

恒常的な消化管の胆汁酸代謝制御を標的とする 食生活設計による脂肪性肝疾患の予防研究

宮田 昌明

国立研究開発法人水産研究・教育機構水産大学校食品科学科 教授

緒 言

肝臓における生活習慣病の表現型である脂肪性肝疾患は肝臓に脂肪が溜まる脂肪肝と肝臓の炎症、繊維化を伴う肝炎からなり成人男性の約3割が該当する。病状が進行すると肝癌になり、悪化すると肝移植以外に根本的な治療法がないのが現状で、食生活による予防の必要性が非常に高まっている。

胆汁酸は消化管で脂質や脂肪性ビタミンの吸収に関与するだけでなく、核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) や膜受容体 TGR5 シグナル等を介して様々な脂質・糖代謝シグナル伝達に関与する。最近の研究は胆汁酸の分子種特異的な核内受容体や膜受容体シグナルが存在し、消化管の胆汁酸量に加え質的变化がこれらのシグナルを変化させ肝臓の脂質代謝を調節するとされる¹⁾。筆者らも腸内細菌により生成される胆汁酸が選択的に FXR シグナルを活性化することや消化管胆汁酸吸収トランスポーターの分解系制御に関与することを個体レベルで明らかにした^{2,3)}。

胆汁酸はある種の腸内細菌により脱抱合されて非抱合型胆汁酸にさらに脱水酸化されて二次胆汁酸に変換される。またこれらの胆汁酸はその約95%が消化管から吸収されて肝臓に移行する腸肝循環をされている。よって腸内細菌による胆汁酸の代謝変換や消化管での胆汁酸吸収を食事成分により調節できれば消化管の胆汁酸量や組成を制御できると考えられる。これらのことから、食事成分による腸内細菌叢や胆汁酸吸収の変動により消化管胆汁酸の量や組成を恒常的に変化させることで、腸肝胆汁酸シグナルを変化させ、恒常的に脂肪性肝疾患を予防できると考えた。

本研究では胆汁酸の分子種に依存した受容体応答性の差異について培養細胞系を用いて明らかにするとともに、脂肪性肝疾患のモデルである *Fxr* 欠損マウスに魚油を摂取させるモデルの解析により脂肪性肝疾患の予防のための基礎的知見を得ることを目的とした。

実験方法

1. 動物実験

Fxr 欠損マウス⁴⁾は、米国国立衛生研究所 Dr. Frank J. Gonzalez より供与され、国立研究開発法人水産研究・教育機構水産大学校実験動物飼育施設内で飼育繁殖させた。C57BL/6N マウスは日本チャールズ・リバー株式会社より購入した。4%コーン油含有精製飼料 (AIN-93M ベース) および4%魚油含有精製飼料 (AIN-93M ベース) は、マルハニチロ株式会社より供与された DHA-22K (ドコサヘキサエン酸: DHA 26.3%、エイコサペンタエン酸: EPA 6.3% 含有) を使用し、オリエンタル酵母工業株式会社にて調製された。8~10週齢の雌性 *Fxr* 欠損マウスに4週間これらの飼料を自由摂取させた。

2. マウス初代培養肝細胞の調製

麻醉下で雄性 C57BL/6N マウス (8~9週齢) の肝臓を collagenase type IV 含有緩衝液により還流した後、肝臓を摘出し、William's E medium が入ったシャーレに入れ、十分振盪して細胞をバラバラにした。遠心後細胞をコラーゲン I 型プレートに播いた。

3. 脂肪酸分析

肝臓の脂質を Folch らの方法で抽出し、BF₃ 法によりメチル化後ガスクロマトグラフィー (G-6000、株式会社日立製作所) で分析した。分離カラムは TC-FFAP (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm) を用いカラム温度 (180~220°C)、検出器 (FID) で検出した。

4. 脂質含量と肝障害レベルの測定

肝内および糞中のトリグリセロール (TG)、総コレステロール (TC) および遊離脂肪酸 (FFA) 濃度は、それぞれトリグリセライド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコーおよび NEFA C-テストワコー (和光純薬) を用いて定量した。血清中の ALT 活性と ALP 活

