

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14917

研究課題名(和文)胆汁酸負荷により体内で増加する化合物の同定と生活習慣病発症における関与

研究課題名(英文) Identification of molecules that increase in response to bile acid supplementation and involvement of those in life style-related diseases

研究代表者

石塚 敏 (Ishizuka, Satoshi)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00271627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：加齢に伴う摂取エネルギーの過多で肝臓から消化管内への胆汁酸分泌が増加する。ラットを用いてこの時に増加するコール酸を飼料に添加することで同様な状態を作成したところ、多様な症状が誘導されることを見出した。この時に、各組織や血液中には多様な胆汁酸分子種が観察される。そこで、体内での胆汁酸の代謝を解析するとともに、どのような分子種が当該症状の形成に関わるかを検証した。その結果、腸肝循環で増加したコール酸が主にデオキシコール酸あるいはタウロデオキシコール酸という形態を介し、ステロール代謝の制御を経て脂質蓄積に関わる経路が見出された。

研究成果の概要(英文)：Excess energy intake during aging enhances bile acid secretion from liver to intestinal lumen. Several symptoms are developed by the diet supplemented with cholic acid to mimic that condition accompanied by alteration of bile acid metabolism in organs and blood. We investigated bile acid metabolism to find responsible molecular species of bile acid for development of the symptoms observed in the cholic acid supplementation. Consequently, the cholic acid supplementation is involved in lipid accumulation via modulation of sterol metabolism by increase mainly in deoxycholic acid and taurocholic acid.

研究分野：食品栄養学

キーワード：胆汁酸

1. 研究開始当初の背景

高脂肪食の摂取により胆汁酸分泌が増大し、肝臓で合成される一次胆汁酸は加齢によりコール酸に偏る。加齢に伴う高脂肪食摂取で増加する状態をコール酸添加食で模倣してラットに与えると、炎症や繊維化をともなわない肝臓での脂質蓄積などの症状を惹起することを見出した。LC-MS を用いて、各組織や血液中には多様な胆汁酸分子種が観察される。これらのことから、胆汁酸や関連化合物と当該病態の発症との関連、生活習慣病発症におけるこれらの物質の関わりに興味をもたれる。

2. 研究の目的

加齢に伴う摂取エネルギー過多により分泌の増加がおこる胆汁酸はコール酸 (CA) である [Reddy et al. J Nutr, 1980; Uchida et al. Arch Gerontol Geriatr, 1990]。そこで、この状態を模倣するために CA 添加食を作成した。問題はその添加量である。CA は腸内細菌により、7 位の脱水酸化を経て二次胆汁酸であるデオキシコール酸 (DCA) に変換される。高脂肪食摂取や加齢した状態でも、一般に CA から DCA への変換は滞りなく進行する。飼料に添加する CA 濃度を段階的に変えた実験を行い、この条件を満たす条件の飼料をラットに与えると、炎症や繊維化をともなわない非肥満型の単純性脂肪肝などの症状を引き起こすことを見出した [Islam et al. Gastroenterology, 2011; 一部投稿中]。この時の胆汁酸代謝に関わる化合物を同定し、上記 CA 誘導性病態発症におけるそれらの化合物の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実験には 3 週齢の WKAH/HkmSlc または Slc:Wistar 雄性ラット (日本エスエルシー株式会社) を用いた。本研究は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に基づいて実施した。ラットは 1 匹ずつステンレス製の網ケージに入れて飼育、12 時間の明暗周期 (明期 8:00-20:00) で、室温 22±1、湿度 55±5% の環境に維持した。飼育期間中は飼料・飲用水ともに自由摂取させた。AIN-93G に準じた基本飼料による馴化ののち、基本飼料群および CA 添加飼料群の 2 群に分け、13 週間の試験飼育を実施した。試験期間終了時には、解剖を行い、各種臓器重量を測定するとともに、WKAH/HkmSlc ラットの場合には各種臓器、消化管内容物および糞、門脈血漿の各種胆汁酸濃度を測定し、CA による症状との関連を検証した。

4. 研究成果

CA 添加飼料で 13 週間飼育した時の糞中胆汁酸組成を図 1 に示す。CA から腸内細菌の白湯により生成される DCA の濃度が 8 倍程度増えている一方、CA が一度吸収されたのちに肝臓で作られるタウロコール酸の有意な増加は

