

神戸学院大学大学院 薬学研究科 学位論文

非アルコール性脂肪肝炎と  
リポタンパク代謝制御機構の解明

2021 年 7 月

安 田 大 将

# 目 次

## 略語一覧

序 論.....	1
----------	---

## 本 論

### 第 1 章 コリン欠乏高脂肪食負荷非アルコール性脂肪性肝炎マウスモデルに おける血清コレステロールおよびトリグリセリド値の解析

1-1. 緒 言.....	4
1-2. 実験材料および実験方法	
1-2-1. 動物モデル.....	8
1-2-2. サンプルの調製および生化学解析.....	8
1-2-3. 病理組織学的解析.....	9
1-2-4. トータル RNA 抽出および逆転写反応.....	10
1-2-5. 定量的リアルタイム RT-PCR.....	11
1-2-6. 統計学的解析.....	12
1-3. 結 果	
1-3-1. CDAHFD がマウスの体重に及ぼす影響.....	13
1-3-2. CDAHFD がマウスの肝臓重量と肝臓の肉眼的および顕微鏡的外観に 与える影響.....	14
1-3-3. 肝臓の脂質含量と ALT および脂質濃度.....	16

1-3-4. 肝臓組織における炎症、線維症、TG 取り込みに関連する遺伝子発現	18
1-3-5. 肝臓での脂質蓄積と体重および血清脂質値との相関性の検討	20
1-3-6. 血清 ALT 値および肝臓での TNF- $\alpha$ 発現量と体重あるいは血清脂質値との相関性の検討	22
1-3-7. 肝臓での TGF- $\beta$ および CD36 発現量と体重および血清脂質値との相関性の検討	24
1-4. 考 察	26
<b>第 2 章 肝細胞におけるナルディライジンによる低密度リポタンパク (LDL)</b>	
<b>-コレステロールの代謝制御の検討</b>	
2-1. 緒 言	29
2-2. 実験材料および実験方法	
2-2-1. 肝細胞特異的 NRDC 欠損および対照マウスの作製	33
2-2-2. 肝細胞特異的 NRDC 欠損および対照マウスのジェノタイピング	
PCR 解析	34
2-2-3. 細胞培養およびマウス初代肝細胞の単離	35
2-2-4. 肝細胞株 AML12 細胞での NRDC 強制発現	36
2-2-5. トータル RNA 抽出および逆転写反応	36
2-2-6. 定量的リアルタイム RT-PCR	37
2-2-7. タンパク質の抽出および精製	38

2-2-8. ウエスタンブロット.....	39
2-2-9. HPLC 法による血清リポタンパク質中のコレステロール濃度および ELISA 法による血清 PCSK9 濃度の測定.....	40
2-2-10. 肝臓組織におけるコレステロール含量の測定.....	41
2-2-11. 統計学的解析.....	41
2-3. 結 果	
2-3-1. 肝細胞における NRDC の遺伝子型および発現抑制の同定.....	42
2-3-2. NRDC <sup>LKO</sup> による表現型への影響.....	45
2-3-3. NRDC <sup>LKO</sup> による血清総コレステロールおよび LDL-C 値への影響 .....	47
2-3-4. NRDC <sup>LKO</sup> によるコレステロール代謝関連遺伝子発現量への影響 .....	49
2-3-5. NRDC による SREBP2 の遺伝子発現および活性化への影響.....	51
2-3-6. NRDC による細胞表面の LDL 受容体タンパク質発現量への影響 .....	53
2-3-7. NRDC による 肝細胞からの PCSK9 分泌制御.....	55
2-4. 考 察.....	57
総 括.....	62
謝 辞.....	64
引用文献.....	66

## 略 語 一 覽

Ab	antibody
ACS	acute coronary syndrome
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
ALT	alanine aminotransferase
APP	amyloid precursor protein
ASCVD	atherosclerotic cardiovascular disease
AST	aspartate aminotransferase
BSA	bovine serum albumin
BW	body weight
CD36	cluster of differentiation 36
CDA	choline-deficient L-amino acid-defined diet
CDAHFD	choline-deficient L-amino acid-defined high-fat diet
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CM	chylomicron
DEPC	diethylpyrocarbonate
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
DTT	dithiothreitol
DW	distilled water
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA	ethyleneglycoltetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
FH	familial hypercholesterolemia
HB-EGF	heparin binding-epidermal growth factor-like growth factor
HCD	high cholesterol diet
HeFH	heterozygous familial hypercholesterolemia
HDAC	histone deacetylase
HDL	high-density lipoprotein
HDL-C	high-density lipoprotein-cholesterol
HE	hematoxylin and eosin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HFD	high fat diet
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
HTGL	hepatic triglyceride lipase
IDOL	inducible degrader of the low-density lipoprotein receptor
IgG	immunoglobulin G
IL-6	interleukin 6
LDL	low-density lipoprotein
LDL-C	low-density lipoprotein-cholesterol
LDLR	low-density lipoprotein receptor
LKO	liver-specific knockout

LPL	lipoproteinlipase
LPS	lipopolysaccharide
LXR	liver X receptor
MCD	methionine-choline deficient diet
MT	masson trichrome
MTP	microsomal triglyceride transfer protein
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
NRDC	N-arginine dibasic convertase
PBS	phosphate-buffered saline
PC	phosphatidylcholine
PCR	polymerase chain reaction
PCSK9	proprotein convertase subtilisin/kexin 9
PEMT	phosphatidyl ethanolamine N-methyltransferase
PGC-1 $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha
PS	penicillin-streptomycin mixture
PSG	penicillin-streptomycin-L-glutamine mixture
PVDF	polyvinylidene difluoride
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RIPA	radio-immunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid
SD	standard diet
SDS	sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate- poly-acrylamide gel electrophoresis
S.E.M.	standard error of the mean
SPF	specific-pathogen free
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
TACE	tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme
TAE	tris acetate ethylenediaminetetraacetic acid
T-Chol	total cholesterol
TE	tris-ethylenediaminetetraacetic acid
TG	triglyceride
TGF- $\beta$	transforming growth factor-beta
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor-alpha
UCP	uncoupling protein
UV	ultraviolet
VLDL	very low density lipoprotein



## 序 論

肝臓は糖質代謝や脂質代謝、血液凝固因子の生成、解毒等に関わる主要臓器の一つである。生体内に摂取された過剰なエネルギーは、グリコーゲンあるいはトリグリセリド (TG) として肝臓組織、脂肪組織、筋肉組織内に貯蔵される。食事摂取により腸管から吸収された TG および生合成されたコレステロールは、リポタンパクにより門脈を通過して肝臓に輸送される。リポタンパクは、血液中において水に不溶な脂質を遠隔組織へ運搬するための複合体粒子である。粒子の外縁側に親水性の部分をもつリン脂質やアポリポタンパクが存在し、粒子の内側には疎水性のコレステロールエステル、遊離コレステロールや TG などの脂質成分が含まれた構造を有している。リポタンパクは、粒子径あるいは比重により、カイロミクロン (CM)、超低密度リポタンパク (VLDL)、低密度リポタンパク (LDL)、高密度リポタンパク (HDL) の主要 4 分画に分類される。中間密度リポタンパク (IDL) は、VLDL から LDL への代謝が遅延した時のみ増加し、健常者ではほとんどみられない。

リポタンパク代謝に関わる脂質代謝経路は、外因性経路と内因性経路が存在する。外因性経路は、食事および胆汁由来のコレステロールおよび脂肪酸が小腸で吸収され、TG およびコレステロールエステルが形成されて CM 粒子に組み込まれ、門脈を通過して肝臓まで運搬される経路である。CM に含まれる TG の一部は、血管内皮細胞表面に存在するリポタンパクリパーゼ (LPL) により加水分解され、遊離脂肪酸となる。TG 含量が低下した CM 粒子は粒子径が縮小し、コレステロールに富んだ CM レムナントとなり、最終的にレムナント受容体を介して肝臓組織中に取り込まれる。内因性経路は、肝臓から末梢組織に TG とコレステロールを輸送する経路である。リポタンパクとして取り込まれたものに加え、肝臓組織内で生合成されたコレステロールと TG が、VLDL 粒子として肝臓組織から血液中に分泌される。血液中に放出

された VLDL の TG は、血管内皮細胞表面の LPL あるいは 肝性トリグリセリドリパーゼ (HTGL) により遊離脂肪酸に加水分解されて TG を失い、コレステロールに富んだ LDL となって、末梢組織の LDL 受容体を介して取り込まれ、コレステロールを供給する。血液中の余剰の LDL 粒子は、肝臓組織に発現する LDL 受容体を介して取り込まれる。また、肝臓組織内で産生されるアポリポタンパク A-I は、血液中で HDL 粒子を形成し、末梢組織の余剰の遊離コレステロールを回収し、肝臓組織内に輸送する。末梢組織から肝臓組織へコレステロールを輸送することを、コレステロール逆転送と呼ぶ (Figure 1)。

外因性経路 (Extrinsic pathway)

内因性経路 (Intrinsic pathway)

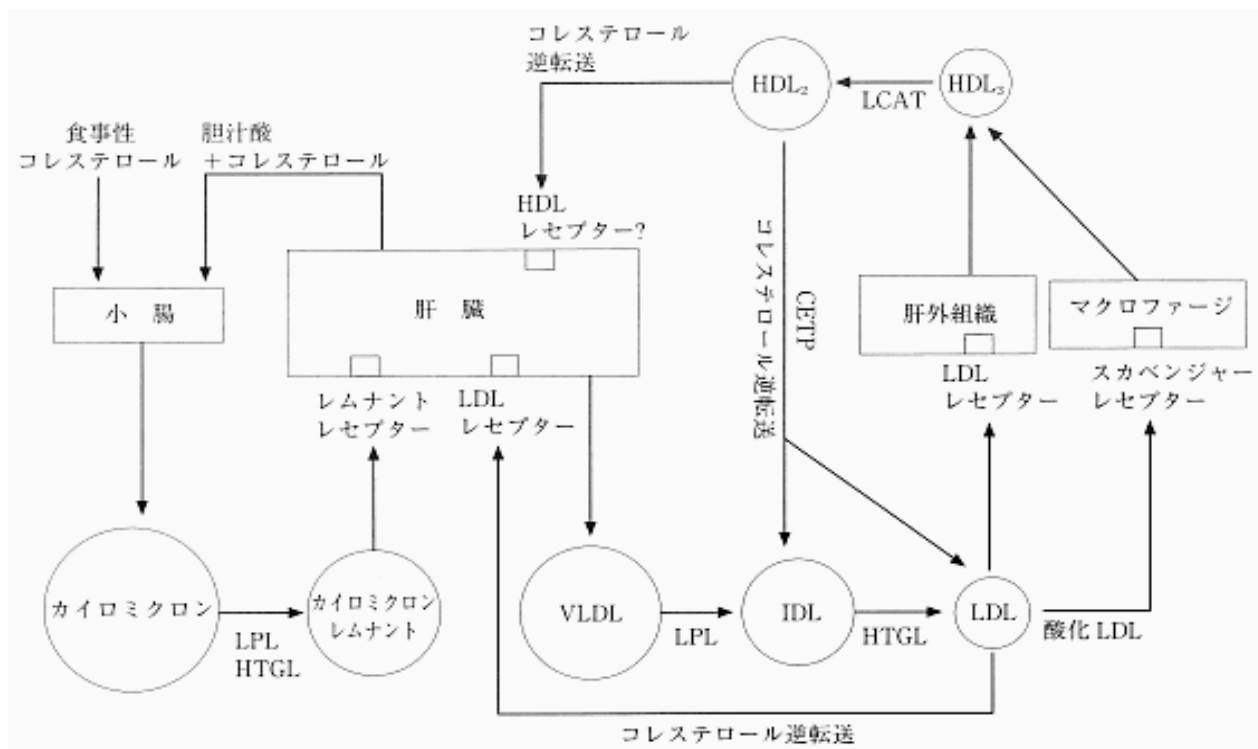


Figure 1. Extrinsic and intrinsic pathways of lipoprotein metabolism.

臨床において、LDL および HDL は動脈硬化性疾患の発症の重要な危険因子および防御因子として認知され、いわゆる悪玉コレステロールおよび善玉コレステロールとして広く知られている。即ち、脂質代謝異常の中でも、高 LDL-コレステロール (LDL-C) は動脈硬化性疾患などの循環器疾患の発症と密接に関連し、高 TG 血症は、脂肪肝および脂肪肝炎、膵炎などの発症に関わり、生命予後を悪化させる原因となる。一般的に高 LDL-C 血症の治療では、食事療法および運動療法などの生活習慣の是正に加え、スタチン系薬剤、コレステロール吸収阻害薬エゼチミブ、胆汁酸吸着レジジン剤、抗プロタンパク質転換酵素サブチリシン/ケキシシン 9 型 (PCSK9) 阻害抗体薬などの服薬により生命予後の改善が図られる。一方、高 TG 血症の治療では、食事療法および運動療法などの生活習慣の是正に加え、脂質低下薬として、フィブラート系薬剤やニコチン酸製剤、イコサペント酸エチル製剤などが使用される。しかしながら、リポタンパク代謝の異常に起因する肝臓疾患における脂肪蓄積および動脈硬化形成の引き金となる脂質異常症の発症の分子機構は未だ未解明の点もあり、新規な機構が存在する可能性も考えられる。脂肪肝、脂肪肝炎に対しては、既存の治療薬では十分な治療効果を得ることが困難である。また、重症の家族性高コレステロール血症の場合、既存の治療薬では十分な治療効果があげられないこともある。さらに、高リスクの動脈硬化性疾患の場合、十分な効果を得るために極端に低い血清 LDL-C の管理目標値が診療ガイドライン上で設定されているため、既存の治療薬のみでは管理目標値に到達できないこともある。このような病態において、より詳細な病態の分子機構の解明が新規の治療につながる可能性がある。

そこで本研究は、脂肪肝および肝炎を呈する非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) における CDAHFD 負荷動物モデルの有用性、脂質異常症におけるコレステロール代謝に対するナルディライジン (NRDC) の役割について検討した。

# 本 論

## 第 1 章 コリン欠乏高脂肪食負荷非アルコール性脂肪性肝炎マウスモデルにおける 血清コレステロールおよびトリグリセリド値の解析

### 1-1. 緒 言

脂肪肝は、肝臓に脂肪が過剰に蓄積した状態であり、アルコール摂取量によりアルコール性脂肪肝と非アルコール性脂肪肝に大別される。さらに、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は、その病態により単純性脂肪肝（simple steatosis）と NASH に大別される。NAFLD の中で、NASH は最終的に肝硬変と肝細胞癌に発展する生命予後不良の病態である。

NAFLD の診断は、CT あるいは超音波検査などの画像診断で肝臓組織での脂肪沈着を認める症例で、飲酒量がエタノール換算で男性 30 g/day、女性 20 g/day 未満であり、加えて抗原抗体検査によりウイルス性肝炎の可能性が除外され、さらにヘモクロマトーシスあるいはウイルソン病などの代謝性疾患が否定されることで行われる。NAFLD が単純性脂肪肝あるいは NASH であるのかの鑑別には肝生検による病理組織診断が必要である。肝臓組織の病理組織検査において、NASH 症例では炎症性細胞の浸潤や脂肪沈着、肝細胞の膨張、Mallory 小体、線維化が観察される<sup>1)</sup>。肝生検は NASH の確定診断および線維化の程度を評価する際の重要な診断法であるが、NAFLD の全ての症例に対して侵襲性の高い肝生検を適用することは現実的ではなく、NASH に対する特異的かつ非侵襲的で簡便な検査・診断方法あるいは NASH の病態を忠実に反映する信頼性の高いバイオマーカーの早急な開発が期待されている。しかしながら、現在までに NASH に特異的かつ信頼性の高い診断バイオマーカーは未だ開発に至っておらず、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）およびアスパラギン

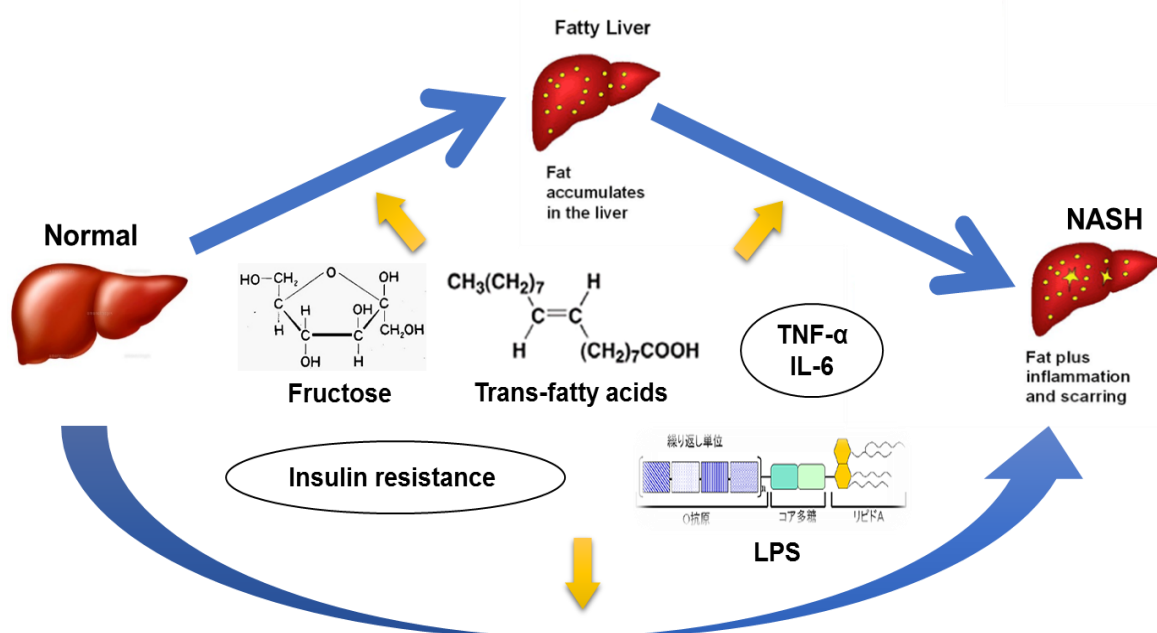
酸アミノトランスフェラーゼ（AST）で代替的に肝機能を評価している。また、食事や運動などの生活習慣の改善による肥満の解消および体重の減少を除いて、NASH に特異的かつ有効性の高い治療法は未だ確立されておらず、その治療薬剤の誕生が望まれている。

単純性脂肪肝を有する一部の患者は、ヒト NASH の特徴である肝炎と肝線維症を発症し、肝硬変に至ることで、最終的に肝細胞癌に進展する<sup>4)</sup>。しかし、多くの場合は単純性脂肪肝に留まり、NASH あるいは肝細胞癌にまで進行することは少数である。NASH の病態進展に関与する分子メカニズムは、従来より two-hit theory が提唱されてきた<sup>2)</sup>。即ち、first hit は肝臓での脂肪蓄積であり、second hit は腸管からの細菌性エンドトキシンの混入あるいは Kupffer 細胞および肝星細胞の活性化などによる炎症反応とその後の肝線維化である。肝臓組織における脂肪蓄積は、脂肪組織から肝臓組織への脂肪酸の流入量の増加、肝臓での de novo 脂肪酸合成の亢進、肝臓での脂肪酸  $\beta$  酸化の減少、TG に富む VLDL の肝臓組織から血液中への分泌の減少によるものと考えられている。一方、最近では脂質、腸管からの細菌性エンドトキシン、酸化的ストレス、炎症性サイトカインなどの種々の刺激に反応し、脂肪肝、肝炎、肝線維症が並行して進行する multiple parallel hit 仮説が提唱されている<sup>3)</sup> (Figure 2)。実際に、ヒト NASH の患者で脂肪蓄積が軽度であるにもかかわらず著明な線維化を呈する症例も存在する。これまでに NAFLD/NASH の病態と関連する候補分子が明らかになりつつあるが、病態の進展を規定する鍵となる分子は未だ明らかにされておらず、その分子機構の解明が望まれている。それゆえ、NAFLD/NASH の分子機構の解明および新規の予防や治療法を確立するために、ヒト NASH の病態を忠実に反映するマウスモデルの開発が必要である。

NAFLD/NASH の病態の進展を規定する分子機構の解明のために、遺伝子改変あるいは食餌供与により誘発される複数の NASH マウスモデルが提唱されている<sup>5-7)</sup>。こ

これらのモデルの中で、レプチン欠損（ob/ob）およびレプチン抵抗性（db/db）マウスなどの遺伝的肥満モデルは、過食症に起因する肥満、高血糖、インスリン抵抗性および脂肪肝を示すことが報告されている<sup>8,9</sup>。食餌栄養モデルである高脂肪食負荷マウスは、容易に脂肪肝を呈するが、肝線維症に至らないことが知られている。これらのマウスモデルでは、共通して通常食供与下では脂肪肝を発症するものの、ヒト NASH の特徴的な所見の一つである顕著な肝線維化を示さない。また、別の遺伝子改変モデルであるステロール応答配列結合タンパク質（SREBP）1c トランスジェニックマウスは、脂肪肝および肝線維症を示すものの、肝臓組織に局限した脂肪蓄積を示し、内臓肥満は示さないことが報告されている<sup>10</sup>。肝炎や肝線維化へ進展させるにはメチオニンおよびコリン欠乏食（MCD）などの実験食餌の供与が必要である。通常、肝臓中の脂質が循環血液中に VLDL として分泌されるには、メチオニンおよびコリンから合成されるホスファチジルコリン（PC）が必要である。MCD モデルは、メチオニンおよびコリンの欠乏により PC の合成が低下し、肝臓組織内への脂肪蓄積あるいは肝炎を誘発させる NASH モデルとして考案された実験食餌である<sup>11-13</sup>。しかしながら、MCD は脂肪肝、肝炎および肝線維症を呈し、ヒト NASH に類似する所見が見られる一方で、ヒト NASH では通常認められない重度な体重減少<sup>14</sup>、血清脂質値の低下および VLDL の分泌に重要なミクロソームトリグリセリド転送タンパク質（MTP）の肝臓組織での発現量の低下が見られた<sup>15</sup>。即ち、MCD モデルでは、通常ヒトでは肥満に起因する NASH の特性とは異なる点が存在することが明らかとなった。また、遺伝子改変および食餌栄養モデルを組み合わせた MCD 供与 db/db マウスモデルは、脂肪肝を発症した後に顕著な肝線維化を示したことから、NASH の分子機構の解明に有用なマウスモデルとなる可能性が示唆されている<sup>15</sup>。しかしながら、このモデルはレプチン受容体の遺伝的異常を有するとともに、血清脂質プロファイルについては明確には示されていない。これらの実験上の難点を克服するために、コリン欠乏 L-ア

