

# 腸内細菌由来の腸肝シグナル応答による胆汁酸ホメオスタシスの制御機序の解明

宮田 昌明  
東北大学大学院薬学研究科 助教

## 緒 言

腸内細菌は宿主の生理機能の一部を担い、宿主の臓器の一つと考えられている。腸内細菌叢の変化は宿主のエネルギー代謝を変動させるという近年の多くの報告より腸内細菌は宿主の脂質や糖代謝調節に関与していると考えられるようになったが、これらの関連についての直接的な分子レベルの知見は少ない。

胆汁酸はコレステロールから生合成され、消化管において脂質や脂溶性ビタミンなどの吸収に関与するだけでなく、核内受容体や膜受容体を介するシグナル伝達物質として脂質や糖代謝の調節にも関与するとされている。この胆汁酸の生体内ホメオスタシスは胆汁酸の核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) シグナルにより厳密に調節されていると考えられてきた<sup>1)</sup>。

最近申請者らはマウスに抗菌薬を投与して腸内細菌による胆汁酸の代謝変換を阻害すると、胆汁酸ホメオスタシスが変化し、胆汁酸プールサイズが増加する事を見いだした。この時、消化管の FXR 標的遺伝子の fibroblast growth factor (FGF) 15/19 の発現が減少し、これにより肝臓の胆汁酸合成の律速酵素 CYP7A1 発現、活性が増加すること<sup>2)</sup>、消化管の胆汁酸吸収トランスポーター apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) 発現と吸収活性が増加することを明らかにした<sup>3)</sup>。FGF15/19 はエンドクリン作用を持つペプチドで肝臓に作用し、胆汁酸合成や糖新生を抑制し、グリコーゲン合成を亢進するなどの作用が報告されている<sup>4)</sup>。そこで本研究では腸内細菌の胆汁酸代謝変換に依存する消化管と肝臓をつなぐシグナルである回腸 FXR/FGF15/19 シグナル等の調節機序、消化管胆汁酸吸収トランスポーター (ASBT) の発現調節機序を明らかにする事により腸内細菌由来の腸肝シグナルによる胆汁酸ホメオスタシスの調節機序を解明することを目的とした。

## 実験方法

### 1. 動物への薬物処理

雄性 C57BL/6N マウスあるいは *Fxr* 欠損マウス (米国立衛生研究所、Dr. Frank J. Gonzalez より供与) を用いた。FXR 標的遺伝子発現解析の実験では C57BL/6N マウスあるいは *Fxr* 欠損マウスにアンピシリン (100 mg/kg) を 3 日間経口投与した。またアンピシリンと胆汁酸との併用実験ではアンピシリン最終投与時に胆汁酸 (100 mg/kg あるいは 500 mg/kg) をアンピシリンと併用し、3 時間後に解剖した。胆汁酸単独投与実験では胆汁酸 (500 mg/kg) を 1 度投与後 3 時間で解剖した。Asbt タンパク発現の解析実験では C57BL/6N マウスにアンピシリン (100 mg/kg) を投与後、3、12、24 時間で解剖した。アンピシリンと胆汁酸併用実験ではアンピシリン投与後 12 時間で胆汁酸 (500 mg/kg) を投与し 3 時間後に解剖した。

### 2. 胆汁酸組成解析

HPLC を用いて組成解析を実施した。分離カラムは L-column ODS 2.1×150 mm (5 μm) (財団法人 化学物質評価研究機構) を、反応カラムは Enzymepak 3α-HSD column 4.0×20 mm (日本分光) を用いた。胆汁酸は 3α-hydroxysteroid dehydrogenase (3α-HSD) による反応で生成する β-NADH を励起波長 (365 nm)、蛍光波長 (470 nm) で FP-920S 蛍光検出器 (日本分光) により検出した<sup>5)</sup>。

### 3. 遺伝子発現レベルの解析

回腸より定法に従い RNA を単離し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて cDNA 合成した。Real-time PCR は Power SYBR® Green PCR mix (Applied Biosystems) を用い ABI PRISM®7000 で実施した。

## Asbt発現解析

Kessler らの方法を用い回腸の刷子縁膜を調製した<sup>6)</sup>。Anti-Asbt 抗体は Dr. Paul A. Dawson (Wake Forest University) より供与された。Anti- $\beta$ -actin 抗体 (AC-15) は Sigma-Aldrich Inc. より購入した。イムノブロットの検出は Luminata Crescendo Western HRP substrate (Millipore Corporation) および Image Capture G3 (Liponics Inc.) を用いて化学発光により検出した。

