

令和元年9月6日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00904

研究課題名(和文) 消化管の胆汁酸制御を標的とする水産由来の食生活設計による脂肪性肝疾患の予防研究

研究課題名(英文) The protection of fatty liver disease by fish-derived dietary habit targeted to intestinal bile acid control

研究代表者

宮田 昌明 (Miyata, Masaaki)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産大学校・教授

研究者番号：90239418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪性肝疾患モデルのfarnesoid X receptor(FXR)欠損マウスに2%魚油含有食を4週間摂取させると非含有食に比べ肝臓と血清中の脂質レベルが低下し、肝障害の軽減が認められた。しかし、消化管管腔内の胆汁酸の質的、量的な変化は認められなかった。Taurine 0.5%含有水をFxr欠損マウスに4週間摂取させると肝臓、血中のトリグリセリドの減少と肝障害の軽減が認められた。Taurine 0.5%含有水10日間摂取により野生型マウスでは、消化管管腔内と門脈中で胆汁酸組成の変化が認められ、回腸のFXR標的遺伝子のFgf15やShpのmRNAレベルの減少が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水産由来食品に多く含まれる魚油成分やタウリンの摂取が脂肪性肝疾患モデルマウスの病態を改善する事が示された。特にタウリンの処置においては、消化管管腔内の胆汁酸組成が変化し、胆汁酸量も増加することが示され、同時に消化管の胆汁酸受容体であるFXRシグナルを軽減する可能性が示された。これらの事実は消化管の胆汁酸組成を変化させることにより消化管FXRシグナルを調節することで、脂肪性肝疾患の予防や改善が出来る可能性を示している。胆汁酸組成変化を誘起出来る食品成分に脂肪性肝疾患の予防や改善作用がある可能性が考えられ、本研究は脂肪性肝疾患の予防や改善作用のある食品成分の探索のために重要な知見を提供した。

研究成果の概要(英文)：Farnesoid X receptor (Fxr)-null mice were used as a model of fatty liver disease because they exhibit higher levels of hepatic lipids and hepatic damage-associated diagnostic markers. The feeding of 2% fish oil diet for four weeks decreased hepatic and serum lipid levels and hepatic damage-associated diagnostic marker levels in Fxr-null mice, compared to those of control diet. However, no significant differences in bile acid composition and content in intestinal lumen were observed between control and fish oil group. The drinking of 0.5% taurine containing water for 4 weeks significantly decreased hepatic and serum lipid levels and hepatic damage-associated diagnostic marker levels in Fxr-null mice, compared to those of control group. Significant changes in bile acid composition and content in intestinal lumen of wild-type mice were found between 0.5% taurine and control group. mRNA levels of FXR target gene (Fgf15 and Shp) were significantly decreased in 0.5% taurine group.

研究分野：食品機能学

キーワード：胆汁酸 消化管 タウリン 魚油 脂肪性肝疾患 FXR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。他の生活習慣病と関連が高く、病状が進行すると肝臓になり、悪化すると肝移植以外に根本的な治療法がない。食生活の欧米化がこの疾患を急速に増大させていると考えられ、食生活の改善による予防の必要性が非常に高まっている。特に魚や海藻などの海産物は健康機能性に優れ、これらを多く取り入れた日本食は脂肪性肝疾患の予防効果が高いとされている。魚や海藻などの海洋性生物には陸上生物とは異なった成分が多く含まれており、未だ未知の成分を含む水産機能性成分を有効利用した新規な食事設計により脂肪性肝疾患を予防できると考えられる。

胆汁酸は消化管に排出された後、腸内細菌により脱抱合や脱水酸化され、複数種の分子種で消化管内に存在する。消化管の胆汁酸は脂質や脂溶性ビタミンの吸収に関与するだけでなく、シグナル伝達物質として、消化管の核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) や膜受容体 TGR5 を介して様々な脂質・糖代謝シグナルを腸から肝などへ伝達するとされる。近年この消化管胆汁酸を介する腸肝シグナルの肝機能に及ぼす影響の重要性が指摘され肝疾患との関連が指摘されている (Nat Commun, 4,2384 (2013); J Clin Invest, 125,386-401 (2015))。また抗菌薬などを用いた最近の研究は胆汁酸が分子種特異的に核内受容体や膜受容体のアゴニストだけではなくアンタゴニストにもなるため、消化管の胆汁酸の質的变化がこれら受容体シグナルを大きく変化させるとされる (Cell Metab, 17, 225-235 (2013))。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恒常的に調節出来れば消化管の胆汁酸量や組成の制御を介して脂肪性肝疾患の予防が実現出来ると考えられる。これらのことから、海産物由来食事成分による腸内細菌叢の変動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、脂肪性肝疾患の予防につながれると着想した。

