



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	コレステロールトランスポーターNPC1L1を介した脂溶性抗酸化物質の消化管吸収動態の解析 [全文の要約]
Author(s)	梨本, 俊亮
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：薬学部図書室】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(臨床薬学)
Dissertation Number	甲第13969号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77993
Type	doctoral thesis
File Information	Shunsuke_NASHIMOTO_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士（臨床薬学） 氏名 梨本 俊亮

学 位 論 文 題 名

コレステロールトランスポーターNPC1L1 を介した
脂溶性抗酸化物質の消化管吸収動態の解析

コレステロールは細胞膜の構成成分であり、胆汁酸およびステロイドホルモンの前駆物質でもある、生体にとって必要不可欠な物質である。一方で過剰なコレステロールは動脈硬化性疾患の発症および進行の危険因子となるため、健康維持のためには生体内のコレステロール濃度を適切な値に維持することが必要である。コレステロールの恒常性は生体内での合成と消化管からの吸収により維持されているが、近年は食生活の欧米化によりコレステロールの摂取量が増加しており、コレステロールの消化管吸収の制御は動脈硬化性疾患の予防の観点から重要と考えられる。コレステロールは胆汁による乳化およびリパーゼによる消化を受けて、胆汁酸塩、リン脂質、モノアシルグリセロール等から構成される混合ミセルに可溶化された形で消化管から吸収されることが知られているが、この消化管吸収に関与するトランスポーターとして Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) が報告されている。また、この NPC1L1 の阻害薬であるエゼチミブはコレステロール吸収阻害薬として臨床現場で汎用されている。

加えて、NPC1L1 はステロール骨格を持たないビタミン E の輸送にも関与することが報告されている。ビタミン E はビタミン C やユビキノンなどと協働して、生体内において抗酸化物質として働くことが知られている。コレステロールを末梢組織に運搬する LDL の構成脂質は酸化を受けやすいため、コレステロールとビタミン E が共通の経路で輸送されることは、生体にとって動脈硬化を進展させる酸化 LDL の生成抑制に寄与していると考えられる。また、NPC1L1 はビタミン K 等の輸送にも関与しており、その基質認識性は広範であることが示唆されている。そのため、抗酸化作用を持つビタミン E 以外の脂溶性物質の消化管吸収にも NPC1L1 が関与する可能性が考えられる。さらに、これまでの知見を踏まえた上での疑問点として、構造上の類似性の低いこれら脂溶性物質の輸送がコレステロールと類似した機構で行われるのか、またエゼチミブによってこれら脂溶性抗酸化物質の消化管吸収がコレステロールと同様に低下しているのかといった点がある。

以上を踏まえ本研究では、NPC1L1 の *in vitro* 機能評価系を構築し、脂溶性抗酸化物質の消化管からの吸収機構を解明することを目的とした。また、NPC1L1 基質の消化管吸収にエゼチミブが及ぼす影響を明らかにすることを併せて目的とした。

最初に、NPC1L1 の機能を評価する *in vitro* 系の確立を試みた。評価系は既報に従いリポフェクション法により *hNPC1L1* 遺伝子をイヌ腎尿細管上皮細胞由来 MDCK 細胞に導入することにより作製した。NPC1L1 の輸送活性は³H-コレステロールを細胞内に取り込ませることにより評価した。また、コレステロールはそのままでは溶解性が低いため、エマルションあるいは混合ミセルに可溶化させて取り込み実験に用いた。NPC1L1 安定発現 MDCK 細胞へのコレステロールの取り込み実験を行ったところ、平均粒子径 200 nm 程度のエマルションを用いた場合では mock 細胞と比較したコレステロール輸送活性の有意な亢進は認められなかった。一方で平均粒子径 10 nm 程度の混合ミセルを用いた場合では、mock 細胞と比較して NPC1L1 発現細胞におけるコレステロール輸送活性の有意な亢進が認められ、エゼチミブによりその取り込み量は有意に減少した。このことから、粒子径の違いが NPC1L1 による基質認識に影響を与えることが示唆された。しかしながら、MDCK 細胞においては内在性の輸送活性が高く、NPC1L1 による輸送活性の評価は困難であることが示唆された。

そこで新規評価系として *Xenopus laevis* oocyte (oocyte) 発現系の構築を試みた。この系は cRNA を直接細胞内に注入することにより目的の輸送担体のみを細胞膜上に発現させることができるため、トランスポーター研究において汎用されている。*hNPC1L1* 遺伝子の cRNA を細胞内に注入後、NPC1L1 の発現が確認された oocyte を用いてコレステロールの

