、図 26B に示すように、 ^3H -CE-LDL の FCR には群間で差を認めなかった (Luc: 0.097 ± 0.044 pools/h, NPC2 0.098 ± 0.040 pools/h, $p=0.938$)。従って、LDL 代謝低下が原因ではないことが示唆された。

(9) 肝臓特異的 NPC2 過剰発現による VLDL 代謝に及ぼす影響

同様に、なぜ肝臓 NPC2 過剰発現により VLDL 分画のコレステロール/TG 濃度が増加したのか、 $[^{14}\text{C}]$ -TO-VLDL を用いて VLDL-TG 代謝動態の検討を行った。 $[^{14}\text{C}]$ -TO-VLDL の血中からの消失曲線 (図 27A) をみると NPC2 過剰発現による VLDL の代謝は低下する傾向を示した (Luc: 5.22 ± 0.78 pools/h, NPC2: 4.33 ± 0.43 pools/h, $p=0.36$) (図 27B)。

(10) 肝臓特異的 NPC2 過剰発現による肝臓 VLDL 合成に及ぼす影響

最後に、肝臓 NPC2 過剰発現による高 TG 血症が肝臓からの VLDL 産生増加によるものか否かを検討するため、LPL 阻害薬である Poloxamer407 を用いてその影響を検討した。LPL を阻害すると VLDL 中 TG の水解が抑制され、VLDL の異化が著しく滞り経時的に血清 TG 濃度が増加するが、この増加は肝臓における VLDL 産生を反映する。図 28 に示すように、予想に反して Ad-NPC2 投与により VLDL 産生低下を認めた。以上、VLDL 代謝実験結果 (図 27B) と併せて考えると、肝臓 NPC2 過剰発現による VLDL 増加は代謝遅延によることが推測された。

第4節 考察および小括

肝臓特異的 NPC2 過剰発現により血清 HDL-C 濃度が低下、アポ B 含有リポ蛋白濃度が増加することに加え、RCT は有意に低下することから、肝臓 NPC2 発現増加は動脈硬化促進的に作用することが示された。

HDL 代謝実験では HDL の異化に変化はなく (図 24)、肝臓からの HDL 新生の低下 (図 25) が低 HDL 血症の原因であることが示唆された。マウスを用いた検討から、血中 HDL-C 濃度の 70% は肝臓、30% は小腸における ABCA1 を介した HDL 新生反応によって規定される (46)。肝臓の HDL 新生は、まず肝臓からアポ A-I が細胞外へ分泌されることを起点に、その後再び肝細胞表面と接触し、リン脂質やコレステロールを ABCA1 依存性に獲得することにより原始 HDL と呼ばれる円板状

HDLが形成される(47)。NPC2過剰発現によりABCA1の発現量には変化がなかった(図22)ため、アポA-IとABCA1との反応が阻害されるか、その反応の場へのコレステロール輸送不全などが考えられるが、今後のさらなる検討を要する。また、FPLC分画コレステロール濃度をみると、HDLがより小粒子化していた(図17A)が、その機序としてELの発現増加(図20)が考えられる。ELは血管内皮細胞表面に分布し、HDLのリン脂質を水解することでHDL濃度の低下をもたらす(48, 49)。ELの産生は全身の血管内皮細胞および肝細胞で行われる(49)が、肝臓NPC2過剰発現が血中EL蛋白の増加をもたらしたのかは不明である。さらに、HDL-C濃度が低下しているにも関わらず、血中アポA-I濃度は増加(図20)、加えてアポA-Iの分布がLDLと重複するように大粒子HDLに認められる(図21)。後述するように、肝臓NPC2発現により胆汁うっ滞が引き起こされる可能性があり、そのような状況ではリポ蛋白Xと呼ばれる異常リポ蛋白(主として大粒子HDL)が血中に認められることが知られるため、そういった変化を反映した結果なのかもしれない。マウスはコレステロールエステル転送蛋白(CETP)が欠損しているため高HDL血症動物であるが、ヒトではCETP活性が高い。そのため、ヒトではHDL濃度を規定するのは異化速度で、低HDL血症ではHDL異化亢進を認める。一方、本研究では、低HDL血症で異化速度に変化なく産生低下を認めたのは種特異的の可能性がある。今後、ハムスターのようなCETP活性のある動物モデルでの検証が必要である。

肝臓NPC2過剰発現によるアポB含有リポ蛋白(VLDL/IDL/LDL)中コレステロールおよびTG濃度増加のメカニズムについては、代謝実験および培養肝細胞を用いた検討の結果、VLDL増加は異化遅延(図27)、LDL増加は産生増加によることが推測された。これらのアポB含有リポ蛋白代謝と肝臓でのコレステロール代謝関連分子の発現量は必ずしも一致した変化を示さなかった。たとえば、細胞

内コレステロール濃度を制御する最も重要な転写因子SREBP2の発現は、NPC2発現による肝臓コレステロール含量増加を反映し顕著に低下しているのに対し、SREBP2活性化により発現量が増加するLDLR、HMGCoARには明らかな変化を認めなかった（図22）。また、PCSK9はLDLRを分解してその発現を低下させ高LDL-C血症をもたらすが、血中と肝臓の発現量の変化が全く逆であること（図20、22）、その顕著な変化とは対照的に肝臓LDLRの発現には変化がみられないことなどである。さらに、VLDL代謝遅延（図27）においては、その代謝の下流の産物（図1）であるLDL濃度は通常低下するが、LDL濃度は逆に増加した。またNPC2発現によりVLDL産生が低下する（図25、28）が、HDLを含めたりポ蛋白産生にNPC2が関与する可能性があり、肝臓NPC2過剰発現の影響の全容を解明するにはさらなる検討が必要である。

図23の示すとおり、肝臓NPC2過剰発現により肝臓にマクロファージ由来コレステロールが蓄積し、胆汁および糞便中への排泄が滞ることが示唆された。さらにそれはコレステロールそのものではなく、胆汁酸の変化に起因することが示された（図23F、G）。前述のとおり、RCTで最も重要なステップは末梢細胞（本実験ではマクロファージ）からのHDLによるコレステロール搬出反応であるが、肝臓NPC2過剰発現によりこの段階が影響を受けた可能性は残る。血中HDL-C濃度に変化を認めたものの、低HDL-C血症そのものが末梢からの肝臓へのコレステロール転送に影響することは考えにくい、そのことを証明するためには、標識HDLを用いた代謝実験（図24）で得られた肝臓、胆汁、糞便への放射性コレステロールを測定し、マクロファージ由来とHDL由来のコレステロールの分布に差がないことを今後確認する必要がある。また、NPC2過剰発現によるコレステロール代謝関連分子の発現量変化をみると、RCTに影響する可能性のある変化が多く観察された。すなわち、LXR α 、ABCG5/G8、CYP7A1の発現低

下（図22）である。肝臓LXR α 発現が低下、あるいは不活性化すると、LXRリガンド存在下あるいは高コレステロール食飼育下でマウスのRCTが低下することが知られる(50)。また、第2章で述べたとおり、LXR活性化によるRCT促進には ABCG5/G8が必要である(32)ことから、RCTが低下することが予想される結果であった。

このような肝臓コレステロール代謝関連分子とRCTの変化を併せて考えると、RCT低下の主たる原因はCYP7A1発現低下による胆汁酸合成低下に起因する可能性が示唆された。背景で述べたとおり、ABCG5/G8依存性にコレステロールの胆汁排泄が亢進すること(51)、また、マウス肝臓にNPC2を過剰発現しても胆汁酸排泄には影響がないことがYamanashiら(45)により報告されているため、NPC2発現増大によりRCTが促進すると予想されたが、マクロファージ由来コレステロールは胆汁酸として排泄が低下するためRCTが抑制されるという、仮説とは逆の結果となった。上記既報(45)ではABCG5/G8の蛋白発現量は変化しておらず本研究とは明白な相違を認めた。何らかの違いが結果の乖離に結びついていると考えられるが、マウス種の違いやテトラサイクリンによる発現誘導系を用いていることが影響している可能性が考えられた。

以上、マウスにおける肝臓 NPC2 過剰発現は血清脂質プロファイルを修飾し、RCT を抑制するが、それらの変化にとって最も重要な現象は肝臓コレステロール含量の増加であろう。しかし単純にコレステロール負荷食下で飼育した場合とは異なり、コレステロール負荷による反応が理論どおりに生じているのは SREBP2 発現量のみである。LXR α 標的遺伝子である ABCG5/G8/CYP7A1/LXR α 自体の発現量が理論とは逆に低下していることは、NPC2 過剰発現が肝細胞内小器官のコレステロール分布のアンバランスを引き起こしている可能性を示して

おり、そのことがコレステロール代謝関連分子発現量、脂質プロファイル、および RCT の複雑な変化につながっていると示唆される。

第 4 章 総括

肝臓は HDL 代謝および RCT 経路において中心的な役割を果たす。本研究では、肝臓におけるコレステロール代謝関連分子の発現量を増減させることにより、血清脂質代謝および RCT にいかなる影響が生じるか、マウスを用いて検討した。

CYP27A1 は肝臓において胆汁酸合成にかかわり、その欠損はヒトにおいて早発性冠動脈疾患を合併する脳腱黄色腫を発症するが、アデノウィルスベクターによるマウス肝臓 CYP27A1 ノックダウンは血清脂質プロファイルおよび RCT に変化をもたらさなかった。このことから、脳腱黄色腫における動脈硬化形成促進作用はマクロファージにおける CYP27A1 欠損が大きく寄与し、肝臓の役割は顕著でないことが示唆される。しかし本研究では内因性 CYP27A1 発現がわずかながら残存しており、完全欠損下では異なる結果が得られる可能性は残る。

マウス肝臓 NPC2 の発現を抑制することは、ヒト Niemann-Pick 病 C 型における低 HDL-C 血症のメカニズムを探索するためのよいモデルと考えられたが、CYP27A1 実験と同等の発現抑制効率を得ることはできなかった。次に、肝臓 NPC2 過剰発現は肝臓から腸管へコレステロール排泄を促し、その結果 RCT を促進、抗動脈効果的に作用するという作業仮説のもと検討を行ったが、予想とは異なり NPC2 発現増加により肝臓コレステロール蓄積が促進、低 HDL-C 血症および高 VLDL/IDL/LDL 血症が惹起され、RCT が低下した。細胞内コレステロール濃度を制御する 2 つの重要なシステムである SREBP2 と LXR、およびそれらの標的遺伝子の発現量が生理的制御を逸脱し変化したことを考慮すると、NPC2 発現

増加により肝臓コレステロール代謝の恒常性維持が破綻し、むしろ動脈硬化形成促進的なフェノタイプが誘導されたと示唆される。このことは肝臓 NPC2 の発現抑制が逆に動脈硬化抑制的に働く可能性を包含する。Niemann-Pick 病 C 型で認められるように、肝臓 NPC2 発現低下により低 HDL-C 血症が惹起されたとしても、RCT は促進し動脈硬化形成は抑制されるかもしれない。今後、肝臓 NPC2 抑制実験系の確立に取り組み、RCT および動脈硬化形成に及ぼす影響を検討することにより、肝臓 NPC2 の動脈硬化の修飾因子としての可能性を探っていきたい。

第 5 章 結論

マウス肝臓における CYP27A1 の発現抑制は血清脂質および RCT に影響を与えなかった。一方、NPC2 過剰発現は血中 HDL-C 濃度を低下、アポ B 含有リポ蛋白濃度を増加させ、RCT を抑制した。

謝辞

本研究の遂行、論文の作成、研究指導に際し、終始ご教授賜りました、防衛医科大学校内科学教授 池脇克則先生、同非常勤講師 綾織誠人先生、東京慈恵会医科大学付属病院 臨床検査医学講座 吉田博先生、東ソー株式会社 真仁田 大輔先生に謹んで感謝御礼申し上げます。

単語・略語説明

ABCA1: ATP 結合カセットトランスポーターA1

ABCG5: ATP 結合カセットトランスポーターG5

ABCG8: ATP 結合カセットトランスポーターG8

BSA: 牛血清アルブミン

CE: コレステリルエステル

CETP: コレステリルエステル転送蛋白

CYP7A1: コレステロール7 α -ヒドロキシラーゼ

CYP27A1: コレステロール27 α -ヒドロキシラーゼ

EL: 血管内皮リパーゼ

FCR: 異化速度

FPLC: 中高压液体クロマトグラフィー

HDL: 高比重リポ蛋白

HPLC: 高速液体クロマトグラフィー

LacZ: β ガラクトシダーゼ

LCAT: レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ

LDL: 低比重リポ蛋白

LPDS: リポタンパク除去血清

Luc: ルシフェラーゼ

LXR: Liver X receptors

miR: マイクロRNA

NPC1: Niemann-Pick C1

NPC2: Niemann-Pick C2

PBS: リン酸緩衝生理食塩水

RCT: コレステロール逆転送

SR-BI: スカベンジャー受容体クラス B タイプ I

SREBP: ステロール調節エレメント結合蛋白

VLDL: 超低比重リポ蛋白

引用文献

1. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005;366(9493):1267-78.
2. Cannon CP, Blazing MA, Giugliano RP, McCagg A, White JA, Theroux P, et al. Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med*. 2015;372(25):2387-97.
3. Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bittner VA, Diaz R, et al. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*. 2018;379(22):2097-107.
4. Perrone V, Sangiorgi D, Buda S, Degli Esposti L. Residual cardiovascular risk in patients who received lipid-lowering treatment in a real-life setting: retrospective study. *Clinicoecon Outcomes Res*. 2016;8:649-55.
5. Wilson PW, Garrison RJ, Castelli WP, Feinleib M, McNamara PM, Kannel WB. Prevalence of coronary heart disease in the Framingham Offspring Study: role of lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol*. 1980;46(4):649-54.
6. Gordon DJ, Knoke J, Probstfield JL, Superko R, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in hypercholesterolemic men: the Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *Circulation*. 1986;74(6):1217-25.
7. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989;79(1):8-15.
8. Miller NE, Thelle DS, Forde OH, Mjos OD. The Tromso heart-study. High-density lipoprotein and coronary heart-disease: a prospective case-control study. *Lancet*. 1977;1(8019):965-8.
9. Miller M, Seidler A, Kwiterovich PO, Pearson TA. Long-term predictors of subsequent cardiovascular events with coronary artery disease and 'desirable' levels of plasma total cholesterol. *Circulation*. 1992;86(4):1165-70.
10. Pekkanen J, Linn S, Heiss G, Suchindran CM, Leon A, Rifkind BM, et al. Ten-year mortality from cardiovascular disease in relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1990;322(24):1700-7.
11. Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, Maroni J, Szarek M, Grundy SM, et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. *N Engl J Med*. 2007;357(13):1301-10.
12. Ouimet M, Barrett TJ, Fisher EA. HDL and Reverse Cholesterol Transport. *Circ Res*. 2019;124(10):1505-18.

13. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med.* 2007;357(21):2109-22.
14. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, et al. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2012;367(22):2089-99.
15. Voight BF, Peloso GM, Orho-Melander M, Frikke-Schmidt R, Barbalic M, Jensen MK, et al. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet.* 2012;380(9841):572-80.
16. Tanigawa H, Billheimer JT, Tohyama J, Zhang Y, Rothblat G, Rader DJ. Expression of cholesteryl ester transfer protein in mice promotes macrophage reverse cholesterol transport. *Circulation.* 2007;116(11):1267-73.
17. Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2870-4.
18. Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(3):721-7.
19. Takiguchi S, Ayaori M, Yakushiji E, Nishida T, Nakaya K, Sasaki M, et al. Hepatic Overexpression of Endothelial Lipase Lowers High-Density Lipoprotein but Maintains Reverse Cholesterol Transport in Mice: Role of Scavenger Receptor Class B Type I/ATP-Binding Cassette Transporter A1-Dependent Pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(7):1454-67.
20. Hovingh GK, de Groot E, van der Steeg W, Boekholdt SM, Hutten BA, Kuivenhoven JA, et al. Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16(2):139-45.
21. Nakaya K, Ayaori M, Uto-Kondo H, Sotherden GM, Nishida T, Katamoto H, et al. Overexpression of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 in macrophages promotes reverse cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(8):1402-11.
22. Nie S, Chen G, Cao X, Zhang Y. Cerebrotendinous xanthomatosis: a comprehensive review of pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and management. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:179.
23. Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol.* 2004;40(3):539-51.
24. Rizzolo D, Buckley K, Kong B, Zhan L, Shen J, Stofan M, et al. Bile Acid Homeostasis in a Cholesterol 7 α -Hydroxylase and Sterol 27-Hydroxylase Double

Knockout Mouse Model. *Hepatology*. 2019;70(1):389-402.

