

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08392

研究課題名(和文) コレステロール胆石形成における肝臓AhRの機能解析と分子標的治療への応用

研究課題名(英文) The role of AhR on cholesterol gallstone disease.

研究代表者

和田 平 (WADA, Taira)

日本大学・薬学部・准教授

研究者番号：20597398

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)：ダイオキシン受容体として知られているAryl hydrocarbon Receptor (AhR)によるコレステロール及び胆汁酸代謝制御機構の解明を通じて、コレステロール胆石形成の新たなメカニズムを明らかにする。  
胆石誘導食を給餌した肝臓特異的AhR欠損(LKO)マウスにおけるコレステロール胆石形成率はControlマウスと比較して有意に低いものであった。胆石誘導食を誘発性の高コレステロール血症は、LKOマウスにおいて有意に抑制された。以上の結果より、肝臓AhRは、コレステロール・胆汁酸排泄の方向性を制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、一般的な生活を営む人の血中ダイオキシン濃度と糖尿病の発症率との間に正の相関が報告され、低濃度ダイオキシン類の持続的曝露による慢性毒性発現の解明が世界的にも注目されている。しかしながら、これまで低濃度ダイオキシン類の慢性曝露による肝臓の機能異常とそれに伴う肝疾患の発症メカニズムを解明するための有用な戦略がなかったが、本研究で用いた肝臓特異的AhR欠損マウスを用いた解析によりそれを可能にした。本研究より、低濃度ダイオキシンの持続曝露はコレステロール胆石の形成及び高コレステロール血症の発症リスクであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To examine the role of AhR the cholesterol metabolism, we analyzed the liver AhR specific knockout mice fed a lithogenic diet. The lithogenic diet induced cholesterol gallstone diseases and hypercholesterolemia were prevented in LKO mice. These results revealed that hepatic AhR regulates the excretion of cholesterol and bile acid.

研究分野：生物系薬学

キーワード：胆石 AhR コレステロール

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

胆道がんは、早期発見が困難かつ予後不良の難治性のがんの一つであり、その罹患数も年々増加の一途を辿っている。また、我が国の胆道がん罹患率は諸外国と比較して著しく高いことから、胆道がんの予防・治療法の開発は喫緊の課題とされている。2008年に厚生労働省研究班より、胆石の既往のあるグループの胆道がんへの発症リスクは、既往のないグループに比較して2~3倍に増加することが報告され、胆石症が胆道がんの最大の危険因子として認識されている(Ishiguro *et al.*, 2008)。我が国の胆石症の70%を占めるコレステロール胆石症は、過剰な動物性脂肪の摂取による胆汁コレステロール濃度の増加によって発症する生活習慣病である。肥満症や脂質異常症の生活習慣病患者では、肝臓から胆汁コレステロールが過剰に分泌される。そのため、他の胆汁脂質構成成分である胆汁酸およびリン脂質とのバランスが破綻し、コレステロールの結晶化ならびに胆石へ成長が認められる(図1)。コレステロール胆石の形成は段階的に進み、肥満、年齢、性別等の様々な因子によって複雑に制御されていることが示唆されているが、その詳細なメカニズムについては不明な点が多い。

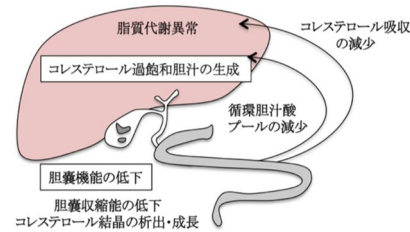


図1 コレステロール胆石形成機序

胆道がんの発症要因は多様であるが、疫学調査からダイオキシン類の曝露もその一つであることが明らかにされている(Brown 1987)。ダイオキシン類は、細胞内に存在する受容体型転写因子 Aryl hydrocarbon Receptor(AhR)と結合して毒性の多くを発現する。AhR 欠損(KO)マウスがダイオキシン類の示す毒性に対して耐性を示すことから、AhR はダイオキシン類が示す毒性発現に深く関与していると考えられている。