そこで本章では、これまでの CDAHFD マウスモデルでは検討されていなかった NASH の病態進展と体重と血清脂質プロファイルの変動および肝細胞への脂肪酸の取り込みを促進する CD36 や炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ )、線維症マーカーである形質転換成長因子 (TGF- $\beta$ ) などの脂肪肝および肝炎、肝線維症に関連する分子指標との相関性について検討し、NAFLD/NASH における CDAHFD マウスモデルの有用性について検討することを目的とした。



**Figure 2. The overview of multiple parallel hit hypothesis.**

## 1-2. 実験材料および実験方法

### 1-2-1. 動物モデル

8 週齢の雄性の C57BL/6J 系統マウスを日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した。標準的食餌 (MF; Oriental yeast; SD) を供与して 1 週間の順応期間を設定し、無作為に 2 群に分離した。コリン欠乏、0.1% メチオニン、62 kcal% 脂肪を含むコリン欠乏高脂肪食 (A06071302; Research Diets Inc; CDAHFD) を与え、他方の群には SD を供与した。CDAHFD および SD の食餌組成は Table 1 に示した通りである。自由摂水の条件に加えて両群に、マウス 1 匹あたり 5 g/day の分量で食餌を 14 週間供与した。各食餌摂取量を測定し、食餌摂取に影響を与える食餌の変性を回避するために、2 日間毎に新鮮な食餌と交換した。本研究における全てのマウスは、22°C の室温と 12 時間の明暗サイクルの制御された条件下で、特定病原体を含まない SPF 環境下で飼育した。本研究のプロトコールは、神戸学院大学動物実験倫理委員会の承認を取得した上で実施した。

### 1-2-2. サンプルの調製および生化学解析

マウスの体重は毎週測定し、実験食餌供与開始から 14 週間後に摘出した肝臓組織の重量を測定した。一晩絶食させた後、ジエチルエーテル (Nacalai Tesque) にて麻酔したマウスの眼窩静脈から血液サンプルを採取し、4°C で  $16,000 \times g$  にて 5 分間遠心分離して血清を得た。血清サンプルは解析に使用するまで -80°C で凍結保存した。血清中の TG、総コレステロール (T-Chol)、ALT 濃度および肝臓組織中の TG 含量は、標準酵素アッセイにより測定した。マウスの肝臓組織からの総脂質は、Folch 法により抽出した<sup>19)</sup>。



Ingredients (g)	CDAHFD (A06071302)	SD (MF)
L-Cystine	4.2	3.6
L-Isoleucine	7.6	8.9
L-Leucine	15.8	17.4
L-Lysine	13.2	12.4
L-Methionine	0.8	4.4
L-Phenylalanine	8.4	10.4
L-Threonine	7.2	8.9
L-Tryptophan	2.1	2.8
L-Valine	9.3	10.8
L-Histidine	4.6	6.0
L-Alanine	5.1	12.0
L-Arginine	6.0	14.2
L-Aspartic Acid	12.1	21.4
L-Glutamic Acid	38.2	39.9
Glycine	3.0	11.8
L-Proline	17.8	13.1
L-Serine	10.0	11.1
L-Tyrosine	9.2	6.8
Choline	0	1.8
Protein	174.6	231.0
Fat	270	51.0
Fiber	50.0	28.8
Total Calories	3924	3590

**Table 1. Contents of CDAHFD and SD are shown.**

### 1-2-3. 病理組織学的解析

マウスの肝臓組織を摘出し、10% の中性緩衝ホルムアルデヒド（Wako）で 4℃ で 48 時間固定し、パラフィン包埋した。肝切片（厚さ 4 μm）は、70% エタノール中に 24 時間浸し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）およびマッソントリクローム（MT）で染色して光学顕微鏡で観察した。

#### 1-2-4. トータル RNA 抽出 および逆転写反応

トータル RNA の抽出、単離、精製は RNAiso Plus Reagent (TaKaRa) を使用し、製品プロトコールの手順に従って以下の通り行った。即ち、マイクロチューブに採取した肝臓組織片 10 mg に RNAiso Plus Reagent を 500  $\mu$ L 加え、バイオマッシャー II (Nippi) を用いて組織片をホモジェナイズした後、クロロホルム (Nacalai Tesque) を 100  $\mu$ L 加え、15 秒間激しく転倒混和した。その後、氷上で 2 分間静置し、4°C で 12,000 $\times$ g にて 15 分間遠心分離した。遠心後、水層 (上層) を約 500  $\mu$ L をマイクロチューブに移し、イソプロパノール (Nacalai Tesque) を 500  $\mu$ L 加えて転倒混和した。その後室温で 5 分間静置し、4°C で 12,000 $\times$ g にて 10 分間遠心分離した。遠心後、得られた沈殿物に ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理水 (Nacalai Tesque) で希釈した 75% エタノール を 1 mL 加えて転倒混和し、4°C で 12,000 $\times$ g にて 5 分間遠心分離した。遠心後、上清を除去して室温で約 10 分間風乾した。沈殿物が透明になったことを確認した後に DEPC 処理水を加え、氷上で 5 分間インキュベートして沈殿物を溶解した。得られたサンプルは、逆転写反応に使用するまで -80°C で凍結保存した。

逆転写反応は、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO) を使用して行った。製品プロトコールに従って、得られた トータル RNA サンプルを 65°C で 5 分間インキュベートし、氷上で急冷した。その後、トータル RNA 1  $\mu$ g に 5 $\times$ RT バッファー [50 mM Tris-HCl (pH8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 10 mM dNTP]、逆転写酵素 [20 mM Tris-HCl (pH7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.01% Nonidet P-40, 50% Glycerol] 100 U/ $\mu$ L、プライマー混合液 [10 pmol oligo (dT) primer, 25 pmol random primer]、nuclease-free water を混合し、全量を 10  $\mu$ L として反応液を 37°C で 15 分間、98°C で 5 分間の条件で反応させた。反応終了後は 4°C で保存し、nuclease-free water で 10 倍に希釈した。

### 1-2-5. 定量的リアルタイム RT-PCR

定量的リアルタイム RT-PCR (qRT-PCR) は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を使用し、7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems) を使用して特定の遺伝子を増幅した。製品プロトコールに従って、逆転写反応させたテンプレート溶液に THUNDERBIRD SYBR qPCR mix、50×ROX reference dye、6 pmol forward primer、6 pmol reverse primer、nuclease-free water を加えて混合し、全量を 20  $\mu$ L として反応液を 95°C で 20 秒間、95°C で 3 秒間、60°C で 30 秒間の増幅反応を 40 サイクル行った。遺伝子発現量は、 $\beta$ -actin mRNA 発現量と比較することにより正規化した。全ての反応は duplicate にて行った。qRT-PCR 解析に使用した遺伝子特異的プライマー (Sigma-Aldrich) の塩基配列は Table 2 に示した通りである。

Target	Primer sequence (5' $\rightarrow$ 3')
TNF- $\alpha$ Fwd	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
TNF- $\alpha$ Rev	GCTACGACG TGGGCTACAG
TGF- $\beta$ Fwd	GCTAATGGTGGACCGCAACAAC
TGF- $\beta$ Rev	CACTGCTTCCCGAATGTCTGAC
Collagen I Fwd	GCTCCTCTTAGGGGCCACT
Collagen I Rev	ATTGGGGACCCTTAGGCCAT
Collagen IV Fwd	TCCGGGAGAGATTGGTTTCC
Collagen IV Rev	CTGGCCTATAA GCCCTGGT
CD36 Fwd	TCTTATGGTGTGCTAGACATTGGC
CD36 Rev	AGGTTCTGAAACATCTGGACTTGC
MTP Fwd	CCTACCAGGCCCAACAAGAC
MTP Rev	CGCTCAATTTTGCATGTATCC
$\beta$ -actin Fwd	CTGACTGACTACCTCATGAAGATCCT
$\beta$ -actin Rev	CTTAATGTCACGCACGATTTCC

**Table 2. The primer sequences used in qRT-PCR are shown.**

Fwd: forward, Rev: reverse

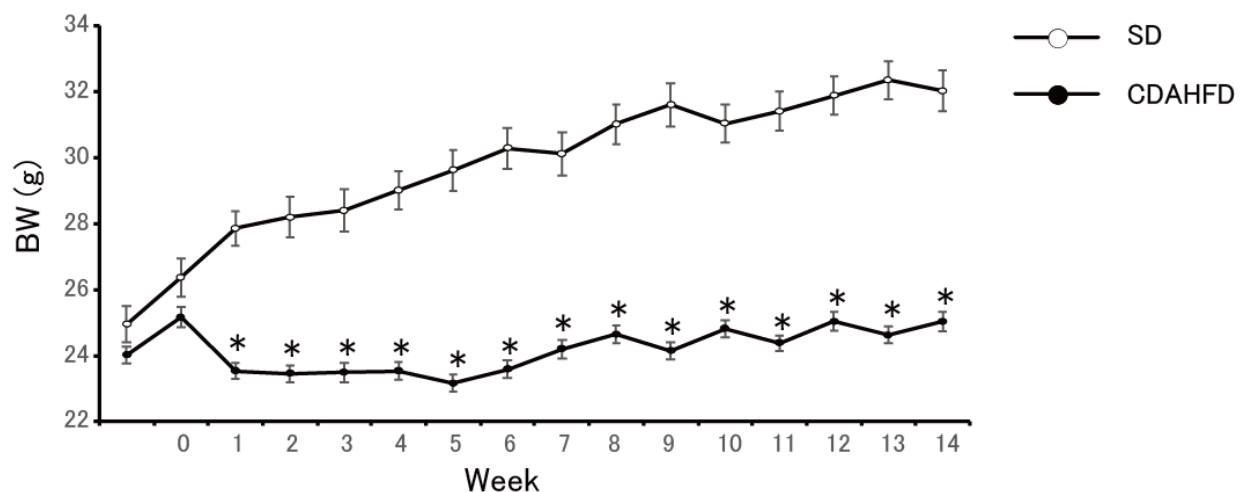
#### 1-2-6. 統計学的解析

数値データは、平均値  $\pm$  標準誤差 (standard error of the mean; S.E.M.) として表した。平均値間の差の統計的有意性は、Student's *t*-test を用いて評価した。相関性の統計的有意性は、Spearman's test を用いて解析した。P 値は 0.05 未満を統計的に有意であると判定した。

### 1-3. 結 果

#### 1-3-1. CDAHFD がマウスの体重に及ぼす影響

CDAHFD あるいは SD を 14 週間供与したところ、CDAHFD 供与マウスの体重は、供与期間を通して SD 供与マウスよりも有意に低値 ( $P < 0.0001$ ) であった (Figure 3)。14 週目における CDAHFD 群と SD 群の平均体重は、それぞれ  $24.8 \pm 0.2$  g および  $32.0 \pm 0.6$  g であった ( $P < 0.0001$ )。これらの体重減少は、脂肪無添加の MCD モデルで報告された体重減少に比べて軽度であった。しかし、CDAHFD 群の体重減少は、統計的に有意であり、ヒト NASH の一般的な表現型とは異なるものであった。

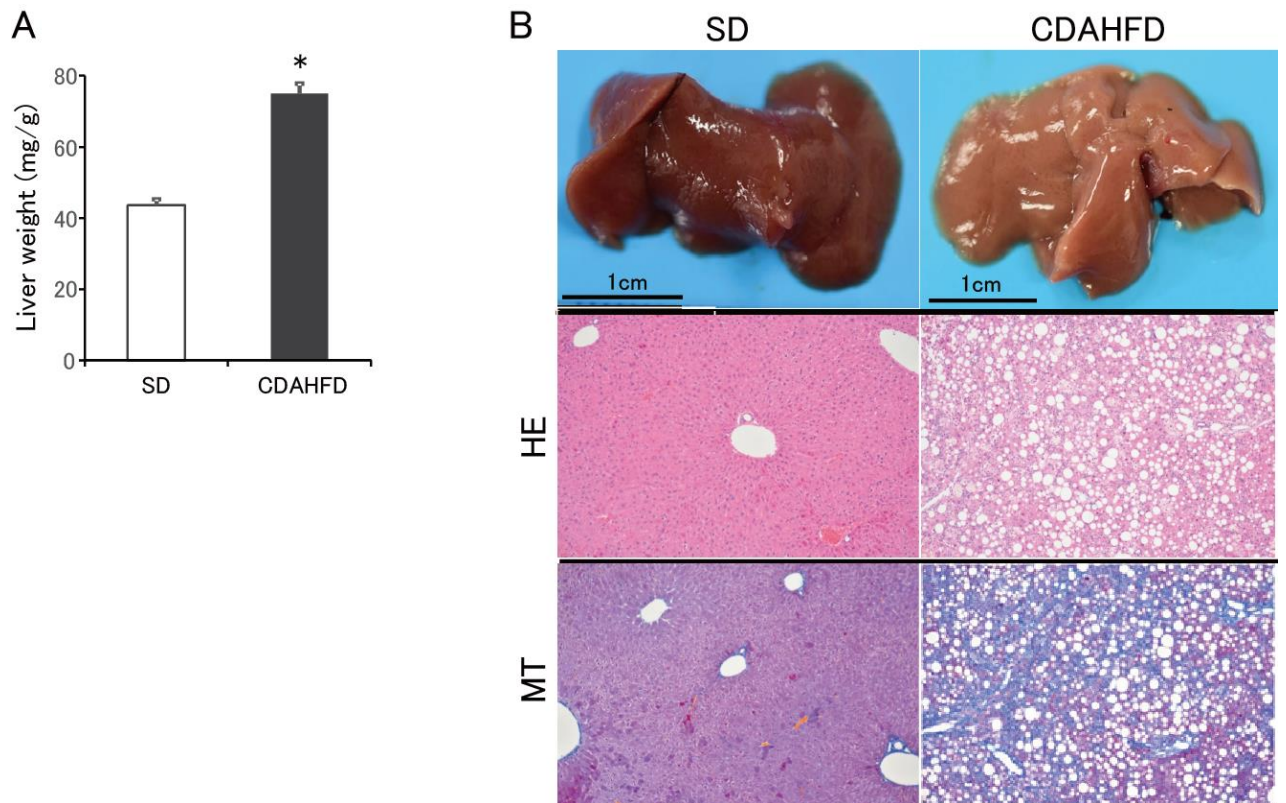


**Figure 3. Comparison of body weight changes in mice fed CDAHFD or SD.**

Weekly body weight (BW) changes in mice fed CDAHFD or SD for 14 weeks are indicated (n=10). Values are indicated as mean  $\pm$  S.E.M. \*:  $P < 0.0001$  vs SD.

### 1-3-2. CDAHFD がマウスの肝臓重量と肝臓の肉眼的および顕微鏡的外観に与える影響

CDAHFD 群 ( $74.9 \pm 2.8$  mg/体重) の肝臓重量は、SD 群 ( $43.6 \pm 1.7$  mg/g) と比べて有意に ( $P < 0.0001$ ) 高重量であった (Figure 4A)。CDAHFD 供与マウスから摘出した肝臓の外観は、SD 供与マウスと比べて淡色の色調を呈した (Figure 4B 上段)。さらに、HE および MT 染色による組織病理学的解析の結果、CDAHFD 供与マウスの肝臓組織における脂肪滴、白血球浸潤および線維化が認められたが、SD 供与マウスでは認められなかった (Figure 4B 下段)。このように、これまでの研究で報告されてきた通り<sup>18)</sup>、CDAHFD を供与したマウスの肝臓はヒト NASH に類似する組織像を呈した。



**Figure 4. Liver weight, macroscopic appearance and histology in mice fed CDAHFD or SD.**

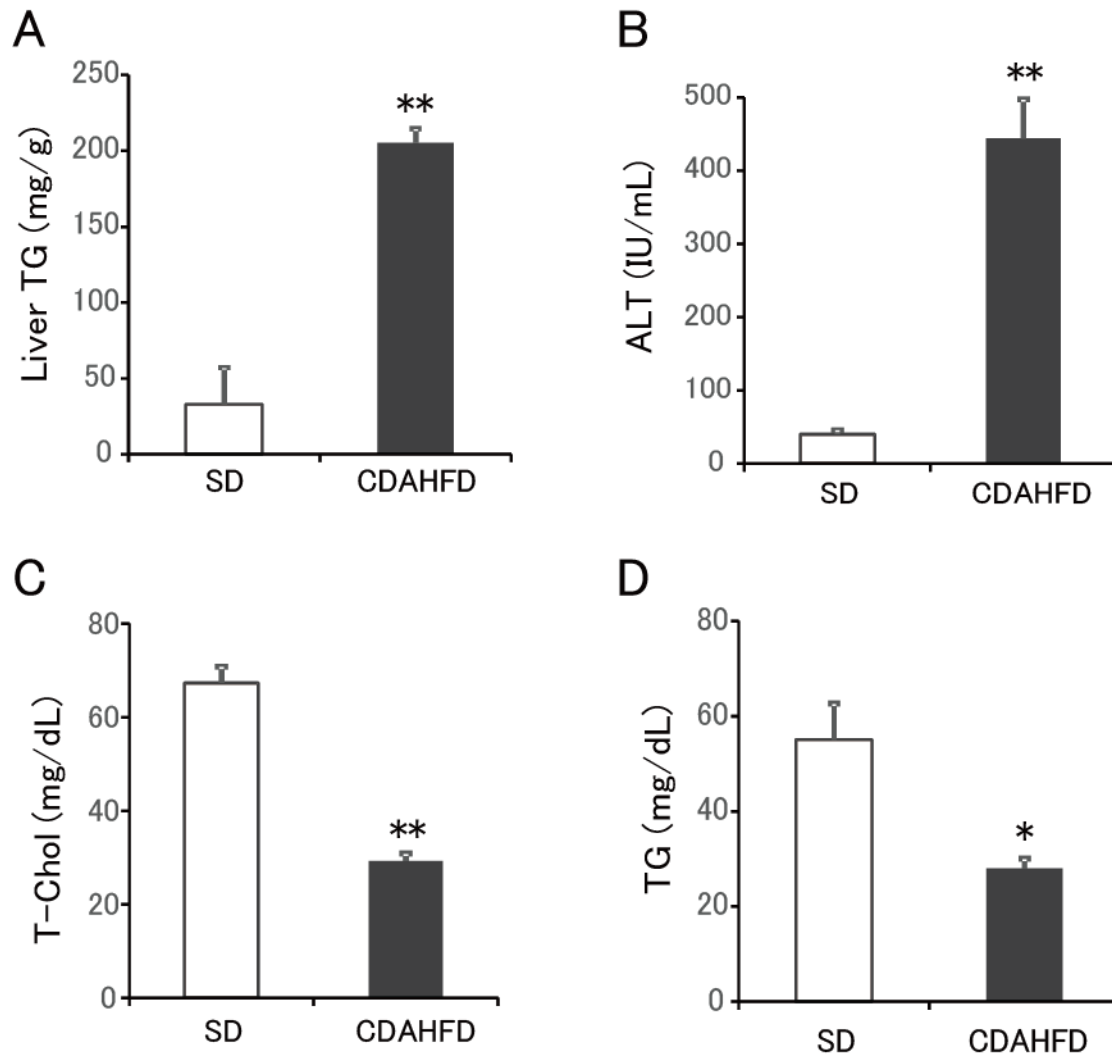
Liver weight relative to BW (mg/g, panel A) and representative liver macroscopic appearance and histopathology (panel B) in mice fed CDAHFD or SD for 14 weeks are shown. In panel A, liver weight in mice fed CDAHFD or SD for 14 week is shown (n=10). In panel B, upper panels indicate macroscopic appearance, middle and lower panels show microscopic images in hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson's trichrome (MT) staining, respectively.

Values are indicated as mean  $\pm$  S.E.M. \*:  $P < 0.0001$  vs SD.