25. Song C, Liao S. Cholestenic acid is a naturally occurring ligand for liver X receptor alpha. *Endocrinology*. 2000;141(11):4180-4.

26. Szanto A, Benko S, Szatmari I, Balint BL, Furtos I, Ruhl R, et al. Transcriptional regulation of human CYP27 integrates retinoid, peroxisome proliferator-activated receptor, and liver X receptor signaling in macrophages. *Mol Cell Biol*. 2004;24(18):8154-66.

27. Chen W, Chen G, Head DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab*. 2007;5(1):73-9.

28. Basso F, Freeman L, Knapper CL, Remaley A, Stonik J, Neufeld EB, et al. Role of the hepatic ABCA1 transporter in modulating intrahepatic cholesterol and plasma HDL cholesterol concentrations. *J Lipid Res*. 2003;44(2):296-302.

29. Singaraja RR, Visscher H, James ER, Chroni A, Coutinho JM, Brunham LR, et al. Specific mutations in ABCA1 have discrete effects on ABCA1 function and lipid phenotypes both in vivo and in vitro. *Circ Res*. 2006;99(4):389-97.

30. Bi X, Zhu X, Duong M, Boudyguina EY, Wilson MD, Gebre AK, et al. Liver ABCA1 deletion in LDLrKO mice does not impair macrophage reverse cholesterol transport or exacerbate atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33(10):2288-96.

31. Bashore AC, Liu M, Key CC, Boudyguina E, Wang X, Carroll CM, et al. Targeted Deletion of Hepatocyte Abca1 Increases Plasma HDL (High-Density Lipoprotein) Reverse Cholesterol Transport via the LDL (Low-Density Lipoprotein) Receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(9):1747-61.

32. Calpe-Berdiel L, Rotllan N, Fievet C, Roig R, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC. Liver X receptor-mediated activation of reverse cholesterol transport from macrophages to feces in vivo requires ABCG5/G8. *J Lipid Res*. 2008;49(9):1904-11.

33. Weingartner O, Laufs U, Bohm M, Lutjohann D. An alternative pathway of reverse cholesterol transport: the oxysterol 27-hydroxycholesterol. *Atherosclerosis*. 2010;209(1):39-41.

34. von Bahr S, Movin T, Papadogiannakis N, Pikuleva I, Ronnow P, Diczfalusy U, et al. Mechanism of accumulation of cholesterol and cholestanol in tendons and the role of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(7):1129-35.

35. Babiker A, Andersson O, Lund E, Xiu RJ, Deeb S, Reshef A, et al. Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26253-61.

36. Mukhamedova N, Escher G, D'Souza W, Tchoua U, Grant A, Krozowski Z, et al.

Enhancing apolipoprotein A-I-dependent cholesterol efflux elevates cholesterol export from macrophages in vivo. *J Lipid Res.* 2008;49(11):2312-22.

37. Smith TA, Idamakanti N, Rollence ML, Marshall-Neff J, Kim J, Mulgrew K, et al. Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences in vivo gene transfer in mice. *Hum Gene Ther.* 2003;14(8):777-87.

38. Waddington SN, McVey JH, Bhella D, Parker AL, Barker K, Atoda H, et al. Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer. *Cell.* 2008;132(3):397-409.

39. Infante RE, Wang ML, Radhakrishnan A, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(40):15287-92.

40. Storch J, Xu Z. Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1791(7):671-8.

41. Vanier MT, Millat G. Niemann-Pick disease type C. *Clin Genet.* 2003;64(4):269-81.

42. Pentchev PG, Comly ME, Kruth HS, Vanier MT, Wenger DA, Patel S, et al. A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(23):8247-51.

43. Choi HY, Karten B, Chan T, Vance JE, Greer WL, Heidenreich RA, et al. Impaired ABCA1-dependent lipid efflux and hypoalphalipoproteinemia in human Niemann-Pick type C disease. *J Biol Chem.* 2003;278(35):32569-77.

44. Boadu E, Nelson RC, Francis GA. ABCA1-dependent mobilization of lysosomal cholesterol requires functional Niemann-Pick C2 but not Niemann-Pick C1 protein. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1821(3):396-404.

45. Yamanashi Y, Takada T, Yoshikado T, Shoda J, Suzuki H. NPC2 regulates biliary cholesterol secretion via stimulation of ABCG5/G8-mediated cholesterol transport. *Gastroenterology.* 2011;140(5):1664-74.

46. Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, et al. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest.* 2006;116(4):1052-62.

47. Yokoyama S. ABCA1 and biogenesis of HDL. *J Atheroscler Thromb.* 2006;13(1):1-15.

48. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, et al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet.* 1999;21(4):424-8.

49. Hirata K, Dichek HL, Cioffi JA, Choi SY, Leeper NJ, Quintana L, et al. Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J Biol Chem.* 1999;274(20):14170-5.

50. Zhang Y, Breevoort SR, Angdisen J, Fu M, Schmidt DR, Holmstrom SR, et al. Liver LXRA expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse

cholesterol transport in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(5):1688-99.

51. Dijkers A, de Boer JF, Groen AK, Tietge UJ. Hepatic ABCG5/G8 overexpression substantially increases biliary cholesterol secretion but does not impact in vivo macrophage-to-feces RCT. *Atherosclerosis.* 2015;243(2):402-6.

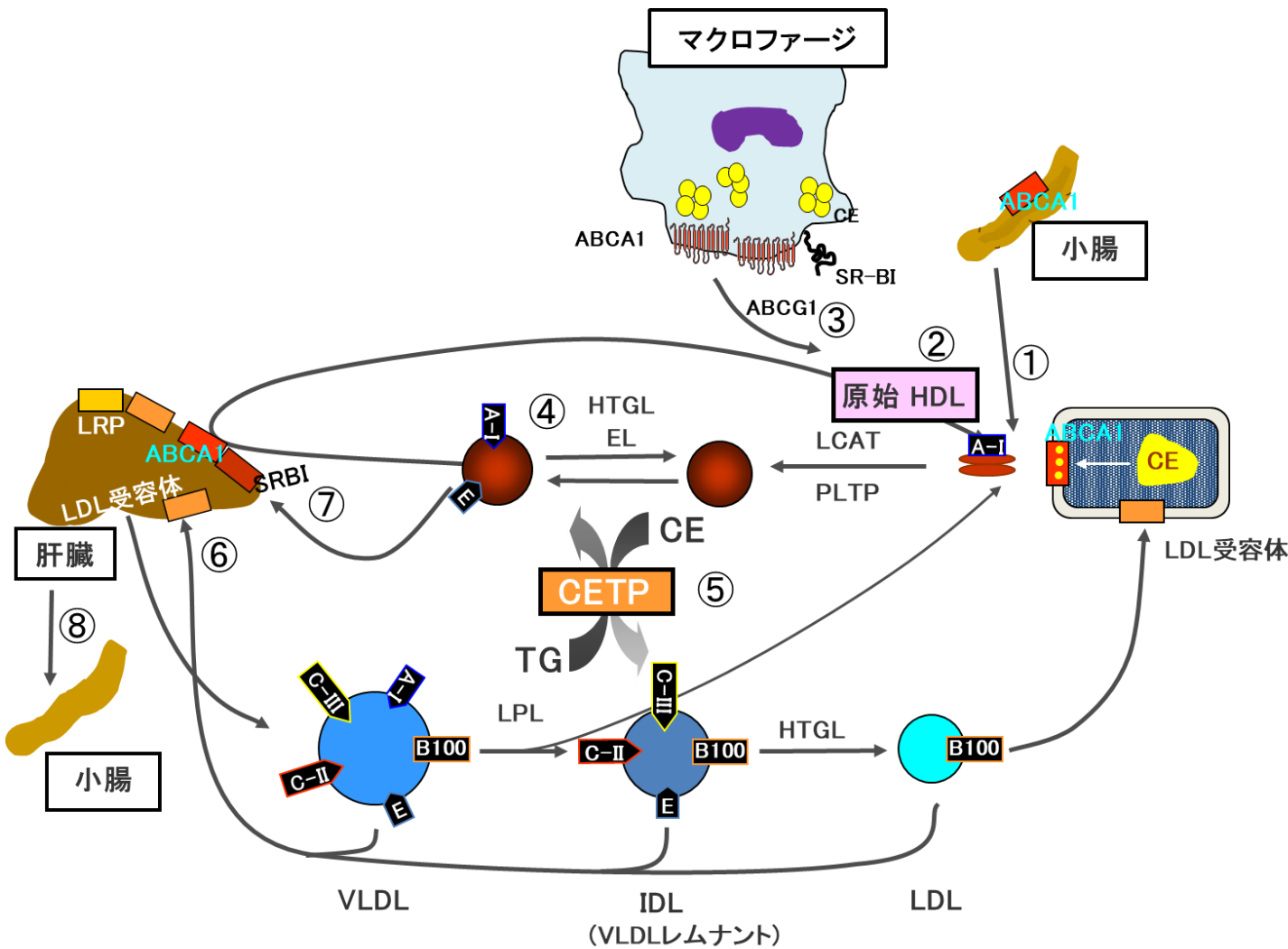


図1 コレステロール逆転送におけるHDLの役割

CE: コレステロールエステル、TG: トリグリセリド、LRP: LDL受容体関連蛋白、SR-BI: スカベンジャー受容体クラスBタイプ1、ABCA1; ATP結合カセットトランスポーターA1、ABCG1: ATP結合カセットトランスポーターG1、LPL: リポタンパクリパーゼ、HTGL: 肝性トリグリセリドリパーゼ、LCAT: レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ、PLTP: リン脂質転送蛋白、CETP: コレステリルエステル転送タンパク、EL: 血管内皮リパーゼ、VLDL: 超低比重リポタンパク、LDL: 低比重リポタンパク、IDL: 中間比重リポタンパク、HDL: 高比重リポタンパク

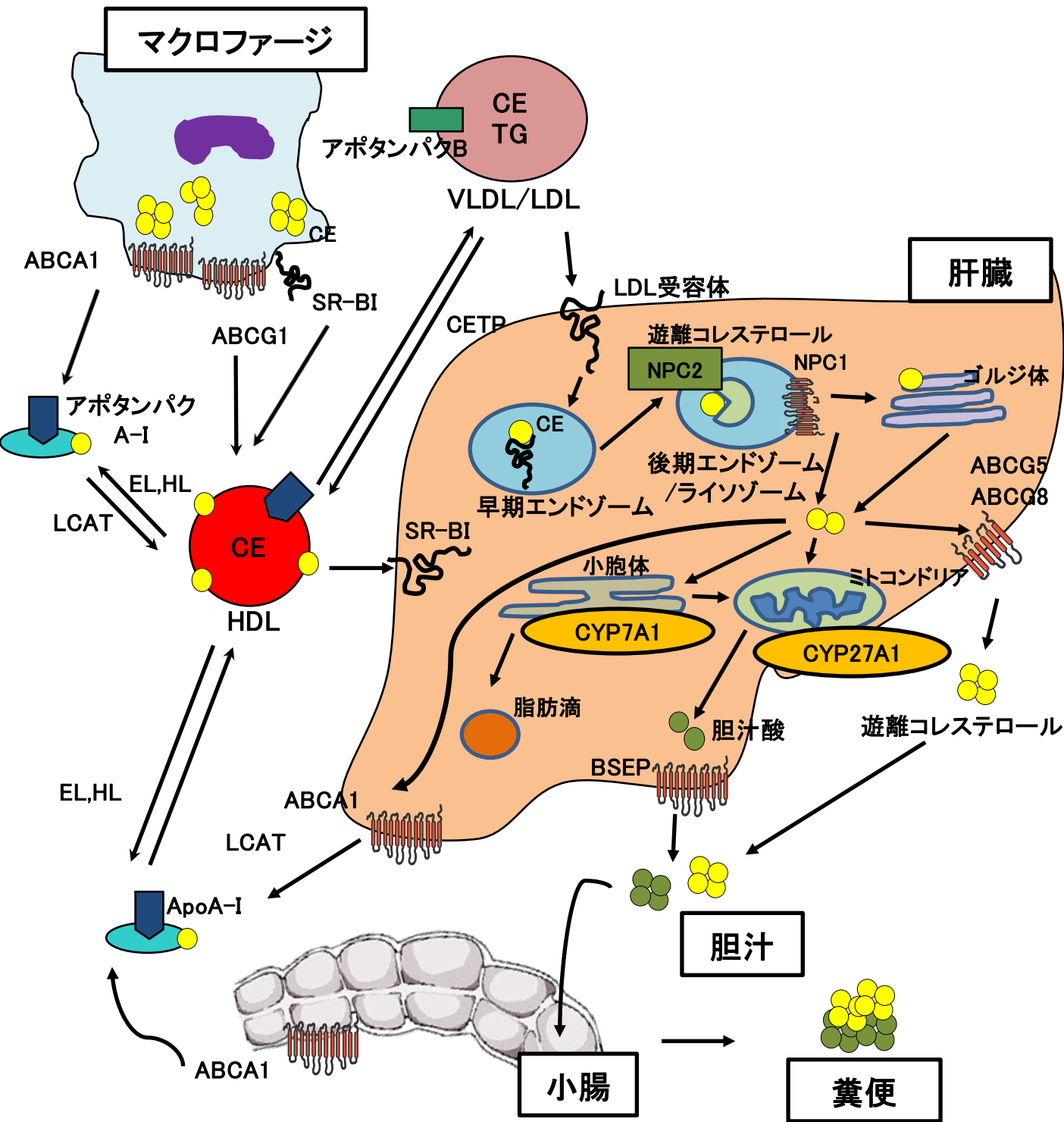


図2 コレステロール逆転送とCYP27A1/NPC2の関係
 ABCA1: ATP結合カセットトランスポーターA1、ABCG1: ATP結合カセットトランスポーターG1、ABCG5: ATP結合カセットトランスポーターG5、ABCG8: ATP結合カセットトランスポーターG8、BSEP: 胆汁酸塩排泄ポンプ、CE: コレステリルエステル、SR-BI:スカベンジャー受容体クラスBタイプ1、LCAT: レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ、EL: 血管内皮リパーゼ、HL: 肝性リパーゼ、CETP:コレステリルエステル転送タンパク、SREBP2:ステロール調節エレメント結合タンパク、CYP7A1:コレステロール7 α -ヒドロキシラーゼ、CYP27A1:コレステロール27 α -ヒドロキシラーゼ、CE: コレステロールエステル、TG: トリグリセリド、VLDL: 超低比重リポタンパク、LDL: 低比重リポタンパク、HDL: 高比重リポタンパク