現在、我が国においてダイオキシン類の排出レベルは減少し、高用量の曝露とその急性毒性が問題となる可能性は少ない。一方、一般的な生活を営む日本人の血中ダイオキシン濃度と糖尿病の発症率との間に正の相関が報告され(Uemura *et al.*, 2008)、極微量(バックグランドレベル)ダイオキシン類の持続的曝露による慢性毒性発現が注視されている。例えば、先に述べたように、(i) ダイオキシン曝露が胆道がんの発症要因の一つであることが疫学的に示されていること、また、(ii) 胆石症が胆道がん発症の最大の危険因子であることから、本研究で取り上げるコレステロール胆石症に関しても極微量(バックグランドレベル)ダイオキシン類による慢性毒性の一つである可能性がある。このような極微量(バックグランドレベル)ダイオキシン類の毒性発生メカニズムを理解する上で AhR KO マウスの利用は有用であるが、特に、他臓器からの影響を除き、曝露した組織における特異的な影響を理解する上で、本研究で用いるような組織特異的 AhR KO マウスは、より詳細な情報を与えると期待できる。

代表者は以前に AhR が脂肪細胞分化を抑制することを明らかにした(Shimba, Wada, *et al.*, *J. Cell Sci.* 2001)。また、ダイオキシン類曝露による肝臓トリグリセリド含量の増加ならびに活性酸素産生などの急性毒性発現メカニズムを明らかにした(Lee, Wada *et al.*, *Gastroenterology* 2010, Wada *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 2013)。さらに代表者は、脂肪肝発症における肝臓 AhR の生理機能を解明した(Wada *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2016)。興味深いことに、高脂肪食を負荷した肝臓特異的 AhR 欠損(AhR LKO)マウスにおいて糞中総胆汁酸排泄量の増加が見られた。このことは、AhR LKO マウスの肝臓においてコレステロールから胆汁酸への異化が亢進している可能性を示唆している(代謝バランスの取れた状態では、胆汁酸生成量と糞中排泄量は等しい)。また、ダイオキシン類を曝露したラットにおいて血中コレステロール濃度の増加および肝臓における胆汁酸合成の律速酵素である *Cyp7a1* 発現量の減少が報告されている(Fletcher *et al.*, 2005)。以上を踏まえ、代表者はコレステロール代謝排泄制御における AhR の役割を明らかにする目的で研究を進めている。現在までの予備的検討において、胆石誘導食を負荷した AhR LKO マウスにおいてコレステロール胆石の形成が抑制されることを明らかにしている。

### 2. 研究の目的

胆道がんの最大の危険因子である胆石症の70%をコレステロール胆石症が占めている。コレステロール胆石の形成は段階的に進み、様々な因子によって制御されているが、代表者はダイオキシン受容体として知られている AhR がコレステロール胆石形成の促進因子である可能性を見出した。そこで本研究では、胆石誘導食を負荷した AhR LKO マウスの解析を通じて、肝臓 AhR に依存したコレステロール胆石形成メカニズムを明らかにする。また AhR を標的にしたコレステロール胆石症の新規治療戦略の開発を促すことを目指す。

### 3. 研究の方法

動物実験は日本大学薬学部実験動物倫理規定に基づいて行った。また、マウスは1ケージあたり4-5匹に分配し、温度 23±1℃、相対湿度 50±10%、明暗周期(明期 8:00-20:00, 暗期 20:00-8:00)の条件で飼育した。マウスの飼育は通常食に固形 NMF を用い、コレステロール胆石及び高コレステロール血症の誘導には胆石誘導食(コレステロール 1.25%, コール酸 0.5%, 飽和脂肪

15%含有)を6週間給餌した。肝臓特異的 AhR 欠損(AhR LKO)マウスは、AhR<sup>flox/flox</sup> マウスと肝臓特異的 Cre リコンビナーゼを発現するマウスを交配することにより作製した。血液生化学的パラメーター及び胆汁脂質成分については、生化学検査用キットを用いて測定した。各組織における遺伝子発現量については、qPCR 法により測定した。

