●特集 膜トランスポーターを分子標的とした治療薬・診断薬

消化管コレステロールトランスポーターNPC1L1と高脂血症治療薬

高田龍平*・鈴木洋史

東京大学 医学部附属病院 薬剤部 〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1

NPC1L1 as a Pharmacological Target of Hypercholesterolemia

Tappei Takada* and Hiroshi Suzuki

Department of Pharmacy, the University of Tokyo Hospital
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

Ezetimibe (Zetia®) is known to be a cholesterol absorption inhibitor, which is approved and used for the treatment of hypercholesterolemia in more than 90 countries in the world. Recently, Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) protein was identified as a pharmacological target of ezetimibe and was found to be responsible for cholesterol absorption. This review article describes the basis and recent topics of physiological significance, clinical knowledge, systems for functional analysis and transcriptional regulation of NPC1L1.

Key words : cholesterol / NPC1L1 / ezetimibe / Zetia / hypercholesterolemia

1. はじめに

世界90カ国以上で使用されており、日本でも2007年6月に発売となったエゼチミブ（ゼチーア®：Fig. 1）は、小腸からのコレステロール吸収の阻害という新しい作用機序を持つ高脂血症治療薬である。本稿では、エゼチミブの薬効標的タンパク質として見出された消化管コレステロールトランスポーターNiemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) について、発見・研究の経緯を最新の研究成果を交えて紹介していく。

2. エゼチミブとNPC1L1

エゼチミブは、コレステロールのエステル化に関わるacyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) 阻害薬を探索する中で偶然に見出され、消化管からのコレステロール吸収を選択的に阻害することで血中コレステロール低下作用を発揮する薬物である¹⁾。エ

ゼチミブの発見以前はコレステロールの消化管吸収に関与する分子や吸収機構はほとんど知られておらず、この化合物の発見を契機に数多くの研究がなされたものの、分子メカニズムは不明であった。

2004年、エゼチミブを創製したシェリング・プラウ社のAltmannらは、ラット空腸から調製したcDNAより約16,500種のexpressed sequence tags (ESTs) を作成し、コレステロールトランスポーターとして期待される特徴である『コレステロールとの相互作用部位を持つこと』『細胞膜貫通領域を持つこと』『シグナル配列を持つこと』『N型糖鎖結合部位を持つこと』の4つを条件に解析を行った結果、唯一の候補遺伝子としてNPC1L1を見出した²⁾。小腸上部での刷子縁膜への発現、ノックアウトマウスにおける消化管コレステロール吸収の低下・エゼチミブ感受性の消失は、NPC1L1がエゼチミブの標的であるコレステロールトランスポーターの実体であることを示唆するものであった（詳細は後述）。

NPC1L1は、コレステロールの細胞小胞内蓄積による中枢神経症状・肝脾腫を症状とする重篤な遺伝病Niemann-Pick病C型の原因遺伝子Niemann-Pick C1 (NPC1) とアミノ酸配列で50%程度の相同性を持つ、

* Corresponding Author

Tel : 03-3815-5411 (内線 35297) Fax : 03-3816-6159

E-mail : tappei-tyky@umin.ac.jp

Fig. 1 Chemical structure of ezetimibe.

13回膜貫通タンパク質であると予測されている (Fig. 2) ^{3~5)}. 3~7番目の膜貫通領域を含む配列は sterol sensing domain と呼ばれ、コレステロール生合成の律速酵素でありスタチン系薬物の標的分子として知られる HMG-CoA還元酵素・脂質代謝に関わる転写因子 sterol responsive element binding protein (SREBP) の活性化制御因子である SREBP-cleavage activating protein (SCAP)・NPC1など、コレステロールの恒常性維持に関わる膜タンパク質に保存されているドメインであるが、NPC1L1分子におけるこのドメインの機能は不明である。NPC1L1は主に消化管に発現しているが、発現分布には種差があり、肝臓における発現はマウスではほとんど検出されないものの、ヒトでは小腸と同程度もしくはそれ以上に高発現している ^{2, 6)}.