古典的経路

代替経路

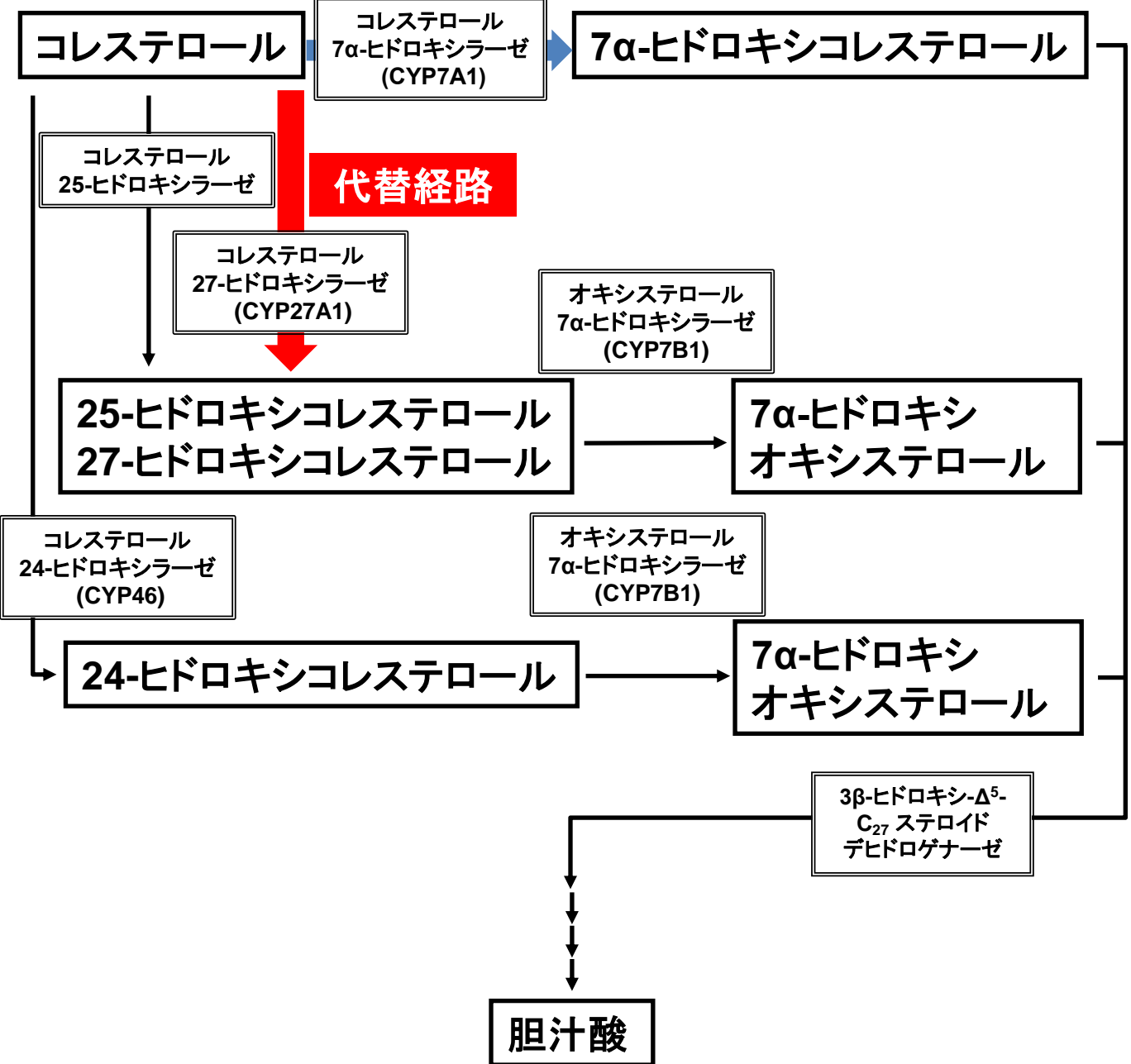


図3 肝臓での胆汁酸合成経路

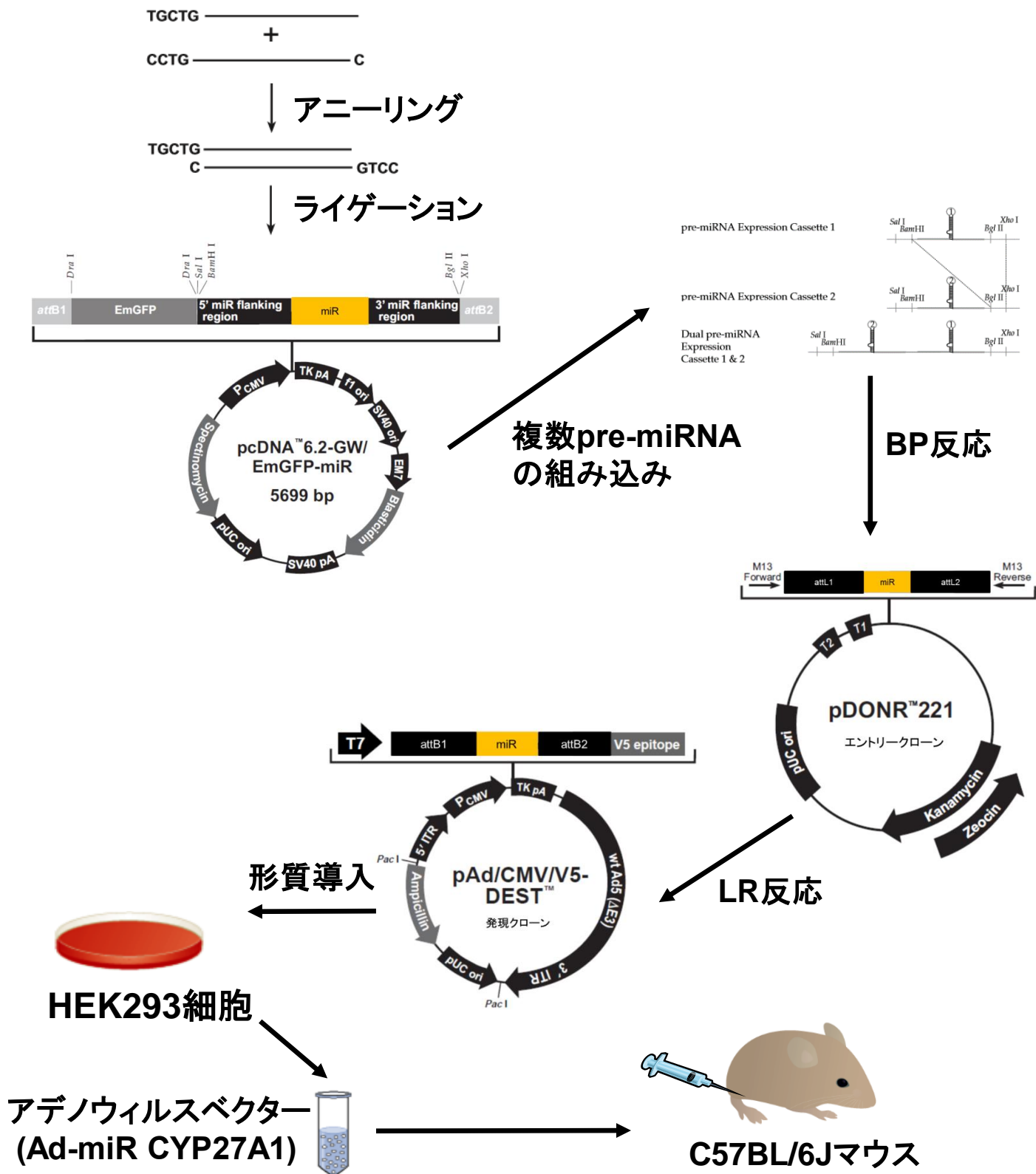


図4 アデノウィルスベクターによるCYP27A1 miRNA発現系の確立

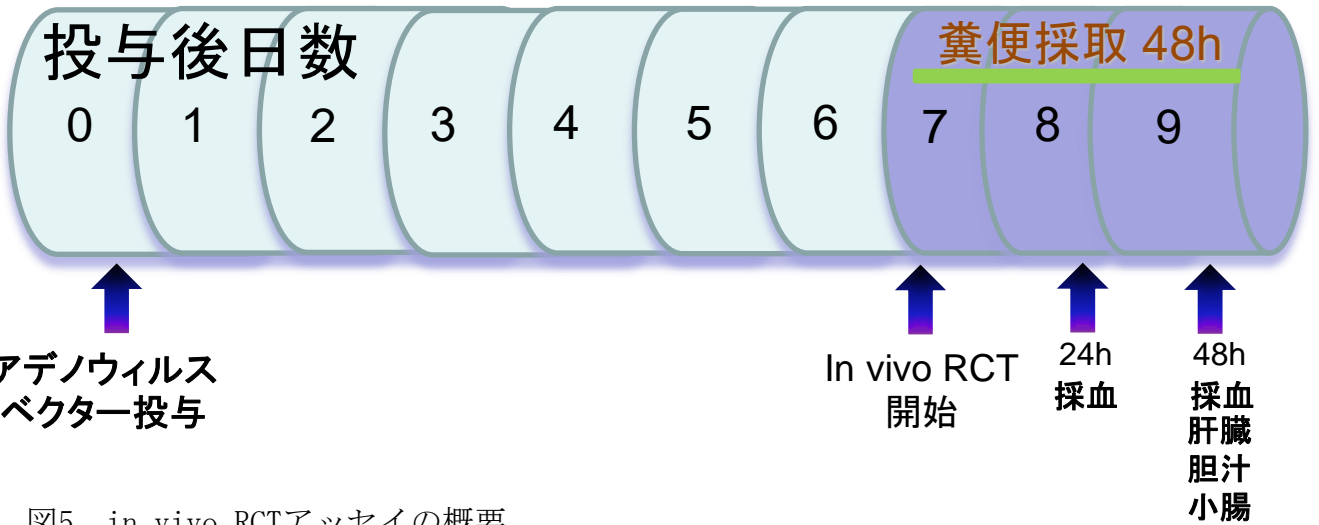
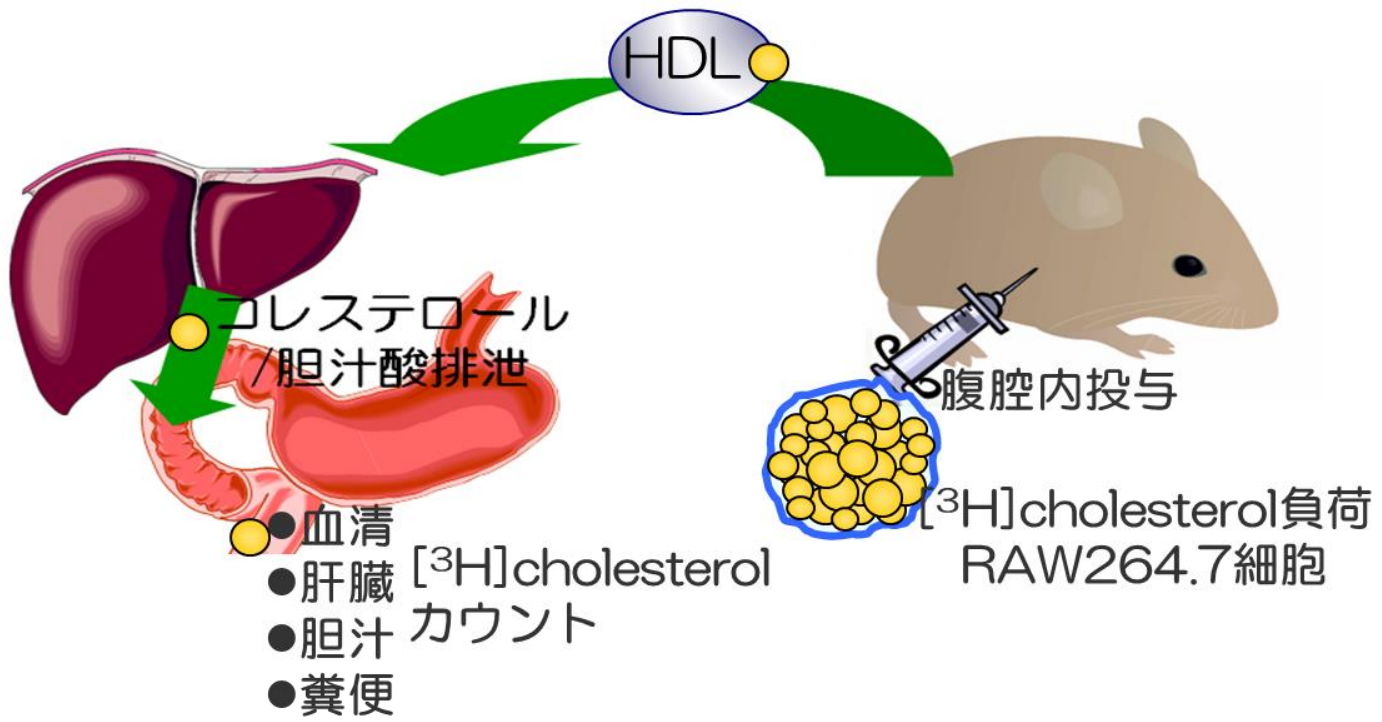


図5 in vivo RCTアッセイの概要

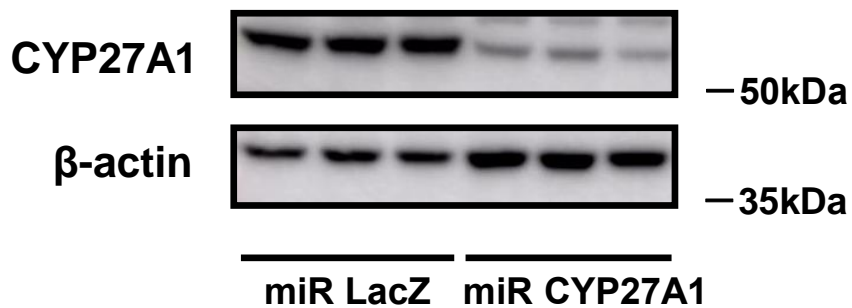


図6 CYP27A1発現抑制アデノウィルスベクター投与によるマウス肝臓のCYP27A1タンパク発現の変化

C57BL/6JマウスにLacZ及びCYP27A1発現抑制 (miR) アデノウィルスベクター (8.3×10^9 IFU) 経静脈投与7日後に肝臓を採取した。方法に示すようにウェスタンブロット解析を行った。

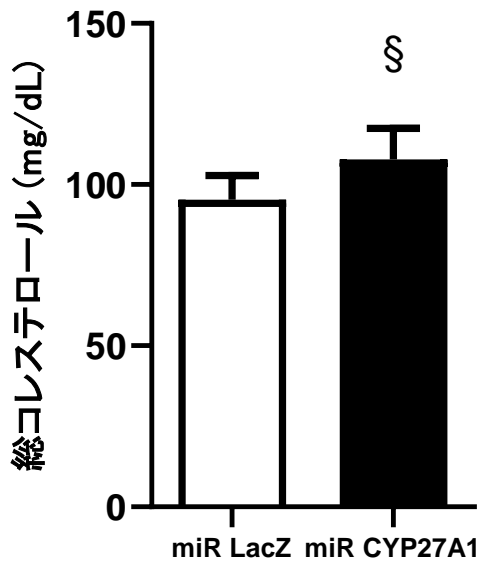
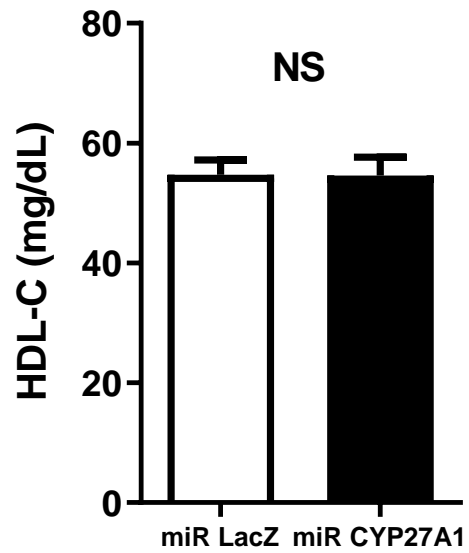
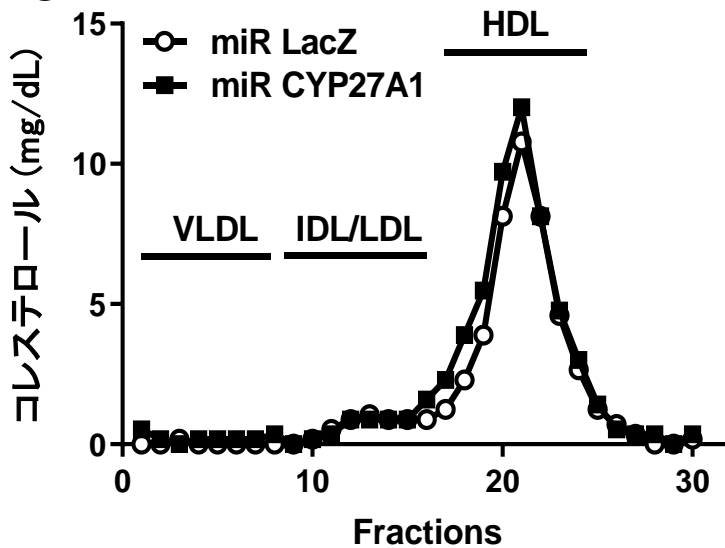
A**B****C**