## 結 果

### 1. アンピシリン投与による消化管FXR標的遺伝子の発現変動

雄性 C57BL/6N マウスに3日間アンピシリンを投与すると肝臓内胆汁酸合成の増加に伴って消化管管腔内の総胆汁酸レベルは増加するが、腸内細菌の減少に伴う胆汁酸代謝変換の低下により腸内細菌による代謝変換により生成される胆汁酸（腸内細菌代謝型胆汁酸）のコール酸 (CA), タウロデオキシコール酸 (TDCA) は検出限界 ( $1\mu\text{mol}$ ) 以下まで低下した。このとき回腸の FXR 標的遺伝子発現を解析すると *Fgf15*, *Shp*, *Ibabp*, *Osta* ともに有意な減少が認められた (図1)。これらの結果より抗菌薬投与による腸内細菌減少に起因する胆汁酸の質的変動が回腸の FXR シグナルを軽減させた可能性が

考えられた。

### 2. 胆汁酸併用投与による消化管FXR標的遺伝子の発現変動

上記の可能性を検証するためにアンピシリンと種々の胆汁酸の併用投与実験を実施した。腸内細菌代謝型胆汁酸の、CA と TDCA で FXR 標的遺伝子の *Fgf15*, *Shp* mRNA レベルの有意な増加が認められたがタウロコール酸 (TCA) では認められなかった。アンピシリン投与で消化管管腔内の TCA は増加し、腸内細菌による脱アミノ酸抱合により生成する CA は減少することから、これらの2種類の胆汁酸に注目して単独投与とアンピシリンとの併用投与実験により胆汁酸組成と FXR 標的遺伝子発現変動をさらに詳細に解析した。単独投与では CA, TCA 投与で共に消化管管腔内の CA レベルの有意な増加が認められたが、アンピシリンとの併用投与では消化管管腔内の胆汁酸変換が低下しているため CA レベルは CA 併用群でのみ増加が認められた (表1)。回腸での吸収の影響を考慮して門脈中の胆汁酸組成も測定したが、消化管管腔内と同様な結果が認められた。

CA あるいは TCA 単独投与とアンピシリンとの併用投与時の FXR 標的遺伝子の発現を測定すると、単独投与では CA, TCA ともに FXR 標的遺伝子の発現増加が

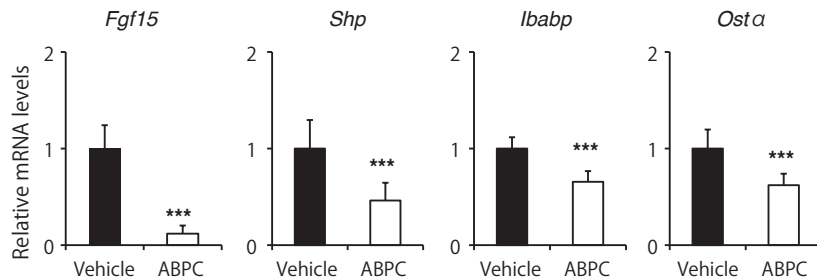


図1 回腸 FXR 標的遺伝子の発現に対するアンピシリン (ABPC) 処置の影響  
溶媒対象群に対する有意差を示す (\*\*\*,  $p < 0.001$ )

表1 胆汁酸の単独あるいはアンピシリン併用投与時の消化管管腔内と門脈中の胆汁酸レベル

| Bile acid                            | Treatment group |                       |                       |                 |                      |                      |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|----------------------|----------------------|
|                                      | ABPC/Vehicle    | ABPC/CA (500 mg/kg)   | ABPC/TCA (500 mg/kg)  | Vehicle         | CA (500 mg/kg)       | TCA (500 mg/kg)      |
| Intestinal lumen ( $\mu\text{mol}$ ) |                 |                       |                       |                 |                      |                      |
| CA                                   | < 0.01          | $1.47 \pm 0.43$       | < 0.01                | $0.10 \pm 0.07$ | $0.90 \pm 0.43^{**}$ | $1.03 \pm 0.74^*$    |
| TCA                                  | $7.33 \pm 0.77$ | $12.29 \pm 1.45^{**}$ | $12.94 \pm 0.92^{**}$ | $3.65 \pm 0.81$ | $8.29 \pm 2.36^{**}$ | $8.77 \pm 2.05^{**}$ |
| Portal vein ( $\mu\text{mol/L}$ )    |                 |                       |                       |                 |                      |                      |
| CA                                   | < 1             | $60 \pm 21$           | < 1                   | $3 \pm 3$       | $63 \pm 14^{**}$     | $54 \pm 52^*$        |
| TCA                                  | $261 \pm 144$   | $369 \pm 156$         | $445 \pm 109^*$       | $228 \pm 174$   | $232 \pm 183$        | $230 \pm 186$        |

アンピシリン群あるいは溶媒対象群に対する有意差を示す (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ).