2. 研究の目的

代表的な生活習慣病である脂肪性肝疾患を食生活により予防することの必要性を考え、本研究では機能性成分を豊富に含む魚や海藻などの海産物由来成分を標的とし、以下の仮説を基礎として疾患予防のための食事設計と予防機序を提案する。消化管胆汁酸は脂質や糖代謝の調節に関与する腸肝シグナルの伝達物質とされ、その質的量的変化は腸肝シグナルを介して肝脂質代謝を含む肝機能を変動させるとされる。よって水産機能性成分を含む食事により消化管胆汁酸組成を調節することで脂肪性肝疾患を予防出来ると仮説を立てた。本研究の目的は薬理学的手法により同定したバイオマーカーを利用して、水産物由来成分を有効利用した食事設計による脂肪性肝疾患の予防のための基礎的知見を得ることである。具体的には以下の3点を明らかにする。

1. 脂肪性肝疾患モデル (脂肪肝と肝炎) と脂肪性肝疾患を防御出来るモデルを用い、脂肪性肝疾患とその予防のための鍵となるバイオマーカー (腸内細菌や胆汁酸の種類) を同定する。
2. 魚油、海藻さらにそれらの中の機能性成分によるバイオマーカー変動を解析し、脂肪性肝疾患の予防効果が期待される成分を選別する。
3. 選別された食品や機能性成分の脂肪性肝疾患予防に対する有効性を評価して、疾患予防出来る食事設計と消化管胆汁酸に依存した脂肪性肝疾患の予防機序を実証する。

3. 研究の方法

(1) 動物への処置

① 12~16週齢の雌性の farnesoid X receptor (FXR) 欠損マウス及び野生型マウス (C57BL/6N) に 2% 魚油含有精製飼料 (4% 魚油精製飼料と 4% コーン油精製飼料を 1対1 で混合) あるいは、4% コーン油含有精製飼料を 4 週間にわたり摂取させた。4% 魚油含有精製飼料は、マルハニチロ株式会社より供与された DHA-22K (DHA 26.3%, 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 AIN-93M ベースで調製されたものを用いた。4% コーン油含有精製飼料は、オリエンタル酵母工業株式会社にて AIN-93M ベースで調製されたものを用いた。

② 8 週齢の雌性 Fxr 欠損マウスと野生型マウスの 0% タウリン (コントロール) 群には、タウリンを含まない水道水を、0.5% タウリン (0.5%) 群には 0.5% タウリンを含む水を、2% タウリン (2%) 群には 2% タウリンを含む水を 4 週間にわたり与えた。

③ 8 週齢の雄性 Fxr 欠損マウスと野生型マウスの 0% タウリン (コントロール) 群には、タウリンを含まない水道水を、2% タウリン (2%) 群には 2% タウリンを含む水を 10 日間にわたり与えた。

(2) 胆汁酸組成解析

胆汁酸組成解析は HPLC により実施した。L-column ODS 2.1×150 mm (5 μm) (財団法人 化学物質評価研究機構)を分離カラムとして用いアセトニトリル/リン酸緩衝液のグラジエントにより溶出させた。胆汁酸検出のために Enzymepak 3a-HSD (hydroxysteroid dehydrogenase) column 4.0×20 mm (日本分光)を用い、胆汁酸により生成する NADH を蛍光検出器(Ex 365 nm、Em 470 nm)で検出した。

(3) タウリン濃度の測定

肝臓サンプルに肝重量の 5 倍量 (v/w) の 6% トリクロロ酢酸溶液を加え、ホモジナイズした。得られたホモジネートを 15,000×rpm, 4°C で 5 分間遠心分離し上清を別の容器に移し替えた。沈殿に対して 0.5 ml の 6% トリクロロ酢酸溶液を加えホモジナイズした。得られたホモジネートを 9,000×g, 4°C で 5 分間遠心分離し、その上清を先ほどの上清と混ぜ合わせた。混ぜ合わせた上清に対して 2 ml のジエチルエーテルを加えて 3 回抽出し、下層をアミノ酸抽出液として用いた。アミノ酸抽出液 500 μl に 10% 塩酸 5 μl を加えて酸性とし、o-phthalaldehyde recryst の 4 mg/ml メタノール溶液 200 μl を加えて攪拌した。そこに 2-mercaptoethanol 5 μl と炭酸緩衝液 (pH9.0) 300 μl を加えて 1 分間常温に放置し 15,000×rpm, 4°C で 5 分間遠心分離し、得られた上清を HPLC にて解析した。