図7 肝臓CYP27A1の発現抑制がマウス血清脂質濃度に及ぼす影響
 C57BL6JマウスにLacZ (Ad-miR LacZ) および CYP27A1 (Ad-miR CYP27A1) 発現抑制アデノウイルスベクター (8.3×10^9 IFU) 経静脈投与7日後の血清脂質濃度を測定した (A, B)。Ad-miR LacZ投与群は7サンプル、Ad-miR CYP27A1投与群は8サンプルの平均と標準誤差として表した。また、方法に示すようにプール血清をFPLCを用いてリポタンパク分画を分離し、そのコレステロール濃度を測定した (C)。§ $P < 0.05$

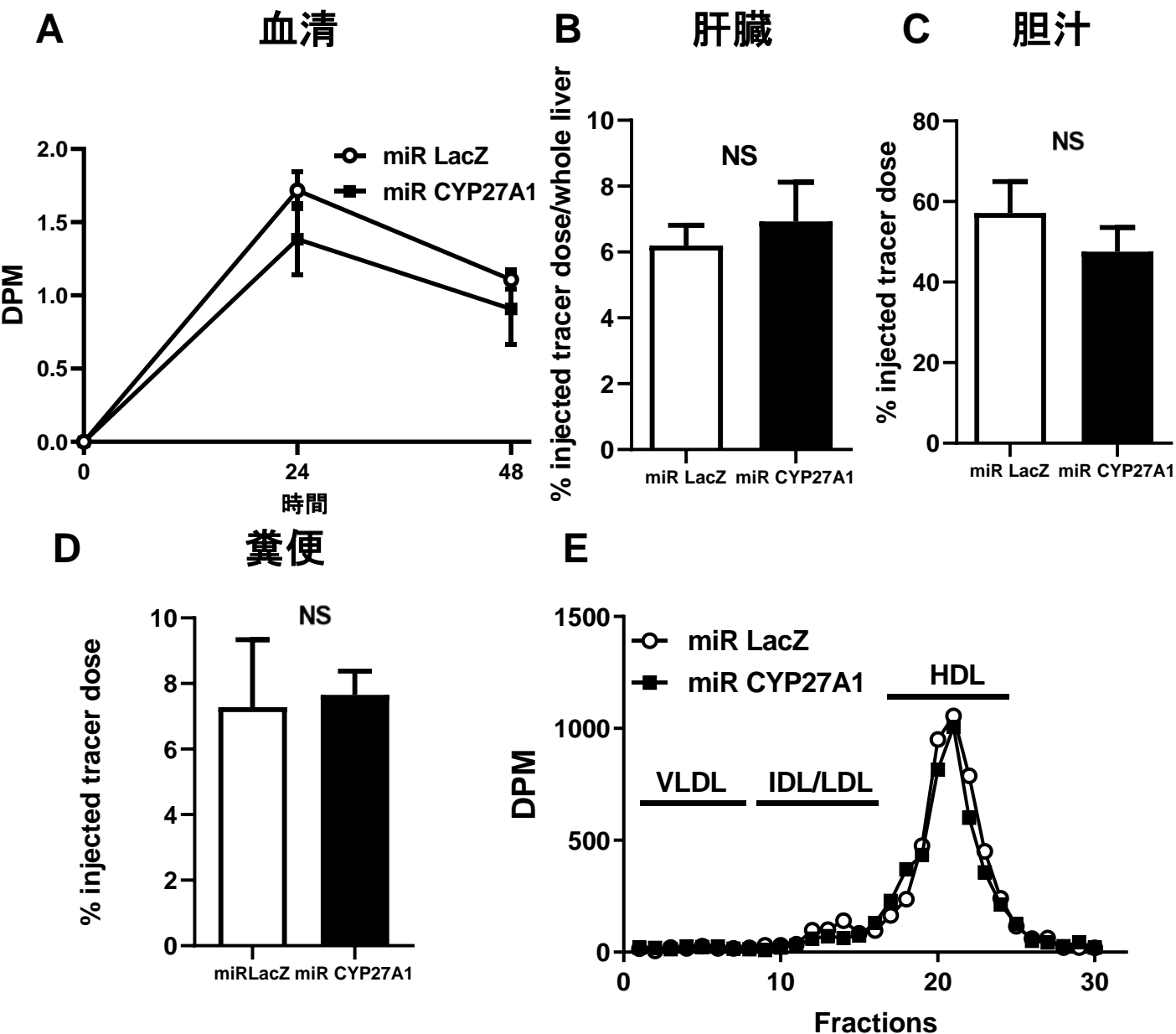


図8 肝臓CYP27A1の発現抑制がRCTに及ぼす影響
 C57BL6JマウスにAd-miR LacZおよびAd-miR CYP27A1 (8.3×10^9 IFU) 経静脈投与7日後、 $[^3\text{H}]$ -コレステロールで標識したRAW267.4細胞を腹腔内投与した。血清 (A)を24、48時間後に、肝臓 (B)、胆汁 (C)を48時間後に採取、48時間連続的に糞便 (D)を収集し、それらの $[^3\text{H}]$ 放射活性を測定した。各群のプール血清をFPLCを用いてリポタンパク分画を分離し、それらの $[^3\text{H}]$ 放射活性を測定した (E)。Ad-miR LacZ投与群は9サンプル、Ad-miR CYP27A1投与群は10サンプルの平均と標準誤差として表した。

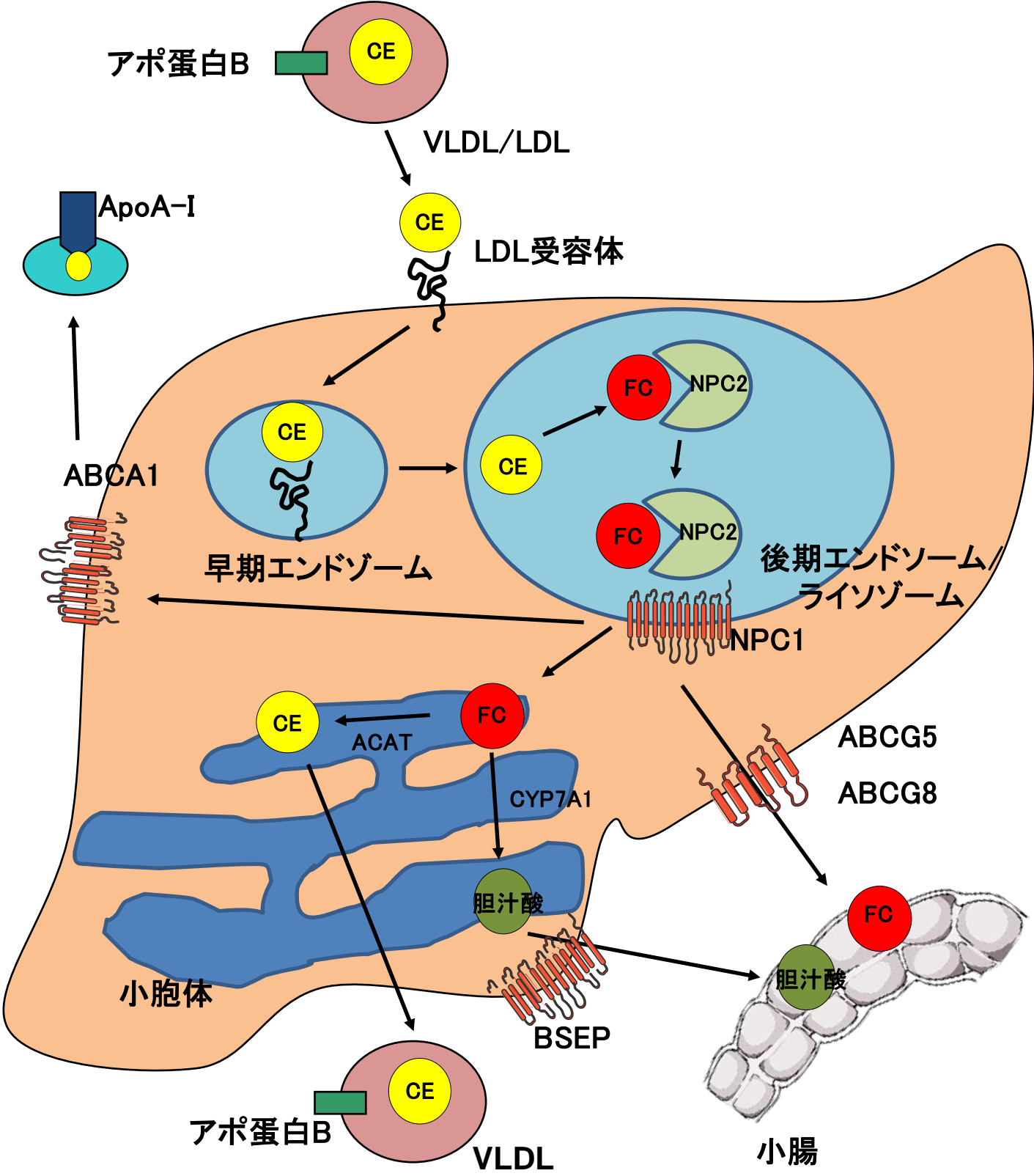
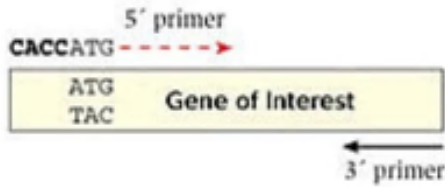
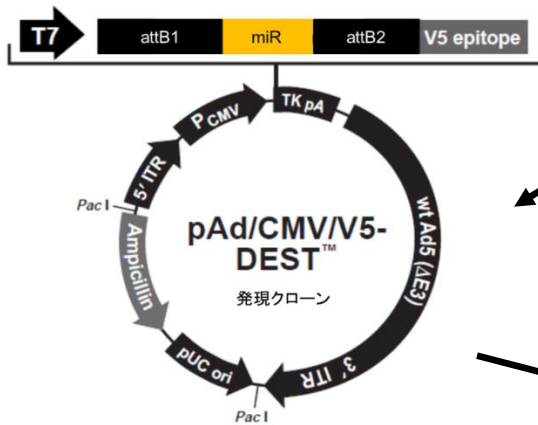
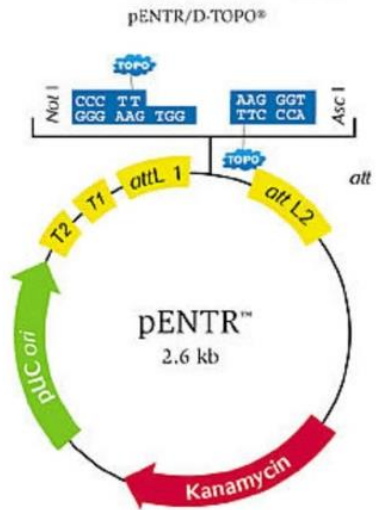


図9 細胞内コレステロール搬送
 CE: コレステリルエステル、FC: 遊離コレステロール、ACAT: CYP7A1:コレステロール7 α -ヒドロキシラーゼ、VLDL: 超低比重リポタンパク、LDL: 低比重リポタンパク、ACAT: アシルCoAコレステロールアシルトランスフェラーゼ、ABCA1: ATP結合カセットトランスポーターA1、ABCG5: ATP結合カセットトランスポーターG5、ABCG8: ATP結合カセットトランスポーターG8、BSEP: 胆汁酸塩排泄ポンプ

マウスNPC2コーディング領域



クローニング反応



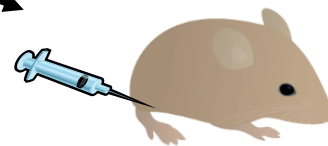
LR反応

形質導入



HEK293細胞

アデノウィルスベクター
(Ad-NPC2)