認められ、併用投与では CA 濃度の上昇した CA 併用投与でのみ発現増加が認められた (図 2A, 2B)。これらの結果は、消化管管腔内の CA レベルの増加が FXR 標的遺伝子の発現増加を誘起することを示している。一方で TCA の FXR 標的遺伝子発現誘導に対する寄与は低いことを示唆している。一方 *Fxr* 欠損マウスでは CA とアンピシリン併用で FXR 標的遺伝子の有意な増加は認められなかった。

### 3. 抗菌薬投与初期の *Asbt* 発現変動

3 日間の抗菌薬投与により回腸刷子縁膜の *Asbt* タンパクレベル、回腸 mRNA レベルが増加し、糞中胆汁酸排泄が減少し、門脈血中胆汁酸濃度が増加することから回腸胆汁酸吸収能が増加する事を明らかにしている<sup>3)</sup>。本研究ではさらに胆汁酸による急性の *Asbt* 発現調節機

序について解析するため、抗菌薬投与初期 (3, 12, 24 時間後) の消化管管腔内の胆汁酸組成と *Asbt* 発現レベルを解析した。消化管管腔内の胆汁酸組成は投与後 12 時間で有意な変動が認められ、上記のアンピシリン投与 3 日と同様な CA, TDCA の有意な減少、TCA の有意な増加が認められた (表 2)。一方回腸 *Asbt* の mRNA レベルはアンピシリン投与 24 時間以内では変動は認められなかったが、回腸刷子縁膜の *Asbt* タンパクレベルは胆汁酸組成の変動と一致して 12 時間以降で有意に増加した (図 3)。この結果より *Asbt* は胆汁酸シグナルによりタンパクレベルでの発現調節を受けることが示唆された。

### 4. 胆汁酸併用投与による消化管 *Asbt* タンパク発現変動

胆汁酸による *Asbt* のタンパクレベルでの発現調節機

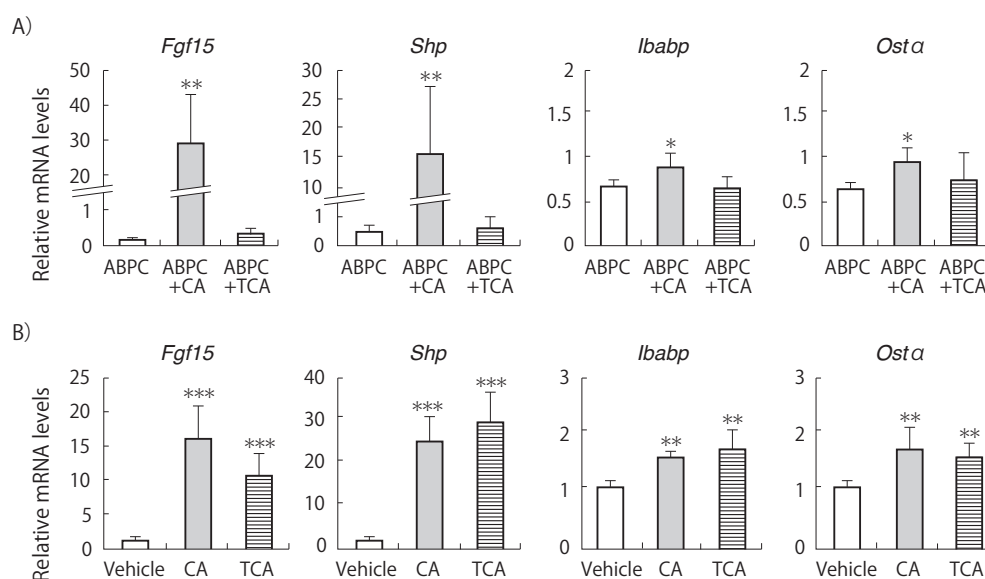


図 2 回腸 FXR 標的遺伝子の発現に対する胆汁酸処置の影響

- A) 胆汁酸とアンピシリンとの併用投与。  
B) 胆汁酸単独投与。アンピシリン群あるいは溶媒対象群に対する有意差を示す (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )。