3. NPC1L1の機能解析

NPC1L1の機能解析はノックアウトマウスから始まり、現在では臨床データ・*in vitro*系での解析も含めさまざまな手法により研究が進められている。

3.1 ノックアウトマウス

NPC1L1のノックアウトマウスは野生型マウスと一見区別がつかないものの、消化管からのコレステロール吸収が有意に低下しており、エゼチミブによる吸収阻害効果は見られない²⁾。また、通常の飼育条件下では血中脂質濃度に違いは見られないが、高コレステロール食で飼育した場合には野生型マウスで見られる血中総コレステロール濃度の大幅な上昇は観察されず、脂肪肝も発症しにくくなる^{6, 7)}。さらに、ノックアウトマウスにおいてはシトステロール・カンペステロールなどの植物性ステロールの吸収率・血中濃度が低下している⁷⁾。この結果は、シトステロール血症（植物ステロールの血中濃度が高値となる遺伝性疾患）治療へのエゼチミブの有用性を示すものである。

Fig. 2 Ball model of predicted membrane topology of human NPC1L1 ⁵. Residues highlighted (black) identify the predicted sterol sensing domain. Colored residues (gray) identify amino acids that are not conserved between human and monkey proteins.

3.2 肝特異的トランスジェニックマウス

コレステロールの消化管吸収に関わるトランスポーターとして同定されたNPC1L1は、ヒトでは肝臓にも高発現しているが、肝臓における生理機能は不明であった。2007年、ヒトNPC1L1の肝特異的トランスジェニックマウスが作成され、詳細な解析がなされた⁸⁾。その結果、導入されたヒトNPC1L1は肝細胞毛細胆管膜上に発現しており、胆汁中のコレステロール濃度が激減していることから、分泌されたコレステロールの肝細胞への再吸収に働いていることが強く示唆された。さらに、このような胆汁中のコレステロール低下作用がエゼチミブ投与により抑制されたことから、ヒトにおけるエゼチミブの薬理作用は小腸・肝臓の両臓器で発揮されていると考えられる。この結果は、エゼチミブ投与や遺伝的多型によりNPC1L1の機能が低下している場合には、消化管吸収の低下によりコレステロールの血中濃度が下がる一方で、胆汁からのコレステロール再吸収が不十分になり得ることを示唆しており、コレステロール胆石の形成率などに影響を与える可能性もある。

3.3 臨床報告

エゼチミブに関する臨床報告はここ数年で急激に増えているが、大部分はエゼチミブの臨床効果を調べたもの（特にエゼチミブ単剤とスタチン単剤、エゼチミブ・スタチン系薬物併用の比較）であり、NPC1L1との関連についての臨床的知見は少ない。ノ

Fig. 3 Time profiles of the uptake of cholesterol and β -sitosterol¹⁸⁾. The uptake of [^{3} H]cholesterol (panel A) and [^{3} H] β -sitosterol (panel B) by CaCo-2 cells transfected with pcDNA3.1 (control cells) or rat NPC1L1-HA cDNA (NPC1L1 cells) was examined at 37 °C for the indicated periods. Open and closed circles represent the results from control cells and NPC1L1 cells, respectively. Each point and vertical bar represent the mean $\pm$ S.D. of three determinations. *, significantly different from control cells by Student's t test ($p < 0.05$). **, significantly different from control cells by Student's t test ($p < 0.01$).