C57BL/6Jマウス

図10 アデノウィルスベクターによるNPC2過剰発現系の確立

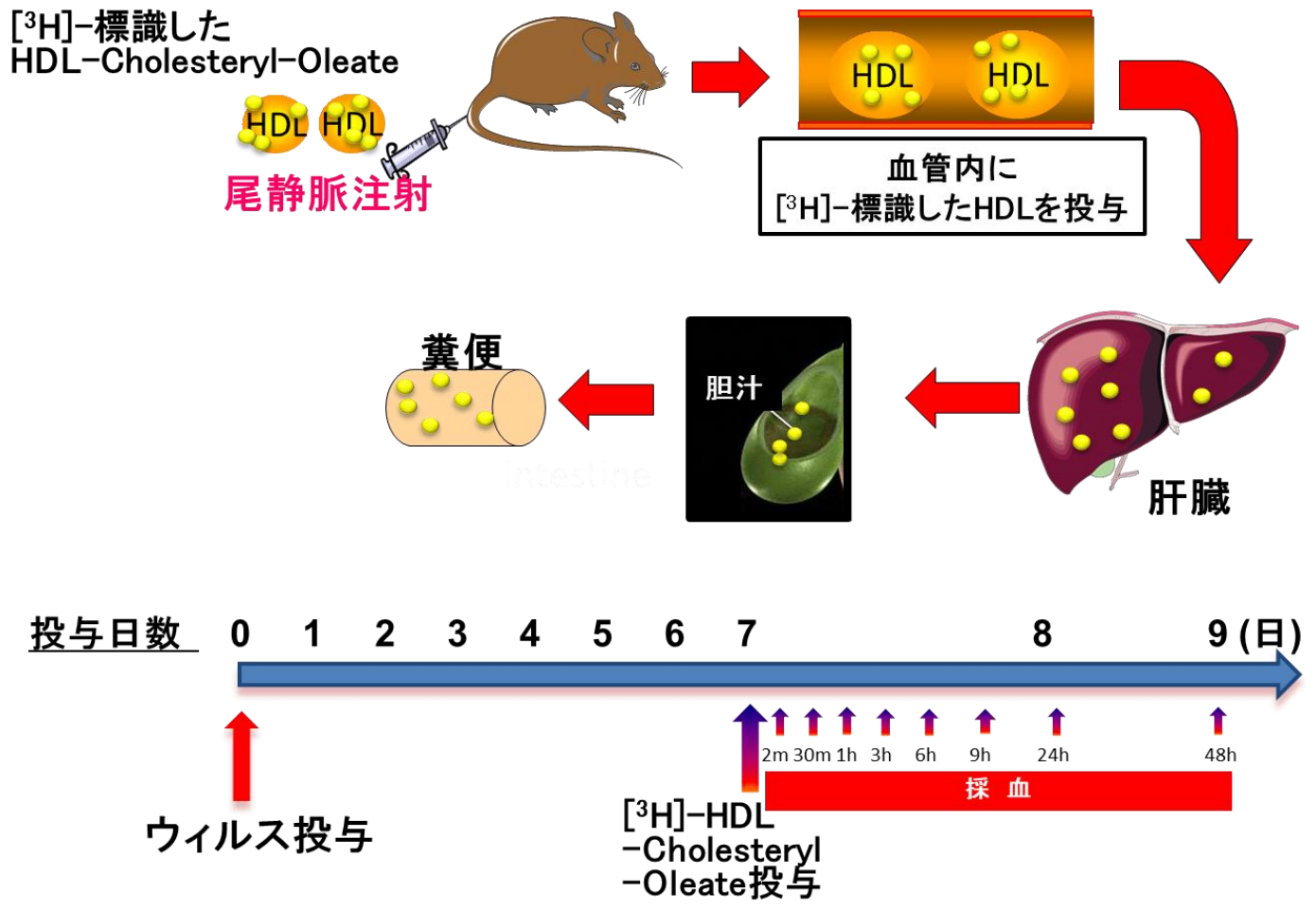


図11 HDL代謝実験の概要

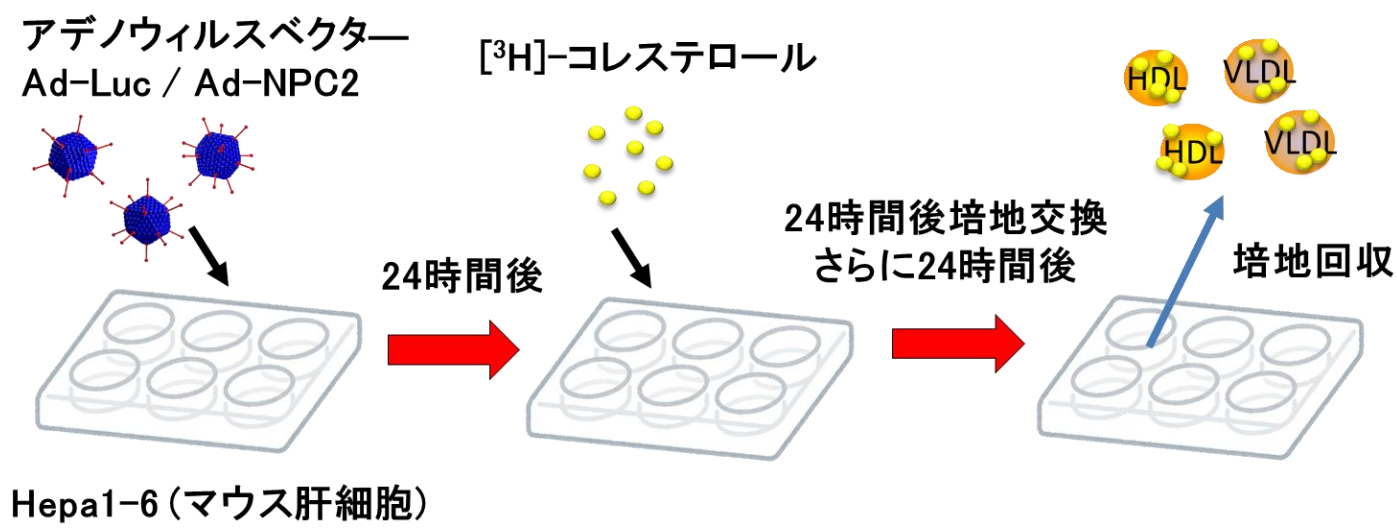


図12 培養肝細胞を用いたリポ蛋白産生実験

intestine

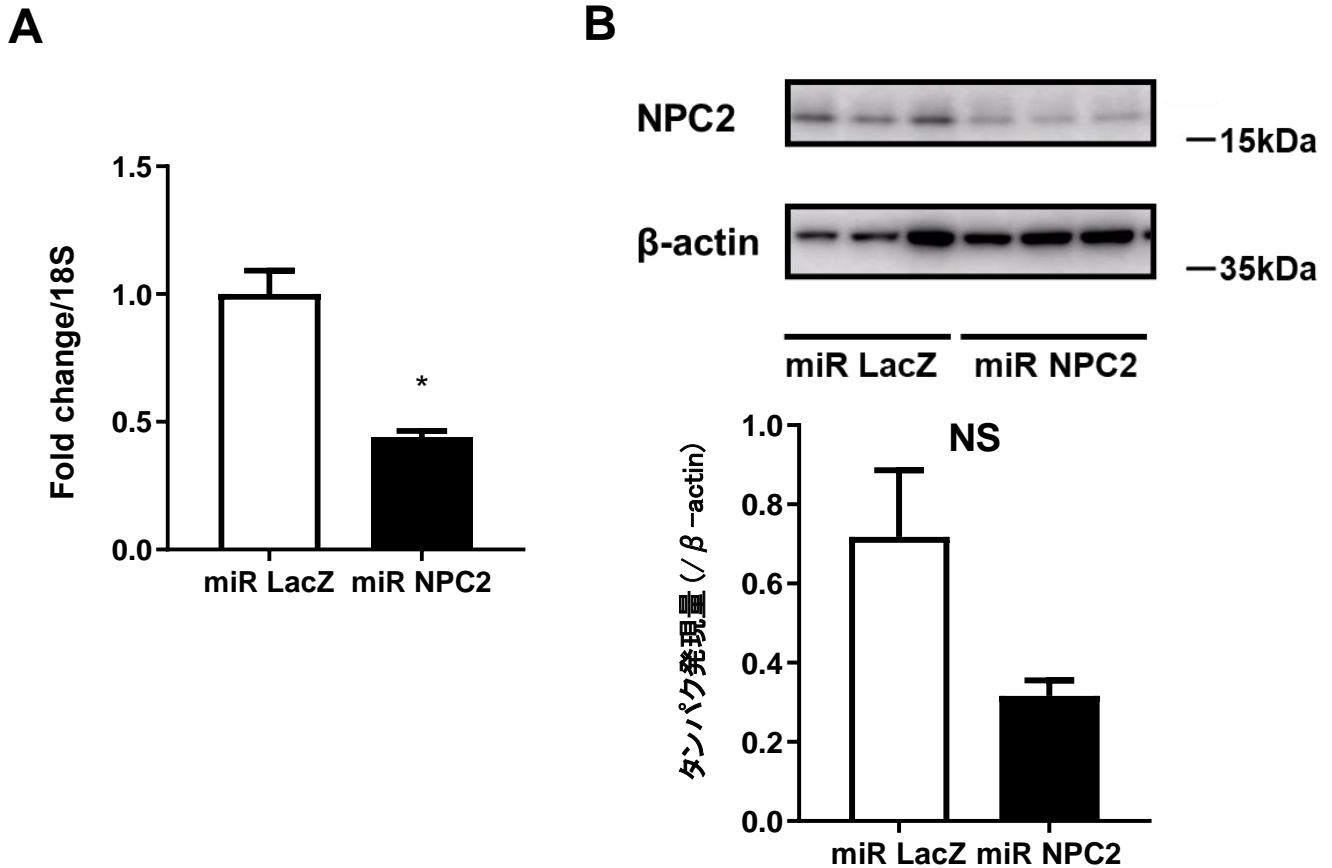


図13 NPC2発現抑制アデノウィルスベクターを投与したマウス肝臓のNPC2 mRNA (A)およびタンパク (B) 発現

C57BL6JマウスにmiR LacZ及びmiR NPC2発現アデノウィルスベクター (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後に肝臓を採取した。方法に示すようにリアルタイムRT-PCRおよびウェスタンブロット解析を行った。mRNAレベルは各群6サンプルの平均と標準誤差として表した。方法のとおりバンドの定量化を行い、 β -actin発現量に対する比を3サンプルの平均と標準誤差として表した。* $p < 0.01$

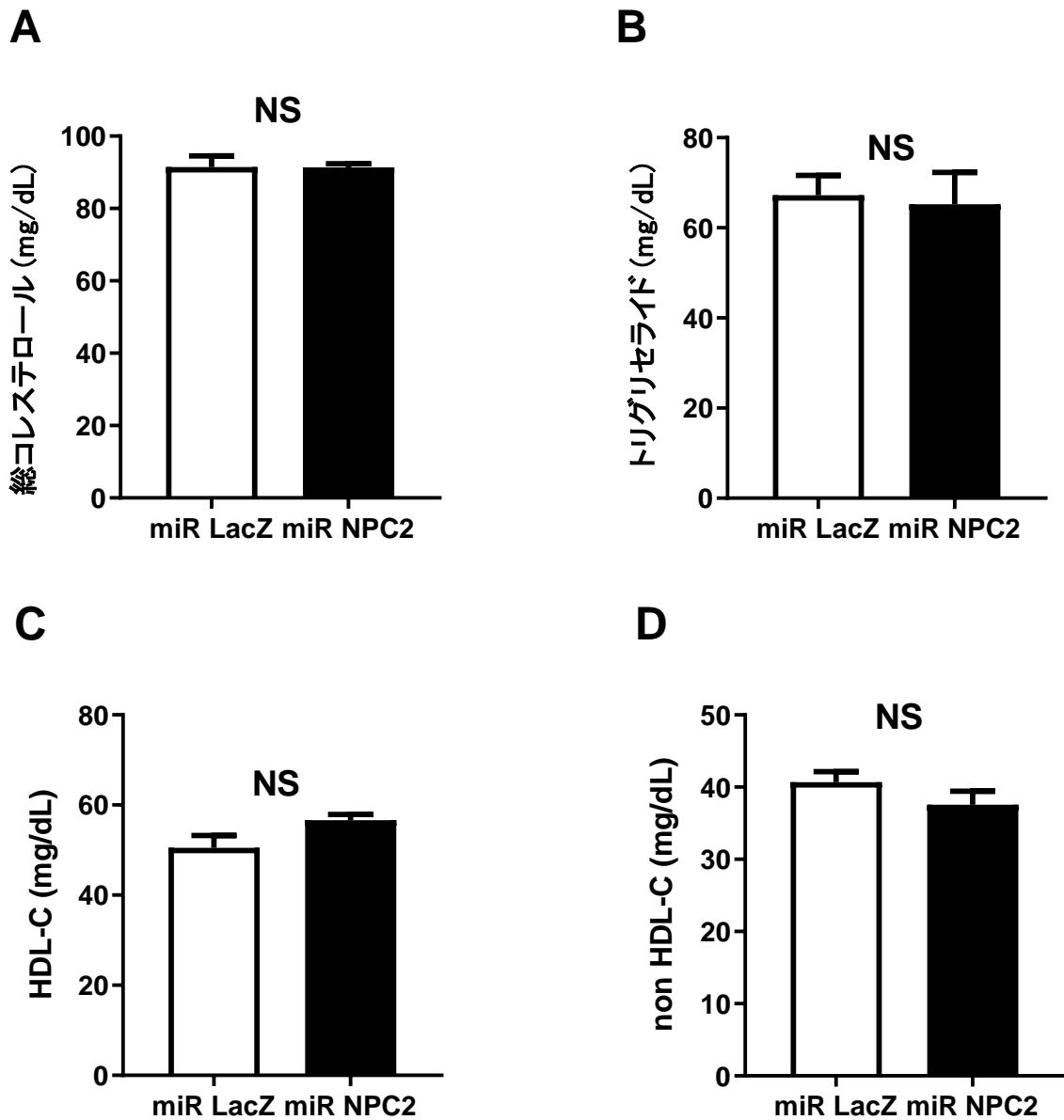


図14 肝臓NPC2発現抑制が血清脂質濃度に及ぼす影響

C57BL/6JマウスにmiR NPC2及びmiR LacZ発現アデノウイルスベクター (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後の血清脂質濃度を測定した。non HDL-C濃度は総コレステロール濃度からHDL-C濃度を差し引いた値とした。Ad-miR LacZ投与群は6サンプル、Ad-miR NPC2投与群は6サンプルの平均と標準誤差として表した。

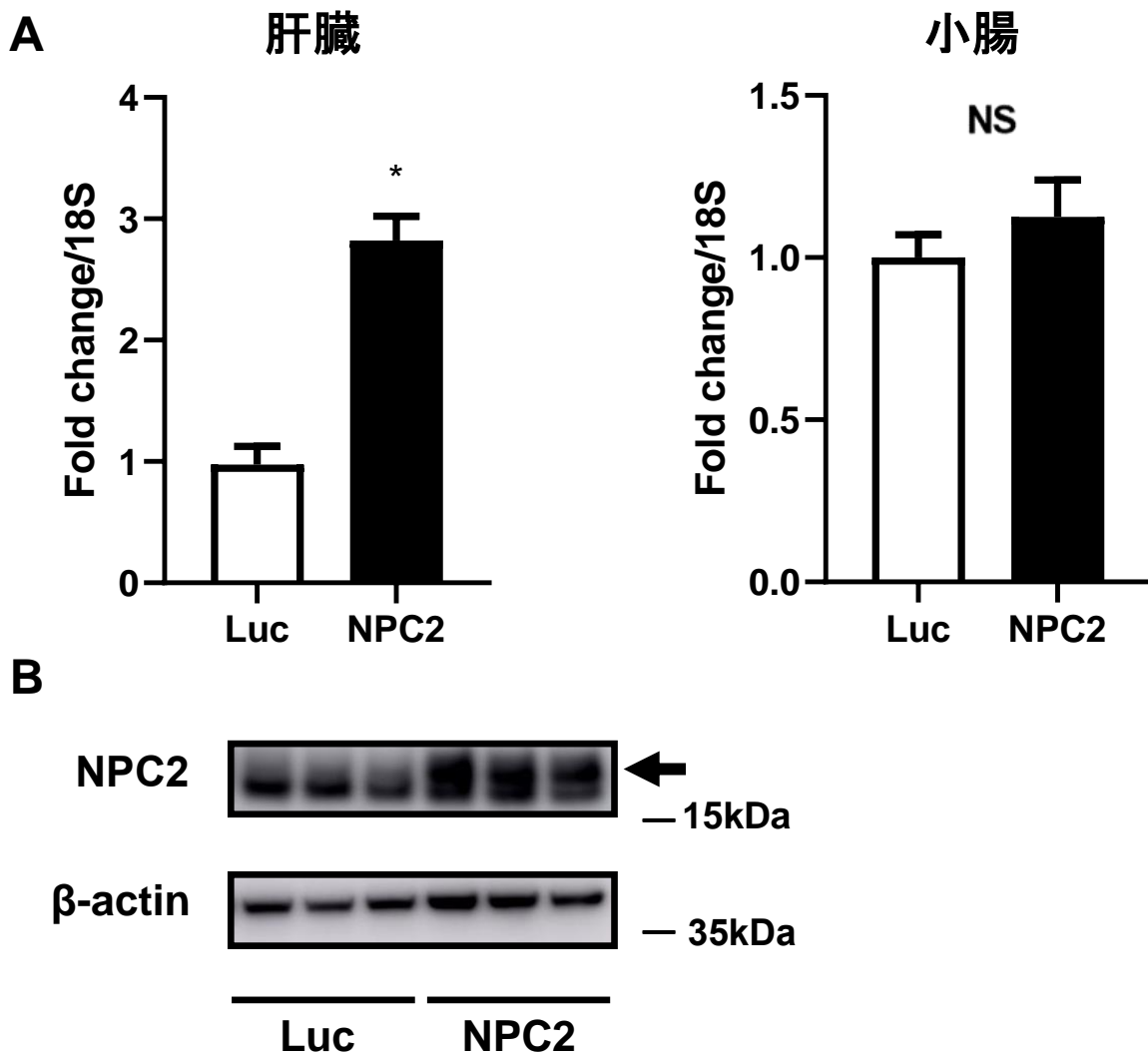


図15 NPC2過剰発現アデノウイルスベクターを投与したマウス肝臓、小腸のmRNA (A)およびNPC2タンパク発現 (B)

C57BL6JマウスにLucおよびNPC2発現アデノウイルスベクター (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後の肝臓を採取した。方法に示すようにリアルタイムRT-PCRおよびウェスタンブロット解析を行った。mRNAレベルはAd-Luc投与群は9サンプル、Ad-NPC2投与群は10サンプルの平均と標準誤差として表した。