4. 研究成果

(1) 魚油成分添加

雌性 *Fxr* 欠損マウスと野生型マウスに魚油 2%(魚油群)あるいは 0%(コントロール群)添加食を 4 週間摂取させると、魚油群の *Fxr* 欠損マウスはコントロール群と比べ肝肥大の指標である肝体重比が有意に低値を示し、野生型マウスのレベルまで低下した。野生型マウスでは両群間で差異は認められなかった。また、肝障害マーカーである ALT, ALP レベル及び肝内総胆汁酸レベルが魚油群の *Fxr* 欠損マウスで低値を示し、そのレベルは野生型マウスと同レベルまで低下した。野生型マウスでは両群間で差異は認められなかった。魚油群の *Fxr* 欠損マウス及び野生型マウスの肝内脂肪酸中の n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) 比率はコントロール群と比較して有意に高値を示し、そのレベルは同程度だった。魚油群の *Fxr* 欠損マウスの肝内及び血中のトリグリセリド(TG), 総コレステロール (TC) レベルはコントロール群と比較して有意に低値を示し、そのレベルは野生型マウスと同レベルまで低下した。野生型マウスは、肝内の TG レベルを除いて有意な変動は、認められなかった。両マウスの魚油群で脂肪酸合成関連酵素のタンパク及び mRNA レベルが低値を示した。以上の結果より、魚油は肝臓の脂質代謝を改善するだけでなく、肝機能障害を軽減し、脂肪性肝疾患を改善することが示唆された。

Fxr 欠損マウスの魚油群では肝臓の脂質代謝を改善するだけでなく、肝機能障害を軽減したが、*Fxr* 欠損マウスの消化管腔内の胆汁酸組成と胆汁酸量については魚油添加群と無添加群で有意な差異は認められず、消化管胆汁酸組成と魚油による脂肪性肝疾患の改善との間の関連は認められなかった。

(2) タウリン長期処理

雌性 *Fxr* 欠損マウスと野生型マウスに 4 週間の間 0% (コントロール群)、0.5%(0.5%T 群)と 2% taurine (2%T 群)含有水を摂取させた。*Fxr* 欠損マウスにおいて、コントロール群に対して 0.5%T 群では肝障害マーカーである ALT、ALP 活性、肝内総胆汁酸量が有意に減少したが 2%T 群ではその減少の程度が小さかった。血清中では両群(0.5%T 群と 2%T 群)とも TG レベルが有意に減少したが、TC、遊離脂肪酸(NEFA)レベルは変動しなかった。肝内では両群ともに TG、NEFA レベルが有意に減少したが、TC レベルは変動しなかった。タウリンレベルについて、肝臓で 0.5%T 群、2%T 群ともに有意に増加し、血清中では 2%T 群が有意に増加した。また、コントロール群に対し、0.5%T 群、2%T 群で脂肪代謝関連遺伝子の *Scd1*, *Cpt1a*, *Acc1*, *Acc2* の mRNA レベルが減少傾向を示した。野生型マウスにおいてコントロール群に対し、0.5%T 群の ALP 活性は有意に減少したが、それ以外の肝

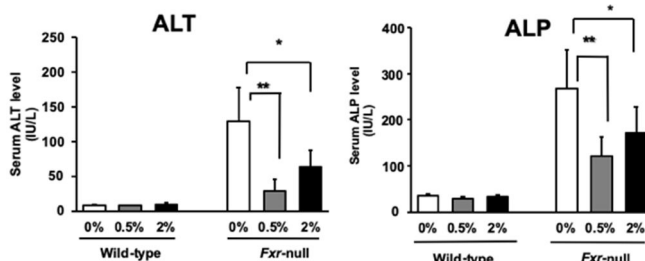


図1 *Fxr*欠損マウスと野生型マウスへのタウリン処置の肝障害マーカーへの影響

障害マーカー、肝内と血清中の脂質レベルは変動しなかった。以上より、タウリンは脂質代謝異常モデルの *Fxr* 欠損マウスの肝機能と脂質代謝を改善したが、高濃度ではその効果が減弱することが示唆された。