### 1-3-3. 肝臓の脂質含量と ALT および脂質濃度

CDAHFD 供与による脂質プロファイルを検討するために、肝臓での脂肪蓄積量、血清中の ALT、T-Chol、TG 値について検討した。肝臓 TG 含有量は、SD 供与マウス ( $32.8 \pm 24.3$  mg/g, Figure 5A) と比べて CDAHFD 供与マウス ( $205.2 \pm 9.2$  mg/g) で有意に高値であった ( $P < 0.0001$ )。血清 ALT 値は、SD ( $40.4 \pm 5.4$  IU/mL, Figure 5B) 供与マウスと比べて CDAHFD ( $443.6 \pm 53.5$  IU/mL) 供与マウスで有意に高値であった ( $P < 0.0001$ )。血清脂質プロファイルに関しては、血清 T-Chol 値は、SD 供与マウス ( $67.3 \pm 3.5$  mg/dL, Figure 5C) と比べて CDAHFD 供与マウス ( $29.3 \pm 1.6$  mg/dL) で有意に ( $P < 0.0001$ ) 低値であった。血清 TG 値についても、SD ( $55.1 \pm 7.6$  mg/dL, Figure 5D) 供与マウスと比べて CDAHFD ( $28.0 \pm 2.0$  mg/dL) 供与マウスの方が有意に低値であった ( $P < 0.01$ )。





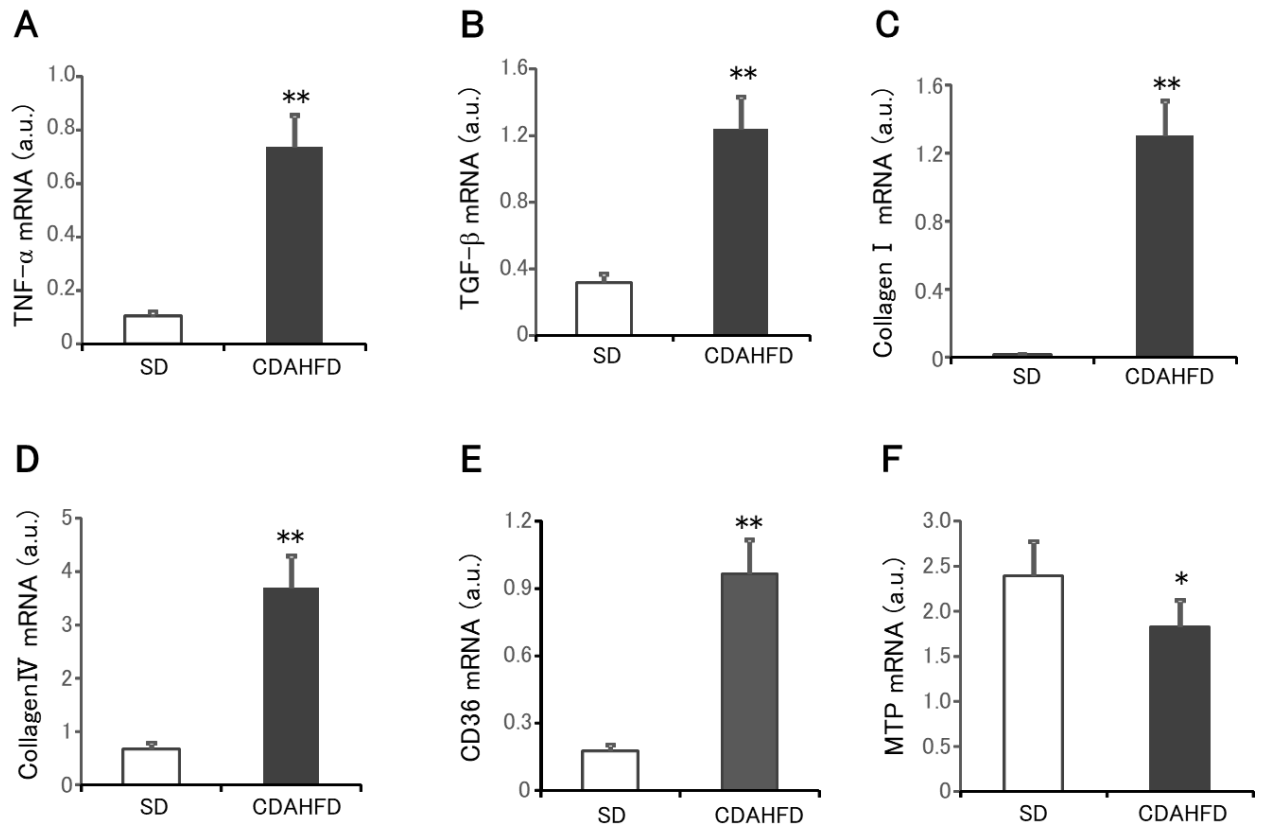
**Figure 5. Intrahepatic TG content and serum ALT and lipid levels in mice fed CDAHFD or SD.**

Intrahepatic TG content (A), serum ALT (B), TG (C) and total cholesterol (T-Chol) (D) levels in mice fed CDAHFD or SD for 14 weeks are shown. Values are indicated as mean  $\pm$  S.E.M.

(n=10). \*:  $P < 0.01$ , \*\*:  $P < 0.0001$  vs SD.

#### 1-3-4. 肝臓組織における炎症、線維症、TG 取り込みに関連する遺伝子発現

肝臓組織での炎症、線維症、TG 取り込みに関連する遺伝子発現量の変化を検討するために、qRT-PCR 解析を実施した。肝臓組織における炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量は、SD 群 ( $0.10 \pm 0.02$  a.u. Figure 6A) と比べて CDAHFD 群 ( $0.74 \pm 0.12$  a.u.) で有意に増加した ( $P < 0.0001$ )。線維化の指標である TGF- $\beta$  mRNA 発現量は、SD 群 ( $0.32 \pm 0.05$  a.u. Figure 6B) と比較して、CDAHFD 群 ( $1.23 \pm 0.20$  a.u.) で有意に ( $P < 0.0001$ ) 増加した。同じく線維化の指標の collagen I および IV mRNA 発現量についても、SD 群 ( $0.02 \pm 0.003$  a.u. および  $0.68 \pm 0.11$  a.u. それぞれ Figure 6C および Figure 6D) と比べて CDAHFD 群 ( $1.30 \pm 0.21$  a.u. および  $3.69 \pm 0.58$  a.u.) で有意に (それぞれ  $P < 0.0001$  および  $P < 0.0001$ ) 顕著に増加した。さらに、CDAHFD 群 ( $0.96 \pm 0.15$  a.u. Figure 6E) では、SD 群 ( $0.18 \pm 0.03$  a.u.) と比較して、肝臓における CD36 mRNA 発現量が有意に ( $P < 0.0001$ ) 増加した。一方で、MTP mRNA 発現量は、SD 群 ( $2.4 \pm 0.38$  a.u. Figure 6F) と比較して CDAHFD 群 ( $1.8 \pm 0.29$  a.u.) で有意に ( $P < 0.05$ ) 減少した。

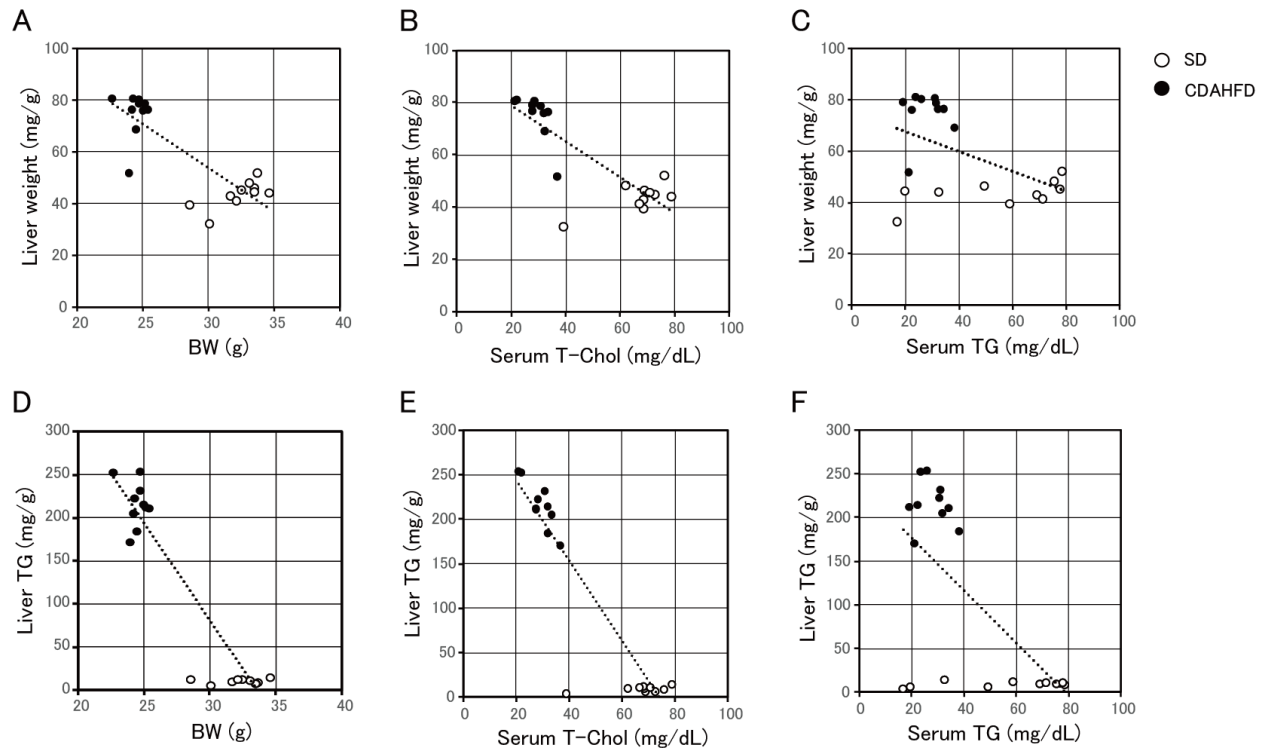


**Figure 6. Relative expression levels of genes related to lipid accumulation, inflammation and fibrosis in mice fed CDAHFD or SD.**

Relative mRNA expression levels of TNF- $\alpha$  (A), TGF- $\beta$  (B), collagen I (C), collagen IV (D), CD36 (E) and MTP (F) in the liver of mice fed CDAHFD or SD for 14 weeks. Expression levels were normalized to  $\beta$ -actin mRNA expression levels. Values are indicated as mean  $\pm$  S.E.M. (n=10). \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.0001$  vs SD.

### 1-3-5. 肝臓での脂質蓄積と体重および血清脂質値との相関性の検討

CDAHFD モデルにおける血清脂質値の変動と NAFLD/NASH の病態進展との関連性を検討するために、体重あるいは血清脂質値と NAFLD/NASH の病態の指標との相関性を検討した。肝臓重量は、体重 (Figure 7A; Spearman's  $\rho = -0.644$ ,  $P < 0.001$ ) および血清 T-Chol 値 (Figure 7B; Spearman's  $\rho = -0.785$ ,  $P < 0.001$ ) との間で有意な逆相関を示した。しかし、血清 TG 値とは統計的に有意な逆相関ではなかった (Figure 7C; Spearman's  $\rho = -0.304$ ,  $P = 0.193$ )。肝臓内での TG 含有量は、体重 (Figure 7D; Spearman's  $\rho = -0.774$ ,  $P < 0.001$ ) および血清 T-Chol 値 (Figure 7E; Spearman's  $\rho = -0.799$ ,  $P < 0.001$ ) と有意な逆相関を示した。一方で、肝臓内 TG 含有量は、血清 TG 値と逆相関する傾向にあったが、統計的に有意ではなかった (Figure 7F; Spearman's  $\rho = -0.330$ ,  $P = 0.155$ )。

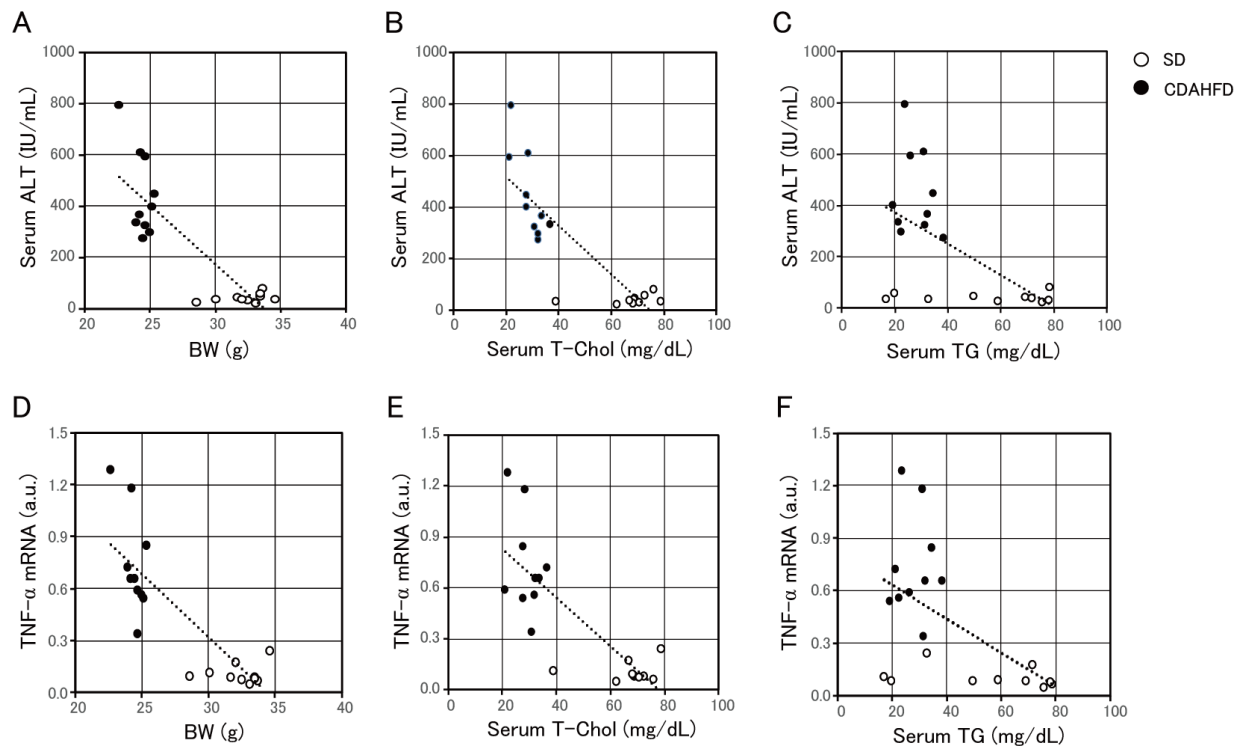


**Figure 7. Relationship of liver weight or intrahepatic TG content with body weight or serum lipid levels.**

Correlation of liver weight (A-C) or intrahepatic TG content (D-F) with body weight (A, D), serum T-Chol (B, E) or TG (C, F) levels in mice fed CDAHFD or SD for 14 weeks (n=10) is shown.

### 1-3-6. 血清 ALT および肝臓での TNF- $\alpha$ 発現量と体重あるいは血清脂質値との 相関性の検討

血清 ALT 値および肝臓組織での TNF- $\alpha$  発現量と体重あるいは血清脂質値との相関性を検討した。血清 ALT 値は、体重 (Figure 8A; Spearman's  $\rho = -0.728$ ,  $P < 0.001$ )、血清 T-Chol 値 (Figure 8B; Spearman's  $\rho = -0.675$ ,  $P < 0.001$ ) および血清 TG 値 (Figure 8C; Spearman's  $\rho = -0.508$ ,  $P < 0.05$ ) との間で有意な逆相関を示した。また、肝臓組織における TNF- $\alpha$  mRNA 発現量は、体重 (Figure 8D; Spearman's  $\rho = -0.774$ ,  $P < 0.001$ )、血清 T-Chol 値 (Figure 8E; Spearman's  $\rho = -0.770$ ,  $P < 0.001$ ) および血清 TG 値 (Figure 8F; Spearman's  $\rho = -0.505$ ,  $P < 0.05$ ) との間で有意な逆相関を示した。



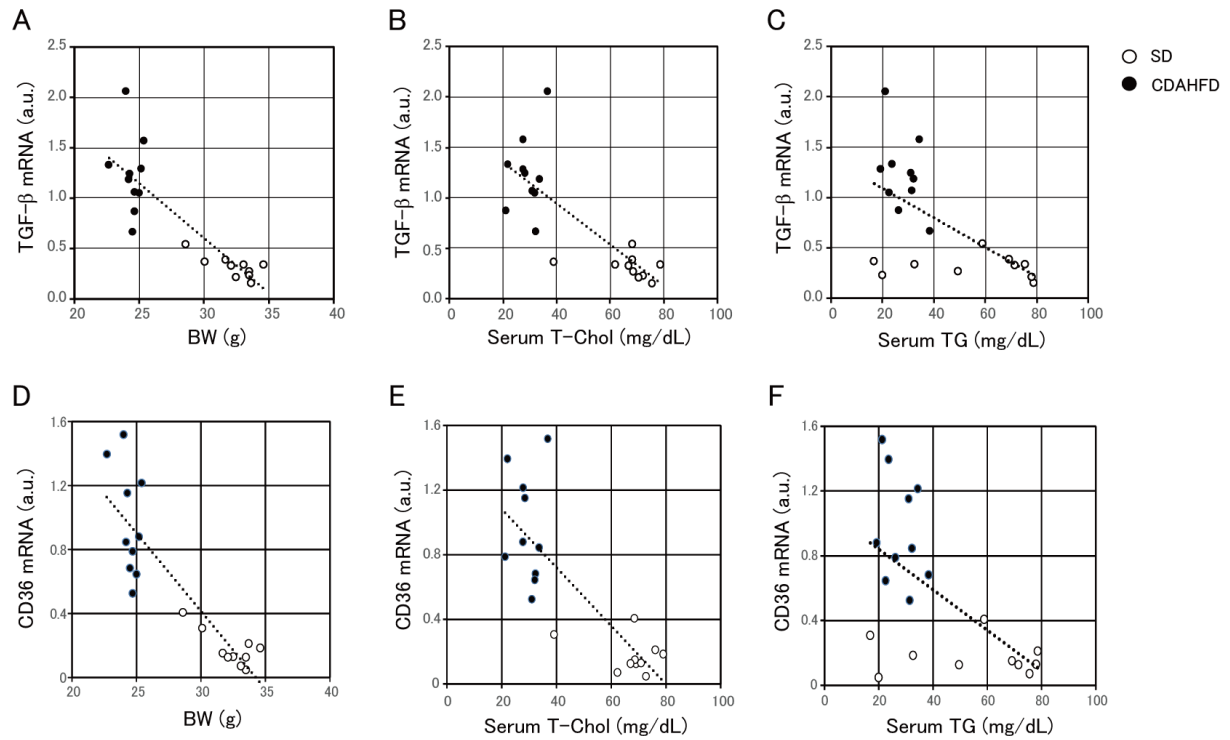
**Figure 8. Relationship of serum ALT or hepatic TNF- $\alpha$  expression levels with body weight or serum lipid levels.**

Correlation of serum ALT (A-C) or hepatic TNF- $\alpha$  mRNA expression (D-F) levels with body weight (A, D), serum T-Chol (B, E) or TG (C, F) levels in mice fed CDAHFD or SD for 14 weeks is shown (n=10).

### 1-3-7. 肝臓での TGF- $\beta$ および CD36 発現量と体重および血清脂質値との相関性の検討

肝臓組織での TGF- $\beta$  および CD36 mRNA 発現量と体重あるいは血清脂質値との間の相関性を検討した。肝臓組織における TGF- $\beta$  mRNA 発現量は、体重 (Figure 9A; Spearman's  $\rho = -0.859$ ,  $P < 0.001$ )、血清 T-Chol 値 (Figure 9B; Spearman's  $\rho = -0.826$ ,  $P < 0.001$ ) および血清 TG 値 (Figure 9C; Spearman's  $\rho = -0.537$ ,  $P < 0.05$ ) との間で有意な逆相関を示した。さらに、肝臓組織における CD36 mRNA 発現量は、体重 (Figure 9D; Spearman's  $\rho = -0.844$ ,  $P < 0.001$ )、血清 T-Chol 値 (Figure 9E; Spearman's  $\rho = -0.764$ ,  $P < 0.001$ ) および血清 TG 値 (Figure 9F; Spearman's  $\rho = -0.478$ ,  $P < 0.05$ ) との間で有意な逆相関を示した。





**Figure 9. Relationship of hepatic TGF- $\beta$  or CD36 expression levels with body weight or serum lipid levels.**

Correlation of hepatic TGF- $\beta$  (A-C) or CD36 (D-F) mRNA expression levels with body weight (A, D), serum T-Chol (B, E) or TG (C, F) levels in mice fed CDAHFD or SD for 14 weeks is shown (n=10).

#### 1-4. 考 察

NAFLD/NASH の特異的かつ有効な予防法と治療法を確立するためには、臨床で観察されるヒト NAFLD/NASH の特徴的所見を忠実に模倣する動物モデルが必要である。従来の HFD や MCD などの栄養モデルやレプチン欠損 (ob/ob) およびレプチン抵抗 (db/db) マウスなどの遺伝子改変モデルでは、肥満や脂肪肝が共通して再現される<sup>8,9,11)</sup>。しかし、HFD モデルやこれらの遺伝子改変モデルでは、NASH の特徴の一つである肝線維症には進展しないことが報告されている<sup>16-19)</sup>。また、MCD による食餌モデルでは、脂肪肝、炎症および線維症を呈する一方で、肥満の表現型を示さず、重度の体重減少が報告されている<sup>16)</sup>。これらの点は、ヒト NASH の臨床的特徴とは異なるものであり、これらの実験上の難点を克服するために、CDAHFD モデルが確立された。

本章では、NASH の病態進展と CDAHFD マウスモデルにおける体重と血清脂質プロファイルの変動および脂肪肝、肝炎、肝線維症に関連する分子指標との相関性について検討し、NAFLD/NASH における CDAHFD マウスモデルの有用性について検討した。本章における検討では、CDAHFD 供与マウスが SD 供与マウスと比較してヒトでの臨床所見とは異なる有意な低体重、血清 T-Chol 値および TG 値が減少することを明らかにした。さらに、従来の NAFLD/NASH 動物モデルを用いた検討では、病態進展に関わる遺伝子発現量について解析されているものの、体重および血清脂質の変動との相関性は十分に検討されていなかった。本研究は、体重および血清脂質と脂肪肝、肝炎および肝線維症に関連する分子指標との相関性は、本研究で初めて明らかされ、体重低下と血清脂質値の低下は、肝臓組織における TG 含有量、TNF- $\alpha$  および TGF- $\beta$  の遺伝子発現量、血清 ALT 値などの NASH の重症指標と有意な逆相関を示し、これらの要因間の重要な関連を示唆した。

リポタンパク代謝の恒常性を維持する上で、ヒトやマウスは VLDL の形成と分泌に重要な役割を果たす PC を合成するために、食物からコリンを摂取する必要がある。また、MTP は肝臓での VLDL の形成と放出に必須のタンパク質であり、実際にヒトではホモ接合型家族性高コレステロール血症を含む極めて重度の高コレステロール血症の治療薬剤として MTP 阻害剤であるロミタピドが開発され、臨床使用されている<sup>20)</sup>。その作用機序から予測される通り、ロミタピドの重要な副作用として、肝臓での TG の蓄積が報告されている<sup>20)</sup>。また、ホスファチジルエタノールアミン N-メチルトランスフェラーゼ (PEMT) および MTP には遺伝子多型が存在し、NAFLD/NASH に対する感受性に影響することが報告されている<sup>21-23)</sup>。MCD 供与マウス<sup>15)</sup>と同様に、CDAHFD 供与マウスにおいても肝臓組織での MTP 発現量の著しい減少がみられ、少なからずヒトの病態と異なる点が存在するものの、MTP 阻害剤により誘発される NAFLD/NASH および PEMT あるいは MTP の遺伝子異常を背景とする NAFLD/NASH の病態を模倣するモデルとなる可能性が考えられた。

