

## 創薬基盤推進研究事業 研究開発課題 事後評価報告書

研究開発課題名	非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の新規創薬ターゲットの同定
代表機関名	国立大学法人東京大学
職名	講師 / 第一副部長
研究開発代表者名	高田 龍平
全研究開発期間	平成 30 年度 ~ 令和 2 年度

### 1. 研究開発成果

本研究開発計画は、既存薬であるエゼチミブの薬効標的であり、肝臓に発現する脂質輸送体：Niemann–Pick C1 Like 1 (NPC1L1) が非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の新規増悪因子であり、新たな創薬ターゲットとなりうることを示すことを目的とした3年計画である。得られた成果およびその意義等の概要は以下のとおりである。

研究開始初年度にあたる 2018 年度においては、研究開発の礎となる proof of concept の早期取得を念頭に、2年度目・3年度目に予定されている研究開発項目をより効率よく実施できるように工夫を重ねながら、研究を進めた。すなわち、高脂肪食投与により脂肪肝を誘導した、ApoE プロモーター依存的 NPC1L1 肝発現トランスジェニック (L1-Tg) マウスにエゼチミブを混餌投与し、NAFLD の進行に与える影響を評価した。その結果、通常食への混餌によりエゼチミブによる脂肪肝回復促進効果を、高脂肪食への混餌によりエゼチミブによる脂肪肝治療効果をそれぞれ見出すことに成功した (Toyoda, Takada *et al*, *FASEB BioAdvances*, 2019, 1(5):283-295)。また、研究開発代表者らは、肝臓に発現する NPC1L1 が新規 NAFLD 増悪因子であることを新たに同定した過程で、その関連分子機構のひとつに Toll-like receptor 4 (TLR4) に代表される自然免疫系が関与していることも明らかにすることができた。さらに、NPC1L1 の生理的基質であるコレステロールの構造類縁体を対象とした定量分析系 (LC-MS による測定) の構築にも着手した。

研究開始2年度にあたる 2019 年度においては、肝臓の NPC1L1 依存的な脂肪肝増悪機序を明らかにするため、高脂肪食投与により脂肪肝を誘導した L1-Tg マウスの解析を行った。胆汁成分解析の結果、胆汁酸やリン脂質の胆汁排泄に違いが認められなかった一方で、L1-Tg マウスにおけるコレステロールの胆汁排泄が、コントロールマウス (高脂肪食を与えた野生型マウス) の場合と比べて有意に低下していることが見出された。また、血液中・肝臓中成分を解析したところ、L1-Tg マウスにおける肝臓から血液中への VLDL 分泌が、高脂肪食投与期間依存的に低下していくことが明らかとなった。また、この表現型は、NPC1L1 阻害剤であるエゼチミブを投与することで予防できた。当該 L1-Tg マウスの肝臓において細胞ストレスマーカーが上昇していたことなどを踏ま

えると、肝臓の NPC1L1 を介して胆汁から肝臓へと再吸収されたコレステロールは、弱い肝障害を誘発することで VLDL 放出活性の低下を招き、肝臓への脂質蓄積(脂肪肝化)が促進されるというスキームが考えられた(Toyoda, Takada, *et al*, *Lipids in Health and Diseases*, 2019, 18:234)。以上の結果は、胆汁由来のコレステロールが肝臓の脂質恒常性に与える影響の観点からも興味深い知見である。

最終年度にあたる 2020 年度においては、肝臓の NPC1L1 依存的な脂肪肝増悪機序のさらなる解析を進めた。NPC1L1 の生理的基質であるコレステロールの構造類縁体を対象とした定量分析系(2018–2019 年度において実験系を構築)を活用し、より詳細な胆汁成分解析を進めたところ、コレステロールの構造類縁体についても、その胆汁排泄が大きく低下していることが見出された。そこで、これらの物質の含有率を増やした高脂肪食を新たに調製し、L1-Tg マウスへの投与試験を行ったところ、従来の高脂肪食の場合と比べてより顕著な脂肪肝の誘導が認められた。この表現型の誘導がエゼチミブの混餌投与によって予防されたことに加え、*in vitro* 輸送実験によってコレステロール類縁体の NPC1L1 による輸送が見出されたことを合わせて考えると、肝 NPC1L1 を介して胆汁から再吸収されたコレステロール類縁体もまた、脂肪肝増悪因子として働くものと考えられた。さらに、上記以外の増悪因子の発見、あるいは競合的に働き悪化を防ぐ分子の存在についても検討を進めた。文献報告などを精査し、標的分子を絞ったうえでの狙い撃ち型のアプローチを展開したところ、新たな標的として他の脂質輸送体の可能性を見出すことに成功した。当該脂質輸送体のヘテロノックアウト(KO)マウスに高脂肪食を与えたところ、肝臓へのコレステロール・中性脂肪の蓄積、および見かけ上のコレステロールの胆汁排泄活性は、同条件で飼育した L1-Tg マウスとほぼ同程度であり、ホモ KO マウスにおいてはさらに強い影響が認められた。