表 2 アンピシリン投与後の経時的な消化管管腔内胆汁酸の組成変動

| Bile acid | 3 hr        |             | 12 hr       |              | 24 hr       |                 |
|-----------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-----------------|
|           | Vehicle     | ABPC        | Vehicle     | ABPC         | Vehicle     | ABPC            |
|           | (μmol)      |             |             |              |             |                 |
| CA        | 0.07 ± 0.06 | 0.07 ± 0.06 | 0.05 ± 0.03 | < 0.01       | 0.04 ± 0.02 | < 0.01          |
| TCA       | 5.63 ± 0.94 | 5.18 ± 0.61 | 5.48 ± 0.47 | 6.22 ± 0.38* | 5.62 ± 0.32 | 8.01 ± 0.84***  |
| TDCA      | 0.13 ± 0.03 | 0.12 ± 0.07 | 0.10 ± 0.03 | < 0.01       | 0.14 ± 0.04 | < 0.01          |
| Others    | 2.58 ± 0.34 | 2.32 ± 0.25 | 2.44 ± 0.23 | 2.96 ± 0.33* | 2.45 ± 0.66 | 4.07 ± 0.61**   |
| Total     | 8.41 ± 1.11 | 7.68 ± 0.77 | 8.08 ± 0.63 | 9.18 ± 0.56* | 8.25 ± 0.93 | 12.08 ± 1.34*** |