観察されなかった。したがって、この条件では CA 負荷による腸内細菌の脱結合や 7 水酸化、すなわち腸内細菌による胆汁酸代謝に滞りが無いこと示している。



図 1 CA 添加飼料を 13 週間摂取させた時の盲腸内容物の胆汁酸濃度・組成
数値は平均値、エラーバーは標準誤差を示す。
*群間の有意差を示す (P < 0.05, Student's t-test, n=10)

一方、この時の門脈血漿中の胆汁酸組成では CA および TCA が主要な胆汁酸分子種であった (図 2)

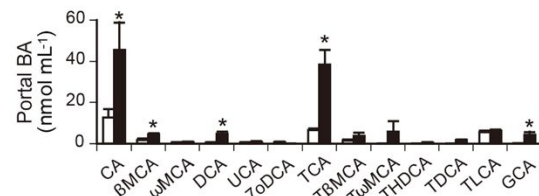


図 2 CA 添加飼料を 13 週間摂取させた時の門脈血漿の胆汁酸濃度・組成
数値は平均値、エラーバーは標準誤差を示す。
*群間の有意差を示す (P < 0.05, Student's t-test, n=10)

CA 摂取飼料で誘導される各種の症状とこれらの胆汁酸との間の関係について、主成分分析および重回帰分析を実施したところ、の関係を見いだすことができた (図 3)。すなわち、本研究における胆汁酸負荷条件では、腸肝循環で増加した CA が主に DCA あるいは TCA という形態を介し、酸化ステロールの制御を経て脂質蓄積に関わる経路である。

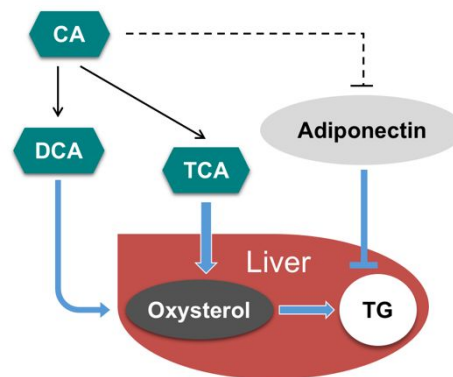


図 3 CA 誘導性症状と胆汁酸分子種の関係

当初は CA 負荷により未知の胆汁酸分子種の探索を目指したが、本研究の CA 負荷では微

量の代謝物が検出されたのみであったため、既知の分子種ではあるが様々な統計手技により CA 誘導性症状に関連する分子種とその経路を特定することに主眼を移し、既知の胆汁酸分子と関連するステロールの代謝を会する経路を提案することができた。

<引用文献>

Hagio M, Matsumoto M, Fukushima M, Hara H, Ishizuka S. 2009. Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents of rats using LC/ESI-MS. *J Lipid Res*, 50: 173-180.

Islam KBMS, Fukiya S, Hagio M, Fujii N, Ishizuka S, Ooka T, Ogura Y, Hayashi T, Yokota A. 2011. Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology*, 141: 1773-1781.

Reddy BS, Hanson D, Mangat S, Mathews L, Sbaschnig M, Sharma C, Simi B. 1980. Effect of high-fat, high-beef diet and of mode of cooking of beef in the diet on fecal bacterial enzymes and fecal bile acids and neutral sterols. *J Nutr*, 110: 1880-1887.

Uchida K, Chikai T, Takase H, Nomura Y, Seo S, Nakao H, Takeuchi N. 1990. Age-related changes of bile acid metabolism in rats. *Arch Gerontol Geriatr*, 10: 37-48.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Lee Y, Yoshitsugu R, Kikuchi K, Joe GH, Tsuji M, Nose T, Shimizu H, Hara H, Minamida K, Miwa K, Ishizuka S. Combination of soya pulp and *Bacillus coagulans* lilac-01 improves intestinal bile acid metabolism without impairing the effects of prebiotics in rats fed a cholic acid-supplemented diet. *Br J Nutr*, 査読有, 116, 603-610, 2016.