性は、それぞれトランスアミナーゼCII-テストワコー、ラボアッセイ™ ALP（和光純薬）を用いて測定した。

結 果

1. 初代培養肝細胞での胆汁酸分子種による胆汁酸代謝応答性

抗菌薬投与により消化管腔内胆汁酸が増加するにもかかわらずFXRシグナルが減弱することから胆汁酸の分子種のなかにはFXRのアンタゴニストとなるものがある可能性が示唆された⁵⁾。そこでtauro cholic acid (TCA) やtauro β-muricholic acid (TβMCA) のFXRシグナルへの影響について解析するため胆汁酸取り込み機能を有するマウス初代培養肝細胞を用いて肝FXR標的遺伝子 (*Shp* および *Ostβ*) のmRNAレベルを測定した。その結果、FXRアゴニストのGW4064 (2 μM) 処置、TCA (100 μM) 処置により肝FXR標的遺伝子のmRNAレベルは有意に増加した (図1)。しかし、TβMCAの存在下では、TCA処置に伴う肝FXR標的遺伝子の発現増加は減弱した。さらにTβMCA単独処置群では、FXR標的遺伝子のmRNAレベルは減少した。

2. *Fxr*欠損マウスにおける魚油添加食摂取の影響

2.1 体重の変化

8~10週齢の雌性*Fxr*欠損マウスに4週間にわたり、4%魚油含有精製飼料および4%コーン油含有精製飼料を与えた際の摂取前、摂取後の体重増加は、魚油群とコーン油群との間に有意な差異は認められなかった。また、両群で摂餌量に有意な差異は認められなかった。

2.2 肝内の脂肪酸組成の変動

魚油あるいはコーン油添加食を摂取させた*Fxr*欠損マ

ウスの肝内脂肪酸組成を測定した結果、コーン油群の肝内には、リノール酸 (18:2)、γ-リノレン酸 (18:3) 等の*n*-6系多価不飽和脂肪酸の蓄積が認められ、魚油群の肝内には、エイコサペンタエン酸 (C20:5)、ドコサペンタエン酸 (22:5)、ドコサヘキサエン酸 (22:6) 等の*n*-3系多価不飽和脂肪酸の蓄積が認められた (表1)。特にドコサヘキサエン酸の脂肪酸組成に占める割合は、魚油群が20%、コーン油群が2%であり、有意な差異が認められた⁶⁾。

表1 *Fxr*欠損マウスの肝内脂肪酸組成

	Weight percentage (%)	
	Corn	Fish
C16:0	17.9±0.9	23.7±2.4*
C16:1 <i>n</i> -7	2.5±0.8	1.9±0.6
C18:0	7.9±1.6	10.4±1.9
C18:1 <i>n</i> -9	36.2±6.4	20.9±3.9*
C18:1 <i>n</i> -7	3.5±0.9	1.4±0.5*
C18:2 <i>n</i> -6	11.5±2.2	2.6±0.2**
C18:3 <i>n</i> -3	ND	ND
C18:3 <i>n</i> -6	0.2±0.1	ND
C20:1 <i>n</i> -9	0.5±0.2	0.1±0.1*
C20:2 <i>n</i> -6	0.1±0.1	ND
C20:3 <i>n</i> -6	ND	ND
C20:4 <i>n</i> -3	ND	ND
C20:4 <i>n</i> -6	8.1±2.1	5.1±0.6
C20:5 <i>n</i> -3	ND	3.2±0.3**
C22:4 <i>n</i> -6	ND	ND
C22:5 <i>n</i> -3	ND	1.1±0.1**
C22:6 <i>n</i> -3	2.0±0.4	20.1±2.5**
Others	9.6±1.9	10.6±1.7

魚油 (Fish) またはコーン油 (Corn) 添加食を摂取した*Fxr*欠損マウスの肝臓内の脂肪酸組成を測定した (平均値±標準偏差、*n*=5, Student's *t*-test: **p*<0.05, ***p*<0.01 vs. Corn)。

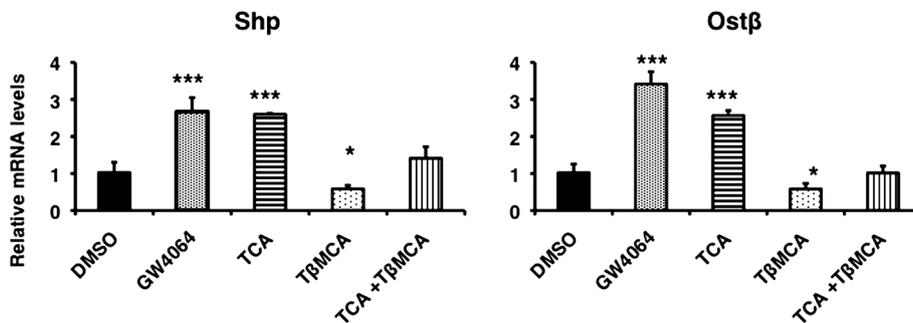


図1 マウス初代培養肝細胞での胆汁酸処理によるFXR標的遺伝子発現

TCA (100 μM), TβMCA (100 μM) を3時間処理後の遺伝子発現変動を測定した (平均値±標準偏差、*n*=5, Dunnett's test: **p*<0.05, *p*<0.001 vs. DMSO)。