#### 4. 研究成果

(1)16 週齢の AhR LKO および Control マウスに胆石誘導食を6週間負荷した後、コレステロール胆石の有無を肉眼で確認したところ、AhR LKO マウスにおける胆嚢内のコレステロール胆石形成率(16%)は、Control マウス(60%)に比較して有意に低いものであった(図1)。そこで、胆嚢内胆汁酸を採取し、胆汁

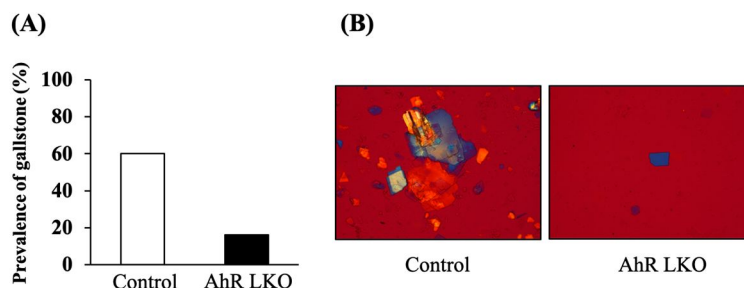


図2 AhR LKOマウスにおける胆石形成率(A)及びコレステロール結晶(B)

脂質成分(コレステロール、胆汁酸、リン脂質)濃度について測定したところ、AhR LKO マウスの総胆汁酸濃度の増加が認められた。一方、胆汁コレステロール及びリン脂質濃度において両群間に違いは認められなかった。また、胆石誘導食を負荷した AhR LKO マウスのコレステロール飽和度(Cholesterol-Saturated Fat Index(CSI))は、Control マウスのそれに比較して有意に低いものであった。そこで、肝臓から胆管への胆汁酸トランスポーターの発現量について RT-qPCR 法により測定したところ、コレステロールトランスポーターである *ATP binding cassette subfamily G member 5(Abcg5)*, *Abcg8*、胆汁酸トランスポーターである *Bile salt export pump (Bsep)*, *Multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2)*、リン脂質トランスポーターである *ATP-binding cassette 4(Abcb4)* 遺伝子発現量において、両群間に違いは見られなかった。次に、肝臓 AhR による胆汁酸の代謝及び排泄制御について検討を行った。胆汁酸の大部分は、小腸を介して糞中へと排泄されることから、糞中胆汁酸濃度を測定したところ、AhR LKO マウスにおける1日あたりの胆汁酸排泄量の増加が見られた。胆汁酸は肝臓内においてコレステロールが代謝(異化及び抱合)されて生成されることから、胆汁酸の生合成経路について検討した。胆汁酸酵素 *Cyp7a1*, *Cyp27a1*, *Cyp8b1* 遺伝子発現量に両群間での違いは見られなかったが、AhR LKO マウスにおいて *Cyp7b1* 遺伝子発現量の減少が見られた。一方、胆汁酸の抱合酵素である *Bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase (Baat)* 及び *Bile acid-coenzyme A ligase (Bal)* 遺伝子の発現量には AhR 遺伝子の欠損の影響は認められなかった。AhR LKO マウスにおける肝臓から胆管を介した糞中への胆汁酸排泄増加には、*Cyp7b1* 遺伝子の減少の寄与は少ないと考えられる。さらに、AhR LKO マウスの肝臓脂質含量及び血中胆汁酸濃度を測定したところ、AhR LKO マウスの肝臓総胆汁酸含量の低下および血中総胆汁酸濃度の増加が認められた。これらのことから、肝臓 AhR の欠損は胆汁酸の恒常性の維持に関与していることが示唆された。