Fig. 4 Inhibitory effect of ezetimibe on the uptake of cholesterol and β -sitosterol¹⁸⁾. The uptake of [^{3} H]cholesterol (panel A) and [^{3} H] β -sitosterol (panel B) by CaCo-2 cells transfected with pcDNA3.1 (control cells) or rat NPC1L1-HA cDNA (NPC1L1 cells) was determined at 37 °C for 60 min in the presence of ezetimibe at the indicated concentrations. Open and closed circles represent the results from control cells and NPC1L1 cells, respectively. Each point and vertical bar represent the mean $\pm$ S.D. of three determinations. *, significantly different from nontreatment with ezetimibe by ANOVA followed by Dunnett's test ($p < 0.05$). **, significantly different from nontreatment with ezetimibe by ANOVA followed by Dunnett's test ($p < 0.01$).

ックアウトマウス・トランスジェニックマウスの結果から、NPC1L1が重篤な遺伝病の原因遺伝子である可能性は低いと考えられ、報告もないが、これは遺伝的多様性を許容できる遺伝子であることを示唆していると考えられる。現在までにNPC1L1の遺伝的多型と血中コレステロール濃度・植物ステロール濃度⁹⁾やエゼチミブ感受性^{10~12)}の関連を調べた報告がなされており、有意な相関が見られている多型もあるが、それらの多型がNPC1L1の発現・機能に与える影響は不明である。また、糖尿病患者群の小腸のNPC1L1発現量は対照群に比べ有意に上

昇していることが報告されており^{13, 14)}、糖尿病時のコレステロール吸収の亢進や糖尿病と高脂血症の関連性を説明し得る知見として興味深い。

3.4 *in vitro* 系でのNPC1L1機能解析

NPC1L1の輸送機能・エゼチミブの阻害効果を評価する*in vitro*実験としては、培養細胞を用いて直接的なコレステロールの取り込みを評価する輸送実験と、細胞膜小胞を用いたエゼチミブおよびコレステロールの結合実験がある。

輸送実験としては、NPC1L1ノックアウトマウスか

Fig. 5 Schematic illustration for the cholesterol-dependent regulation of human NPC1L1²⁴⁾.

ら調製した線維芽細胞⁶⁾, ラット肝癌由来の McArdle-RH7777 細胞^{15, 16)}・イヌ腎尿細管由来の MDCKII 細胞¹⁷⁾ への NPC1L1 遺伝子導入系での解析が報告されているが, いずれもコレステロール枯渇条件 (methyl- β -cyclodextrin による細胞の前処理) が輸送活性に必須であること, 生理的基質であるシトステロールの輸送が観察されないことなどの問題点がある。一方, 私達がヒト消化管由来の CaCo-2 細胞に NPC1L1 を導入した場合には, 胆汁酸・脂質を含む人工ミセルからのコレステロール・シトステロール吸収が見出され, エゼチミブ濃度依存的な阻害効果も確認することができた (Fig. 3, Fig. 4)¹⁸⁾。内因性に NPC1L1 が発現し, エゼチミブ感受性のコレステロール輸送が存在することから, CaCo-2 細胞には NPC1L1 機能に必要な共役因子・環境が備わっていると考えられるが, その詳細は不明である^{18, 19)}。

エゼチミブの活性代謝物であるグルクロン酸抱合エゼチミブを用いた結合実験の結果は, エゼチミブ (およびその代謝物) の標的が NPC1L1 であることを示すものであった^{5, 20)}。具体的には, 消化管上皮細胞刷子縁膜小胞と NPC1L1 遺伝子導入細胞へのグルクロン酸抱合エゼチミブの結合親和性が各動物種ではほぼ対応していたことに加え, NPC1L1 ノックアウトマウスの小腸から調製した細胞膜小胞では結合は見られないと報告されている。一方, 野生型マウス・NPC1L1 ノックアウトマウスから調製した消化管上皮細胞刷子縁膜小胞を用いたコレステロール結合実験により, コレステロールの細胞膜小胞への結合には NPC1L1 の有無は影響せず, プロテアーゼにより結合活性を失う他の因子が重要であることが報告された^{21, 22)}。輸送実験の結果と合わせて考えると,

