

予 備 審 査 の 学 位 論 文 の 要 旨
（ 又 は ， 学 位 論 文 の 要 旨 ）

No.1

論文題名：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	
氏 名 安 田 大 将	学籍番号若しくは 9415104 所 属 機 関 名
主 論 文	
1. <u>Daisuke Yasuda</u> , Yoshinori Hiraoka, Mikiko Ohno, Kiyoto Nishi, Hirotaka Iwasaki, Toru Kita, Eiichiro Nishi, Noriaki Kume Deficiency of nardilysin in the liver reduces serum cholesterol levels Biol Pharm Bull 2021;44(3):363-371	
2. <u>Daisuke Yasuda</u> , Haruki Torii, Rumiko Shimizu, Yoshinori Hiraoka, 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. 2020;43(4):616-618.	

【研究目的】 アテローム性動脈硬化症 (ASCVD) は、世界人口における主要な死因であり、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り、血清コレステロール値の低下は、ASCVD への進展予防に寄与することが示されている (1,2)。血清 LDL-C 値は、主として LDL 受容体 (LDLR) を介した LDL 粒子 の肝臓への取り込みにより制御されている (3,4)。LDLR の発現量は、転写制御因子であるステロール応答配列結合タンパク質 2 (SREBP2) により制御されている。また、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) により LDLR と LDL との結合・エンドサイトーシス後のリサイクリング (再利用) が抑制され、E3-ユビキチンリガーゼである LDLR の誘導性分解タンパク質 (IDOL) による翻訳後調節によっても発現が抑制される。

ナルディライジン (NRDC) は、細胞内局在に依存して多様な生理的役割を果たすメタロエンドペプチダーゼである (5)。細胞膜表面に存在する NRDC は、腫瘍壊死因子 (TNF- α)、アミロイド前駆体タンパク質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し、一方で核内の NRDC は転写調節因子として機能することがこれまでの研究で明らかにされている (6-9)。また、マウスの NRDC 欠損は、成長遅延、神経系の発生分化障害、低体温症および耐糖能異常を示すことが知られている。非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の食餌供与モデルであるコリン欠乏食を 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ているが (10)、この研究では、肝臓の Kupffer 細胞における NRDC が TNF- α 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。一方、肝臓の大部分を占有する肝細胞における NRDC の生理的役割は十分に明らかにされていない。そこで、本研究では肝細胞特異的 NRDC ノックアウト (NRDC^{LKO}) マウスを用いて、コレステロールおよびリポタンパク代謝における肝細胞の NRDC の役割について検討した。

【実験方法】 NRDC^{LKO} マウスは Cre-loxP 法を用いて作製した。C57BL/6J 系統の NRDC^{LKO} および対照の NRDC^{fl} 雄性マウスを 10-12 週齢で遺伝子型毎に無作為に 2 群に割り付けた。一方の群には 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 (HCD) を供与し、他方の群には、継続して標準食餌 (SD) を 20 週間供与した。マウスの体重および食餌摂取量は 1 週間毎に測定した。一晩絶食させた後、マウスの血液試料を採取し、遠心分離して血清を回収した。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 法により測定した。血清および細胞培養液中の PCSK9 濃度は、ELISA 法にて測定した。肝臓組織および培養肝細胞の mRNA 発現量は定量的リアルタイム RT-PCR (qRT-PCR) を用いて解析した。マウス初代培養肝細胞は、10-12 週齢の NRDC^{LKO} および NRDC^{fl} マウスの肝臓から 2 段階コラゲナーゼ灌流法を用いて単離して培養した。NRDC 強発現肝細胞として、マウス肝細胞株に V5 で標識された NRDC 強制発現ベクターを遺伝子導入して作製した。肝臓組織および培養肝細胞の LDLR タンパク質発現量は、超遠心法により膜画分を単離したウェスタンブロット法にて解析した。平均値間の差の統計的有意性は、Student *t*-test により検定し、P 値は 0.05 未満を統計的有意とした。

【結果】 NRDC^{fl} マウスでは SD 供与に比べ HCD 供与で体重および体重あたりの肝臓重量が増加していたが、NRDC^{LKO} マウスでは SD 供与による体重および肝臓重量の増加が抑制されていた。しかし、体重あたりの食餌摂取量は、SD あるいは HCD のいずれが供与された群でも NRDC^{LKO} と NRDC^{fl} との間で有意な差はみられなかった。肝臓中の総コレステロール含量は、HCD 供与で SD 供与に比べて増加していたが、NRDC^{LKO} と NRDC^{fl} との間で有意な差はみられなかった。次に、血清総コレステロールおよび LDL-C 値は、SD あるいは HCD のいずれの食餌供与においても NRDC^{fl} と比較して、NRDC^{LKO} で有意に低下した。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含量を解析したところ、SD あるいは HCD のいずれが供与された場合でも、血清中の Large、Medium、Small、Very small LDL 画分のコレステロール濃度は、NRDC^{fl} と比較して、NRDC^{LKO} でいずれも有意に低下したが、LDL の中でも最も催動脈硬化性の高い Very small 画分での低下が最も著明であった。肝臓組織における脂質リポ蛋白代謝関連遺伝子群の発現量を qRT-PCR 法を用いて解析したところ、LDLR の mRNA 発現量は、SD あるいは HCD のいずれが供与された場合でも NRDC^{fl} と比較して NRDC^{LKO} で有意に増加した。一方で、プロテアソーム依存的な LDLR の分解に関わる IDOL の mRNA 発現量は、SD あるいは HCD のいずれが供与された場合でも、NRDC^{fl} と比較して NRDC^{LKO} で有意に減少した。さらに、肝臓からの VLDL 分泌に関わる MTP の mRNA 発現量は、SD あるいは HCD のいずれが供与された