* $p < 0.01$

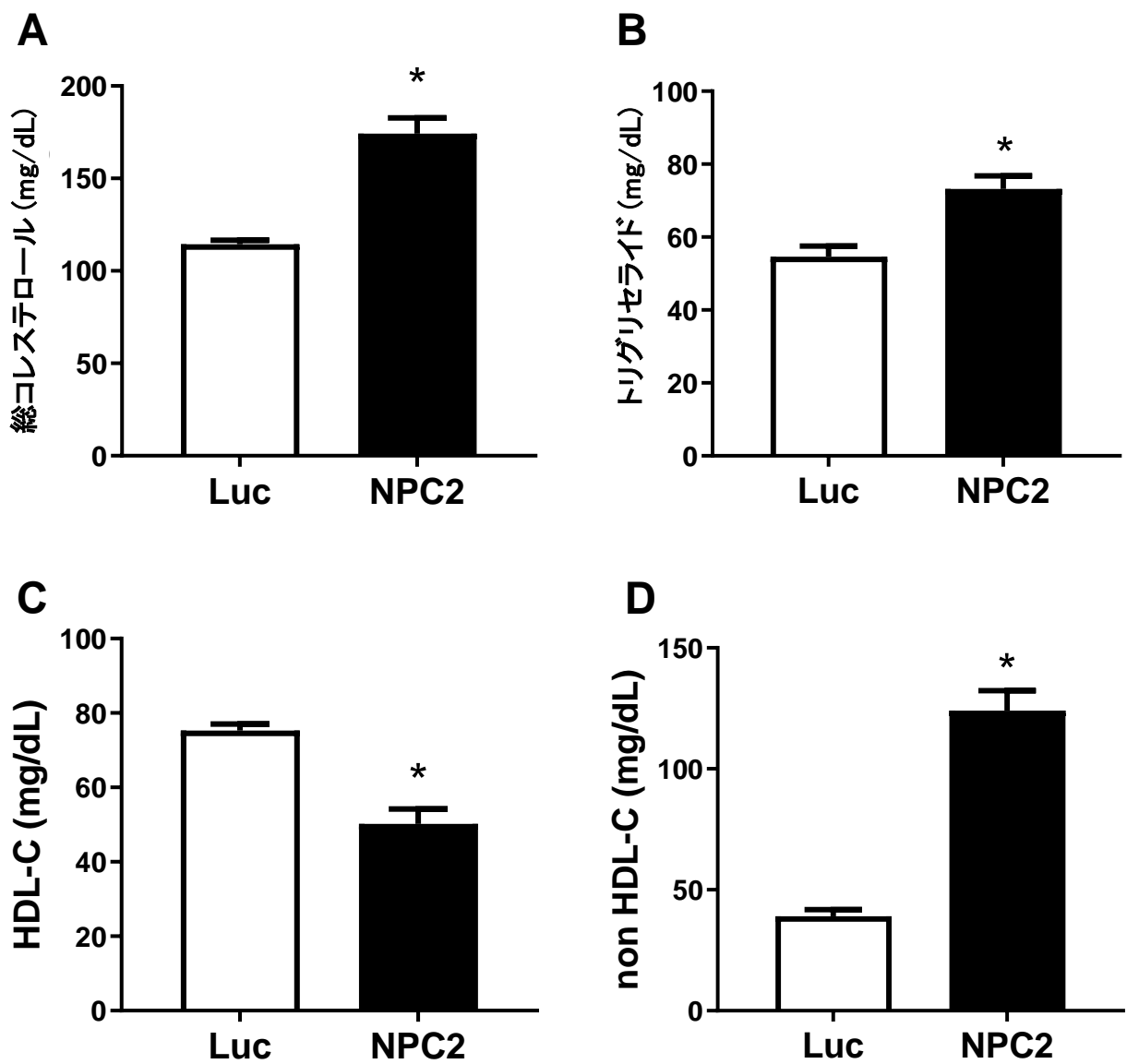


図16 肝臓NPC2過剰発現が血清脂質濃度に及ぼす影響
 C57BL6JマウスにLucおよびNPC2発現アデノウイルスベクター (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後の血清脂質濃度を測定した。non HDL-C濃度は総コレステロール濃度からHDL-C濃度を差し引いた値とした。Ad-Luc投与群は9サンプル、Ad-NPC2投与群は10サンプルの平均と標準誤差として表した。* $P < 0.01$

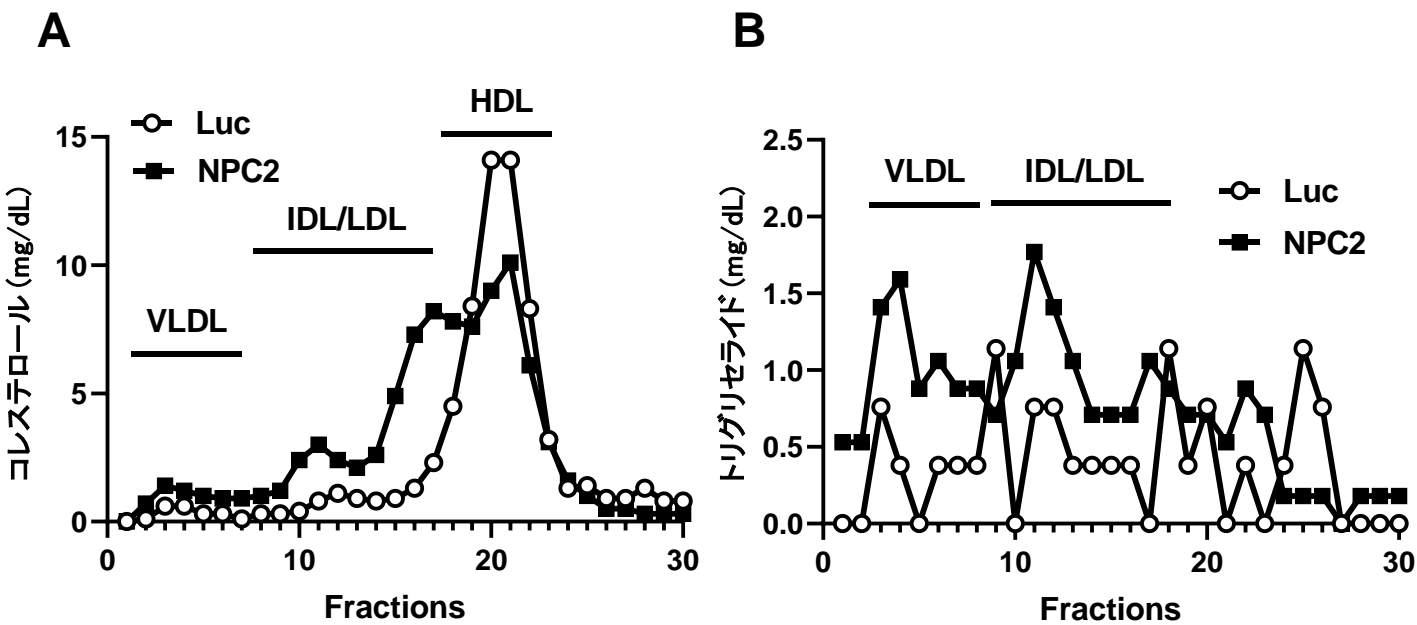


図17 肝臓NPC2過剰発現が血清脂質濃度に及ぼす影響

C57BL6JマウスにLucおよびNPC2発現アデノウィルスベクター (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後に得た血清をプールし (Ad-Luc, n=9; Ad-NPC2, n=10)、FPLCによりリポタンパク分画を分離し、そのコレステロール (A) およびトリグリセライド (B) 濃度を測定した。

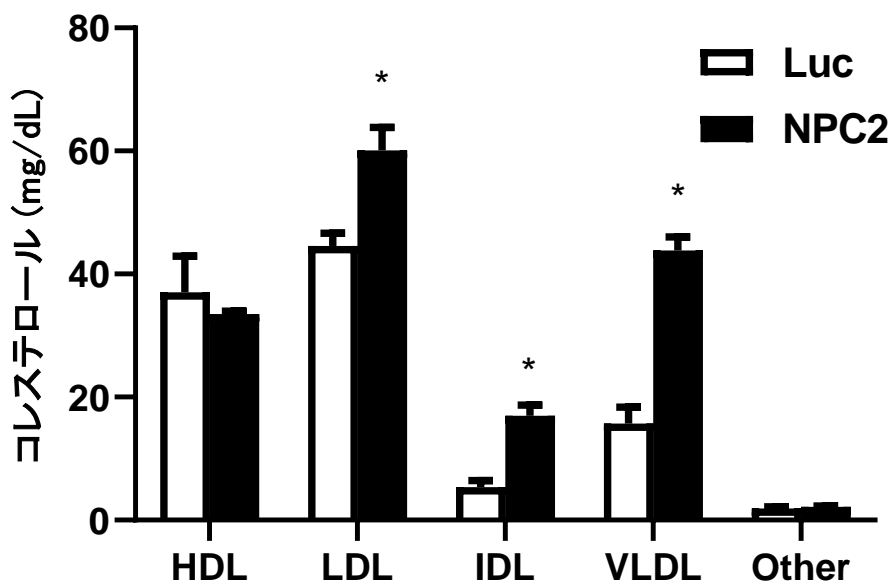


図18 肝臓NPC2過剰発現が血清脂質濃度に及ぼす影響

C57BL6JマウスにLucおよびNPC2発現アデノウイルスベクター (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後に得た血清をHPLCによりリポタンパク分画を分離し、そのコレステロール濃度を測定した。Ad-Luc投与群は4サンプル、Ad-NPC2投与群は4サンプルの平均と標準誤差として表した。* $P < 0.01$

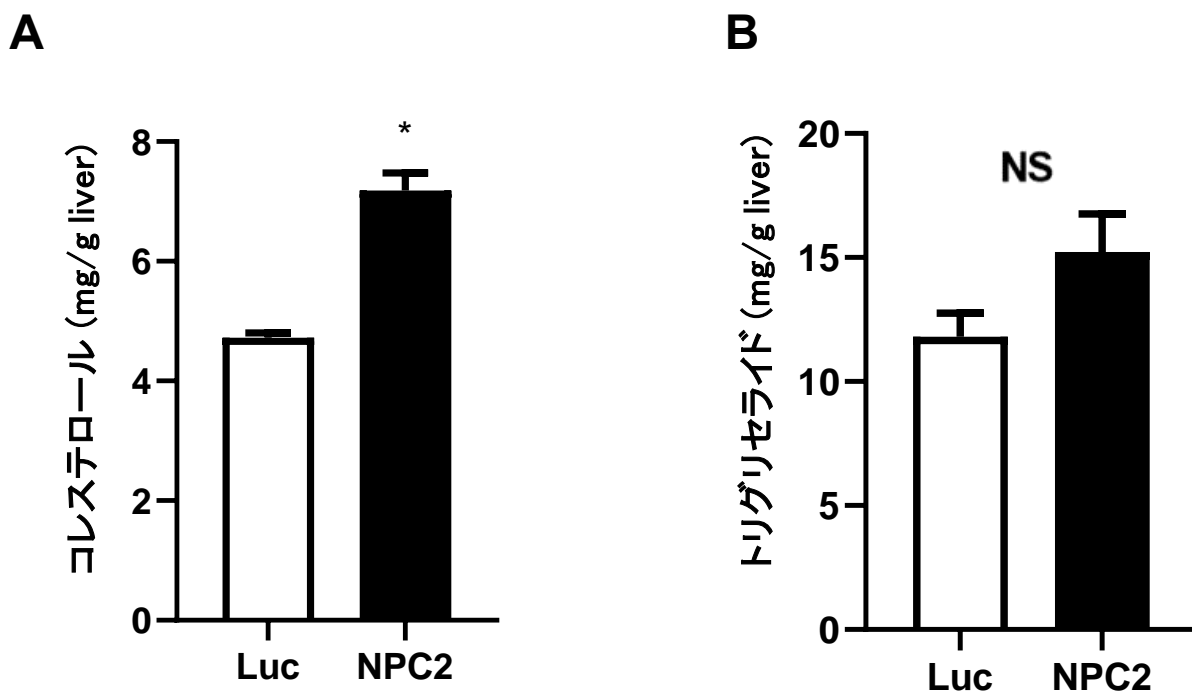


図19 肝臓NPC2過剰発現が肝臓中脂質含量に及ぼす影響
 C57BL6JマウスにLucおよびNPC2発現アデノウィルスベクター (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後に得た肝臓のコレステロール (A) およびトリグリセライド(B)含量を測定した。Ad-Luc投与群、Ad-NPC2投与群は各5サンプルの平均と標準誤差として表した。* $P < 0.01$

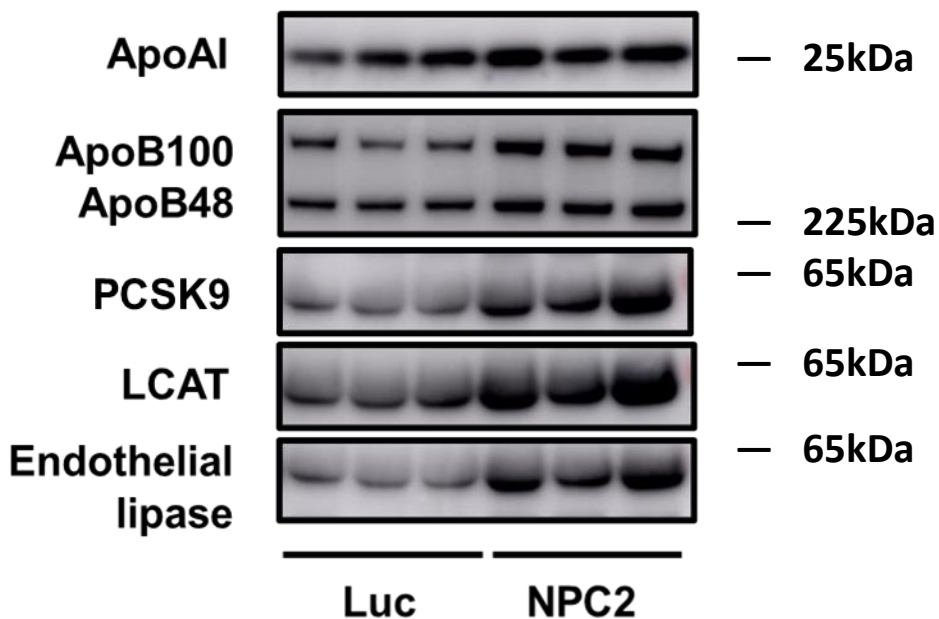


図20 肝臓NPC2過剰発現が血清中のアポ蛋白および脂質代謝関連因子の発現に及ぼす影響
 C57BL6JマウスにLucおよびNPC2発現アデノウィルスベクター (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与
 7日後に得た血清のウェスタンブロット解析を行った。

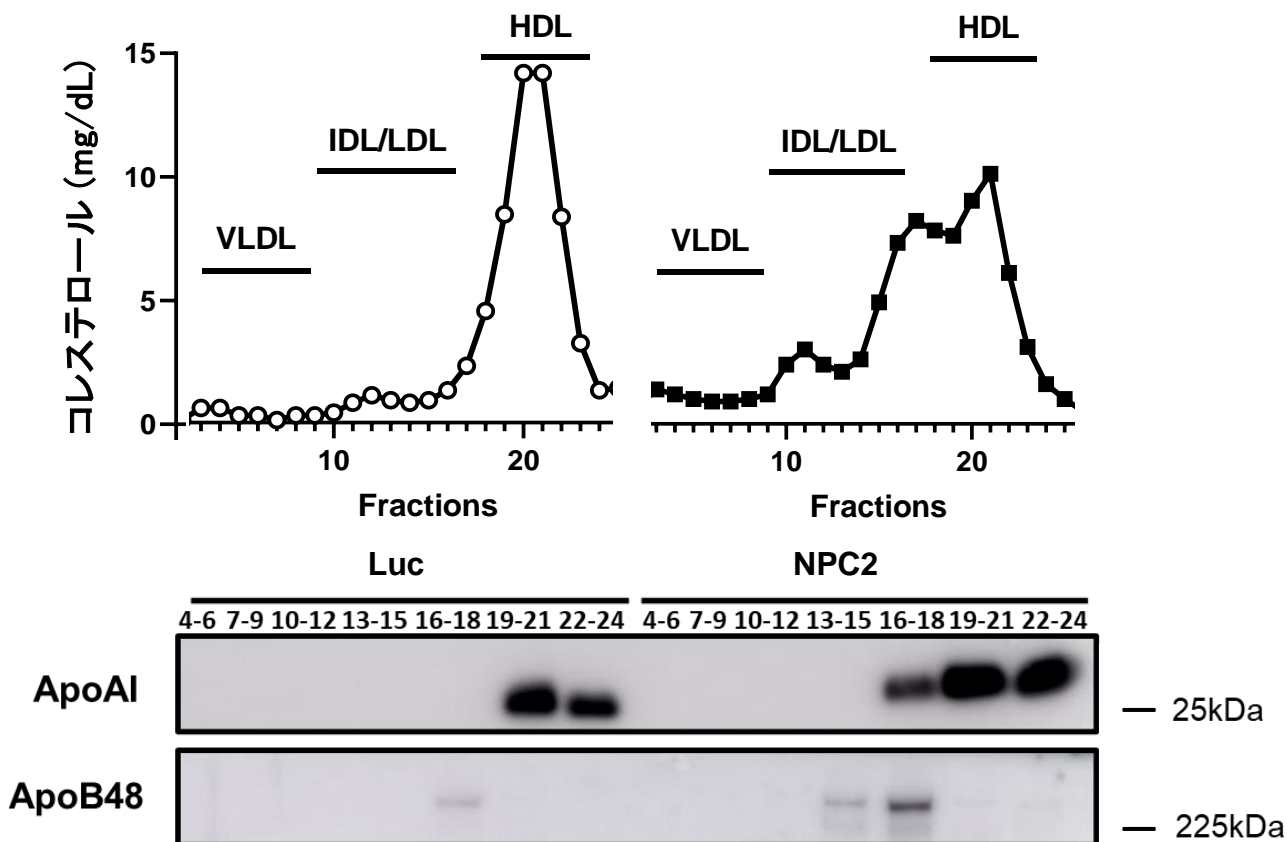


図21 肝臓NPC2過剰発現が血清リポ蛋白およびアポ蛋白に及ぼす影響
 C57BL6JマウスにLucおよびNPC2発現アデノウイルスベクター (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後に得た血清をプールし (Ad-Luc, n=9; Ad-NPC2, n=10)、FPLCによりリポ蛋白分画を分離し、各分画についてウェスタンブロット解析を行った。