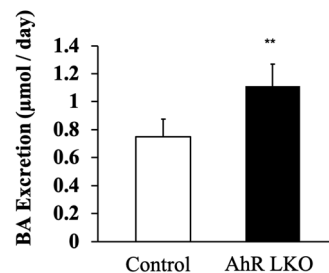


図3 1日当たりの糞中胆汁酸排泄量

(2)胆石誘導食を給餌した Control マウスは、コレステロール胆石の形成とともに高コレステロール血症を呈したが、AhR LKO マウスにおいて胆石誘導食に伴う血中コレステロール濃度の増加が著しく抑制された。また、AhR LKO

マウスにおける LDL コレステロール濃度の低下が見られ、一方で HDL コレステロール濃度においては両群間では有意な違いは見られなかった。次に、肝臓コレステロール含量を測定したところ、AhR LKO マウスにおいて総コレステロール含量、コレステロール

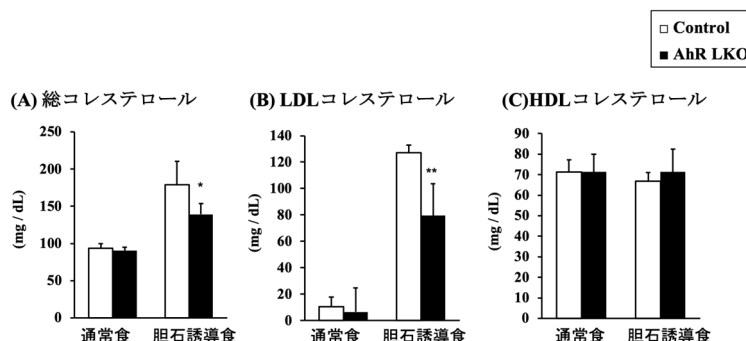


図4 AhR LKOマウスにおける血中コレステロール濃度

エステル含量の増加が見られた。肝臓コレステロールエステルは、トリグリセリドとともに

VLDLとして血中に分泌されることより、VLDL コレステロール分泌関連遺伝子の発現量を測定したところ、AhR LKO マウスにおいて *Microsomal triglyceride transfer protein(Mtp)* 発現量の有意な低下が見られた。したがって、AhR は Mtp 発現制御を介して VLDL コレステロール分泌制御に関与していることが示唆された。以上の結果より、肝臓 AhR は、コレステロール・胆汁酸排泄の方向性を制御していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wada T, Ichihashi Y, Suzuki E, Kosuge Y, Ishige K, Uchiyama T, Makishima M, Nakao R, Oishi K, Shimba S.	4. 巻 19
2. 論文標題 Deletion of Bmal1 Prevents Diet-Induced Ectopic Fat Accumulation by Controlling Oxidative Capacity in the Skeletal Muscle.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 E2813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19092813.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kosuge Y, Osada N, Shimomura A, Miyagishi H, Wada T, Ishige K, Shimba S, Ito Y.	4. 巻 677
2. 論文標題 Relevance of the hippocampal endoplasmic reticulum stress response in a mouse model of chronic kidney disease.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci Lett.	6. 最初と最後の頁 26-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2018.04.021. Epub 2018 Apr 20.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka T, Ohashi S, Saito H, Wada T, Aoyama T, Ichimaru Y, Miyairi S, Kobayashi S.	4. 巻 496
2. 論文標題 Indirubin 3'-oxime inhibits anticancer agent-induced YB-1 nuclear translocation in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 7-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2017.12.106. Epub 2017 Dec 21.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計28件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 和田 平、榛葉 繁紀
2. 発表標題 体内時計システムのNASH発症及び進展における役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田 平、榛葉 繁紀
2. 発表標題 Deletion of Bmal1 prevents diet-induced ectopic fat accumulation by controlling oxidative capacity in the skeletal muscle.
3. 学会等名 Keystone Symposia: New Insights into the Biology of Exercise(Colorado,USA) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田 平、榛葉 繁紀
2. 発表標題 Mice lacking AhR in adipose tissue are resistant to high fat diet-induced adipose tissue inflammation and diabetes
3. 学会等名 Keystone symposia: Obesity and NAFLD (Calgary, Canada) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田平、高橋周一、榛葉繁紀
2. 発表標題 マウスにおける光曝露は末梢組織における代謝を貯蔵方向に誘導する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (福岡)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部遼太、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子Bmal1による血糖調節とその加齢による変化
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会 (東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋周一、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 マウスにおける光曝露は末梢組織における代謝を貯蔵方向に誘導する
3. 学会等名 第63回日本薬学会関東支部大会(東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田平、笠倉由貴、松原惇、榛葉繁紀
2. 発表標題 Ah ( ダイオキシン ) レセプターは脂肪組織における肥満依存性の炎症誘発を介して糖尿病発症に関与する