群でも、NRDC^{eff} と比較して、NRDC^{LKO} で有意に低下した。肝臓組織膜画分における LDL 受容体タンパク質発現量をウェスタンブロット法を用いて解析したところ、SD あるは HCD のいずれの供与でも、NRDC^{eff} と比較して NRDC^{LKO} で有意に増加した。また、初代培養肝細胞膜画分における LDLR タンパク質発現量について解析したところ、NRDC^{eff} マウス由来の初代肝細胞と比較して、NRDC^{LKO} マウス由来の初代肝細胞での有意な発現量の増加がみられた。NRDC を強制発現させた AML12 細胞でも検討したところ、細胞表面の LDLR のタンパク質発現量は、対照と比較して有意な減少がみられた。血清中および培養肝細胞の培養上清中の PCSK9 濃度は、SD と HCD のいずれの供与でも、NRDC^{eff} と比べ NRDC^{LKO} で有意に低下した。一方、NRDC を強制発現させた AML12 細胞からの培養上清中への PCSK9 の分泌量は、対照と比較して有意に増加した。

【考察】本研究では、肝細胞の NRDC を欠損させることによりマウスの血清総コレステロールおよび LDL-C 濃度が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 LDLR の発現量およびリサイクリング（再利用）の増加による細胞膜表面での発現増加に起因する血中 LDL-C の肝臓内への取り込みの増加によりもたらされたものと考えられた。NRDC^{LKO} による LDLR の発現増加は、遺伝子発現の増加のみならず、IDOL の発現低下による寄与もあるものと思われた。血清 PCSK9 濃度の減少による LDLR の再利用の増加もさらに細胞表面での LDLR の発現量を増加させたものと考えられる。また、LDL の前駆リポ蛋白である VLDL の肝臓での産生に関わる MTP の発現低下による VLDL 産生の低下も LDLR の増加とは独立して血清 LDL-C 濃度を低下させた一因である可能性がある。実際に臨床においても、PCSK9 阻害薬であるエボロクマブおよび MTP 阻害剤であるロミタピドが、それぞれ LDLR 依存적および非依存的に血清 LDL-C 値を低下させる薬剤として使用されている (11,12)。初代培養肝細胞および NRDC 強制発現肝細胞株を用いた検討から、NRDC^{LKO} マウスでみられた血清 PCSK9 濃度の低下は、肝細胞において NRDC が PCSK9 の産生あるいは分泌を抑制し、細胞表面での LDLR の発現量を増加させることが示された。LDLR と PCSK9 の発現は SREBP2 (13)、IDOL 並びに MTP の発現は肝臓 X 受容体 (LXR) により活性化される (14,15)。これまでに明らかにされている核内の NRDC による転写制御機能は、肝細胞の NRDC 欠損により SREBP2 を活性化し、LXR の活性化を抑制し得ることが推察される。また、培養肝細胞の結果から肝細胞の NRDC は、PCSK9 の細胞外への分泌を促進し得ることが示唆され、NRDC が PCSK9 の細胞外への分泌過程において細胞内の分子輸送因子の発現量あるいは活性を制御し得ることが考えられた。本研究では、肝細胞の NRDC が多面的な分子制御機構を介して細胞膜表面における LDLR の発現量を制御することにより、血中コレステロール濃度およびリポタンパク代謝の恒常性を維持するために重要な役割を果たすことが明らかにされた。このことから、NRDC が脂質異常症の新たな治療標的となる可能性が示唆された。

【参考文献】

1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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, 3342-3350 (2001).
6. 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 α -secretase activity in an Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Aging*, 35, 213-222 (2014).
7. 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)
8. 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).
 9. 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 β -cell function. *Diabetes*. 65, 3015-3027 (2016).
 10. Ishizu-Higashi S, Seno H, Nishi E, Matsumoto Y, Ikuta K, Tsuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanda K, Komekado H, Chiba T. Deletion of nardilysin prevents the development of steatohepatitis and liver fibrotic changes. *Plos One*, 9, e98017 (2014)
 11. 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)
 12. 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)
 13. Lagace TA. PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr Opin Lipidol*, 25, 387-393 (2014)
 14. 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)
 15. 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)