また、NAFLD を伴う高インスリン血症患者の肝臓中の TG の約 60% が血清中の遊離脂肪酸から合成されるが、空腹時にはそれが約 80% に及び、脂肪組織での TG 分解と遊離脂肪酸の放出に関わるホルモン感受性リパーゼは、インスリンにより活性が抑制されるが、インスリン抵抗性が生じるとその活性化の抑制がかからない<sup>24)</sup>。また、肝臓への遊離脂肪酸の取り込みは制御を受けずその血中濃度に依存するといわれる<sup>24)</sup>。さらに、このような患者では肝臓での脂肪酸合成も亢進されており、肝臓中の TG の約 26% 程度が肝臓組織内で生合成された遊離脂肪酸であり、その割合は空腹時でも高いこと（健常者では空腹時には肝臓組織内で合成された脂肪酸の割合は 5% 未満）から、脂肪組織からの遊離脂肪酸の放出や肝臓内での脂肪酸合成をも加えた実験的動物モデルが必要かもしれない<sup>24)</sup>。この TG の基となる脂肪酸の由来の比率の相違は、肝臓組織における脂肪蓄積あるいは炎症反応の組織像の変動に加え、

脂肪組織を含めた包括的な類似性を有する疾患モデルの重要性を示唆すると思われる。また、肝細胞における CD36 の発現は、肝臓組織への脂肪酸の取り込みおよび NAFLD/NASH の発症に関与することが示唆されている<sup>25)</sup>。さらに、U937 細胞を用いた研究で示されたように、CD36 の発現は TNF- $\alpha$  による炎症性刺激により誘導されることが明らかにされている<sup>26)</sup>。本研究の CDAHFD モデルでみられた血清脂質値の低下は、肝臓での CD36 発現量の増加と MTP 発現量の低下が寄与することが示唆された。

本章における検討により、実際に、従来の実験食餌供与モデルを改善し、ヒト NASH に類似するとされる CDAHFD においても、ヒト NASH の臨床像とは異なる有意な体重増加の抑制および血清脂質の低下が明らかとなった。これらの臨床像の相違点は、遺伝的異常や MTP 阻害薬での治療下ではないヒト NASH の病態を反映するバイオマーカーあるいは治療標的分子を探索する際の重大な障壁となるものと考えられた。また、体重および血清脂質と脂肪蓄積、肝炎および肝線維症に関連する分子指標との相関性は、本研究で初めて明らかされた。従来の NAFLD/NASH 動物モデルを用いた検討では、病態進展に関わる遺伝子発現量について解析されているものの、体重および血清脂質の変動との相関性は十分に検討されていなかった。この研究成果は、NAFLD/NASH の分子機構の解明に直接的に寄与するものではないが、今後の動物モデルを用いた NAFLD/NASH の研究において、体重と血清脂質プロファイルの変動および病態進展に関連する分子指標との相関性を明らかにし、ヒトの病態と類似した実験動物モデルにすることの重要性を示した。一方、MCD 供与レプチン抵抗 (db/db) マウス<sup>15)</sup> では、内臓肥満とインスリン抵抗性を呈するヒト NASH の臨床所見に類似する一方で、それらの血清脂質プロファイルは未だ明らかにされておらず、今後の解明が期待される。

## 第 2 章 肝細胞におけるナルディライジンによる低密度リポタンパク (LDL) - コレステロールの代謝制御の検討

### 2-1. 緒 言

第 1 章では NAFLD/NASH の臨床所見として認められる脂肪肝、肝炎、肝線維症に関連する分子指標と血清脂質との相関性について明らかにした。しかしながら、リポタンパク代謝の異常に起因する脂質異常症では、主として血液中の VLDL 粒子に由来する TG 濃度に加えて LDL 粒子に由来するコレステロール濃度の是正が重要である。そこで本章では、リポタンパクおよびコレステロール代謝において中心的な役割を果たす肝細胞における NRDC について検討することとした。

アテローム性動脈硬化症 (ASCVD) は、世界中の先進国および発展途上国における主要な死因である。特に血清 LDL-コレステロール (LDL-C) 値の上昇に代表される脂質異常症は、ASCVD の強力な危険因子の一つである。即ち、血清 LDL-C 値の低下は、ASCVD への進展予防に寄与することが示されている<sup>27,28)</sup>。しかし、実際の臨床における血清 LDL-C 値の管理目標値の達成は、全ての症例において実現されているものではなく、目標値を上回る濃度で推移する症例も散見されている<sup>29,30)</sup>。

血清 LDL-C 値は、主として肝臓の LDL 受容体を介した LDL 粒子のエンドサイトーシスによる LDL の取り込みにより制御されている<sup>31,32)</sup>。細胞表面における LDL 受容体の発現量は、上流の転写因子である SREBP2 により制御されている。SREBP2 は細胞内のコレステロールプールが減少することにより前駆体から活性型に変換され、細胞質から核内に移行した後に標的遺伝子のプロモーター領域に結合することにより遺伝子発現量を増加させる。また、LDL 受容体の細胞表面での発現量は PCSK9 および E3-ユビキチンリガーゼである LDL 受

容体の誘導性分解タンパク質 (IDOL) による翻訳後調節 (タンパク質分解) によっても制御される。PCSK9 および IDOL の発現は、それぞれ SREBP2 および肝臓 X 受容体 (LXR) により誘導される<sup>33,34)</sup>。PCSK9 は主に肝臓で合成され、循環血液中に放出されるタンパク質である。細胞膜表面の LDL 受容体と結合することで LDL 受容体のエンドソームからライソゾームへのリクルートを促進することにより分解を増加させる<sup>35)</sup>。一方で IDOL は、細胞内に取り込まれた LDL 受容体をポリユビキチン化することによりプロテアソーム依存的な分解を促進する<sup>36)</sup>。また、LDL は VLDL がリポタンパクリパーゼ (LPL) および肝性トリグリセリドリパーゼ (HTGL) により含有する TG が加水分解を受けることで生じるため、血清 LDL-C 値は細胞表面の LDL 受容体発現に加え、MTP による肝臓から血中への VLDL 分泌によっても調節されている<sup>37)</sup>。MTP には 2 種類の一塩基多型が同定されており、血中のリポタンパク脂質濃度への関連が示されている<sup>38)</sup>。

NRDC は、膜型増殖因子であるヘパリン結合型上皮増殖因子 (HB-EGF) の特異的受容体タンパク質として同定された分子量約 140 kDa の M16 ファミリーに属するメタロエンドペプチダーゼである<sup>39)</sup>。その後、膜結合型の HB-EGF を遊離型に変換する細胞外ドメインのシェディング活性化因子として機能することが示された<sup>40)</sup>。

NRDC は、酵素ドメインの内部に高度酸性ドメインを有する特徴的なタンパク質であり、全身に広範囲に存在する。特に肝臓や心臓、精巣、肺組織で強く発現し、細胞内では主に細胞質に存在するが、核内にも移行し、また細胞外にも分泌され、その一部は細胞膜表面に存在している<sup>41)</sup>。全身での遺伝子欠損マウスの作製により、マウスでの NRDC 欠損は、成長遅延、神経系の発生分化障害などが生じることが最初に示されたが<sup>42)</sup>、その後の研究により NRDC が細胞内局在に依存して多様な生理的役割を果たしていることが明らかにされている (Figure 10)。細胞膜表面に存在する NRDC は、HB-EGF に加え、TNF- $\alpha$ <sup>43)</sup>、アミロイド前駆体タンパク質 (APP)<sup>44)</sup> などの膜結

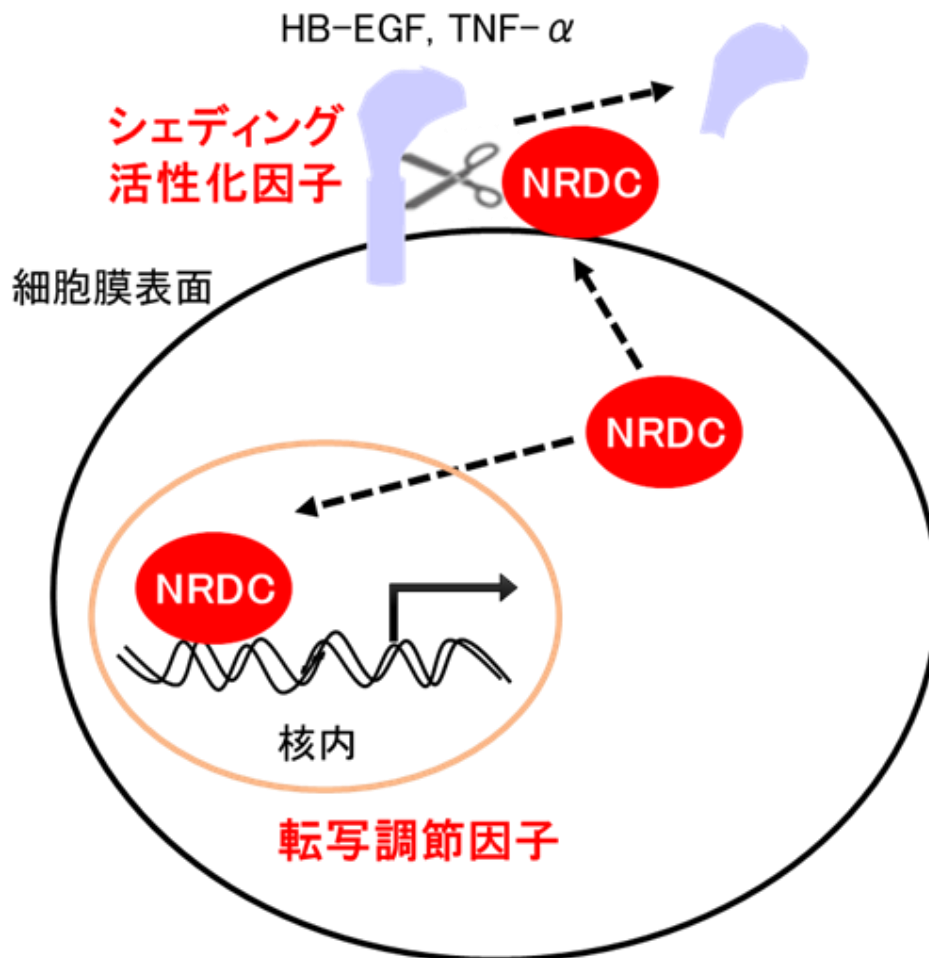
合型タンパク質を遊離型に変換する細胞外ドメインのシェディング活性化因子として機能する。TNF- $\alpha$  の細胞外への遊離は、a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) ファミリーに属する TNF- $\alpha$  変換酵素 (TACE/ADAM17) により促進され、NRDC は ADAM17 の細胞外ドメインに直接的に結合し、ADAM17 の切断酵素活性を直接的に促進する<sup>43)</sup>。マウスでの病態モデルを用いた研究により、胃癌<sup>45)</sup>、アルツハイマー病<sup>46)</sup>、関節リウマチ<sup>47)</sup> における炎症反応の誘発に関連することが明らかにされている。

一方で、核内の NRDC は、ジメチル H3K4 (H3K4me2) 結合タンパク質に作用して翻訳後ヒストン修飾に関与する<sup>48)</sup>。また、褐色脂肪組織では、NRDC と脱共役タンパク質 (Ucp) 1 エンハンサー上のペルオキシソーム増殖剤活性化受容体コアクチベーター (PGC) -1 $\alpha$ での相互作用が転写を抑制し、熱発生を制御する<sup>49)</sup>。さらに、膵臓  $\beta$  細胞の NRDC は、Mafa エンハンサー上の islet-1 と協調して転写を活性化し、 $\beta$  細胞の分化およびインスリン分泌を調節することが明らかにされている<sup>50)</sup>。

さらに、NRDC の欠損はマウスの胃癌の進行、転移に加えて、炎症性疾患増悪の抑制とともに<sup>51)</sup>、H3K9 のアセチル化の減少および H3K4me2 の増加を誘導し、細胞周期関連の遺伝子発現を制御していることも明らかにされている<sup>52)</sup>。NRDC の全身欠損マウスを用いて、NASH の食餌供与モデルである CDAA を NRDC 欠損マウスおよび対照マウスに供与したところ、対照マウスと比べて NRDC 欠損マウスにおける脂肪肝、肝炎、肝線維化、肝障害が有意に抑制されることが明らかにされた<sup>53)</sup>。この NRDC 全身欠損マウスを用いた研究では、肝臓の Kupffer 細胞および浸潤した炎症性細胞における NRDC が TNF- $\alpha$  のシェディング活性化を介して NASH の進展に寄与することが示唆されている。

このように、NRDC は全身の臓器や組織における細胞内局在に依存してシェディング活性化あるいは転写制御など多様な生理活性を有し、NRDC の全身欠損あるいは臓器特異的欠損マウスを用いて各臓器や細胞における NRDC の役割が検討されてい

る。しかしながら、肝臓の大部分を占有する肝細胞における NRDC の生理的役割は明らかにされていない。そこで本章では、肝細胞特異的な NRDC ノックアウト (NRDC<sup>LKO</sup>) マウスを用いて、リポタンパクおよびコレステロール代謝における肝細胞の NRDC の役割について検討した。



**Figure 10. Multiple function of NRDC depending on subcellular localization.**



## 2-2. 実験材料および実験方法

### 2-2-1. 肝細胞特異的 NRDC 欠損および対照マウスの作製

NRDC<sup>LKO</sup> マウスは Cre-loxP 法を用いて作製した。遺伝子ターゲティング法を用いて *Nrd1* 遺伝子の exon 1 の両端に loxP 配列を挿入した *Nrd1* floxed (NRDC<sup>f/f</sup>) マウス (Accession No. CDB1019K, <http://www.clst.riken.jp/arg/mutant%20mice%20list.html>) を作製し、アルブミンプロモーターの下流に Cre-recombinase 遺伝子カセットを挿入した Alb-Cre トランスジェニックマウスと交配した。それらのマウスの交配により得られた C57BL/6J 系統の NRDC<sup>LKO</sup> および NRDC<sup>f/f</sup> 雄性マウスは 4 週齢で離乳し、その後の標準食餌 (MF; Oriental yeast; SD) の摂取および飲水の機会は自由とした。10-12 週齢で、NRDC<sup>LKO</sup> および NRDC<sup>f/f</sup> マウスを遺伝子型毎に無作為に 2 群に分離した。1 群には 1.25% コレステロール、40 kcal% 脂肪含有およびコール酸無添加の組成から成る高コレステロール食餌 (D12108C; Research diet; HCD) に変更し、他方の 1 群は、SD を継続して 20 週間供与した。本研究における全てのマウスは、22°C の室温と 12 時間の明暗サイクルの制御された条件下で、特定病原体を含まない SPF 環境下で飼育した。マウスの体重および食餌摂取量は 1 週間毎に測定した。トータル RNA およびタンパク質抽出のために採取した肝臓組織片は、液体窒素で急速凍結し、解析に使用するまで -80°C にて保存した。本研究のプロトコールは、神戸学院大学動物実験倫理委員会の承認を得た上で実施した。NRDC<sup>LKO</sup> および NRDC<sup>f/f</sup> マウスの遺伝子型の判別は、以下に示したハウスキーピング遺伝子の myogenin および Alb-Cre プライマー並びにマウス尻尾から抽出した DNA を用いたジェノタイピング PCR 解析により実施した。

## 2-2-2. 肝細胞特異的 NRDC 欠損および対照マウスのジェノタイピング PCR 解析

PCR チューブに 10×バッファー [20 mM Tris-HCl (pH8.8), 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Triton X-100]、10 mM dNTPs、10 pmol Myogenin forward primer、10 pmol Myogenin reverse primer、10 pmol Alb-Cre forward primer、10 pmol Alb-Cre reverse primer、テンプレート DNA 50 ng、Taq DNA polymerase [10 mM Tris-HCl (pH7.4), 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, 0.5% Tween-20] 5 U/μL (BioLab)、nuclease-free water を入れて混合し、全量を 25 μL とした。次いで、Thermal Cycler (Bioer Technology) を用いて、94°C で 2 分間、98°C で 10 秒間、60°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間を 35 サイクルの条件で増幅させた。ジェノタイピング PCR 反応で使用した遺伝子特異的プライマー (Sigma-Aldrich) の塩基配列は、Table 3 に示した通りである。

PCR 遺伝子増幅産物は、アガロースゲル電気泳動法を用いて単離した。臭化エチジウム (Nacalai Tesque) 添加 1% agarose (Nacalai Tesque) ゲルを TAE バッファー [tris (hydroxymethyl) aminomethane (Nacalai Tesque) 242 g, acetic acid (Nacalai Tesque) 57.1 mL, 0.5 M EDTA (Nacalai Tesque) 100 mL] を用いて作製し、定電圧135 V の条件で電気泳動して 100% UV 照射下で Cre-recombinase および myogenin の遺伝子増幅バンドを検出し、NRDC<sup>LKO</sup> および NRDC<sup>f/f</sup> マウスの遺伝子型を同定した。

Target	Primer sequence (5'→3')
Myogenin Fwd	TTACGTCCATCGTGGACAGC
Myogenin Rev	TGGGCTGGGTGTTAGCCTTA
Alb-Cre Fwd	GAACCTGATGGACATGTTTCAGG
Alb-Cre Rev	AGTGCGTTCGAACGCTAGAGCCTGT

**Table 3. The primer sequences used in genotyping PCR analysis are shown.**

Fwd: forward, Rev: reverse

### 2-2-3. 細胞培養およびマウス初代肝細胞の単離

マウス肝細胞株 AML12 細胞は、American Type Culture Collection (CRL-2254) から購入し 5  $\mu$ g/mL insulin、5  $\mu$ g/mL transferrin、5 ng/mL selenium mixture (Roche)、40 ng/mL dexamethasone (Sigma-Aldrich)、10% 熱非働化ウシ胎児血清 (FBS; Sigma Aldrich)、100 U/mL penicillin、100  $\mu$ g/mL streptomycin mixture (PS; Nacalai Tesque) 添加 DMEM and Ham's F12 medium 1:1 培地 (Nacalai Tesque) を用いて 37°C で 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。マウス初代肝細胞は、2 段階コラゲナーゼ灌流法により、8-10 週齢の NRDC<sup>f/f</sup> および NRDC<sup>LKO</sup> 雄性マウスの肝臓から単離した。マウスを isoflurane (Wako) で麻酔後、24 G 留置針 (TERUMO) を門脈に穿刺し、37°C で予熱した EGTA バッファー [137 mM NaCl (Nacalai Tesque) , 5.4 mM KCl (Nacalai Tesque) , 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (Nacalai Tesque) , 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.2 mM NaHCO<sub>3</sub> (Nacalai Tesque) , 5.6 mM glucose (Nacalai Tesque) , 10 mM pH7.5 HEPES (Sigma-Aldrich) , 0.5 mM EGTA (Nacalai Tesque) ] を注入して肝臓を灌流した。次に、EGTA バッファーに 2 mg/mL collagenase-type II (Worthington) を添加した collagenase バッファーを肝臓に灌流して取り出した肝細胞懸濁液を採取し、25°C にて 400 rpm で 1 分間遠心分離した。上清を捨て、FBS/PSG-free 1.0 g/dL 低グルコース含有 DMEM 培地に再懸濁し、70  $\mu$ m セルストレーナー (Falcon) を用いて未消化の肝臓組織を除去した。その後、濾液を 25°C にて 400 rpm で 1 分間遠心分離して上清を捨て、10% 熱非働化 FBS、100 U/mL penicillin、100  $\mu$ g/mL streptomycin、0.3 mg/mL L-glutamine mixture (PSG; Nacalai Tesque) を添加した低グルコース含有 DMEM 培地で再懸濁し、単離した初代肝細胞を I 型コラーゲンコートディッシュ (IWAKI) に  $7.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> で播種した。37°C で 24 時間インキュベートした後、細胞を PBS で 2 回洗浄した。次に、培地を新鮮な培地に交換し、初代肝細胞からの PCSK9 分泌量を測定するために 24 時間インキュベートした後、培養上清を回収した。

#### 2-2-4. 肝細胞株 AML12 細胞での NRDC 強制発現

マウス NRDC をコードする cDNA の全長を V5 タンパク質が標識化された pcDNA3.1/V5-His ベクターにサブクローニングして、NRDC 強制発現ベクターを製作した。HilyMax Transfect Reagent (Dojindo) の製品プロトコールに従い、pcDNA3.1/V5-His ベクターに NRDC cDNA をサブクローニングしたもの、またはしていない対照の pcDNA3.1/V5-His ベクターをリポフェクション法により AML12 細胞に遺伝子導入した。即ち、マイクロチューブに FBS/PS-free DMEM and Ham's F12 medium 1:1 培地 (Nacalai Tesque) 100  $\mu$ L に pcDNA3.1/V5-His ベクター 1  $\mu$ g、Hily Max Reagent 20  $\mu$ L を入れて混合し、全量を 150  $\mu$ L として 15 分間室温でインキュベートしたものを、AML12 細胞の培養液 1 mL に全量を添加した。37°C で 6 時間インキュベートした後、細胞毒性の回避のため、新鮮な 10% FBS および 1% PS 添加 DMEM and Ham's F12 medium 1:1 培地に交換した。遺伝子導入から 24 時間後に新鮮な培地と交換し、さらに 24 時間インキュベートした後に培養上清を回収した。培養上清を 25°C にて 3,000 rpm で 5 分間遠心分離して細胞沈殿物を除去し、ELISA 解析に使用するまで -80°C にて凍結保存した。

#### 2-2-5. トータル RNA 抽出および逆転写反応

肝臓組織からのトータル RNA の単離および精製は、組織片 10 mg に RNAiso Plus Reagent (TaKaRa) を用いて 1-2-4. に記載の通り実施した。初代肝細胞および NRDC 強制発現肝細胞株 AML12 細胞からのトータル RNA の単離および精製は、培養上清を捨て、PBS [137mM NaCl (Nacalai Tesque), 2.7 mM KCl (Nacalai Tesque), 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Nacalai Tesque), 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Nacalai Tesque)] で細胞を洗浄した後に RNAiso Plus Reagent を 1 mL 加え、マイクロチューブに細胞溶解液の全量を回収し、以降の手順および逆転写反応は 1-2-4. に記載の通り実施した。