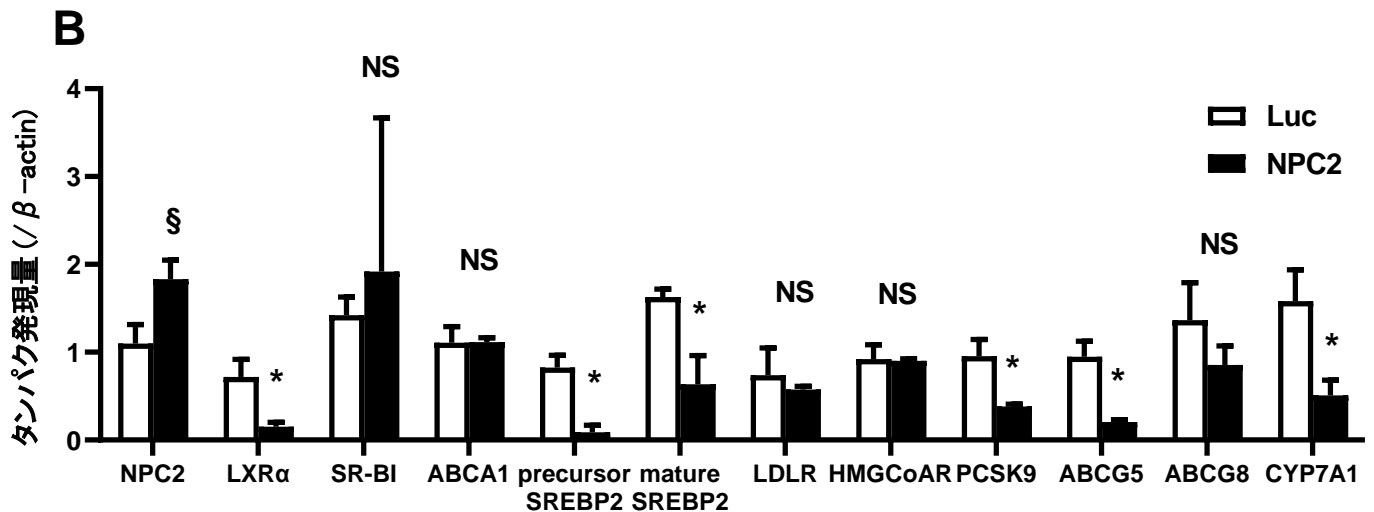
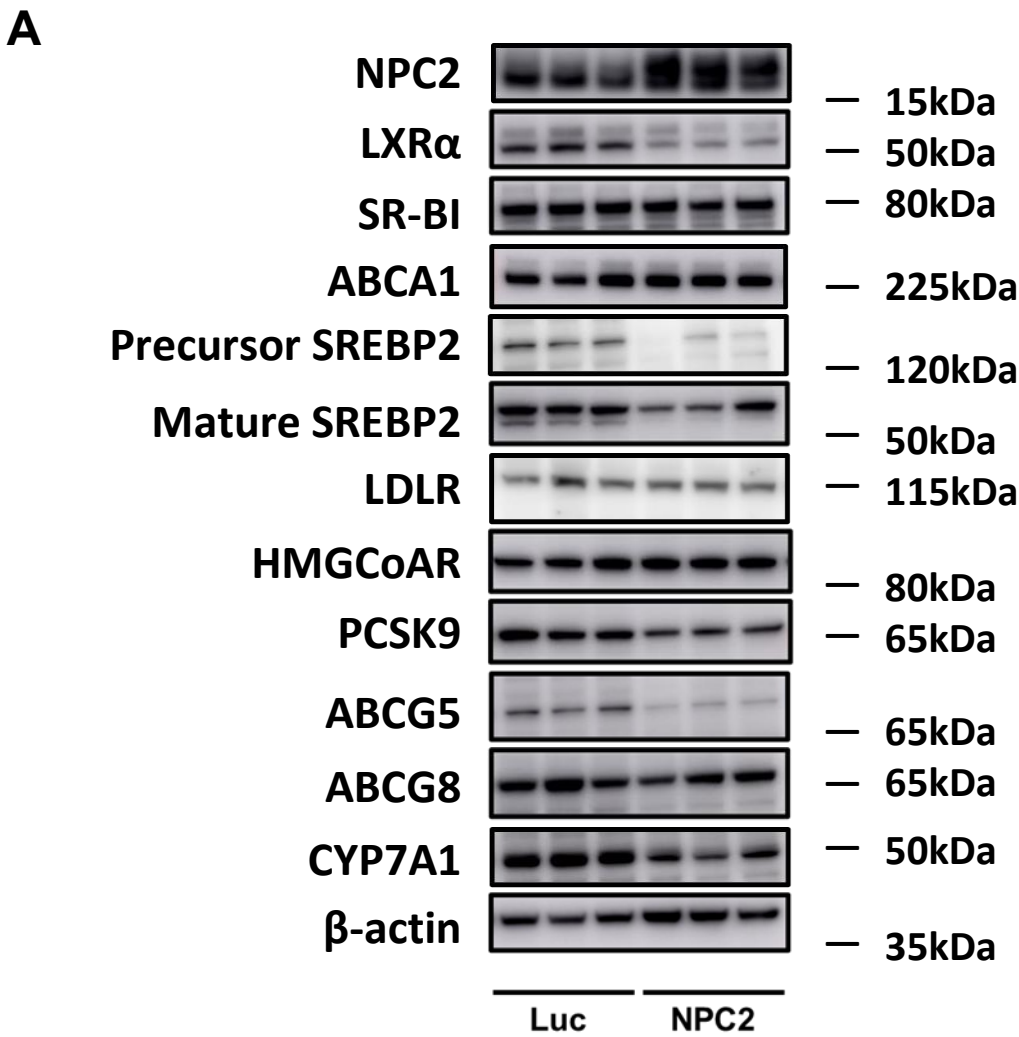
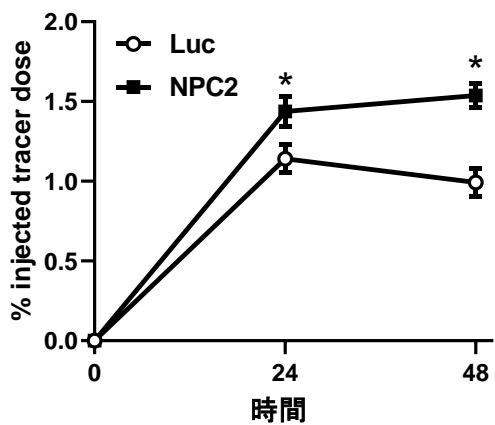
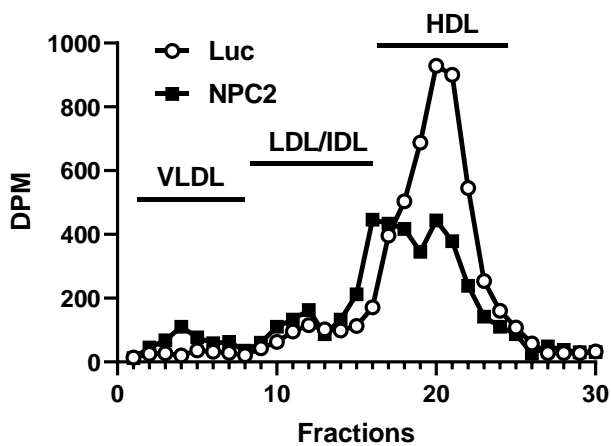


図22 肝臓NPC2過剰発現が肝臓のリポ蛋白代謝関連因子の発現に及ぼす影響
 C57BL6JマウスにLucおよびNPC2発現アデノウィルスベクター (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後に得た肝臓を採取しウェスタンブロット解析を行った(A)。方法のとおりバンドの定量化を行い、 β -actin発現量に対する比を3サンプルの平均と標準誤差として表した。* $P < 0.01$, § $P < 0.05$

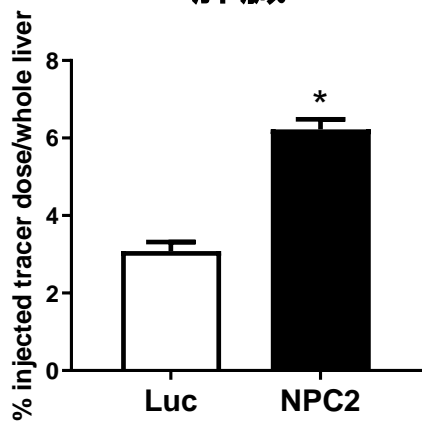
A 血清



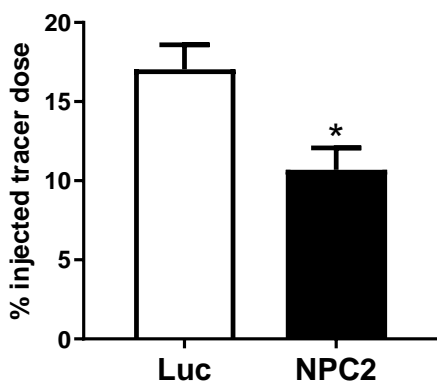
B



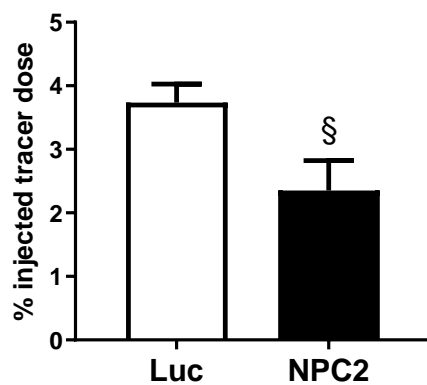
C 肝臟



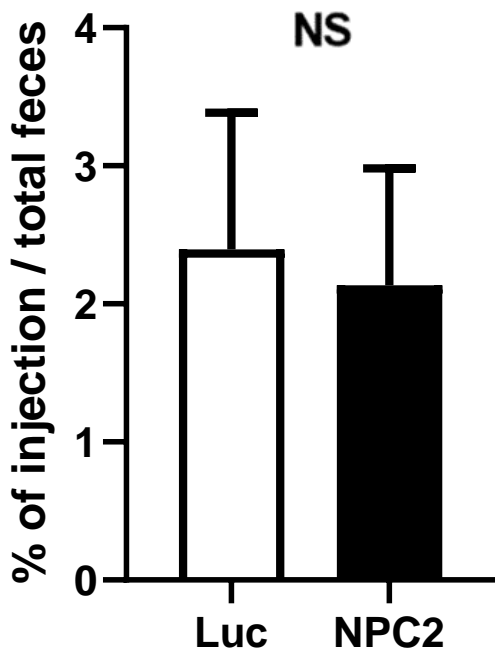
D 胆汁



E 糞便



F 中性ステロール



G 胆汁酸

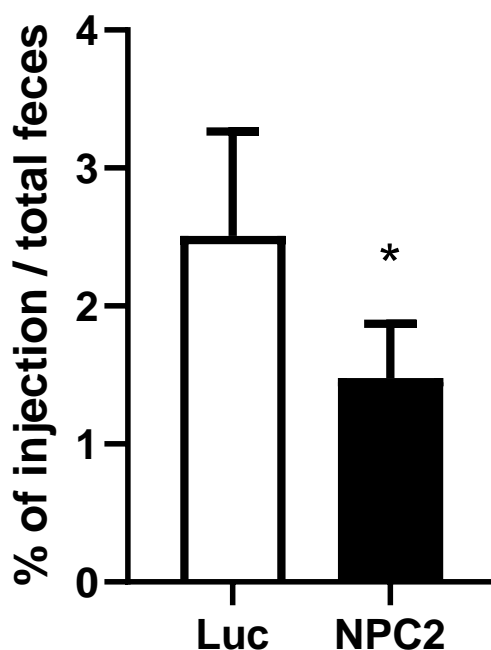


図23 肝臓NPC2過剰発現がRCTに及ぼす影響

C57BL6JマウスにAd-LucまたはAd-NPC2 (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後、 $[^3\text{H}]$ -コレステロールで標識したRAW267.4細胞を腹腔内投与した。血清 (A)を24、48時間後に、肝臓 (C)、胆汁 (D)を48時間後に採取、48時間連続的に糞便 (E)を収集し、それらの $[^3\text{H}]$ 放射活性を測定した。各群のプール血清をFPLCを用いてリポタンパク分画を分離し、それらの $[^3\text{H}]$ 放射活性を測定した (B)。さらに糞便から中性ステロール(F)と胆汁酸(G)を分離し、それらの $[^3\text{H}]$ 放射活性を測定した。Ad-Luc投与群は9サンプル、Ad-NPC2投与群は10サンプルの平均と標準誤差として表した。* $p < 0.01$, § $p < 0.05$

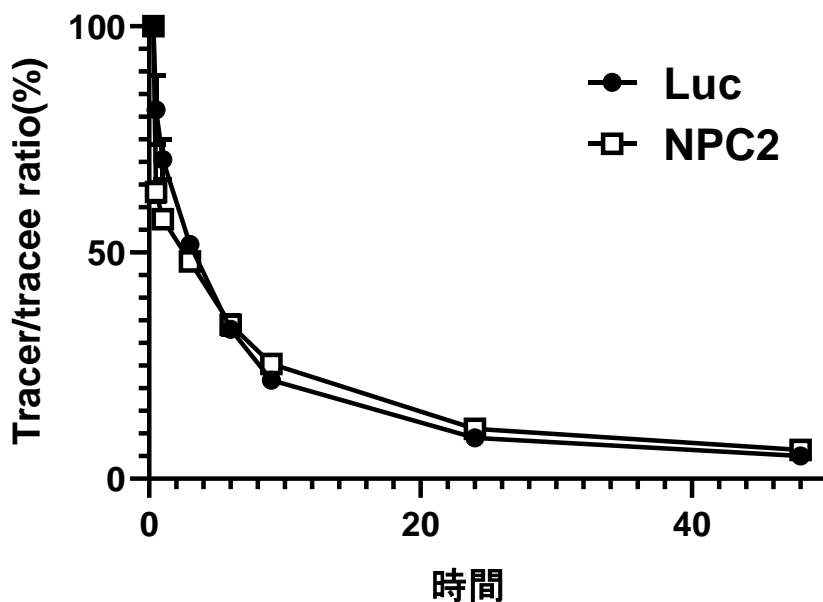
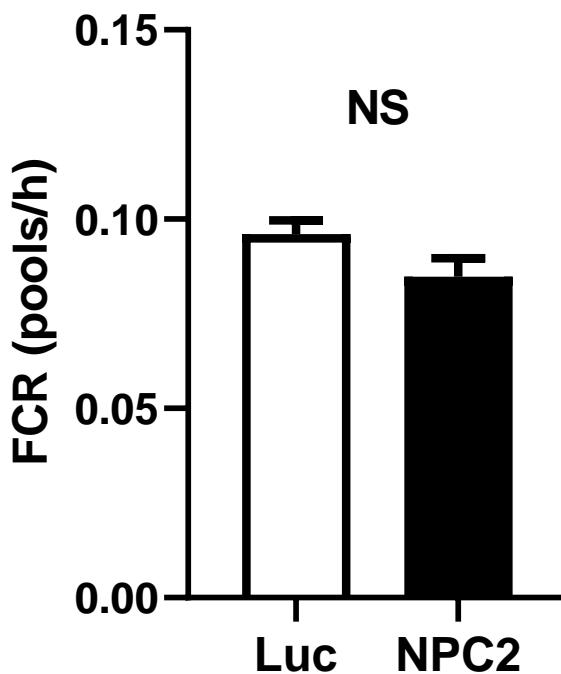
A**B**