NPC1L1 は単独で機能する分子ではなく, コレステロールと結合する他のタンパク質と共役し輸送を行う可能性が高い。今後の解明が待たれるところである。

4. NPC1L1 の発現調節

NPC1L1 の発現変動はコレステロール吸収に大きく影響し, その制御因子は創薬標的となり得ることから, 急速に研究が進んでいる。

4.1 SREBP2/HNF4 α による転写制御

コレステロールの輸送を担う NPC1L1 は, 細胞のコレステロール必要度に応じた発現制御を受けることが合理的であり, 実際にマウス消化管での発現量は高コレステロール食により低下することが知られていた⁷⁾。同様の制御はヒトにも見られ, NPC1L1 はコレステロールによる負の転写調節に関与する SREBP2 の制御下にあることが示されている²³⁾。さらに, 私達は, このような SREBP2 によるコレステロール依存的な NPC1L1 の転写調節が hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) / NR2A1 という核内受容体により増幅されていることを見出した²⁴⁾。ヒト NPC1L1 上流域を用いた解析から, この制御は NPC1L1 上流配列への HNF4 α の直接的な結合を必要とすることが示され (Fig. 5), siRNA により内因性 HNF4 α の発現量を低下させた場合には, NPC1L1 の mRNA 低下・コレステロール依存的発現制御の消失が観察された (Fig. 6)。このような制御により, スタチン系薬物を服用している患者においては NPC1L1 の発現上昇が想定され, 実際にスタチン系薬物併用患者の方がエゼチミブがよく効くようである¹⁾。

4.2 その他の因子による発現調節

その他の制御因子についてもさまざまな検討がなされているが, 詳細なメカニズムは不明である。peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α / NR1C1) に関しては, 野生型マウスで見られるアゴニスト (高脂血症治療薬フェノフィブラート) 投与によるコレステロール吸収低下・NPC1L1 発現量低下が PPAR α ノックアウトマウスにおいては消失するという報告がある一方で²⁵⁾, ヒト由来細胞株では変動は観察されておらず^{26, 27)}, 発現制御に種差がある可能性もある。PPAR δ / NR1C2²⁶⁾・liver X receptors (LXRs / NR1H2&1H3)²⁷⁾・retinoid X receptors (RXRs / NR2Bs)²⁸⁾ の各アゴニストや胆汁酸²⁹⁾ の処理による NPC1L1 mRNA 量の低下も報告されているが, いずれも制御機構は不明であり, 直接的な転写活性の制御ではなく mRNA の安定性の変化によるもので

Fig. 6 Effect of HNF4 α specific knock-down in HepG2 cells²⁴⁾. The effect of siRNA on the mRNA levels of endogenous HNF4 α (panel A) and NPC1L1 (panel B) was determined. In addition, the effect of siHNF4 α on the cholesterol-dependent expression of NPC1L1 was determined (panel C). Values are expressed as the mean $\pm$ S.E. of three determinations. **, significantly different by Student's t test ($p < 0.01$).

ある可能性もある。

5. おわりに

エゼチミブの薬効標的として見出されたNPC1L1は、現在、基礎・臨床の両面から精力的に研究が進められている。高脂血症・胆石症・糖尿病などの病態との関連や、コレステロール輸送機構・機能共役因子・細胞内局在制御など、未解明の点が多く残されており、今後の展開が楽しみである。