## 2-2-6. 定量的リアルタイム RT-PCR

定量的リアルタイム RT-PCR (qRT-PCR) は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を使用し、7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems) を用いて特定の遺伝子を増幅した。製品プロトコールに従って、逆転写反応で得られたテンプレート溶液に THUNDERBIRD SYBR qPCR mix、50×ROX reference dye、6 pmol forward primer、6 pmol reverse primer、nuclease-free water を加えて混合し、全量を 20  $\mu$ L として反応液を 95°C で 20 秒間、95°C で 3 秒間、60°C で 30 秒間の増幅反応を 40 サイクル行った。遺伝子発現量は、 $\beta$ -actin mRNA 発現量と比較することにより正規化した。全ての反応は duplicate にて行った。qRT-PCR 解析に使用した遺伝子特異的プライマー (Sigma-Aldrich) の塩基配列は、Table 4 に示した通りである。

Target	Primer sequence (5' $\rightarrow$ 3')
NRDC Fwd	ATGGATGGCCTTTCCCTTG
NRDC Rev	CGCGAAGTTCAGCTTGTCAA
LDLR Fwd	CTGTGGGCTCCATAGGCTATCT
LDLR Rev	GCGGTCCAGGGTCATCTTC
IDOL Fwd	AGGAGATCAACTCCACCTTCTG
IDOL Rev	ATCTGCAGACCGGACAGG
MTP Fwd	CCTACCAGGCCCAACAAGAC
MTP Rev	CGCTCAATTTTGCATGTATCC
ABCG5 Fwd	TTGCGATACACAGCGATGCT
ABCG5 Rev	TGACTGCCTCTACCTTCTTGTTGT
ABCG8 Fwd	CCGTCGTCAGATTTCCAATGA
ABCG8 Rev	GGCTTCCGACCCATGAATG
SREBP2 Fwd	CCAAAGAAGGAGAGAGGCGG
SREBP2 Rev	CGCCAGACTTGTGCATCTTG
$\beta$ -actin Fwd	CTGACTGACTACCTCATGAAGATCCT
$\beta$ -actin Rev	CTTAATGTACGCACGATTTC

**Table 4.** The primer sequences used in qRT-PCR are shown.

Fwd: forward, Rev: reverse

### 2-2-7. タンパク質の抽出および精製

肝臓組織片および培養肝細胞の細胞全溶解物は、complete mini protease inhibitor cocktail (Roche) 添加 Lysis IP バッファー [25 mM Tris-HCl (pH7.6), 150 mM NaCl, 1% Sodium deoxycholate (Nacalai Tesque), 0.1% SDS (Nacalai Tesque), 1% Nonidet P-40 (Nacalai Tesque)] を用いてホモジナイズして抽出した。その後、4°C にて 14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。

細胞膜画分のタンパク質を抽出するために、採取した肝臓組織片 50 mg に complete mini protease inhibitor cocktail (Roche) 添加バッファー A [250 mM sucrose (Nacalai Tesque), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Nacalai Tesque), 20 mM Tris-HCl (pH7.6)] を 500 µL 加え、バイオマッシャー II (Nippi) を用いてホモジェナイズした後、4°C にて 2,000 ×g で 10 分間遠心分離した。得られた上清を超遠心チューブ (Hitachi Koki) に移し入れ、超遠心チューブをバッファー A で満たした後、4°C にて 120,000 ×g で 1 時間遠心分離した。その後、上清を除去して得られた沈殿物に complete mini protease inhibitor cocktail (Roche) 添加バッファー B [80 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub> (Nacalai Tesque), 50 mM Tris-HCl (pH7.6), 1% Nonidet P-40 (Nacalai Tesque)] 300 µL で沈殿物を再懸濁し、4°C にて 10,000 ×g で 5 分間遠心分離して上清を膜画分タンパク質として回収した。

細胞質および核画分タンパク質を抽出するために、初代培養肝細胞を PBS で洗浄した後に complete mini protease inhibitor cocktail (Roche) 添加バッファー A [50 mM KCl (Nacalai Tesque), 25 mM HEPES (pH7.8), 0.1 mM DTT, 0.5% Nonidet P-40] を 100 µL 加え、氷上で 10 分間インキュベートし、細胞溶解液を得た。マイクロチューブに全量を回収し、4°C にて 3,000 ×rpm で 5 分間遠心分離して得られた上清を細胞質画分として回収した。その後、上清を除去して得られた沈殿物に complete mini protease inhibitor cocktail (Roche) 添加バッファー B [500 mM KCl, 25 mM HEPES

(pH7.8), 0.1 mM DTT, 10% Glycerol (Nacalai Tesque) ] を 50  $\mu$ L 加えて沈殿物を再懸濁し、氷上で 1 時間インキュベートした。その後、4°C にて 14,000 $\times$ rpm で 5 分間遠心分離して得られた上清を可溶性核画分として回収した。得られたサンプルは、TaKaRa BCA Protein Assay Kit (TaKaRa) を用いて総タンパク質濃度を測定し、ウェスタンブロットに使用するまで -80°C にて凍結保存した。

## 2-2-8. ウェスタンブロット

肝臓組織および培養肝細胞から抽出したタンパク質 15-20  $\mu$ g に LDS サンプルバッファー (Thermo Fisher Scientific) を加え、95°C で 5 分間インキュベートして熱変性した。次に、8% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE で分離した。次に PVDF 膜 (Immobilon-P; Millipore) に電氣的に転写した。その後、PVDF 膜を PBS に 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich) を添加した PBS-T に 3% 脱脂粉乳を加えたブロッキングバッファーに浸し、室温で 1 時間インキュベートした。次いで、PVDF 膜を PBS-T で 10 分毎に 3 回洗浄し、1% 脱脂粉乳添加 PBS-T に一次抗体として、rabbit anti-NRDC polyclonal Ab (1:2,000, kindly gifted from prof.Nishi)、rabbit anti-LDL receptor monoclonal Ab (1:5,000, Abcam)、rabbit anti-SREBP2 polyclonal Ab (1:200, Abcam)、mouse anti-V5 monoclonal Ab (1:4,000, Invitrogen)、mouse anti- $\beta$ -actin monoclonal Ab (1:5,000, Wako)、goat anti-laminA/C monoclonal Ab (1:1,000, Santa Cruz) を加え、4°C で一晩インキュベートした。次に、PVDF 膜を PBS-T で 10 分毎に 3 回洗浄し、1% 脱脂粉乳添加 PBS-T に二次抗体として NRDC、LDL receptor、SREBP2 には goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated Ab (NRDC; 1:5,000, LDL receptor; 1:10,000, SREBP2; 1:2,000, Santa Cruz)、V5 および  $\beta$ -actin には goat anti-mouse IgG HRP-conjugated Ab (V5; 1:5,000,  $\beta$ -actin; 1:10,000, Santa Cruz)、laminA/C には mouse anti-goat IgG HRP-conjugated Ab (1:10,000, Santa Cruz) を加え、室温で 1 時間インキュベートした。その後、PBS-T で

10 分毎に 3 回洗浄した後、Chemi-Lumi One (Nacalai Tesque) を用いて化学発光させ、VersaDoc 5000 MP (Bio-Rad) を使用して目的バンドを検出した。目的バンドの発光強度は、Image J ソフトウェアにより定量化した。

## **2-2-9. HPLC 法による血清リポタンパク質中のコレステロール濃度および**

### **ELISA 法による血清 PCSK9 濃度の測定**

一晚絶食させた後 isoflurane (Wako) にて麻酔したマウスの眼窩静脈から血液サンプルを採取し、4°C にて 16,000×g で 5 分間遠心分離して血清を得た。血清および細胞培養液中の PCSK9 濃度は、Mouse PCSK9 DuoSet ELISA Kit (DY3985; R&D Systems) を使用した。96 well プレートに PBS に溶解した PCSK9 capture antibody を加え、室温にて 12 時間インキュベートし、抗体をプレートに固相化した。次に、PBS-T による洗浄を 4 回行い、PBS に溶解した 1% BSA を入れ、室温にて 2 時間インキュベートしてブロッキングした。その後、PBS-T による洗浄を 4 回行い、マウス PCSK9 標準液および血清あるいは培養上清サンプルを加え、室温にて 2 時間インキュベートした。次いで、PBS-T による洗浄を 4 回行い 1% BSA に溶解した PCSK9 detection antibody を入れ、室温にて 2 時間インキュベートした。その後、PBS-T による洗浄を 4 回行い、1% BSA に溶解した avidin-HRP を入れ、室温にて 30 分間遮光の上インキュベートした。最後に、PBS-T による洗浄を 4 回行い、POD 基質 TMB キット (Nacalai Tesque) を入れ、室温にて 30 分間遮光の上インキュベートし、Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific) にて測定波長 450 nm で吸光度を測定した。ELISA 法による測定は triplicate にて行った。また、血清中の総コレステロールおよび LDL サブクラスを含むリポタンパク質コレステロール濃度は、HPLC 法 (LipoSEARCH, Skylight Biotech) により解析した。



#### 2-2-10. 肝臓組織におけるコレステロール含量の測定

肝臓組織中のコレステロール含量は、Folch 法により脂質を抽出して測定した。バリオマッシャーII (Nippi) を用いて 50 mg の組織片をホモジェナイズした後、クロロホルム/メタノール (2:1 v/v) 混合液で均質化し、超純水を加えた。25°C にて 3,000 rpm で 10 分間遠心分離して上層を除去し、ドラフト中で 8 時間風乾した。沈殿物をイソプロパノール (Nacalai Tesque) で溶解し、次いで 96 ウェルプレートに脂質溶液を入れ、LabAssay Cholesterol (Wako) を用いて Multiscan FC にて測定波長 595 nm で吸光度を測定した。得られた測定値は、総コレステロール濃度として細胞内総タンパク質濃度で除した。

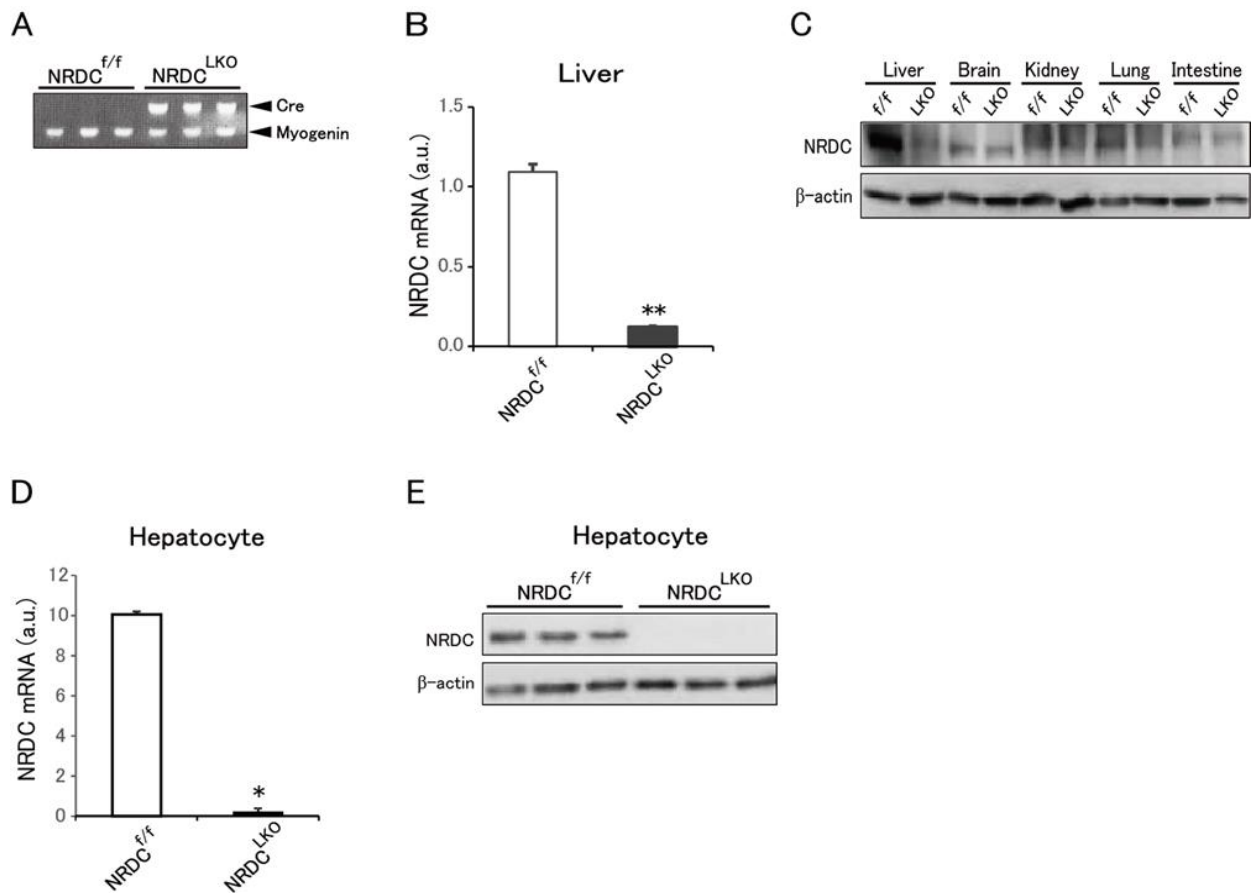
#### 2-2-11. 統計学的解析

数値データは、平均値  $\pm$  標準誤差 (standard error of the mean; S.E.M.) として表した。平均値間の差の統計的有意性は、Student's *t*-test を用いて評価した。P 値は 0.05 未満を統計的に有意であると判定した。

## 2-3. 結 果

### 2-3-1. 肝細胞における NRDC の遺伝子型および発現抑制の同定

NRDC<sup>f/f</sup> マウスと Alb-Cre トランスジェニックマウスの交配により生誕したマウスのジェノタイピング PCR 解析の結果、NRDC<sup>LKO</sup> および NRDC<sup>f/f</sup> マウスにおける myogenin 遺伝子に加え、NRDC<sup>LKO</sup> マウスに特異的に存在する Cre 遺伝子を同定した (Figure 11A)。qRT-PCR 解析の結果、肝臓組織における NRDC<sup>f/f</sup> マウス ( $1.1 \pm 0.1$  a.u.) の NRDC の mRNA 発現量は、NRDC<sup>LKO</sup> マウス ( $0.1 \pm 0.01$  a.u.,  $P < 0.01$ ) で有意な抑制がみられた (Figure 11B)。また、NRDC のタンパク質発現量を解析した結果、NRDC<sup>LKO</sup> マウスにおける肝臓特異的な発現抑制がみられた (Figure 11C)。さらに、NRDC<sup>LKO</sup> および NRDC<sup>f/f</sup> マウス由来の初代肝細胞の NRDC mRNA 発現量は、NRDC<sup>f/f</sup> ( $10.1 \pm 0.4$  a.u.) と比較して NRDC<sup>LKO</sup> ( $0.2 \pm 0.01$  a.u.,  $P < 0.001$ ) において顕著な抑制がみられた (Figure 11D)。NRDC のタンパク質発現量についても NRDC<sup>LKO</sup> マウスにおける著明な発現抑制がみられた (Figure 11E)。



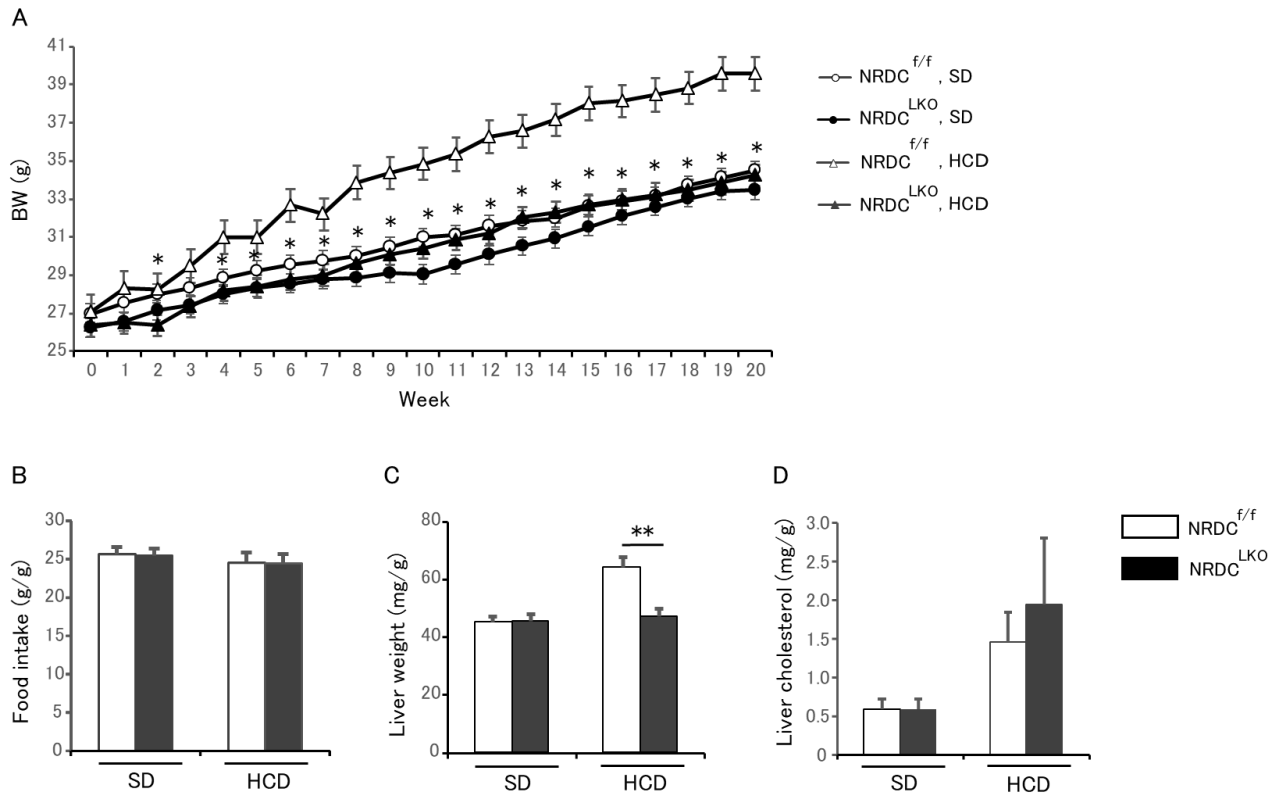
**Figure 11. Liver specific *NRDC* deleted (*NRDC*<sup>LKO</sup>) mice showed negligible hepatic *NRDC* expression.**

A representative image of genotyping PCR products from *NRDC*<sup>LKO</sup> and *NRDC*<sup>f/f</sup> mice is shown (A). *NRDC* mRNA expression levels were measured by qRT-PCR in the liver tissue from *NRDC*<sup>LKO</sup> and *NRDC*<sup>f/f</sup> mice (n=5 per genotype) (B). *NRDC* protein expression levels were measured by immunoblot analysis in the liver, brain, kidney, lung and intestine from *NRDC*<sup>LKO</sup> and *NRDC*<sup>f/f</sup> mice (n=5 per genotype) (C). In primary cultured hepatocytes from *NRDC*<sup>LKO</sup> and *NRDC*<sup>f/f</sup> mice (n=5 per genotype), *NRDC* mRNA (D) and protein (E) expression levels were determined by qRT-PCR and immunoblotting, respectively. Expression levels of mRNA were normalized to β-actin mRNA expression levels.

Representative images are shown (A, C, E). Expression levels of mRNA were normalized to  $\beta$ -actin mRNA expression levels, and values are indicated as mean  $\pm$  S.E.M (B, D) . \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$  vs NRDC<sup>f/f</sup>.