図24 肝臓NPC2過剰発現がHDL代謝に及ぼす影響

C57BL6JマウスにAd-LucまたはAd-NPC2 (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後、 $[^3\text{H}]$ -Cholesteryl Oleateで標識したヒトHDLを経静脈投与した。投与後2分、30分、1、3、6、9、24、48時間後に血清を採取し、その $[^3\text{H}]$ 放射活性を測定した(A)。SAAMIIプログラムによりHDL異化速度 (Fractional catabolic rate, FCR) を算出した (B)。各群5匹の平均と標準誤差として表した。

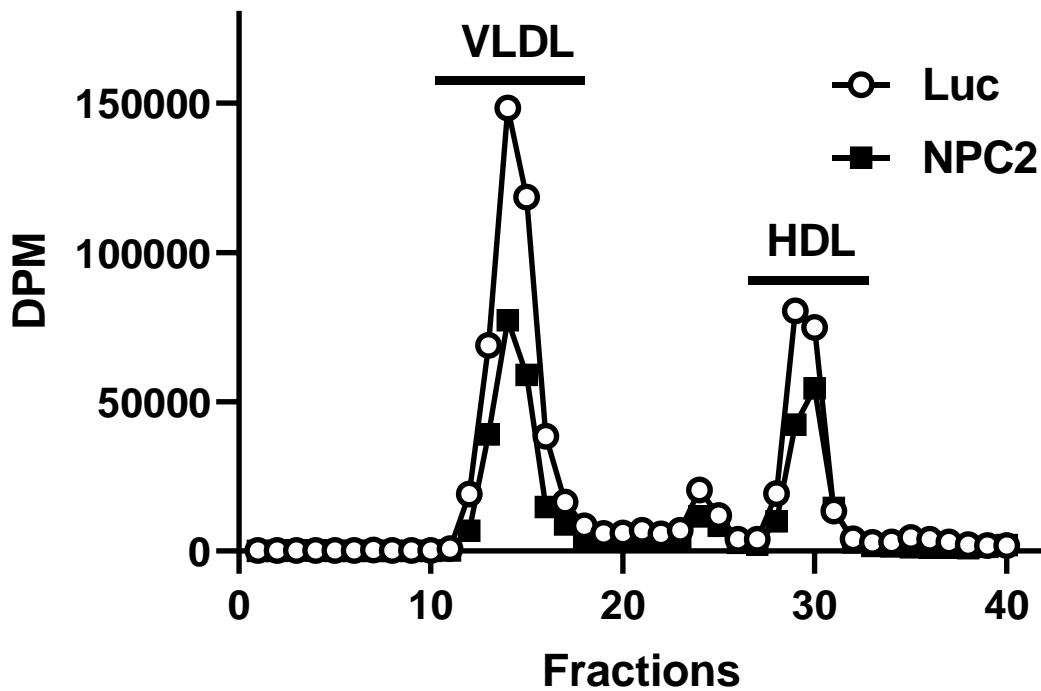


図25 NPC2過剰発現培養肝細胞におけるリポ蛋白新生の検討
 Ad-NPC2およびAd-Lucをマウス肝細胞株Hepa-16に加え、 ^3H -コレステロールで細胞を標識、培地を洗浄・交換し、24時間後回収した培地を濃縮、FPLCにアプライし得られた分画の ^3H 放射活性を測定した。

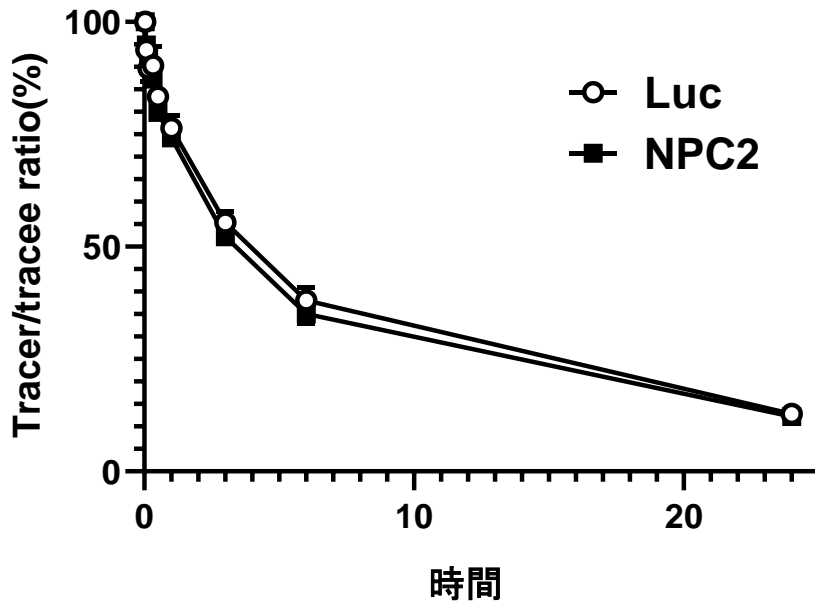
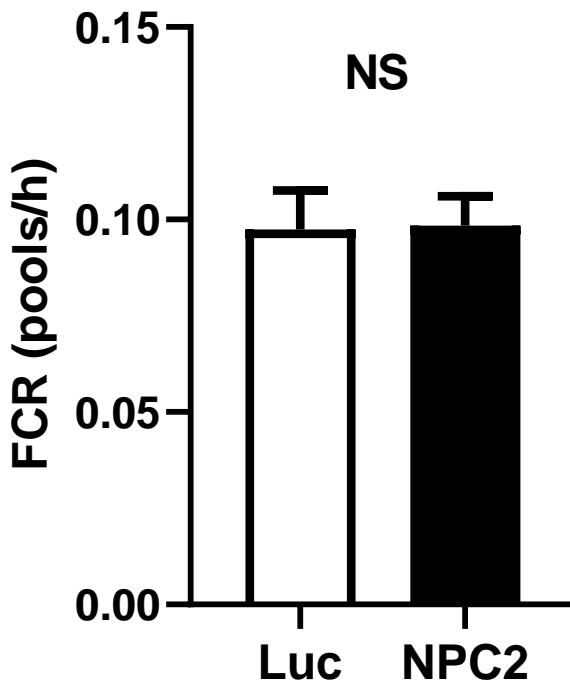
A**B**

図26 肝臓特異的NPC2過剰発現がLDL代謝に及ぼす影響

C57BL6JマウスにAd-LucまたはAd-NPC2 (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後、 $[^3\text{H}]$ -Cholesteryl Oleateで標識したヒトLDLを経静脈投与した。投与後2分、5分、10分、20分、30分、1時間、3時間、6時間、および24時間後に血清を採取し、その $[^3\text{H}]$ 放射活性を測定した (A)。SAAMIIプログラムによりLDL異化速度 (Fractional catabolic rate, FCR) を算出した (B)。Luc群5匹、NPC2群6匹の平均と標準誤差として表した。

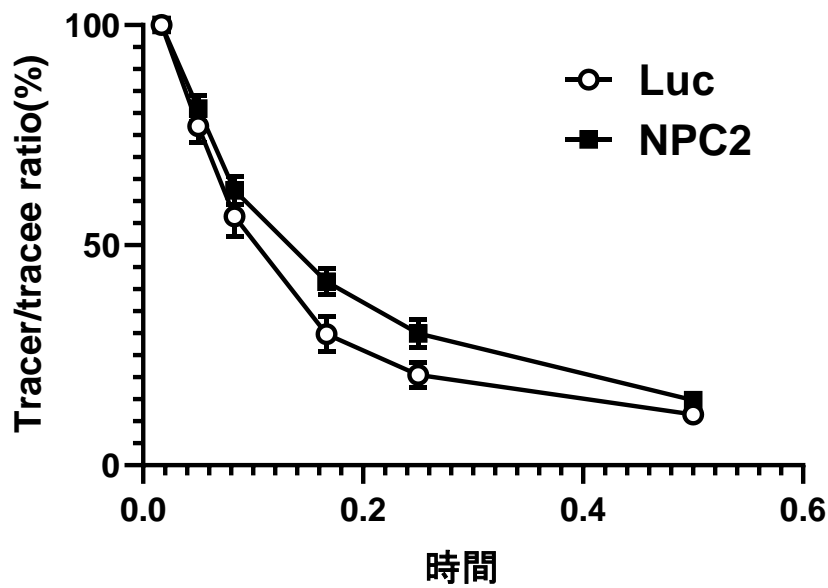
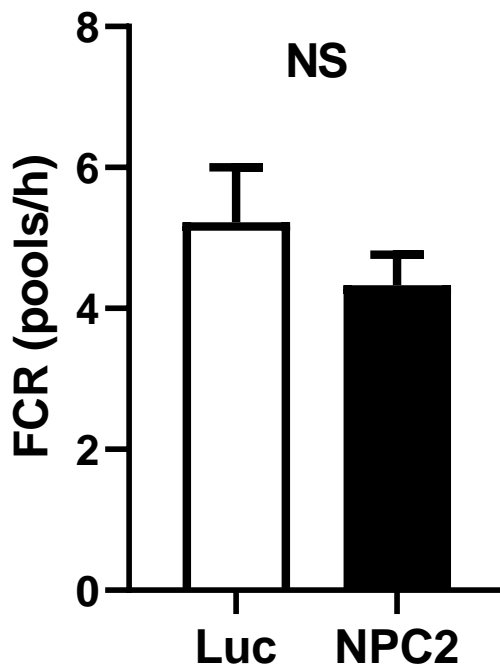
A**B**

図27 NPC2過剰発現マウスにおけるVLDL代謝に及ぼす影響
C57BL6JマウスにAd-LucまたはAd-NPC2 (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後、 $[^{14}\text{C}]$ -Trioleinで標識したヒトVLDLを経静脈投与した。投与後1分、3分、5分、10分、15分、30分、および24時間後に血清を採取し、その $[^{14}\text{C}]$ 放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した (A)。SAAMIIプログラムによりVLDL異化速度を算出した。Luc群5匹、NPC2群6匹の平均と標準誤差として表した。

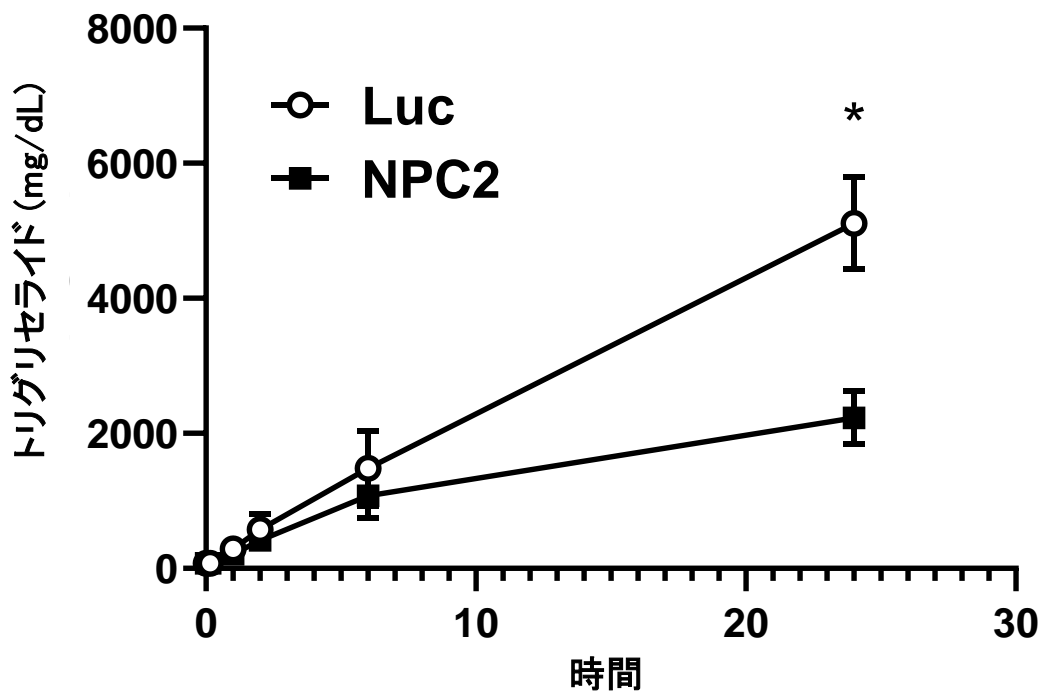


図28 肝臓特異的NPC2過剰発現による肝臓VLDL合成に及ぼす影響
 C57BL6JマウスにAd-LucまたはAd-NPC2 (5.0×10^8 IFU) 経静脈投与7日後、Poloxamer407溶液を腹腔内投与した。投与前、投与後1分、1時間、2時間、6時間および24時間後に血清を採取し、そのトリグリセライド濃度を測定した。各群5匹の平均と標準誤差として表した。

* $p < 0.01$

表1 マウスmiR CYP27A1作成に用いたオリゴDNA配列

マウスmiR CYP27A1①

Top sequence: 5'-TGCTGAAAGGAGGTTGTCCACATTGGGTTTTGGCCAC
TGACTGACCCAATGTGCAACCTTT-3'

Bottom sequence: 5'-CCTGAAAGGAGGTTGCACATTGGGTCAGTCAGT
GGCCAAAACCCAATGTGGACAACCTCCTTTC-3'.

マウスmiR CYP27A1②

Top sequence: 5'-TGCTGTTCATTGGTCAGCAGGAAGTGGTTTTGGCCA
CTGACTGACCACTTVVTTGACCAATGAA-3'

Bottom sequence: 5'-CCTGTTCATTGGTCAAGGAAGTGGTCAGTCAGT
GGCCAAAACCACTTCCTGCTGACCAATGAAC-3'.

表2 マウスmiR NPC2作成に用いたオリゴDNA配列

マウスmiR NPC2①

Top sequence: 5'-TGCTGATAACTCCCACCTTAGAGCCGGTTTTGGCCAC
TGACTGACCGGCTCTAGTGGGAGTTAT-3'

Bottom sequence: 5'-CCTGATAACTCCCAGTAGAGCCGGTCAGTCAGT
GGCCAAAACCGGCTCTAAGGTGGGAGTTATC-3'.

マウスmiR NPC2②

Top sequence: 5'-TGCTGAGGTGATGTTGACACTGTAGGGTTTTGGCCAC
TGACTGACCCTACAGTCAACATCACCT-3'

Bottom sequence: 5'-CCTGAGGTGATGTTGACTGTAGGGTCAGTCAGT
GGCCAAAACCCTACAGTGTCAACATCACCTC-3'.

マウスmiR NPC2③

Top sequence: 5'-TGCTGACAACCGTCAGGCTCAGGAATGTTTTGGCCA
CTGACTGACATTCCTGACTGACGGTTGT-3'

Bottom sequence: 5'-CCTGACAACCGTCAGTCAGGAATGTCAGTCAGT
GGCCAAAACATTCCTGAGCCTGACGGTTGTC-3'.

表3 マウスNPC2作成に用いたプライマー配列

マウスNPC2

Forward sequence: 5'- caccATGCGTTTTCTGGCCGCC -3'

Reverse sequence: 5'- GCTTGTGATCTGAACTGGG -3'.