2.3 肝障害マーカーの変動

魚油およびコーン油添加食の摂取が*Fxr*欠損マウスの肝障害レベルに及ぼす影響を検討するため、肝障害マーカーである血清中のalanine aminotransferase (ALT) 活性、alkaline phosphatase (ALP) 活性を摂取前、摂取後測定した。その結果、摂取前、摂取後で魚油群、コーン油群ともに変化は認められなかった。また摂取後のALT活性、ALP活性は、魚油群とコーン油群との間に有意な差異は認められなかった。

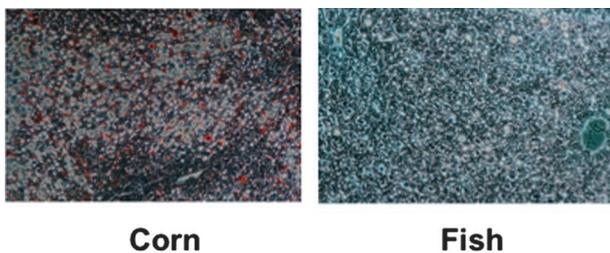


図2 肝臓のオイルレッドO染色

魚油 (Fish) またはコーン油 (Corn) 添加食を摂取した*Fxr*マウスの肝臓のオイルレッドO染色。

2.4 肝内および血清中の脂質レベルの変動

魚油とコーン油添加食摂取の群間で*Fxr*欠損マウスの肝内脂質レベルに及ぼす影響を調べるため、肝臓組織中の脂肪滴の蓄積をオイルレッドO染色で評価した。また肝内のTG、TCおよびFFAレベルを測定した。オイルレッドO染色の結果で赤く染まっているのが脂肪滴である。魚油群の肝臓組織中の脂肪滴は、コーン油群と比較して顕著に低下した (図2)。

魚油群の肝内TG、TCおよびFFAレベルは、コーン油群と比較して有意に低値を示した (図3)。魚油とコーン油添加食の摂取間で*Fxr*欠損マウスの血清中脂質レベルに及ぼす影響を調べるため、血清中のTG、TCおよびFFAレベルを測定した。血清中では、魚油群のFFAレベルがコーン油群と比較して有意に低値を示したがTG、TCのレベルには有意な差異は認められなかった (図4)。

2.5 肝臓における脂質代謝関連因子の発現レベルの変動

魚油摂取がコーン油摂取に比べ肝内の脂質レベルを低下させていたため、脂質合成に参与するfatty acid synthase (Fas)、stearoyl CoA desaturase 1 (Scd1)、acetyl-CoA carboxylase 1 (Acc1) や脂肪酸の β 酸化

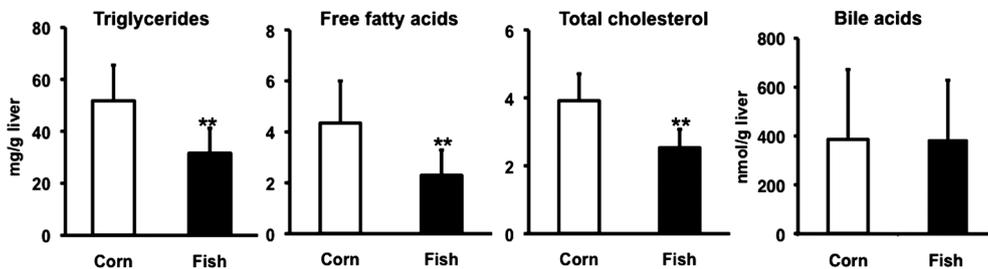


図3 肝臓の脂質レベルの変動

魚油 (Fish) またはコーン油 (Corn) 添加食を摂取した*Fxr*欠損マウスの肝内脂質レベルを測定した (平均値±標準偏差、 $n=5$, Student's *t*-test: ** $p < 0.01$, vs. Corn)。