### 2-3-2. NRDC<sup>LKO</sup> による表現型への影響

NRDC<sup>LKO</sup> および NRDC<sup>f/f</sup> マウスに SD あるいは HCD を 20 週間供与した際の 1 週間毎の体重推移を Figure 12A に示した。SD を供与した NRDC<sup>LKO</sup> および NRDC<sup>f/f</sup> 群における体重推移は、全ての週において有意な差はみられず同等であった。一方で、HCD を供与した NRDC<sup>LKO</sup> および NRDC<sup>f/f</sup> 群における体重は、2 週目以降より NRDC<sup>f/f</sup> 群と比較して NRDC<sup>LKO</sup> 群において有意に低下した。しかし、体重当たりの食餌摂取量は、SD あるいは HCD を供与した NRDC<sup>LKO</sup> (SD;  $25.5 \pm 0.3$  mg/g, HCD;  $24.5 \pm 1.0$  mg/g) および NRDC<sup>f/f</sup> (SD;  $25.7 \pm 0.5$  mg/g, HCD;  $24.5 \pm 0.8$  mg/g) 群で有意な差はみられなかった (Figure 12B)。また、食餌供与 20 週目における体重当たりの肝臓重量は、SD を供与した NRDC<sup>LKO</sup> ( $45.9 \pm 1.9$  mg/g) および NRDC<sup>f/f</sup> ( $45.5 \pm 1.4$  mg/g) 群では、有意な差はみられなかったが、HCD を供与した群では、NRDC<sup>f/f</sup> 群 ( $64.4 \pm 4.4$  mg/g) と比較して NRDC<sup>LKO</sup> 群 ( $46.9 \pm 2.9$  mg/g,  $P < 0.01$ ) で有意に低下した (Figure 12C)。さらに、肝臓中のコレステロール含量は、SD あるいは HCD を供与した NRDC<sup>LKO</sup> (SD;  $0.6 \pm 0.1$  mg/g, HCD;  $1.9 \pm 0.9$  mg/g) と NRDC<sup>f/f</sup> (SD;  $0.6 \pm 0.1$  mg/g, HCD;  $1.5 \pm 0.4$  mg/g) との間で有意な差はみられなかった (Figure 12D)。

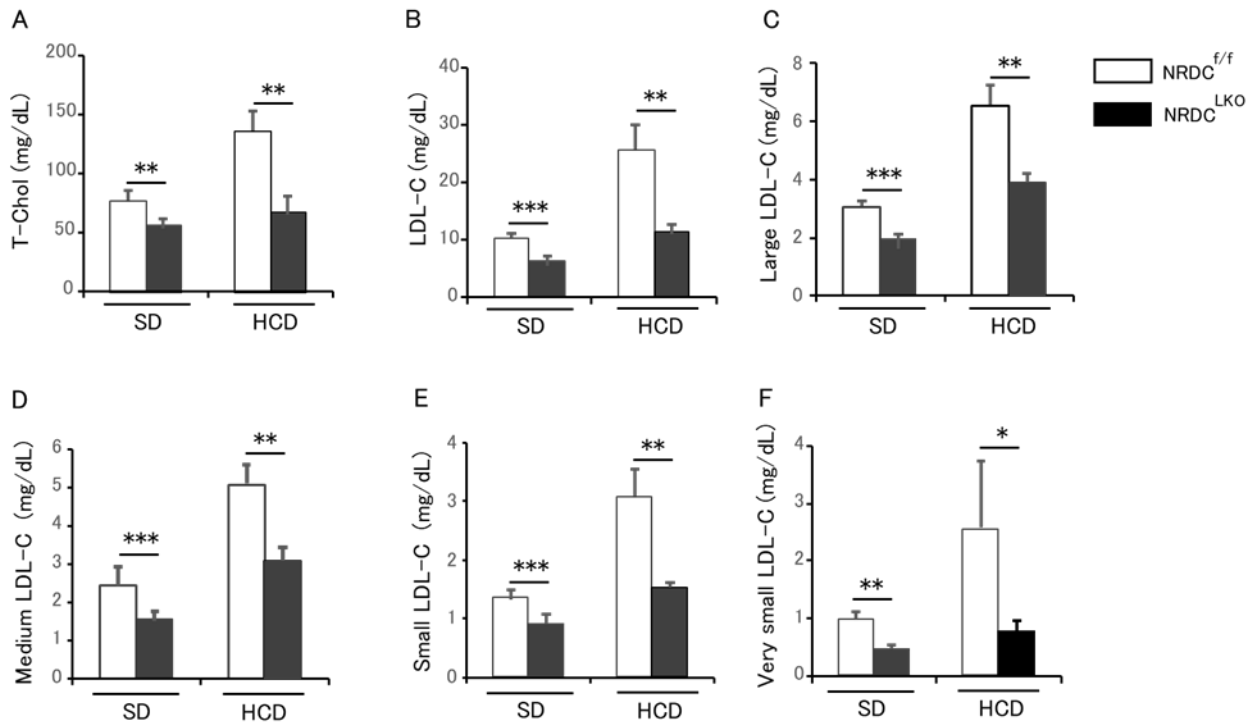


**Figure 12. Body weight, liver weight and food intake in NRDC<sup>LKO</sup> mice were almost equivalent to NRDC<sup>f/f</sup> mice.**

Weekly changes in the body weight are shown in NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice fed SD or HCD (SD; NRDC<sup>f/f</sup> n=16, NRDC<sup>LKO</sup> n=12, HCD; NRDC<sup>f/f</sup> n=12, NRDC<sup>LKO</sup> n=11, \**P* < 0.05, NRDC<sup>f/f</sup> vs NRDC<sup>LKO</sup> mice fed HCD (A). Amounts of food intake per body weight are shown in NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice fed SD or HCD (SD; NRDC<sup>f/f</sup> n=16, NRDC<sup>LKO</sup> n=12, HCD; NRDC<sup>f/f</sup> n=12, NRDC<sup>LKO</sup> n=11) (B). Liver weight per body weight is shown in NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice fed SD or HCD (SD; NRDC<sup>f/f</sup> n=16, NRDC<sup>LKO</sup> n=12, HCD; NRDC<sup>f/f</sup> n=12, NRDC<sup>LKO</sup> n=13), \*\**P* < 0.001 vs NRDC<sup>f/f</sup>. (C). Total cholesterol levels in the liver tissue are shown in NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice fed SD or HCD (SD; NRDC<sup>f/f</sup> n=16, NRDC<sup>LKO</sup> n=12, HCD; NRDC<sup>f/f</sup> n=12, NRDC<sup>LKO</sup> n=13) (D). Values are indicated as mean ± S.E.M.

### 2-3-3. NRDC<sup>LKO</sup> による血清総コレステロールおよび LDL-C 値への影響

血清総コレステロール値は、SD あるいは HCD のいずれの食餌供与においても NRDC<sup>ff</sup> 群 (SD;  $76.2 \pm 3.9$  mg/dL および HCD;  $135.8 \pm 15.6$  mg/dL) と比較して、NRDC<sup>LKO</sup> 群 (SD;  $56.7 \pm 2.9$  mg/dL,  $P < 0.01$  および HCD;  $67.7 \pm 8.1$  mg/dL,  $P < 0.01$ ) で有意に低下した (Figure 13A)。次に、血清リポタンパク質の主要分画におけるコレステロール濃度を解析した結果、SD および HCD を供与した LDL 画分における NRDC<sup>ff</sup> 群 (SD;  $10.1 \pm 0.5$  mg/dL および HCD;  $25.6 \pm 4.1$  mg/dL) のコレステロール濃度は、NRDC<sup>LKO</sup> 群 (SD;  $6.3 \pm 0.3$  mg/dL,  $P < 0.001$  および HCD;  $11.3 \pm 0.8$  mg/dL,  $P < 0.01$ ) で有意に低下した (Figure 13B)。さらに、LDL 画分の粒子径によるサブクラスにおけるコレステロール濃度を解析したところ、SD および HCD を供与したマウスの血清中の large、medium、small 画分におけるコレステロール濃度は、NRDC<sup>ff</sup> 群 (各々 SD;  $3.1 \pm 0.1$  mg/dL,  $2.4 \pm 0.5$  mg/dL,  $1.3 \pm 0.1$  mg/dL および HCD;  $6.6 \pm 0.7$  mg/dL,  $5.1 \pm 0.5$  mg/dL,  $3.1 \pm 0.4$  mg/dL) と比較して、NRDC<sup>LKO</sup> 群 (各々 SD;  $2.0 \pm 0.1$  mg/dL, 35.5% 低下,  $P < 0.001$ ,  $1.6 \pm 0.1$  mg/dL, 33.3% 低下,  $P < 0.001$ ,  $0.9 \pm 0.1$  mg/dL, 30.8% 低下,  $P < 0.001$  および HCD;  $3.9 \pm 0.4$  mg/dL, 40.9% 低下,  $P < 0.01$ ,  $3.1 \pm 0.3$  mg/dL, 39.2% 低下,  $P < 0.01$ ,  $1.5 \pm 0.1$  mg/dL, 51.6% 低下,  $P < 0.01$ ) で有意に低下した (Figure 13C,D,E)。また、LDL サブクラス分類の中で、動脈硬化形成作用の関連性の高い very small LDL 画分におけるコレステロール濃度は、NRDC<sup>ff</sup> 群 (SD;  $1.0 \pm 0.1$  mg/dL および HCD;  $2.6 \pm 1.2$  mg/dL) と比較して、NRDC<sup>LKO</sup> 群 (SD;  $0.5 \pm 0.1$  mg/dL, 50.0% 低下,  $P < 0.01$  および HCD;  $0.8 \pm 0.2$  mg/dL, 69.2% 低下,  $P < 0.05$ ) において有意に低下した (Figure 13F)。このように、肝臓での NRDC の欠損により、すべての LDL サブクラスで有意にコレステロール濃度は減少したが、催動脈硬化作用が最も強い very small LDL 分画で最も顕著な減少がみられた。



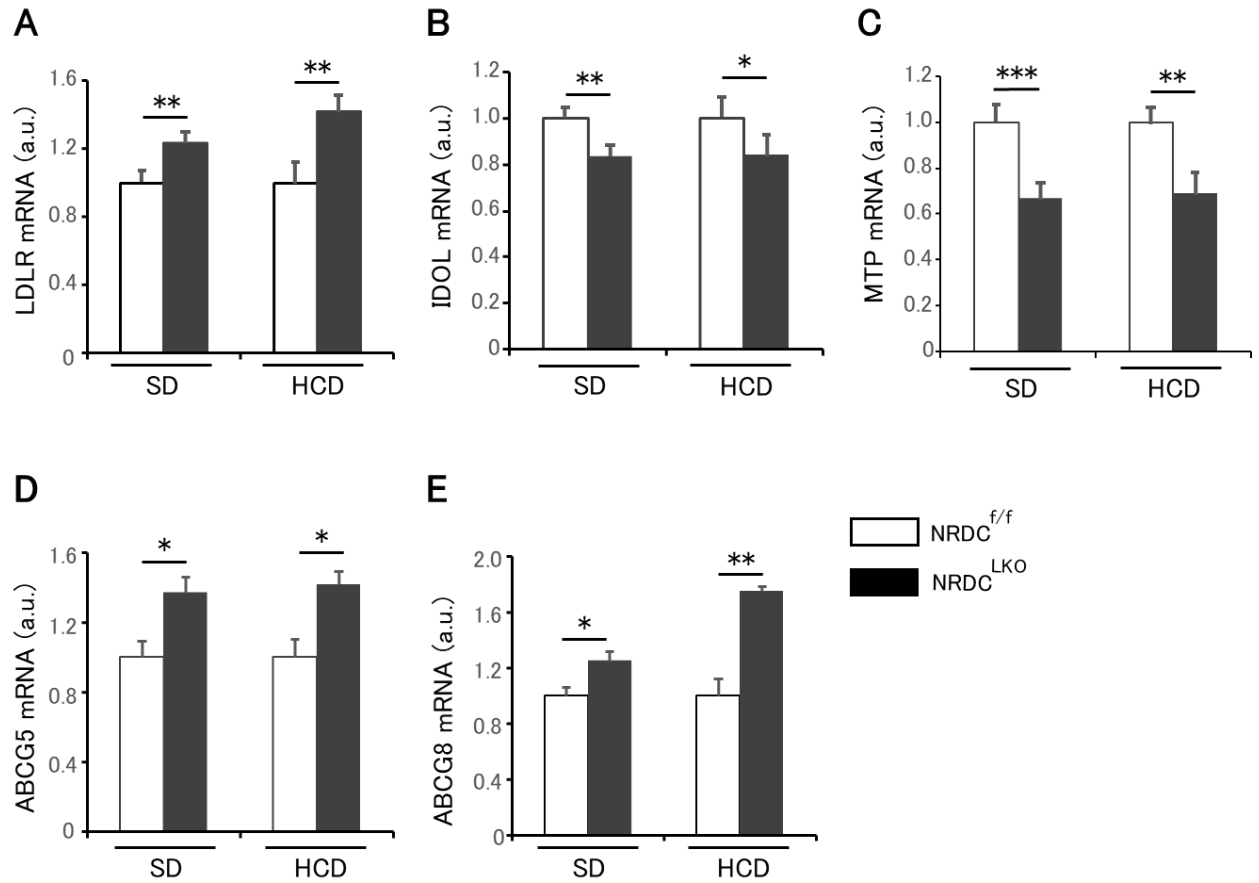
**Figure 13. Serum total cholesterol and LDL-C levels were significantly lower in NRDC<sup>LKO</sup> mice than in NRDC<sup>f/f</sup> mice.**

Serum total cholesterol (A) and LDL-C (B) levels are shown in NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice fed SD or HCD (n=7-12 per genotype). Cholesterol content in each LDL fraction, which was measured by HPLC, is indicated in NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice fed SD or HCD (SD; NRDC<sup>f/f</sup> n=16, NRDC<sup>LKO</sup> n=12, HCD; NRDC<sup>f/f</sup> n=12, NRDC<sup>LKO</sup> n=11, (C-F). Values are indicated as mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs NRDC<sup>f/f</sup>.



#### 2-3-4. NRDC<sup>LKO</sup> によるコレステロール代謝関連遺伝子発現量への影響

肝臓組織における脂質代謝関連遺伝子群の発現量を qRT-PCR 法を用いて解析した。血中 LDL-C の肝臓内への取り込みに関わる LDL 受容体の mRNA 発現量は、SD および HCD を供与した NRDC<sup>f/f</sup> 群 (SD;  $1.0 \pm 0.1$  a.u. および HCD;  $1.0 \pm 0.1$  a.u.) と比較して、NRDC<sup>LKO</sup> 群 (SD;  $1.2 \pm 0.1$  a.u.,  $P < 0.01$  および HCD;  $1.4 \pm 0.1$  a.u.,  $P < 0.01$ ) で有意に増加した (Figure 14A)。一方で、プロテアソーム依存的な LDL 受容体の分解に関わる IDOL の mRNA 発現量は、SD および HCD を供与した NRDC<sup>f/f</sup> 群 (SD;  $1.0 \pm 0.1$  a.u. および HCD;  $1.0 \pm 0.1$  a.u.) と比較して、NRDC<sup>LKO</sup> 群 (SD;  $0.8 \pm 0.02$  a.u.,  $P < 0.01$  および HCD;  $0.7 \pm 0.1$  a.u.,  $P < 0.05$ ) で有意に減少した (Figure 14B)。さらに、肝臓から血液中へのリポタンパク排出に関わる MTP の mRNA 発現量は、SD および HCD を供与した NRDC<sup>f/f</sup> 群 (SD;  $1.0 \pm 0.1$  a.u. および HCD;  $1.0 \pm 0.1$  a.u.) と比較して、NRDC<sup>LKO</sup> 群 (SD;  $0.7 \pm 0.1$  a.u.,  $P < 0.001$  および HCD;  $0.7 \pm 0.1$  a.u.,  $P < 0.01$ ) で有意に減少した (Figure 14C)。また、肝臓から胆道へのコレステロール排泄に関わる ABCG5 および ABCG8 トランスポーターの mRNA 発現量は、SD および HCD を供与した NRDC<sup>f/f</sup> 群 (各々 SD;  $1.0 \pm 0.1$  a.u.,  $1.0 \pm 0.1$  a.u. および HCD;  $1.0 \pm 0.1$  a.u.,  $1.0 \pm 0.1$  a.u.) と比較して、NRDC<sup>LKO</sup> 群 (各々 SD;  $1.4 \pm 0.1$  a.u.,  $P < 0.05$ ,  $1.3 \pm 0.1$  a.u.,  $P < 0.05$  および HCD;  $1.4 \pm 0.1$  a.u.,  $P < 0.05$ ,  $1.8 \pm 0.1$  a.u.,  $P < 0.01$ ) で有意に増加した (Figure 14D, E)。

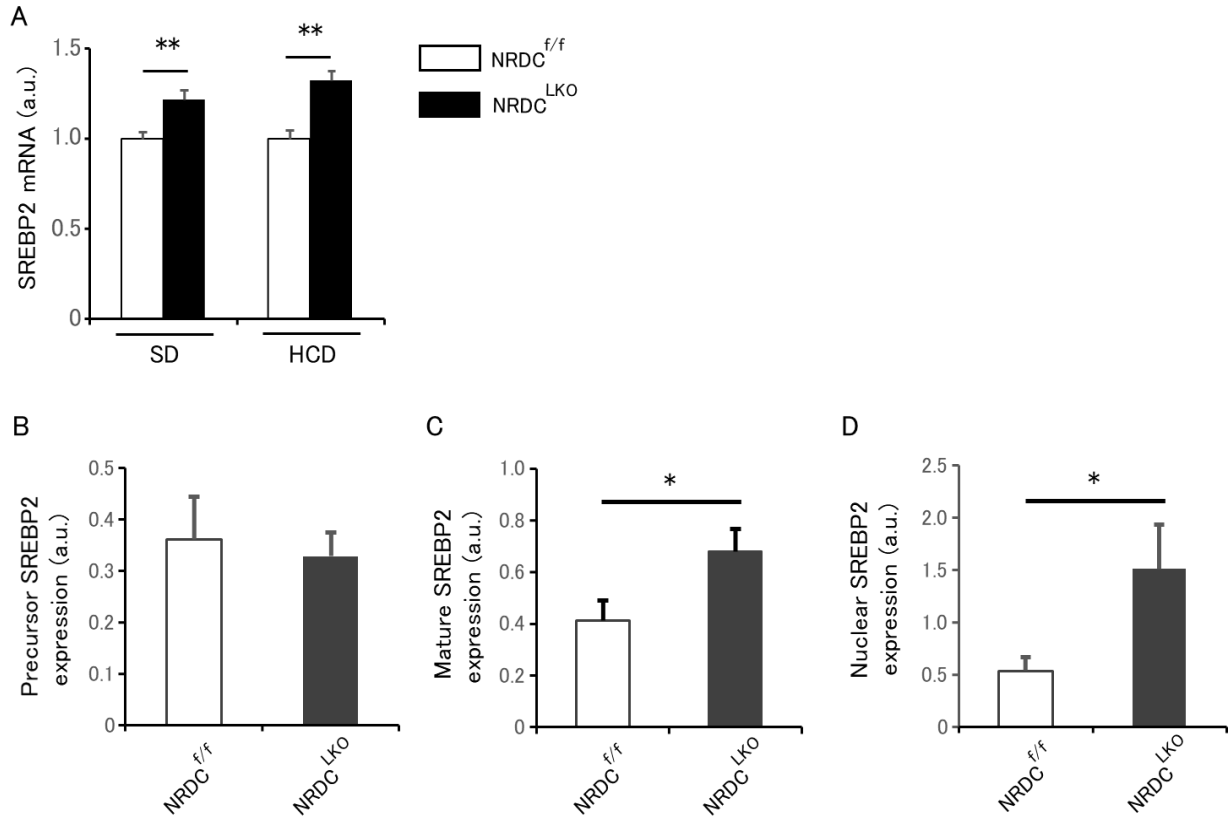


**Figure 14. Relative expression levels of genes involved in cholesterol metabolism in NRDC<sup>LKO</sup> mice fed SD or HCD.**

Relative mRNA expression level of LDL receptor (A), IDOL (B), MTP (C), ABCG5 (D) and ABCG8 (E) in the liver tissue of NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice fed SD or HCD (SD; NRDC<sup>f/f</sup> n=16, NRDC<sup>LKO</sup> n=12, HCD; NRDC<sup>f/f</sup> n=7, NRDC<sup>LKO</sup> n=9) as determined by quantitative RT-PCR. Expression levels were normalized to  $\beta$ -actin mRNA expression levels. Values are indicated as mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs NRDC<sup>f/f</sup>.

### 2-3-5. NRDC による SREBP2 の遺伝子発現および活性化への影響

肝臓組織における SREBP2 の遺伝子発現量を qRT-PCR 法を用いて解析した。肝細胞の LDL 受容体の転写因子である SREBP2 の mRNA 発現量は、SD および HCD を供与した NRDC<sup>f/f</sup> 群 (SD;  $1.0 \pm 0.03$  a.u. および HCD;  $1.0 \pm 0.1$  a.u.) と比較して、NRDC<sup>LKO</sup> 群 (SD;  $1.2 \pm 0.1$  a.u.,  $P < 0.01$  および HCD;  $1.3 \pm 0.1$  a.u.,  $P < 0.01$ ) で有意に増加した (Figure 15A)。また、初代肝細胞における SREBP2 の核内移行をウエスタンブロット法を用いて解析した。細胞質における前駆体型の SREBP2 のタンパク質発現量は、NRDC<sup>f/f</sup> 群由来の初代肝細胞 ( $0.4 \pm 0.1$  a.u.) と NRDC<sup>LKO</sup> 群由来の初代肝細胞 ( $0.3 \pm 0.1$  a.u.) との間で有意な差はみられなかった (Figure 15B)。一方で、細胞質の活性型および核内の SREBP2 のタンパク質発現量は、NRDC<sup>f/f</sup> 群由来の初代肝細胞 ( $0.4 \pm 0.1$  a.u. および  $0.5 \pm 0.1$  a.u.) と比較して NRDC<sup>LKO</sup> 群由来の初代肝細胞 ( $0.7 \pm 0.1$  a.u.,  $P < 0.05$  および  $1.5 \pm 0.4$  a.u.,  $P < 0.05$ ) で有意に増加した (Figure 15C,D)。

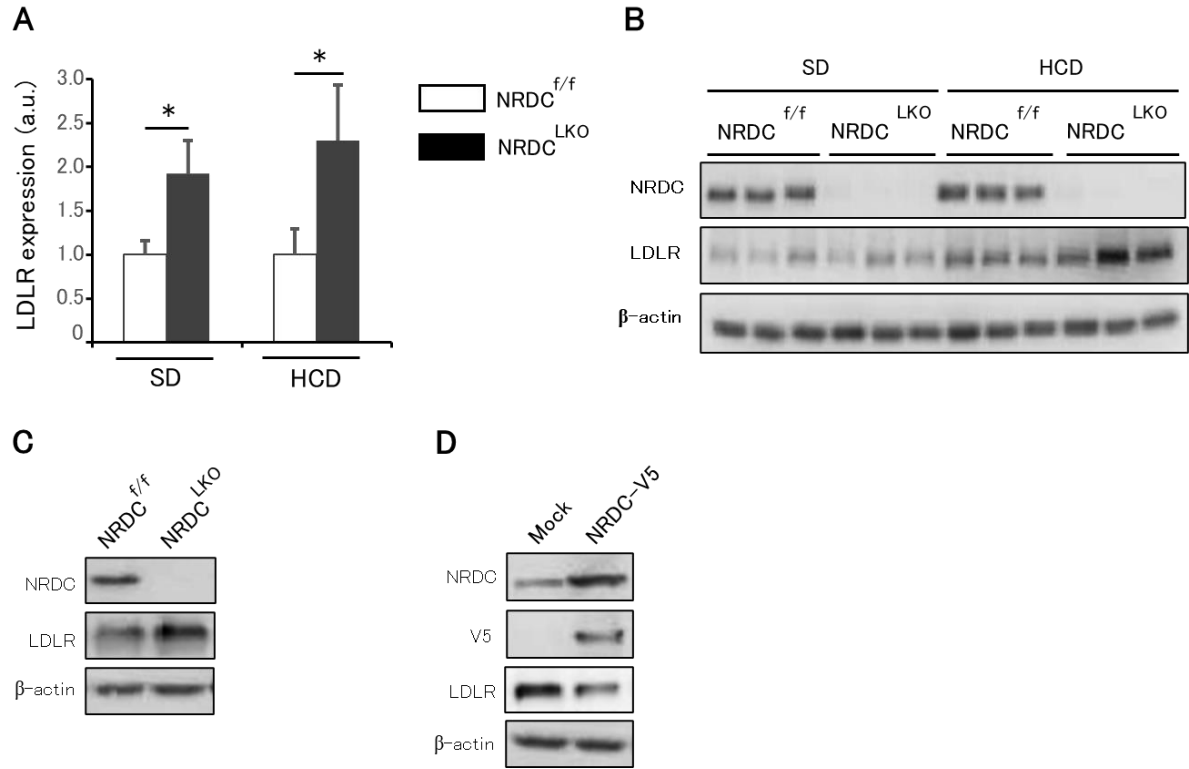


**Figure 15. Relative mRNA expression levels of SREBP2 in liver tissues from NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice fed SD or HCD, and precursor, mature and nuclear SREBP2 protein levels in primary cultured hepatocytes derived from NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice.**

Relative mRNA expression level of SREBP2 in the liver tissue of NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice fed SD or HCD (SD; NRDC<sup>f/f</sup> n=16, NRDC<sup>LKO</sup> n=12, HCD; NRDC<sup>f/f</sup> n=7, NRDC<sup>LKO</sup> n=9) as determined by quantitative RT-PCR. Expression levels were normalized to  $\beta$ -actin mRNA expression levels (A). Precursor (125 kDa) and mature (55 kDa) forms of SREBP2 protein expression levels in cytosol and nuclear fractional cell lysates were determined by immunoblot analysis in primary cultured hepatocytes derived from NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice at 8-10 weeks of age (n=4 per genotype) (B-D). Values are indicated as mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NRDC<sup>f/f</sup>.