[学会発表](計26件)

1. 堀 将太、常木 生也、花井 健人、清水 英寿、原 博、石塚 敏: 貧血を伴わない鉄欠乏状態と高シヨ糖食摂取の組み合わせによる肝臓脂質蓄積 日本農芸化学会 2018 年度大会 名城大学天白キャンパス(愛知県・名古屋市)2018.3.15-18.
2. 橘田 真理、加茂 佳恵、趙 佳賢、原 博、石塚 敏: コール酸負荷によるラット回腸組織でのアディポネクチン集積 日

本農芸化学会 2018 年度大会 名城大学天白キャンパス(愛知県・名古屋市)2018.3.15-18.

3. 石塚 敏:胆汁酸代謝から未病に迫る 第358回細胞工学会研究会講演会 島根大学生物資源科学部(島根県・松江市)2017.12.16.
4. 堀 将太、常木 生也、花井 健人、李 娟美、清水 英寿、原 博、石塚 敏: 新規非アルコール性脂肪肝モデルでの肝脂質蓄積における鉄濃度減少の寄与 第24回未病システム学会学術総会 ワークピア横浜(神奈川県・横浜市)2017.11.4-5.
5. 石塚 敏:胆汁酸による脂肪肝の発症とその悪化 第4回愛媛大学食品健康科学研究セミナー 愛媛大学農学部(愛媛県・松山市)2017.9.22.
6. Lee DG, Takahashi Y, Shimoda T, Lee Y, Joe GH, Kamo Y, Hori S, Hanai T, Takeuchi A, Tanaka Y, Shimizu H, Kumura H, Ishizuka S. Ingestion of skim milk cheese modulates bile acid metabolism and cholic acid-induced disorders in rats. The International Conference of Korean Society of Food Science of Animal Resources and 49th Annual Meeting, Poster No.209, Cheonan (Korea), 2017. 5.18-19. (The Excellence Poster Presentation Award)
7. Hori S, Tanaka Y, Tsuneki I, Hanai T, Shimizu H, Hara H, Ishizuka S. Modulation of hepatic mineral concentrations in bile acid-induced fatty liver. *Experimental Biology 2017, Chicago (USA)*, 2017.4.22-26.
8. 堀 将太、常木 生也、花井 健人、清水 英寿、原 博、石塚 敏:胆汁酸誘導性の非肥満型脂肪肝における鉄濃度低下と脂質蓄積 第71回日本栄養・食糧学会大会 沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)2017.5.19-21。(学生優秀発表賞受賞)
9. 加茂 佳恵、花井 健人、堀 将太、多田 幸司、田中 愛健、古川 裕美子、溝上 拓哉、城内 文吾、佐藤 匡央、清水 英寿、原 博、石塚 敏:胆汁酸誘導性脂肪肝発症における血中アディポネクチンの関与 日本農芸化学会 2017 年度大会 京都女子大学(京都府・京都市)2017.3.17-20.
10. 高橋 勇太郎、李 東根、李 娟美、趙 佳賢、加茂 佳恵、多田 幸司、堀 将太、花井 健人、竹内 あかり、田中 愛健、清水 英寿、若松 純一、原 博、石塚 敏、玖村 朗人:胆汁酸誘導性未病状態の脱