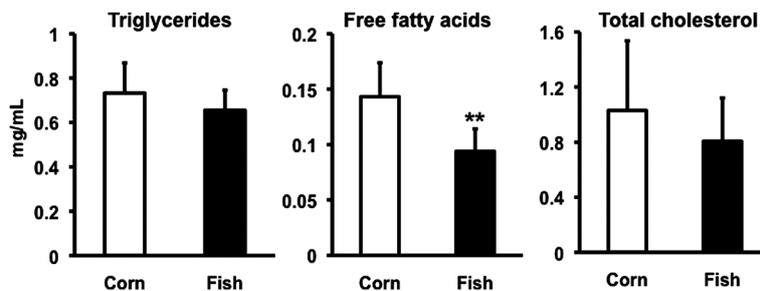


図4 血中の脂質レベルの変動

魚油 (Fish) またはコーン油 (Corn) 添加食を摂取した*Fxr*欠損マウスの肝内脂質レベルを測定した (平均値±標準偏差、 $n=5$, Student's *t*-test: ** $p < 0.01$, vs. Corn)。

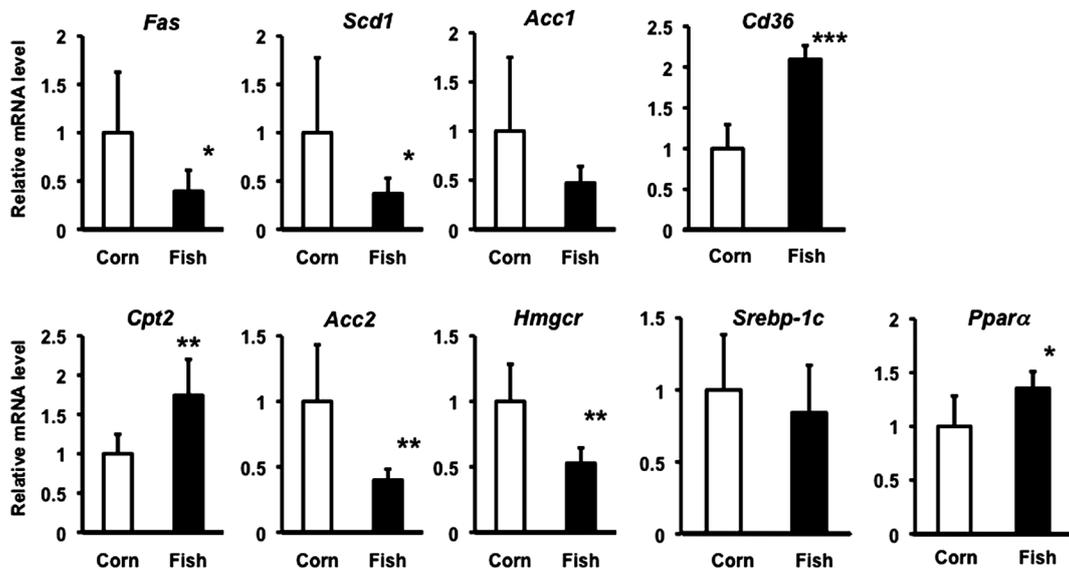


図5 脂質関連遺伝子の発現変動

魚油 (Fish) またはコーン油 (Corn) 添加食を摂取した *Fxr* 欠損マウス肝臓の脂質関連遺伝子の mRNA レベルを測定した (平均値 ± 標準偏差, $n=5$, Student's *t*-test: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. Corn)。

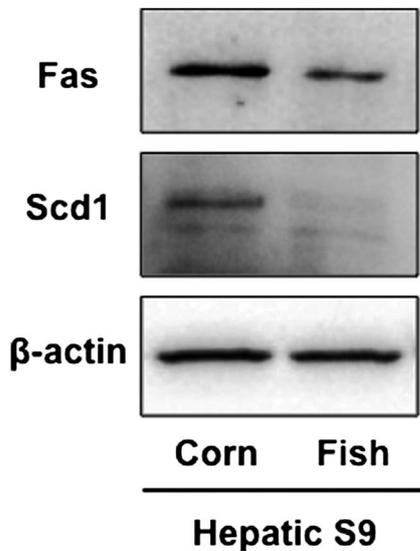


図6 脂肪酸合成関連タンパク質の発現変動

魚油 (Fish) またはコーン油 (Corn) 添加食を摂取した *Fxr* 欠損マウス肝臓の S9 画分を用いた脂肪酸合成関連タンパク質のウエスタンブロット解析を実施した。