### 2-3-6. NRDC による細胞表面の LDL 受容体タンパク質発現量への影響

肝臓組織における LDL 受容体タンパク質発現量をウエスタンブロット法を用いて解析したところ、SD および HCD を供与した NRDC<sup>f/f</sup> 群 (SD;  $1.0 \pm 0.2$  a.u. および HCD;  $1.0 \pm 0.3$  a.u.) と比較して、NRDC<sup>LKO</sup> 群 (SD;  $1.9 \pm 0.4$  a.u.,  $P < 0.05$  および HCD;  $2.3 \pm 0.6$  a.u.,  $P < 0.05$ ) で有意に増加した (Figure 16A, B)。また、初代肝細胞における LDL 受容体タンパク質発現量について解析したところ、NRDC<sup>f/f</sup> マウス由来の初代肝細胞と比較して、NRDC<sup>LKO</sup> マウス由来の初代肝細胞での発現量の増加がみられた (Figure 16C)。一方で、NRDC を強制発現させた肝細胞株 AML12 細胞 (NRDC-V5) における LDL 受容体タンパク質発現は、NRDC を強制発現させていない AML12 細胞 (Mock) と比較して、NRDC タンパク質の発現量の増加と LDL 受容体タンパク質の発現量の減少がみられた (Figure 16D)。



**Figure 16. Hepatic NRDC affects LDL metabolism via regulation of hepatic LDL receptor expression.**

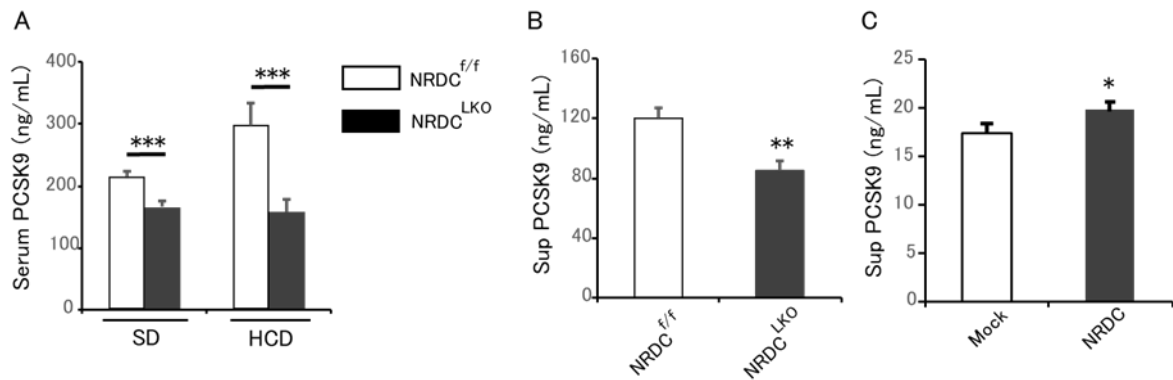
LDL receptor expression levels were determined by immunoblot analysis in the plasma membrane fraction of the liver tissue of NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice fed SD or HCD (SD; NRDC<sup>f/f</sup> n=16, NRDC<sup>LKO</sup> n=12, HCD; NRDC<sup>f/f</sup> n=12, NRDC<sup>LKO</sup> n=13) (A), and the representative image is shown (B). LDL receptor expression levels in whole cell lysates were determined by immunoblot analysis in primary cultured hepatocytes derived from NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice at 8-10 weeks of age (C), as well as in AML12 cells transfected with V5-tagged NRDC expression vector (D). Expression levels were normalized to β-actin expression levels. Values are indicated as mean ± S.E.M. \**P* < 0.05 vs NRDC<sup>f/f</sup>.

### 2-3-7. NRDC による 肝細胞からの PCSK9 分泌制御

血清中および培養肝細胞の培養上清中の PCSK9 濃度を ELISA 法を用いて測定した。血清 PCSK9 濃度は、SD および HCD を供与した NRDC<sup>f/f</sup> 群 (SD;  $214.5 \pm 8.1$  ng/mL および HCD;  $298.1 \pm 37.0$  ng/mL) に比べて、NRDC<sup>LKO</sup> 群 (SD;  $165.4 \pm 9.1$  ng/mL,  $P < 0.001$  および HCD;  $157.9 \pm 20.4$  ng/mL,  $P < 0.001$ ) で有意に低下した (Figure 17A)。

また、初代肝細胞からの培養上清中への PCSK9 の分泌量を解析したところ、PCSK9 分泌量は、NRDC<sup>f/f</sup> 群由来の初代肝細胞 ( $119.6 \pm 7.3$  ng/mL) に比べて、NRDC<sup>LKO</sup> 群由来の初代肝細胞 ( $84.7 \pm 7.1$  ng/mL,  $P < 0.01$ ) において有意に減少した (Figure 17B)。

一方で、NRDC を強制発現させた 肝細胞株 AML12 細胞 ( $19.7 \pm 0.7$  ng/mL,  $P < 0.05$ ) からの培養上清中への PCSK9 の分泌量は、NRDC を強制発現させていない AML12 細胞 ( $17.4 \pm 0.9$  ng/mL) と比較して有意に増加した (Figure 17C)。



**Figure 17. NRDC expression in hepatocyte reduced PCSK9 production and secretion levels.**

Circulating serum PCSK9 levels are shown in NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice fed SD or HCD (SD; NRDC<sup>f/f</sup> n=16, NRDC<sup>LKO</sup> n=12, HCD; NRDC<sup>f/f</sup> n=12, NRDC<sup>LKO</sup> n=13) (A). Secreted PCSK9 levels in cell-conditioned media of primary cultured hepatocytes derived from NRDC<sup>LKO</sup> and NRDC<sup>f/f</sup> mice at 8-10 weeks of age (n=4 per genotype) are shown (B). Secreted PCSK9 levels in cell-conditioned media of AML12 cells transfected with V5-tagged NRDC expression vector or mock-transfected are shown (n=4 each) (C). PCSK9 concentrations were determined by ELISA. Values are indicated as mean  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs NRDC<sup>f/f</sup>.



## 2-4. 考 察

本章では、リポタンパクおよびコレステロール代謝における肝細胞の NRDC の役割について検討した。本章の検討において NRDC<sup>LKO</sup> マウスの血清総コレステロールおよび LDL-C 濃度は、対照マウスと比較して有意に低下することを見出した。血清中のコレステロール濃度の低下は、肝細胞における LDL 受容体の発現量および再利用の増加による血中 LDL の肝臓内への取り込みの増加に起因するものと考えられた。実際に、高コレステロール血症の治療薬剤としてスタチン系の脂質低下薬が臨床使用され、HMG-CoA 還元酵素を阻害することによる LDL 受容体の発現増加の分子機構が応用されている<sup>31,32)</sup>。LDL 受容体の発現量の増加は、*in vivo* における NRDC<sup>LKO</sup> による SREBP2 の転写の亢進および初代肝細胞における NRDC 欠損による SREBP2 の核内移行の増加を介した活性化が寄与し、さらに細胞膜表面における LDL 受容体の安定性の調節因子である血清 PCSK9 濃度の減少および IDOL の発現減少によるものと考えられた。初代肝細胞および NRDC 強制発現肝細胞株を用いた検討から、NRDC<sup>LKO</sup> マウスでみられた血清 PCSK9 濃度の低下には、PCSK9 の主要産生組織である肝臓における肝細胞の NRDC が PCSK9 の産生あるいは分泌の低下に寄与し、LDL 受容体の発現量を制御することが示唆された。しかしながら、肝細胞の NRDC による PCSK9 の細胞内輸送あるいは分泌制御の詳細な分子機構については今後の研究で詳細に検討する必要があるものと考えられた。実臨床においても、PCSK9 阻害抗体薬であるエボロクマブおよびアリロクマブ（2-4 週おきの皮下注射）が HMG-CoA 還元酵素阻害剤のスタチンに加えて、ヘテロ接合体家族性高コレステロール血症（HeFH）を含めた重症の高コレステロール血症の治療薬剤として使用されており、血清 LDL-C 値の約 60-70% ほどの劇的な低下に加え、急性冠症候群（ACS）発症後の心血管イベントの再発を抑制することが大規模臨床試験において示されている<sup>54-57)</sup>。最近では、PCSK9 に対する siRNA の注射製剤インクリシラン

も開発され、3-6 ヶ月おきの皮下注射で、血清 PCSK9 濃度の持続した約 80% ほどの顕著な低下に加え、血清 LDL-C 値の約 50-60% ほどの著明な低下が示されているが<sup>58)</sup>、その心血管イベント発症予防に関する大規模臨床試験の結果はまだ示されていない。FH の多くはヘテロ接合体の LDL 受容体遺伝子変異であり、複数の遺伝子変異が報告されている<sup>59)</sup>。稀ではあるが、LDL 受容体ホモ接合体変異の患者も存在する。LDL 受容体の遺伝子変異には、極めて機能が低下しているものの若干は LDL 受容体の機能を保持している機能低下 (LDL 受容体-defective) 変異と、LDL 受容体の機能を全く有さない機能欠落 (LDL 受容体-negative) 変異とがある<sup>60)</sup>。LDL 受容体の機能低下変異の場合、スタチンや PCSK9 阻害抗体薬の効果がある程度は期待できるが<sup>55,61)</sup>、LDL 受容体機能欠落変異の場合は理論上も期待できず、脂肪肝などの副作用の懸念の高い MTP 阻害薬ロミタピドが使用されるか、薬物治療ではない LDL 吸着カラムを使用したプラブマフェレーシスが適応となる<sup>62-65)</sup>。本研究の成果から、NRDC の抑制が MTP の発現抑制を介して、このような重症の患者の治療に貢献できる可能性があると思われた。

さらに、肝臓での NRDC の抑制による IDOL の発現低下は、PCSK9 の血中濃度の低下に加えて細胞表面の LDL 受容体発現量の増加に相乗的に寄与し、血清 LDL-C 濃度を低下させることが示唆されている<sup>66)</sup>。興味深いことに、IDOL と MTP の遺伝子発現は、LXR の活性化により制御されている<sup>67)</sup>。これまでの研究で明らかにされているように、核内の NRDC の欠損によるエピジェネティック機能<sup>48,52)</sup>の欠落が、LXR の活性化を抑制し得ることが示唆されるが、その詳細な分子機構については今後の研究が待たれる。

本章における検討では、肝細胞での NRDC 欠損が、LDL 受容体の mRNA 発現を誘導することに加え、PCSK9 の分泌を抑制することを明らかにした。NRDC による SREBP2 の活性化抑制は LDL 受容体と同様に PCSK9 の発現を抑制するが、NRDC

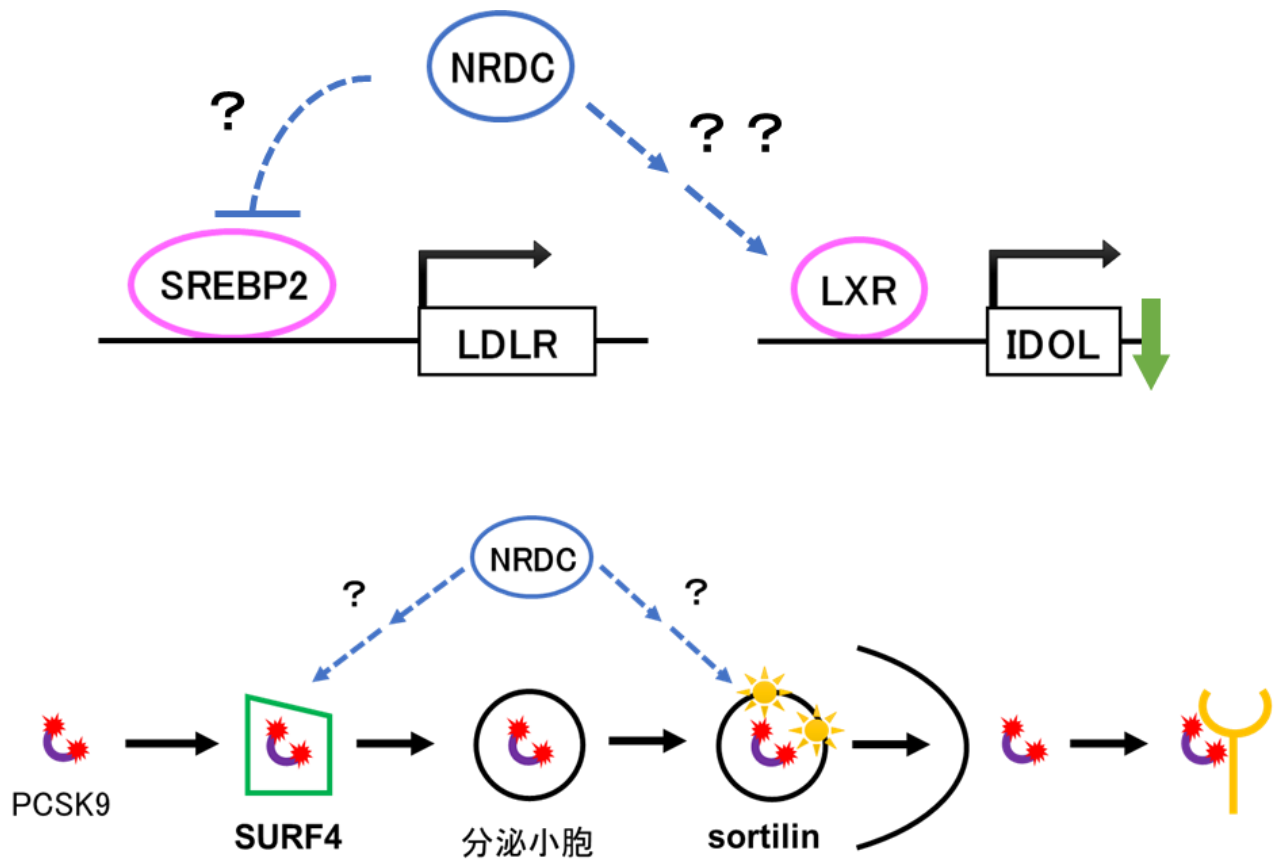
は PCSK9 に対してはその遺伝子発現抑制よりも細胞外への分泌促進の方に強く作用していることが示された。細胞外への PCSK9 の分泌は、放出制御因子の sortilin 1 (SORT1)<sup>68)</sup> および細胞内輸送因子の小胞体カーゴ受容体 SURF4<sup>69)</sup> が重要な役割を果たしていることがこれまでの研究で示唆されている。即ち、肝細胞の NRDC は PCSK9 の細胞外への分泌過程における SORT1 あるいは SURF4 の発現量あるいは活性化を制御している可能性があるものと考えられた (Figure 18)。

また、LXR $\alpha$  のリン酸化が障害されたマウスでは、肝臓の NRDC 欠損と同様に、高コレステロール食餌供与下における血清コレステロール濃度の低下および LDL 受容体 mRNA 発現量の増加が報告されている<sup>70)</sup>。即ち、肝臓での NRDC 欠損は、LXR の活性化、あるいはその下流の細胞内情報伝達を抑制することで、その標的を制御している可能性がある。さらに、LXR は脂肪酸代謝においても重要な役割を果たすことが知られ、HCD を供与した肝臓で NRDC を欠損するマウスでの体重増加の抑制は、LXR による SREBP1c 活性化が抑制されることで、肝臓での脂肪合成が減少した可能性が考えられた。肝細胞における NRDC は、LXR に関わる可能性があることで、コレステロールに加えて TG 代謝にも深く関与し、脂質代謝を包括的に制御し得る可能性が考えられた。しかしながら、肝細胞の NRDC による SREBP2 の活性化抑制および LXR の活性化促進の分子機構の詳細は、今後さらに詳細に検討する必要があるものと思われた。

血清 LDL サブクラスにおけるコレステロール濃度は、large LDL、medium LDL、small LDL、very small LDL のいずれの画分において NRDC<sup>LKO</sup> マウスでいずれも有意に減少したが、その中でも動脈硬化形成作用との関連性が最も高い very small LDL<sup>71)</sup> で最も強い減少を示した。Very small LDL は、ヒトでは健常者に比べて高 TG 血症を合併する患者において著明に増加することが明らかにされており<sup>72)</sup>、このことから、マウスでも血中 TG 値の低下に随伴してみられた現象である可能性が示唆

された。即ち、肝細胞の NRDC は、血中 LDL-C に加えて TG 濃度の制御にも関与する可能性が示されたが、特にヒトの病態生理における意義については、さらなる検討が必要であると思われた。

本章では、肝細胞の NRDC が細胞膜表面における LDL 受容体の発現量に対し、SREBP2 の活性化抑制による遺伝子転写の抑制と、PCSK9 と IDOL の発現促進による受容体分子の分解の促進との二つの機序で減少させることを明らかにした。また、それに加えて、MTP の発現促進により VLDL 産生を増加させることで血中 LDL-C 濃度を上昇させていることを明らかにした (Figure 18)。また、ヒトにおける NRDC の役割の解明には今後の検討を待たねばならないが、ヒトでも同様の分子機構が明らかになれば、脂質異常症における LDL-C 低下作用を有するこれまでにない新規の薬剤の治療標的となる可能性が示された。さらに本章の結果は、従来より報告されてきた NRDC の膜タンパク質のシェディング活性化および転写因子機能に加えて、PCSK9 などの細胞内における分子輸送制御あるいは分泌制御機能を有する可能性を明らかにした。本章における研究成果は、肝細胞の NRDC が脂質リポタンパク代謝において重要な制御因子であることを示し、既存の PCSK9 阻害抗体薬および MTP 阻害薬に次ぐ脂質異常症の新規の治療標的となる可能性を示した。LDL 受容体を全く発現しない遺伝子型の家族性高コレステロール血症の場合、PCSK9 阻害抗体薬でも効果がなく、副作用の懸念が大きい MTP 阻害薬が必要になる。本研究の結果では、肝臓での NRDC の抑制により MTP の発現低下と血清 LDL-C 値の低下が期待できると考えられる。さらに、今後はこれらの結果を基に肝細胞の NRDC が LDL-C に加え、血清 TG 値などの脂質検査値の変動にも寄与するのかを検討し、NRDC によるリポタンパク代謝の全容を明らかにすることが必要であると考えられた。



**Figure 18. Hypothetical illustration of LDL receptor expression regulation through transcriptional regulation of SREBP2 and LXR, and PCSK9 secretion regulation by NRDC in hepatocytes.**

## 総 括

本研究は脂肪肝および脂肪肝の動物実験モデルにおける新知見と、動脈硬化性疾患などの循環器疾患の発症と密接に関連する高 LDL-コレステロール血症などのリポタンパク代謝および脂質代謝異常に関わる分子の新たな知見を見出した。

第 1 章では、脂肪肝および肝炎を呈する NASH における CDAHFD 負荷動物モデルの有用性について、ヒトとの類似性および血清脂質プロファイルと病態進展に関連する分子指標との相関性の点から検討した。その結果、従来の実験食餌供与モデルの欠点を改善した CDAHFD モデルにおいても、有意な低体重および血清脂質の低下などヒト NASH の臨床像とは大いに異なる点が存在し、血清脂質と NAFLD/NASH の病態進展には有意な相関性が複数存在することを明らかにした。これらの結果は、今後の動物モデルを用いた NAFLD/NASH の研究において、体重と血清脂質値の変動に加えて病態進展に関連する分子指標との相関性についても検討することの重要性を明示した。しかしながら、NAFLD/NASH に特異的な検査、診断あるいは治療法は現在までに確立されておらず、それらに有用な候補分子が明らかにされつつあるが、臨床応用に至るには未だ病態に対する知見が乏しいのが現状である。NAFLD/NASH の発症機構の解明にはヒトにおける病態を忠実に反映する動物モデルを用いた検討が必要であり、本研究の成果を含めた各々の動物モデルの特性を明らかにし、ヒトと実験動物との病態の相違点を最小限に留めたモデルを用いた検討が今後重要であると考えられた。

第 2 章では、リポタンパクおよびコレステロール代謝における肝細胞の多機能プロテアーゼ NRDC の役割について検討した。その結果、肝細胞の NRDC は LDL 受容体の発現抑制、MTP の発現促進と、PCSK9 および IDOL などの LDL 受容体の分

解促進因子の分泌を亢進することで血中 LDL-C を増加させることを明らかにした。また、肝細胞における NRDC は、これまでに明らかにされてきた細胞表面でのシェディング活性化や核内での転写制御機能に加え、細胞内の分子輸送あるいは分泌制御に関わる新たな機能を有する可能性を明らかにした。これらの結果は、肝細胞の NRDC がコレステロールや TG などの脂質代謝において既存の脂質低下薬に次ぐ脂質異常症の新規の薬剤の治療標的となる可能性を示し、各臓器および各細胞種における NRDC の生理機能を今後解明していく上での新たな知見を提示した。