文 献

- ゼチーア錠 インタビューフォーム
- Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, *et al.* : *Science*, **303**, 1201-1204 (2004)
- Davies JP, Levy B and Ioannou YA : *Genomics*, **65**, 137-145 (2000)
- Iyer SP, Yao X, Crona JH, *et al.* : *Biochim. Biophys. Acta.*, **1722**, 282-292 (2005)
- Hawes BE, O'Neill KA, Yao X., *et al.* : *Mol. Pharmacol.*, **71**, 19-29 (2007)
- Davies JP, Scott C, Oishi K, *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **280**, 12710-12720 (2005)
- Davis HR, Jr., Zhu LJ, Hoos LM, *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **279**, 33586-33592 (2004)
- Temel RE, Tang W, Ma Y, *et al.* : *J. Clin. Invest*, **117**, 1968-1978 (2007)
- Cohen JC, Pertsemlidis A, Fahmi S, *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **103**, 1810-1815 (2006)
- Hegele RA, Guy J, Ban MR, *et al.* : *Lipids Health Dis*, **4**, 16 (2005)
- Simon JS, Karnoub MC, Devlin DJ, *et al.* : *Genomics*, **86**, 648-656 (2005)
- Pisciotta L, Fasano T, Bellocchio A, *et al.* : *Atherosclerosis*, **194**, e116-122 (2007)
- Lally S, Tan CY, Owens D, *et al.* : *Diabetologia*, **49**, 1008-1016 (2006)
- Lally SE, Owens D and Tomkin GH : *Diabetologia*, **50**, 217-219 (2007)
- Yu L, Bharadwaj S, Brown JM, *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **281**, 6616-6624 (2006)
- Brown JM, Rudel LL and Yu L : *Biochem. J.*, **406**, 273-283 (2007)
- Weinglass AB, Kohler MG, Nketiah EO, *et al.* : *Mol. Pharmacol.*, **73**, 1072-1084 (2008)
- Yamanashi Y, Takada T and Suzuki H : *J. Pharmacol. Exp. Ther*, **320**, 559-564 (2007)
- Sane AT, Sinnott D, Delvin E, *et al.* : *J. Lipid. Res.*, **47**, 2112-2120 (2006)

- 20) Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **102**, 8132-8137 (2005)
- 21) Labonte ED, Howles PN, Granholm NA, *et al.* : *Biochim. Biophys. Acta.*, **1771**, 1132-1139 (2007)
- 22) Knopfel M, Davies JP, Duong PT, *et al.* : *Biochim. Biophys. Acta.*, **1771**, 1140-1147 (2007)
- 23) Alrefai WA, Annaba F, Sarwar Z, *et al.* : *Am J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, **292**, G369-376 (2007)
- 24) Iwayanagi Y, Takada T and Suzuki H : *Pharm. Res.*, **25**, 1134-1141 (2008)
- 25) Valasek MA, Clarke SL and Repa JJ : *J. Lipid. Res.*, **48**, 2725-2735 (2007)
- 26) van der Veen JN, Kruit JK, Havinga R, *et al.* : *J. Lipid. Res.*, **46**, 526-534 (2005)
- 27) Duval C, Touche V, Tailleux A, *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **340**, 1259-1263 (2006)
- 28) Lalloyer F, Fievet C, Lestavel S, *et al.* : *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**, 2731-2737 (2006)
- 29) Ratliff EP, Gutierrez A and Davis RA : *J. Lipid. Res.*, **47**, 1513-1520 (2006)

(Received 13 March 2008 ;

Accepted 17 March 2008)

著者略歴

高田 龍平 (たかだ たっぺい)

1999年3月 東京大学薬学部卒業
 2001年3月 東京大学大学院薬学系
 研究科修士課程修了
 2004年3月 東京大学大学院薬学系
 研究科博士後期課程
 修了
 2001年4月～2004年3月 日本学術振
 興会特別研究員DC1
 2004年4月 東京大学医学部附属病
 院薬剤部 助手
 2007年4月 東京大学医学部附属病
 院薬剤部 助教
 現在に至る

鈴木 洋史 (すずき ひろし)

1988年1月 東京大学薬学部教務
 職員
 1989年2月 東京大学薬学部 助手
 1996年4月 東京大学薬学部 助
 教授
 2003年4月 東京大学医学部 助教
 授・附属病院薬剤部副
 部長
 2004年6月 東京大学医学部 教
 授・附属病院薬剤
 部長
 現在に至る