取り込み実験を行ったところ、NPC1L1 発現 oocyte においてコレステロール輸送活性の顕著な亢進が認められ、エゼチミブによりその取り込み量は有意に減少した。また、cRNA の代わりに水を注入した oocyte においてはエゼチミブ存在下においてコレステロールの取り込み量が減少せず、内在性 NPC1L1 の活性は認められなかった。このことから、oocyte は内在性の輸送活性が低く、NPC1L1 を介したコレステロール取り込みの評価に有用である可能性が示された。さらに内在性 NPC1L1 の活性が認められないことから、oocyte 発現系は変異体解析にも適した系であると考えられる。先行研究において、コレステロール結合能の低下が報告されている NPC1L1 L216A 変異体を oocyte に発現させて取り込み実験を行ったところ、コレステロールの取り込み量は水注入群と同程度まで低下した。このことから L216A 変異により NPC1L1 のコレステロール取り込み活性が低下したことが示され、oocyte 発現系は変異体解析にも応用可能な系であることが示唆された。

続いて、ここまでの検討で構築した発現系を用い、混合ミセルに可溶化させたビタミン E およびユビキノンの消化管吸収がコレステロールと類似した機構で輸送されているか検証した。ビタミン E およびユビキノンの細胞内取り込み量は HPLC または LC-MS/MS により定量した。NPC1L1 安定発現 MDCK 細胞を用いた系において、ビタミン E の 1 種である α -トコフェロールの輸送活性の亢進が認められ、エゼチミブ存在下においてその取り込み量は減少した。また、L216A 変異により α -トコフェロールの取り込み量が mock 細胞と同程度まで減少した。以上より、 α -トコフェロールは NPC1L1 を介して細胞内に取り込まれ、その輸送にはコレステロール同様 216 番目のロイシン残基が重要であることが示唆された。一方でヒト生体内に存在するユビキノンであるコエンザイム Q10 (CoQ10) については値のばらつきが大きいものの、NPC1L1 発現細胞において mock 細胞と比較して CoQ10 の輸送活性が亢進し、エゼチミブ存在下では取り込み量の減少が認められた。また同様の検討をラット生体内に存在するユビキノンであるコエンザイム Q9 (CoQ9) についても行ったところ、NPC1L1 発現細胞において取り込み量が有意に増大する様子が観察され、ユビキノン類が NPC1L1 を介して細胞内に取り込まれることが示された。

また、MDCK 細胞の結果を受け、oocyte 発現系を用いてビタミン E およびユビキノンの取り込みに及ぼす L216A 変異の影響の評価を試みた。しかしながら、NPC1L1 発現 oocyte において、ビタミン E の 1 種である α -トコトリエノールおよび CoQ10 の control 群と比較した輸送活性の亢進は認められなかった。なお、oocyte 内に内在性の α -トコフェロールが多く含まれていたため、 α -トコフェロールの取り込みを評価することはできなかった。本検討においては、 α -トコトリエノール、CoQ10 共に取り込み量が少なく、定量限界付近であったことから、oocyte における NPC1L1 を介した輸送の評価には定量感度が不十分であった可能性も考えられる。本結果についてはサンプルからの抽出条件の最適化等を行い、より定量感度の高い条件で再度検討する必要があると考えられた。

最後に Wistar 系雄性ラットを用いて α -トコフェロールおよび CoQ10 の消化管吸収に NPC1L1 が関与するか検討した。 α -トコフェロール単独投与時には投与後 24 時間に渡って血漿中濃度の増大が認められた一方で、エゼチミブ同時投与群では血漿中濃度の増大はほとんど認められなかった。さらに、 α -トコフェロールの長期投与によって肝臓中 α -トコフェロール濃度が増大し、その増大分がエゼチミブによって減少することが示された。しかしながら、エゼチミブ単独投与群と saline 投与群の間では有意差は認められず、NPC1L1 阻害下においても α -トコフェロールの濃度は維持されていることが示された。一方で CoQ10 も α -トコフェロール同様に単独投与時に認められた血漿中濃度の増大がエゼチミブ併用時に抑制されることが示された。以上より、エゼチミブにより α -トコフェロールおよび CoQ10 の消化管吸収が抑制されることが示された。

本研究の結果から、今回新たに構築した oocyte 発現系は NPC1L1 の機能評価に有用であること、またビタミン E およびユビキノンの消化管吸収には NPC1L1 が関与していることが示された。これにより、エゼチミブ服用患者においてはこれら脂溶性抗酸化物質の吸収量が低下している可能性が考えられる。しかしながら、エゼチミブによるこれら脂溶性物質の吸収量の低下が動脈硬化性疾患の発症リスク増大に繋がるのか、また血中濃度が低下した場合、ビタミン E やユビキノンをサプリメントの形で補うことが有益なのかについては未だ明らかではなく、今後更なる研究が行われる必要がある。