本研究の第 1 章と第 2 章とを通して考察する。第 1 章では、コリン摂食を低下させることで肝臓での MTP の発現が低下し、脂肪肝炎が惹起されるが、血清中の総コレステロールおよび TG 値は低下することが示された。第 2 章では、肝細胞の NRDC を欠損させることで、肝臓での MTP の発現が低下し、血清中の LDL-C 値が低下することが示され、LDL-C のサブクラスの値の変化から、おそらくは血清 TG 値も低下している可能性が推察された。肝臓での MTP の発現と、血清脂質の変動は、第 1 章と第 2 章とで偶然にも同様であった。しかしながら、肝臓特異的ではなく全身での NRDC の欠損であり、またその実験モデルも、第 1 章での CDAHFD ではなく、高脂肪を含まない CDAA であり、必ずしも同一とは言えないが、全身の NRDC 欠損マウスでは脂肪肝炎が抑制されることが先行論文で報告され<sup>53)</sup>、MTP の発現と脂肪肝炎との関係については本研究とは逆の結果を示している。この事実からも、さらにヒトの病態に近い実験動物モデルが必要であると考えられた。

最後に、本研究で得られた知見からは、既存の薬剤でも十分に管理しきれない重症の脂質異常症に対する新たな創薬ターゲットを提供する可能性が提起されたことが意義深いものと考えられた。しかしながら、ヒトにおいても NRDC が本研究の結果と同様に作用しているかについての今後の検討が必要であろうと思われた。

## 謝 辞

本研究の機会を与えて頂き、学位論文をまとめるにあたり、学部生の頃より終始御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を賜りました神戸学院大学 薬学部 病態代謝研究室 久米 典昭 教授に深甚なる謝意を表します。

本論文の作成にあたり、御校閲および御助言を賜りました神戸学院大学 薬学部 屋山 勝俊 教授、白川 晶一 教授に謝意を表します。

本研究を実施するにあたり、*Nrd1*<sup>flox/flox</sup> および Alb-Cre Tg マウスの御供与並びに多大なる御協力を賜りました滋賀医科大学 医学部 薬理学講座 西 英一郎 教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、学部生の頃より終始親切丁寧な御指導並びに幾多の御助言を賜りました神戸学院大学 薬学部 病態代謝研究室 平岡 義範 助教に厚く御礼申し上げます。

本研究において、マウス肝細胞の初代培養手技の御指導並びに御助言を賜りました京都大学大学院 医学研究科 循環器内科学講座 尾野 亘 准教授、堀江 貴裕 助教、西野 共達 特定助教に深く感謝申し上げます。

本研究を実施する上で共同研究機器の使用法の御教示並びに使用に際して多大なる御協力を賜りました神戸学院大学 薬学部 屋山 勝俊 教授、鷹野 正興 教授、榎本 理世 講師、檜原 正則 助教、濱田 美智子 助教に心より感謝致します。

また、研究生活を送る上で幾多の御助言並びに御協力を賜りました神戸学院大学 薬学部 岸本 修一 教授、清水 るみ子 先生、武庫川女子大学 薬学部 鳥井 栄貴 先生に御礼申し上げます。



本研究を遂行する上で尊命を捧げて頂いた多数の実験動物に深く感謝し、ご冥福をお祈り致します。

本研究の実験や試薬の準備、実験動物の世話など多方面で協力して頂き、研究室生活の苦楽を共有しました本研究室の川西 裕子 学士、伊藤 壮駿 学士、森脇 彩菜 学士、川ノ上 大輔 学士、八木 夏希 学士、大塩 裕也 学士、青木 奈々 学士、浦上 茜 学士をはじめ、卒業生の皆様に心より感謝申し上げます。

最後になりましたが、薬学部入学時から今日に至るまで、大変な心配と苦勞をかけてきたにも関わらず、如何なる時も激励の言葉と生活上のご支援を賜り、温かく見守って下さいました家族の皆様にこの上ない感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) Adams LA, Sanderson S, Lindor KD, Angulo P. The histological course of nonalcoholic fatty liver disease: a longitudinal study of 103 patients with sequential liver biopsies. *J Hepatol.* **42**, 132-138 (2005).
- 2) Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two hits? *Gastroenterology*, **114**, 842-845, (1998).
- 3) Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*, **52**, 1836-1846 (2010).
- 4) MaPherson S, Hardy T, Henderson E, Burt AD, Day CP, Anstee QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implication for prognosis and clinical management. *J Hepatol*, **62**, 1148-1155 (2015).
- 5) Imajo K, Yoneda M, Kessoku T, Ogawa Y, Maeda S, Sumida Y, Hyogo H, Eguchi Y, Wada K, Nakajima A. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Mol Sci*, **14**, 21833–21857 (2013).
- 6) Sanches SCL, Ramalho LN, Augusto MJ, da Silva DM, Ramelho FS. Nonalcoholic steatohepatitis: a search for factual animal models. *BioMed Research International*, (2015).
- 7) Farrell G, Schattenberg JM, Leclercq I, Yeh MM, Goldin R, Teoh N, Schuppan D. Mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. Towards optimization of their relevance to human NASH. *Hepatology*, **69**, 2241-2257 (2018).
- 8) Diehl AM. Lessons from animal models of NASH. *Hepatology Research*, **2**, 138-144 (2005).

- 9) Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol*, **18**, 2300-2308 (2012).
- 10) Nakayama H, Otabe S, Ueno T, et al. Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism: Clinical and Experimental*, **56**, 470-475 (2007).
- 11) Yao ZM, Vance DE. The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J Biol Chem*. **263**, 2998-3004 (1988).
- 12) Kulinski A, Vance DE, Vance JE. A choline-deficient diet in mice inhibits neither the CDP-choline pathway for phosphatidylcholine synthesis in hepatocytes nor apolipoprotein B secretion. *J Biol Chem*, **279**, 23916-23924 (2004).
- 13) Marcolin E, Forgiarini LF, Tieppo J, Dias S, de Freitas LAR, Marroni NP. Methionine- and choline-diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis. *Arq Gastroenterol*, **48**, 72-79 (2011).
- 14) Inoue M, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Igarashi K, Chayama K. Bach 1 gene ablation reduces steatosis in mouse MCD diet model. *J Clin Biochem Nutr*, **48**, 161-166 (2011).
- 15) Sahai A, Malladi P, Pan X, PAUL R, Melin-Aldana H, Green RM, Whittington PF. Obese and diabetic *db/db* mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Gastrointest Liver Physiol*, **287**, G1035-G1043 (2004).
- 16) Denda A, Kitayama W, Kishida H, et al. Expression of inducible nitric oxide (NO) synthase but not prevention by its gene ablation of hepatocarcinogenesis with fibrosis

- cAUsed by a choline-deficient, L-amino acid-defined diet in rats and mice. *Nitric Oxide*, **16**, 164-176 (2007).
- 17) Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga T, Tanaka C, Ito T, Katsune A, Sidoh M. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Path*, **94**, 93-103 (2013).
- 18) Ikawa-Yoshida A, Matsuo S, Kato A, Ohmori Y, Higashida A, Kaneko E, Matsumoto M. Hepatocellular carcinoma in a mouse model fed a choline-deficient, L-amino acid-defined , high fat diet. *Int J Exp Path*, **98**, 221-233 (2017).
- 19) Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, **226**, 497-509 (1957).
- 20) Gouloze SC, Cohn AF, Rissman R. New drug mechanism lomitapide. *Br J Clin Pharmacol*, **80**, 179-181 (2015).
- 21) Song L, da Costa KA, Fischer LM, et al. Polymorphism of the PEMT gene and susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *FASEB J*, **19**, 1266-1271 (2005).
- 22) Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, et al. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*, **40**, 781-786 (2004).
- 23) Gambino R, Cassader M, Pagano G, Durazzo M, Musso G. Polymorphism in microsomal triglyceride transfer protein: a link between liver disease and atherogenic postprandial lipid profile in NASH? *Hepatology*, **45**, 1097-1107 (2007).
- 24) Tamura S, Shimomura I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. **115**, 1139-42 (2005).

- 25) Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M, et al. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes*, **56**, 2863-2871 (2007).
- 26) Martius G, Alwahsh SM, Rave-Fränk M, Hess CF, Christiansen H, Ramadori G, Malik IA. Hepatic fat accumulation and regulation of FAT/CD36: an effect of hepatic irradiation. *J Clin Exp Pathol.*, **7**, 5379-92 (2017).
- 27) Wang N, Fulcher J, Abeysuriya N, Park L, Kumar S, Di Tanna GL, Wilcox I, Keech A, Rodgers A, Lal S. Intensive LDL cholesterol-lowering treatment beyond current recommendations for the prevention of major vascular events: a systematic review and meta-analysis of randomised trials including 327,037 participants. *Lancet Diabetes Endocrinol*, **8**, 36-49 (2020).
- 28) Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*, **376**, 1670-1681 (2010).
- 29) Shimizu R, Torii H, Yasuda D, Hiraoka Y, Kitada T, Hashida T, Yoshimoto A, Kita T, Kume N. Serum lipid goal attainment in chronic kidney disease (CKD) under the Japan Atherosclerosis Society (JAS) 2012 guideline: a single-center study. *J Atheroscler Thromb*, **22**, 949-957 (2015).
- 30) Shimizu R, Torii H, Yasuda D, Hiraoka Y, Furukawa Y, Yoshimoto A, Iwakura T, Matsuoka N, Tomii K, Kohara N, Hashida T, Kume N. Comparison of serum lipid management between elderly and non-elderly patients with and without coronary heart disease (CHD). *Prev Med Rep*, **4**, 192-198 (2016).
- 31) Goldstein JL, Kita T, Brown MS. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, **309**,

288-296 (1983).

32) Kume N, Kita T, Mikami A, Yokode M, Ishii K, Nagano Y, Kawai C. Induction of mRNA for low-density lipoprotein receptors in heterozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits treated with CS-514 (pravastatin) and cholestyramine. *Circulation*, **79**, 1084-1090 (1989).

33) Lagace TA. PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr Opin Lipidol*, **25**, 387-393 (2014).

34) Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science*, **325**, 100-104 (2009).

35) Ai D, Chen C, Han S, Ganda A, Murphy AJ, Haeusler R, Thorp E, Accili D, Horton JD, Tall AR. Regulation of hepatic LDL receptors by mTORC1 and PCSK9 in mice. *J Clin Invest*. **122**, 1262-70 (2012).

36) Dong B, Wu M, Cao A, Li H, Liu J. Suppression of Idol expression is an additional mechanism underlying statin-induced up-regulation of hepatic LDL receptor expression. *Int J Mol Med*. **27**, 103-10 (2011).

37) Abumrad NA, Davidson NO. Role of the gut in lipid homeostasis. *Physiol Rev*. **92**, 1061-85 (2012).

38) Suzuki T, Swift LL. Discovery of novel splice variants and regulatory mechanisms for microsomal triglyceride transfer protein in human tissues. *Sci Rep*, **6**, 27308 (2016).

39) Nishi E, Prat A, Hospital V, Elenius K, Klagsbrun M. N-arginine dibasic convertase is a specific receptor for heparin-binding EGF-like growth factor that mediates cell migration. *EMBO J*. **20**, 3342-50 (2001).

40) Nishi E, Hiraoka Y, Yoshida K, Okawa K, Kita T: Nardilysin enhances ectodomain shedding of heparin-binding EGF-like growth factor through activation of tumor necrosis

factor- $\alpha$ -converting enzyme. *J Biol Chem*, **281**, 31164-31172 (2006).

41) Seidah NG, Prat A. Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem*. **38**, 79-94 (2002).

42) Ohno M, Hiraoka Y, Matsuoka T, Tomimoto H, Takao K, Miyakawa T, Oshima N, Kiyonari H, Kimura T, Kita T, Nishi E. Nardilysin regulates axonal maturation and myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci*, **12**, 1506-1513 (2009).

43) Hiraoka Y, Yoshida K, Ohno M, Matsuoka T, Kita T, Nishi E: Ectodomain shedding of TNF- $\alpha$  is enhanced by nardilysin via activation of ADAM proteases. *Biochem Biophys Res Commun*, **370**, 154-158 (2008).

44) Hiraoka Y, Ohno M, Yoshida K, Okawa K, Tomimoto H, Kita T, Nishi E: Enhancement of  $\alpha$ -secretase cleavage of amyloid precursor protein by a metalloendopeptidase nardilysin. *J Neurochem*, **102**, 1595-1605 (2007).

16) Li J, Chu M, Wang S, Chan D, Qi S, Wu M, Zhou Z, Jiwen Li J, Nishi E, Qin J, Wong J: Identification and characterization of nardilysin as a novel dimethyl H3K4-binding protein involved in transcriptional regulation. *J Biol Chem*, **287**, 10089-10098 (2012)

45) Kanda K, Komekado H, Sawabu T, Ishizu S, Nakanishi Y, Nakatsuji M, Akitake-Kawano R, Ohno M, Hiraoka Y, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Matsumoto K, Kunichika M, Kimura T, Seno H, Nishi E, Chiba T. Nardilysin and ADAM proteases promote gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signalling via enhanced ectodomain shedding of TNF- $\alpha$ . *EMBO Mol Med*. **4**, 396-411 (2012).

46) Ohno M, Hiraoka Y, Lichtenthaler SF, Nishi K, Saijo S, Matsuoka T, Tomimoto H, Araki W, Takahashi R, Kita T, Kimura T, Nishi E. Nardilysin prevents amyloid plaque formation by enhancing  $\alpha$ -secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model.

*Neurobiol Aging*, **35**, 213-22 (2014).

47) Fujii T, Nishi E, Ito H, Yoshitomi H, Furu M, Okabe N, Ohno M, Nishi K, Morita Y, Morita Y, Azukizawa M, Okahata A, Tomizawa T, Kimura T, Matsuda S. Nardilysin is involved in autoimmune arthritis via the regulation of tumour necrosis factor alpha secretion. *RMD Open*. **3**, e000436 (2013).

48) Li J, Chu M, Wang S, Chan D, Qi S, Wu M, Zhou Z, Jiwen Li J, Nishi E, Qin J, Wong J: Identification and characterization of nardilysin as a novel dimethyl H3K4-binding protein involved in transcriptional regulation. *J Biol Chem*, **287**, 10089-10098 (2012).

49) Hiraoka Y, Matsuoka T, Ohno M, Nakamura K, Saijo S, Matsumura S, Nishi K, Sakamoto J, Chen PM, Inoue K, Fushiki T, Kita T, Kimura T, Nishi E. Critical roles of nardilysin in the maintenance of body temperature homeostasis. *Nat Commun*, **5**, 3224 (2014).

50) Nishi K, Sato Y, Ohno M, Hiraoka Y, Saijo S, Sakamoto J, Chen PM, Morita Y, Matsuda S, Iwasaki K, Sugizaki K, Harada N, Mukumoto Y, Kiyonari H, Furuyama K, Kawaguchi Y, Uemoto S, Kita T, Inagaki N, Kimura T, Nishi E. Nardilysin is required for maintaining pancreatic  $\beta$ -cell function. *Diabetes*, **65**, 3015-3027 (2016).

51) Kimura Y, Ikuta K, Kimura T, Chiba T, Oshima H, Oshima M, Nishi E, Seno H: Nardilysin regulates inflammation, metaplasia, and tumors in murine stomach. *Sci Rep*, **7**, 43052 (2017).

52) Morita Y, Ohno M, Nishi K, Hiraoka Y, Saijo S, Matsuda S, Kita T, Kimura T, Nishi E. Genome-wide profiling of nardilysin target genes reveals its role in epigenetic regulation and cell cycle progression. *Sci Rep*, **7**, 14801 (2017).

53) Ishizu-Higashi S, Seno H, Nishi E, Matsumoto Y, Ikuta K, Tsuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanda K, Komekado chiba T: Deletion of nardilysin



prevents the development of steatohepatitis and liver fibrotic changes. *PLoS One*, **9**, e98017 (2014).

54) Karatasakis A, Danek BA, Karacsonyi J, Rangan BV, Roesle MK, Knickelbine T, Miedema MD, Khalili H, Ahmad Z, Abdullah S, Banerjee S, Brilakis ES. Effect of PCSK9 inhibitors on clinical outcomes in patients with hypercholesterolemia: A meta-analysis of 35 randomized controlled trials. *J Am Heart Assoc*. **6**, e006910 (2017)

55) Sabatine MS , Giugliano RP, Keech AC, Honarpour N, Wiviott SD, Murphy SA, Kuder JK, Wang H, Liu T, Wasserman SM, Sever PS, Pedersen TR. Evolocumab and clinical outcomes in patients with cardiovascular disease. *N Engl J Med*, **376**, 1713-1722 (2017).

56) Schwartz GG, Steg PG, Szarek M, Bhatt DL, Bittner VA, Diaz R, Edelberg JM, Goodman SG, Hanotin C, Harrington RA, Jukema JW, Lecorps G, Mahaffey KW, Moryusef A, Pordy R, Quintero K, Roe MT, Sasiela WJ, Tamby J-F, Tricoci P, White HD, Zeiher AM. Alirocumab and cardiovascular outcomes after acute coronary syndrome. *N Engl J Med*, **379**, 2097-2107 (2018).

57) Hori M, Ohta N, Takahashi A, Masuda H, Isoda R, Yamamoto S, Son C, Ogura M, Hosoda K, Miyamoto Y, Harada-Shiba M. Impact of LDLR and PCSK9 pathogenic variants in Japanese heterozygous familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis*, **289**, 101-108 (2019).

58) Ray KK, Wright RS, Kallend D, Koenig W, Leiter LA, Raal FJ, Bisch JA, Richardson T, Jaros M, Wijngaard PLJ, Kastelein JJP, for the ORION-10 and ORIIN-11 Investigators. The phase 3 trials of inclisiran in patients with elevated LDL cholesterol. *N Engl J Med*, **382**, 1507-1519 (2020).

- 59) Mytilinaiou M, Kyrou I, Khan M, Grammatopoulos DK, Randeva HS. Familial hypercholesterolemia: New horizons for diagnosis and effective management. *Front Pharmacol*, **9**, 707 (2018).
- 60) Rader DJ, Cohen J, Hobbs HH. Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. *J Clin Invest*, **111**, 1795–1803 (2003).
- 61) Raal FJ, Pilcher GJ, Panz VR, van Deventer HE, Brice BC, Blom DJ, Marais AD. Reduction in mortality in subjects with homozygous familial hypercholesterolemia associated with advances in lipid-lowering therapy. *Circulation*. **124**, 2202–2207 (2011).
- 62) Stein EA, Honarpour N, Wasserman SM, Xu F, Scott R, Raal FJ. Effect of the proprotein convertase subtilisin/kexin 9 monoclonal antibody, AMG 145, in homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation*, **128**, 2113-2120 (2013).
- 63) Goldstein JL, Hobbs HH, Brown MS, Sriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. 2863–2913 (2001).
- 64) Khoury E, Brisson D, Roy N, Tremblay G, Gaudet D: Review of the long-term safety of lomitapide: a microsomal triglycerides transfer protein inhibitor for treating homozygous familial hypercholesterolemia. *Expert Opin Drug Saf*, **18**, 403-414 (2019).
- 65) Sirtori CR, Pavanello C, Bertolini S: Microsomal transfer protein (MTP) inhibition-a novel approach to the treatment of homozygous hypercholesterolemia. *Ann Med*, **46**, 464-474 (2014).
- 66) Zhang CP, Tian Y, Zhang M, Tuo QO Chen JX, Liao DF. IDOL, inducible degrader of low-density lipoprotein receptor, serves as a potential therapeutic target for dyslipidemia. *Med Hypotheses*, **86**, 138-142 (2016).
- 67) Han CC, Wang JW, Pan ZX, Tang H, Xiang SX, Wang J, Li L, Xu F, Wei SH. Effect of liver X receptor activation on the very low density lipoprotein secretion and messenger

ribonucleic acid level of related genes in goose primary hepatocytes. *Poult Sci*, **90**, 402-409 (2011).

68) Gustafsen C, Kjolby M, Nyegaard M, Mattheisen M, Lundhede J, Buttenschøn H, Mors O, Bentzon JF, Madsen P, Nykjaer A, Glerup S. The hypercholesterolemia-risk gene SORT1 facilitates PCSK9 secretion. *Cell Metab*, **19**, 310-318 (2014).

69) Emmer BT, Hesketh GG, Kotnik E, Tang VT, Lascuna PJ, Xiang J, Gingras AC, Chen XW, Ginsburg D. The cargo receptor SURF4 promotes the efficient cellular secretion of PCSK9. *eLife*, **7**, e38839 (2018).

70) Becares N, Gage MC, Voisin M, Shrestha E, Martin-Gutierrez L, Liang N, Louie R, Pourcet B, Pello OM, Luong TV, Goñi S, Pichardo-Almaraz C, Røberg-Larsen H, Diaz-Zuccarini V, Steffensen KR, O'Brien A, Garabedian MJ, Rombouts K, Treuter E, Pineda-Torra I. Impaired LXR $\alpha$  phosphorylation attenuates progression of fatty liver disease. *Cell Rep*, **26**, 984-995 (2019).

71) Hoogeveen RC, Gaubatz JW, Sun W, Dodge RC, Crocby JR, Jiang J, Couper D, Virani SS, Kathiresan S, Boerwinkle E, Ballantyne CM. Small dense low-density lipoprotein cholesterol concentrations predict risk for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **34**, 1069-1077 (2014).

72) Kathiresan S, Otvos JD, Sullivan LM, Keyes MJ, Schaefer EJ, Wilson PW, D'Agostino RB, Vasan RS, Robins SJ. Increased small low-density lipoprotein particle number: a prominent feature of the metabolic syndrome in the Framingham Heart Study. *Circulation*, **113**, 20-29 (2006).

## 主 論 文

1. Daisuke Yasuda, Haruki Torii, Rumiko Shimizu, Yoshinori Hiraoka and Noriaki Kume.

Reduced serum cholesterol and triglyceride levels in a choline-deficient L-Amino acid-defined high-fat diet (CDAHFD)-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

*Biol Pharm Bull*, **43**(4):616-618 (2020)

2. Daisuke Yasuda, Yoshinori Hiraoka, Mikiko Ohno, Kiyoto Nishi, Hirotaka Iwasaki, Toru Kita, Eiichiro Nishi and Noriaki Kume.

Deficiency of nardilysin in the liver reduces serum cholesterol levels.

*Biol Pharm Bull*, **44**(3):363-371 (2021)