に 関 与 す る carnitine palmitoyltransferase 2 (*Cpt2*), acetyl-CoA carboxylase 2 (*Acc2*) やコレステロール合成に 関 与 す る hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (*Hmgcr*) 等 の 肝 脂 質 代 謝 関 連 因 子 の 肝 内 mRNA レベルを測定した。その結果、コーン油群と比較して魚油群の *Fas*, *Scd1*, *Acc2* および *Hmgcr* の肝内 mRNA レベルが有意に低値を示し、*Cpt2* の肝内 mRNA レベルが有意に

高値を示した (図5)。魚油群の *Acc1* の肝内 mRNA レベルもコーン油群と比較して低い傾向がみられた。

魚油摂取がコーン油摂取に比べ *Fas*, *Scd1* 等の脂質合成に 関 与 す る 因 子 の 肝 内 mRNA レベルを低下させていたため、それらの因子の肝内タンパク質レベルを測定した。各個体の肝臓から S9 画分を調整し、各群の S9 をプールした $2\mu\text{g}$ をウエスタンブロット解析した。その結果、魚油群の肝内 *Fas*, *Scd1* タンパク質レベルは、コーン油群と比較して低値を示した (図6)。

考 察

マウス初代培養肝細胞を用いた実験により TCA は FXR シグナルを活性化したが、 $T\beta\text{MCA}$ は活性化せず、むしろ TCA による FXR の活性化を抑制し、 $T\beta\text{MCA}$ は FXR のアンタゴニストとなる可能性が示された。これらの結果は胆汁酸の分子種によって FXR シグナルを活性化するものと活性化を抑制するものがあることを示しており、胆汁酸組成を変化させることで FXR シグナルを制御できる可能性があることを示唆している。食事成分により消化管腔内の胆汁酸組成、特に $T\beta\text{MCA}$ レベルを変動させて、消化管の FXR シグナルを変動させることで、FXR の腸肝シグナルを介した脂肪性肝疾患の予防法の開発が可能であることが示唆された。消化管腔内の胆汁酸組成は胆汁酸を代謝変換する腸内細菌叢によってコントロールされており、腸内細菌叢を変化させる食事成

分の探索が必要と考えられる。

一方脂肪性肝疾患モデルである *Fxr* 欠損マウスに魚油添加食を摂取させることで、肝内の DHA 等の増加と、肝臓のトリグリセリド、遊離脂肪酸、総コレステロールレベルの減少と脂肪滴の減少が認められ、脂肪肝の改善が認められた。このとき脂肪酸合成酵素である *Fas* や *Scd1* のタンパクレベルの減少も認められ、肝臓のトリグリセリド合成が減少していることが示唆された。魚油成分は肝臓や血中の脂質レベルを低下させることが知られていたが、この作用は FXR の欠損下でも認められたことから、少なくとも FXR に依存しない機序によって魚油の脂質低下作用が起こることが示唆された。

今後魚油を摂取させた *Fxr* 欠損マウスの肝臓や消化管腔内の胆汁酸組成の変動や胆汁酸代謝系を解析することで、胆汁酸組成変動と脂肪肝改善の間の関連等を明らかにしていく必要があると考えている。

要 約

初代培養肝細胞に T β MCA と TCA を処理して FXR 標的遺伝子発現を解析したところ、TCA 単独処理で FXR 標的遺伝子 (*Shp* と *Ost β*) の発現が増加したが T β MCA

の併用はその増加を抑制させた。また T β MCA 単独処理は FXR 標的遺伝子発現を低下させた。このことより T β MCA は FXR のアンタゴニストとして作用することが示唆された。一方脂肪性肝疾患モデルである *Fxr* 欠損マウスに魚油添加食を摂取させると肝臓の脂肪肝が軽減し、肝臓の脂質レベルも低下した。このことより魚油成分の脂質低下作用は FXR に依存しない機序により起こることが示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人三島海雲記念財団による研究助成を賜りましたことを深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) F. Li, et al.: *Nat. Commun.*, **4**, 2384, 2013.
- 2) H. Kuribayashi, et al.: *Eur. J. Pharmacol.*, **697**, 132–138, 2012.
- 3) M. Miyata, et al.: *Eur. J. Pharmacol.*, **714**, 507–514, 2013.
- 4) C. J. Sinal, et al.: *Cell*, **102**, 731–744, 2000.
- 5) M. Miyata, et al.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **331**, 1079–1085, 2009.
- 6) M. Miyata, et al.: *Fish Sci.*, **82**, 529–536, 2016.