溶媒対象群に対する有意差を示す (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )。

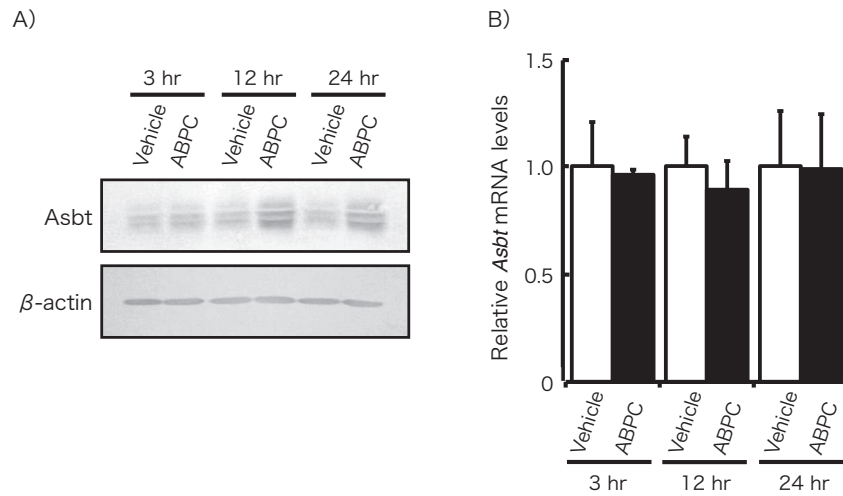


図3 アンピシリン投与後の経時的な回腸 Asbt 発現変動

A) 回腸刷子縁膜の Asbt タンパクレベル、B) 回腸 Asbt mRNA レベル。

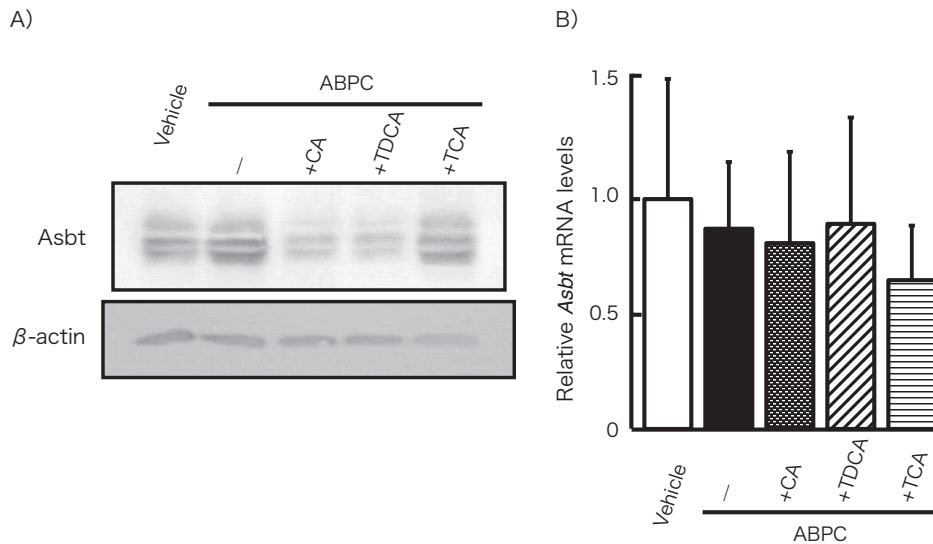


図4 回腸 Asbt 発現における胆汁酸分子種特異的な影響

A) 回腸刷子縁膜の Asbt タンパクレベル、B) 回腸 Asbt mRNA レベル。

序を明らかにするためアンピシリンと胆汁酸の併用投与実験を実施した。アンピシリン投与後12時間で腸内細菌代謝型胆汁酸のCAあるいはTDCA、それ以外のTCAを投与し、その3時間後の回腸刷子縁膜Asbtタンパク発現を解析した。アンピシリン投与で増加したAsbtタンパクレベルはCAあるいはTDCA併用で、顕著に減少したが、TCA併用では顕著な減少は認められなかった(図4)。これらの結果は腸内細菌代謝型胆汁酸により回腸刷子縁膜のAsbtタンパクの発現が抑制的に調節されていることを示唆する。

### 考 察

胆汁酸のホメオスタシスは主に肝臓での胆汁酸合成と消化管からの吸収の過程で制御されていると考えられる。本研究により腸内細菌代謝型胆汁酸(CAやTDCA)によりFgf15等の回腸FXR標的遺伝子のmRNAレベルの発現が促進的に、さらに回腸胆汁酸吸収トランスポーターAsbtタンパク発現が抑制的に調節されていることが明らかになった。

FGF15/19は肝臓の胆汁酸合成の律速酵素のCYP7A1を抑制的に調節することより<sup>7)</sup>、上記の結果は腸内細菌が胆汁酸代謝変換を介して肝臓の胆汁酸合成(CYP7A1

発現)を抑制的に調節することを意味する。さらに腸内細菌が胆汁酸代謝変換を介して回腸の胆汁酸吸収トランスポーター (Asbt) タンパクの発現を抑制的に調節し、胆汁酸吸収を抑えていることを意味する。腸内細菌は胆汁酸代謝変換を介して、少なくともこれら2種類の機序により胆汁酸プールサイズを負に調節することで、胆汁酸ホメオスタシスの維持に関与していると考えられる。

これまで腸内細菌による胆汁酸変換は7 $\alpha$ -脱水酸化による2次胆汁酸生成の意義が注目されていたが、本研究ではTCAからCA等への脱アミノ酸抱合により消化管のFXRシグナルが活性化されたり、Asbtタンパク発現が調節されていることが明らかになり、胆汁酸脱アミノ酸抱合の生理的意義の一端が解明された。腸内細菌代謝型胆汁酸のCAやTDCAがどのような機序により特異的にFXRシグナルを活性化するのか、ASBTタンパクレベルを調節するのが今後の課題である。

## 要 約

腸内細菌による代謝変換で生成された腸内細菌代謝型胆汁酸 (CA や TDCA) はマウス消化管のFXRシグナルを活性化させ、その標的遺伝子である回腸 Fgf15 の発現を上昇させる。その Fgf15 は肝臓に作用し、胆汁酸合成を抑制させると考えられる。さらに腸内細菌代謝型胆

汁酸は回腸刷子縁膜上の胆汁酸吸収トランスポーターのAsbtタンパクレベルを急性にかつ抑制的に調節することで消化管の胆汁酸吸収をコントロールしている。腸内細菌は上記の機構を介して宿主の胆汁酸プールが過剰にならないよう負に制御してい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) P.Lefebvre, et al.; *Physiol Rev* 89, 147-191, 2009.
- 2) M.Miyata, et al.; *J Pharmacol Exp Ther* 331, 1079-1085, 2009.
- 3) M.Miyata, et al.; *J Pharmacol Exp Ther* 336, 188-196, 2011.
- 4) S. A. Jones : *Adv Exp Med Biol* 728, 171-182, 2012.
- 5) H.Kitada, et al.; *J Biol Chem* 278, 17838-17844, 2003.
- 6) M.Kessler, et al.; *Biochim Biophys Acta* 506, 136-154, 1978.
- 7) T.Inagaki, et al.; *Cell Metab* 2, 217-225, 2005.