本研究開発を通じて得られた成果を礎としてさらに研究が進展することで、予防医学の発展を通じた国民健康増進への貢献のみならず、さらなる創薬ターゲット候補が同定されるものと期待される。また、NPC1L1 を発現しているという点でよりヒトに近い肝臓を持つ L1-Tg マウスが、新たな NAFLD モデルマウスとして有用である可能性が示されたことも、また重要な知見であろう。

The goal of this project was to identify a new drug target for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). At the start of this three years AMED project (Research on Development of New Drugs), we hypothesized that the hepatic lipid transporter Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is a novel NAFLD-exacerbating factor amenable to therapeutic intervention by its selective inhibitor “ezetimibe” that has been on the market as a globally used lipid-lowering drug. This was because a few clinical observations had suggested the potential efficacy of ezetimibe on human NAFLD at the start of this project, whereas the well-known molecular basis of ezetimibe as a lipid-lowering drug (inhibition of intestinal cholesterol absorption that is mainly facilitated by intestinal NPC1L1) could not explain the beneficial effect of this drug on the hepatic phenotypes. As summarized below, we successfully achieved our mission. We believe that outcomes of this study will have a great clinical impact and contribute to the understanding of the aetiology of NAFLD; additionally, our findings uncover feasible opportunities for repositioning drugs to treat NAFLD in the near future.

NAFLD is one of the most common liver diseases worldwide, although its pathogenesis remains to be elucidated. In this project, we revealed that hepatic NPC1L1, a cholesterol re-absorber from bile to the liver expressed on the bile canalicular membrane, is a novel NAFLD risk factor contributing to steatosis formation. Indeed, transgenic mice with hepatic expression of human NPC1L1 under a liver-specific promoter (L1-Tg mice) developed steatosis with a high-fat diet (HFD) containing cholesterol within a few weeks, and this steatosis was prevented and recovered by ezetimibe [1]. These results indicate that hepatic NPC1L1 is an NAFLD-exacerbating factor amenable to therapeutic intervention and would extend our understanding of the vital role of cholesterol uptake from bile in the development of NAFLD. Furthermore, administration of a TLR4 inhibitor also prevented the hepatic NPC1L1-mediated steatosis formation, suggesting a latent link between physiological roles of hepatic NPC1L1 and regulation of innate immune system.

Further analyses revealed that unlike the liver of wild-type mice that have little expression of hepatic Npc1l1, the liver of L1-Tg mice displayed time-dependent changes in parameters that indicated steatosis formation. In an early stage of the steatosis characterized by mild accumulation of hepatic cholesterol and triglycerides (TG), between WT and L1-Tg mice fed a HFD for two weeks, there were no significant differences in the hepatic expression of Ppar $\alpha$ , Acox1, Cd36, Srebf1, and Srebf2; however, the hepatic ability to secrete very low-density lipoprotein (VLDL)-TG decreased in L1-Tg mice [2]. These results suggest that hepatic NPC1L1 exacerbates diet-induced steatosis, which was accompanied by decreased hepatic ability of VLDL-TG secretion. Our findings provide a deeper understanding of L1-Tg mice as a promising NAFLD animal model that is able to re-absorb biliary-secreted cholesterol similar to humans.

#### **References:**

[1] Yu Toyoda\*, Tappei Takada<sup>\*#</sup> (\*, co-first; #, corresponding author), Masakazu Umezawa, Fumiya Tomura, Yoshihide Yamanashi, Ken Takeda, Hiroshi Suzuki#. Identification of hepatic

NPC1L1 as an NAFLD risk factor evidenced by ezetimibe-mediated steatosis prevention and recovery. *FASEB BioAdvances*. 2019, 1(5):283-295, doi: 10.1096/fba.2018-00044.

[2] Yu Toyoda<sup>\*</sup>, Tappei Takada<sup>\*#</sup> (\*, co-first; #, corresponding author), Yoshihide Yamanashi, Hiroshi Suzuki. Pathophysiological importance of bile cholesterol reabsorption: hepatic NPC1L1-exacerbated steatosis and decreasing VLDL-TG secretion in mice fed a high-fat diet. *Lipids in Health and Disease*. 2019, 18:234, doi:10.1186/s12944-019-1179-0.

## 2. 総合評価

良い

### 【評価コメント】

肝臓に発現する脂質輸送体 NPC1L1 が NAFLD の増悪因子であり、新たな創薬ターゲットとなるという作業仮説を着実に検証し、非臨床 POC を取得したことは評価できる。また、関連分子機構のひとつに TLR4 に代表される自然免疫系が関与していることや新たな標的として他の脂質輸送体の可能性を見出した。

今後、本研究成果の最大化に向け、患者検体を用いた発症機序の解明や臨床情報を活用し、ヒトでの外挿性を考慮した創薬研究を進め、企業との連携も視野に、NAFLD 治療薬開発が具現化していくことを期待する。

以上