3. 学会等名 第24回アディポサイエンス・シンポジウム(大阪)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田平, 斎藤隆宏, 榛葉繁紀
2. 発表標題 肝臓AhRによるコレステロール排泄制御機構
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会(幕張)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹谷 太成, 野伏 康仁, 及川 直毅, 和田 平, 榛葉 繁紀, 岸川 幸生
2. 発表標題 レンセンソウ全草水抽出物による脂肪細胞分化促進作用
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会(幕張)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 平、湯澤 美輝、榛葉 繁紀
2. 発表標題 アディポネクチン受容体合成アゴニストによる肝がん由来細胞の細胞死誘発機序
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会(横浜)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田平, 伊藤一登, 長嶋秀星, 榛葉繁紀
2. 発表標題 光照射による末梢エネルギー代謝制御
3. 学会等名 第25回時間生物学会(長崎)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田平、斎藤賢宏、中嶋孝久、榛葉繁紀
2. 発表標題 Molecular clock system regulates biliary lipid secretion.
3. 学会等名 2018 MD0/JSSX Joint Meeting (金沢) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤一登、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 光照射によるクエン酸回路の組織特異的制御
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会(東京)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 酢田萌、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 脂肪組織における体内時計システムの変調が前立腺に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会（東京）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 湯澤美樹、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 アディポネクチン受容体合成アゴニストは肝がん由来細胞特異的に細胞死を誘発する
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会（東京）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田平、酢田萌、榛葉繁紀
2. 発表標題 脂肪組織における体内時計システムの変調が前立腺に及ぼす影響
3. 学会等名 第23回アディポサイエンスシンポジウム(大阪)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田平
2. 発表標題 A novel function of adiponectin as a regulator of circadian rhythm.
3. 学会等名 DESIRE Conference 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榛葉繁紀、和田平
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1によるエネルギー代謝を中心とした骨格筋機能の制御
3. 学会等名 日本薬学会第138年会(金沢)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1によるエネルギー代謝を中心とした骨格筋機能の制御
3. 学会等名 日本薬学会第138年会(金沢)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1による骨格筋のCaシグナル伝達
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1によるエネルギー代謝を中心とした骨格筋機能の制御
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田平、市橋裕也、鈴木英美、澤村順哉、小菅康弘、内山武人、榛葉繁紀
2. 発表標題 時計遺伝子BMAL1による骨格筋のCaシグナル伝達制御を介したエネルギー代謝調節
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 長嶋秀星、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 光刺激による肝臓及び脂肪組織における活性酸素産生
3. 学会等名 第61回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 石渡彩華、柴田恵理、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 体内時計システムを介した脂肪組織-精巣間クロストークによる血中テストステロン量の制御
3. 学会等名 第61回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中嶋孝久、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 体内時計システムによる尿酸代謝制御とシフトワークによるその破綻
3. 学会等名 平成29年9月16日 第61回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 渡辺千裕、和田平、内山武人、榛葉繁紀
2. 発表標題 体内時計システム調節を司る低分子化合物による炎症性サイトカインの発現制御
3. 学会等名 第61回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小松ほなみ、山本普子、和田平、榛葉繁紀
2. 発表標題 アディポネクチンによる時間特異的代謝制御
3. 学会等名 第61回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榛葉繁紀、和田平、小松ほなみ、湯澤美輝
2. 発表標題 アディポネクチン受容体アゴニストによる体内時計システムの制御
3. 学会等名 第22回アディポサイエンス・シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----