- 脂乳チーズによる改善作用 日本農芸化学会2017年度大会 京都女子大学(京都市)2017.3.17-20.
11. 竹内 あかり、堀 将太、趙 佳賢、田中 愛健、原 博、石塚 敏:胆汁酸摂取ラット回腸粘膜におけるIgA産生の増加 日本農芸化学会2017年度大会 京都女子大学(京都市)2017.3.17-20.
 12. 石塚 敏:生体試料からの胆汁酸抽出・分析とその応用例 7 seas project プレミーティング 順天堂大学本郷キャンパス(東京都・文京区)2017.2.24.
 13. 石塚 敏:食環境と加齢による胆汁酸代謝の変動と未病 第3回分子細胞生物学研究室セミナー 島根大学生物資源科学部(島根県・松江市)2016.12.17.
 14. 堀 将太、常木 生也、花井 健人、清水 英寿、原 博、石塚 敏:コール酸誘導性脂肪肝における肝臓ミネラルの網羅的解析 第38回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)2016.11.30-12.2
 15. 田中 愛健、花井 健人、堀 将太、加茂 佳恵、多田 幸司、溝上 拓哉、渡辺 真通、清水 英寿、城内 文吾、佐藤 匡央、吹谷 智、横田 篤、原 博、石塚 敏:胆汁酸誘導性脂肪肝の発症における糖の関与 第46回日本栄養・食糧学会北海道支部会 とかちプラザ(北海道・帯広市)2016.11.29-30.
 16. 加茂 佳恵、多田 幸司、堀 将太、清水 英寿、原 博、石塚 敏:胆汁酸負荷による血中アディポネクチン濃度低下におけるT-カドヘリンの関与 日本農芸化学会北海道支部平成28年度第2回講演会 北海道大学大学院農学研究院(北海道・札幌市)2016.11.23.
 17. 堀 将太、田中 愛健、常木 生也、花井 健人、清水 英寿、原 博、石塚 敏:胆汁酸誘導性脂肪肝での糖代謝におけるミネラル動態の関与: 日本農芸化学会北海道支部平成28年度第2回講演会 北海道大学大学院農学研究院(北海道・札幌市)2016.11.23.
 18. 石塚 敏:脂肪肝誘導因子としての胆汁酸 第50回日本栄養・食糧学会東北支部大会 公開シンポジウム 岩手大学農学部(岩手県・盛岡市)2016.11.6.
 19. 石塚 敏:胆汁酸の代謝解析と関連病態 7 seas project プレキックオフミーティング AP品川(東京都・港区)2016.10.23.
 20. 石塚 敏:胆汁酸代謝に着目した新規病態モデルの確立 第5回愛媛大学食品健康科学研究セミナー 愛媛大学農学部(愛媛県・松山市)2016.9.30.
 21. 高橋 勇太郎、李 娟美、趙 佳賢、加茂 佳恵、多田 幸司、堀 将太、花井 健人、竹内 あかり、田中 愛健、清水 英寿、若松 純一、原 博、石塚 敏、玖村 朗人:胆汁酸誘導性病態の発症に及ぼす脱脂乳チーズ摂取の作用 日本農芸化学会北海道支部平成28年度第1回講演会 ホテル函館ロイヤル(北海道・函館市)2016.8.6-7.(優秀発表賞受賞)
 22. Ishizuka S, Hagio M, Shimizu H, Joe GH, Takatsuki M, Shiwaku M, Lee JY, Fujii N, Fukiya S, Yokota A. Cholic acid promotes gut epithelial proliferation in rats exposed to gamma-radiation. XXIV International Bile Acid Meeting: Bile Acids in Health and Disease, Düsseldorf (Germany), 2016.6.17-18.
 23. 石塚 敏:食品表示制度を踏まえた食素材開発事例-機能性評価での研究者の役割- 西川町・山形大学合同企画「西川町らしい健康・食品産業を考える」西川町交流センター(山形県・西村山郡西川町)2016.6.4.
 24. 石塚 敏:消化器系組織の構造と機能-外来物質の排除と許容- 岩手大学大学院農学研究科(岩手県・盛岡市)2016.6.3.
 25. 花井 健人、辻 美咲、吉次 玲香、菊地 慧大、野勢 琢馬、堀 将太、多田 幸司、清水 英寿、原 博、石塚 敏:コール酸による脂肪肝誘導の検証と脂肪肝発症に関わるパラメータ変動の再現性 第70回日本栄養・食糧学会大会 武庫川女子大学(兵庫県・西宮市)2016.5.13-15.
 26. 堀 将太、常木 生也、花井 健人、清水 英寿、原 博、石塚 敏:コール酸摂取に伴う肝臓鉄濃度減少と脂質蓄積 第70回日本栄養・食糧学会大会 武庫川女子大学(兵庫県・西宮市)2016.5.13-15.
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://lab.agr.hokudai.ac.jp/nutrbiocem/>
6. 研究組織
- (1)研究代表者
石塚 敏 (ISHIZUKA, Satoshi)
北海道大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号:00271627
 - (2)研究分担者
清水 英寿 (SHIMIZU, Hidehisa)
島根大学・生物資源科学部・准教授
研究者番号:10547532