(3) タウリン短期処理

タウリンによる短期の生体への影響を明らかにするため雄性 *Fxr* 欠損マウスと野生型マウスに 10 日間 0% (コントロール群) と 2% taurine (2% T 群) 含有水を摂取させた。野生型マウスの 2% T 群において、肝臓および門脈血中における総胆汁酸レベルの有意な増加が認められた。胆汁酸組成については肝臓および門脈血中ともに tauro- β -muricholic acid と taurocholic acid の両者の増加が認められた。一方 *Fxr* 欠損マウスにおいては、肝臓、門脈血中ともに総胆汁酸レベルに有意な変化は認められなかった。また、胆汁酸組成はいずれの群においても有意な差異は認められなかった。遺伝子発現量において、野生型マウスの 2% T 群で肝臓での胆汁酸合成の律速酵素である *Cyp7a1* と小腸での胆汁酸吸収トランスポーターである *Asbt* の mRNA レベルが有意に増加し、小腸の FXR 標的遺伝子である *Fgf15* と *Shp* mRNA レベルの優位な減少が認められたが、*Fxr* 欠損マウスではいずれの変動も認められなかった。以上の結果より、タウリンは FXR の存在下で肝臓と消化管の胆汁酸動態を変化させ、胆汁酸プールサイズを増加させることが示唆された。また肝臓の胆汁酸合成の律速酵素遺伝子である *Cyp7a1* 発現の増加は胆汁酸プールサイズの増加を支持する結果である。一方消化管の FXR 標的遺伝子である *Fgf15* や *Shp* mRNA レベルの有意な減少はタウリンが消化管の FXR シグナルを減弱させることを示唆している。タウリンが消化管の FXR シグナルを減弱させる理由として門脈血中で認められた、FXR アンタゴニストの tauro- β -muricholic acid の増加が関係するかもしれない。今後の詳細な研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

M. Miyata, K. Shinno, T. Kinoshita, Y. Kinoshita and Y. Sugiura. Fish oil feeding reverses hepatomegaly and disrupted hepatic function due to the lack of FXR signaling. *J. Toxicol. Sci.*, 42 (6), 671-681 (2017) doi: 10.2131/jts.42.671 (査読有り)

〔学会発表〕(計 8 件)

宮田昌明、新野耕平、杉浦義正 魚油摂取による脂肪性肝疾患モデルである *Fxr* 欠損マウスの肝機能改善作用 平成 28 年度 日本水産学会秋季大会奈良 (近畿大学・農学部) 2016.9.10

K. Shinno, Y. Sugiura and M. Miyata, Fish oil treatment improves hepatic function in *Fxr*-null mice 2017 Joint International Symposium between PNU and NFU Shimonoseki 2016.10.29

船木萌浩、杉浦義正、宮田昌明 タウリンによる肝機能改善作用の解析-リトコール酸誘発性肝障害の防御- 日本農芸化学会中四国支部 第 48 回講演会 徳島大学 2017.6.17

A. Funaki, C. Fukuhara, Y. Sumiya, Y. Sugiura and M. Miyata, Influence of high-dose taurine treatment in fatty liver disease models Symposium between National Fisheries University and Pukyong National University. National Fisheries University 2017.11.1

船木萌浩、住屋佑希乃、福原千晶、杉浦義正、宮田昌明 タウリン摂取によるマウス *Cyp7a1* 遺伝子の発現上昇機序 本農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会 広島大学 2018.1.27

宮田昌明、船木萌浩、福原千晶、住屋佑希乃、杉浦義正 脂肪性肝疾患モデルへのタウリン摂取の影響 日本農芸化学会 2018 年度大会 名城大学 2018.3.16

宮田昌明、船木萌浩、住屋由紀乃、福原千晶、杉浦義正、タウリンによるマウス FXR シグナルと胆汁酸代謝動態の調節 第 45 回日本毒性学会学術年会 大阪国際会議場

2018.7.20

宮田昌明, 船木萌浩、江口昌志、住屋由紀乃, 杉浦義正 タウリン摂取によるマウス FXR
シグナルと胆汁酸動態の変動 日本農芸化学会 2019 年度大会 東京農業大学 2019.3.24

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fish-u.ac.jp/food/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。