

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10575

研究課題名(和文) プロテオーム解析による胆汁酸動態制御機構の変化からみた減量手術の糖尿病改善効果

研究課題名(英文) Anti-diabetic effect of metabolic surgery by proteome analysis of bile acids dynamics after surgery

研究代表者

内藤 剛 (Naitoh, Takeshi)

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：50291258

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：十二指腸空腸バイパス(duodenal-jejunal bypass: DJB)は体重増加を抑制し、糖代謝を改善するが、術後の血中胆汁酸値上昇機序や、代謝改善機序は不明である。DJB術後は、食物が通過しない胆膵路内で胆汁酸が脂質と混和せず、高濃度で存在することで、胆汁酸が早期に再吸収されていた。この腸肝循環短絡化が、術後の血中胆汁酸値上昇に寄与していると考えられた。プロテオーム解析で、肝の carboxylesterase 1d の発現が亢進していた。このタンパク質はFXRの標的遺伝子であり、PPAR を介してインスリン感受性を改善するため、DJB術後の代謝改善機序の1つである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病的肥満症やそれに伴う糖尿病はしばしば内科治療抵抗性であり、減量手術は現在最も有効な治療方法の一つと考えられている。減量手術後の代謝改善機序の一つとして、血中胆汁酸値の上昇が挙げられているが、詳細な機序は不明であった。本研究は減量手術後に胆汁酸動態が変化する機序や、術後の代謝改善機序の一端を明らかにした。減量手術はまだ発展途上にあり、今回得られた知見は、術式改良に寄与すると考えられるが、それだけでなく、創薬を含め胆汁酸をtargetとした新たな治療法の確立に貢献し得るものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Duodenal-jejunal bypass (DJB) shows great effects on host metabolism through bile acid (BA) signaling. However, the mechanism of elevation of serum BA levels after DJB remains unknown. First, we revealed that the enterohepatic circulation of BAs was shortened after DJB. BA levels in the intestine after DJB indicated that BAs would be reabsorbed in the bilio-pancreatic (BP) limb. Second, inhibition study of BA transporters showed that organic-anion transporting peptide played an important role in BA absorption in the BP-limb. BA absorption tended to increase in the absence of lipid solutions compared with that in the presence of lipid solutions. We attributed the increased BA reabsorption in the BP-limb to lack of food in the BP-limb, which contains concentrated BAs and no lipids. Third, proteome analysis suggested that liver carboxylesterase 1d, which is known FXR target gene and improve glucose metabolism through activating PPAR, was involved in the metabolic effects after DJB.

研究分野：消化器外科 減量代謝改善手術

キーワード：減量手術 十二指腸空腸バイパス術 胆汁酸 糖尿病 プロテオーム解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

病的肥満に対する減量手術は、体重減少だけでなく、糖尿病などの代謝疾患を劇的に改善する。糖代謝の改善は、体重が減少するより早期にみられることから、体重減少に依存しない直接的な効果と考えられている。

減量手術は、胃を縮小する手術と、消化管のバイパスを付加した手術に分けられるが、後者で糖代謝改善効果が高いことから、我々はバイパス術の主体である十二指腸空腸バイパス (duodenal-jejunal bypass: DJB) 術後の糖代謝改善効果について研究を行ってきた。

これまでの研究で我々は、DJB 術後の腸管のうち胆汁や膵液といった消化液のみが通過する胆膵路 (bilio-pancreatic limb: BP-limb) の長さが、DJB 術後の糖代謝改善および血中胆汁酸値上昇に重要であること、BP-limb を切除するとこれらの効果がキャンセルされることを見出した。しかし、DJB 術後の血中胆汁酸値上昇機序や、BP-limb の機能、胆汁酸が DJB 術後の代謝に与える影響については明らかになっていない。

2. 研究の目的

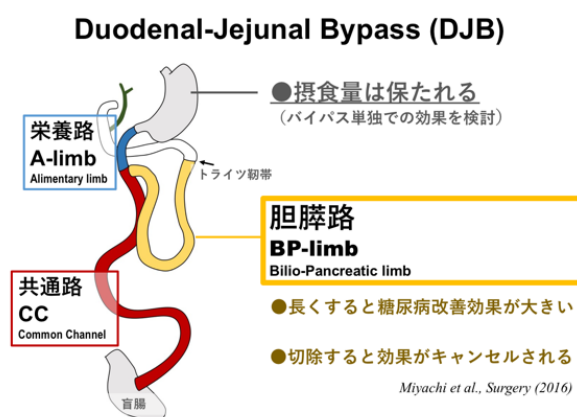
- (1) DJB 術後の血中胆汁酸値上昇の機序を解明する
- (2) BP-limb の機能解析を行う
- (3) プロテオーム解析による肝組織中のタンパク発現プロファイルの解析を行うことによって、Metabolic surgery の体重減少効果、糖代謝改善効果に関する機序を解明する

3. 研究の方法

(1) モデルラット

雄性の Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) または Sprague Dawley (SD) ラットを使用した。5 週齢で購入、SPF 環境下での単飼育とし、通常食を与えた。20 週齢で後述する DJB を行った。術後 8 週目に食餌負荷試験、術後 11 週目にインスリン負荷試験を行い、術後 12 週目に犠死を行い、サンプル採取を行った。

(2) 十二指腸空腸バイパス術 (DJB)



20 週齢で、DJB または sham 手術を行った。全身麻酔下に、十二指腸を切離し肛門側断端を閉鎖した。Treitz 靭帯から 30cm 肛門側の空腸を切離し、その肛門側断端を十二指腸の口側断端と端々吻合した。空腸の口側断端は、十二指腸-空腸吻合部から 3cm 肛門側の遠位空腸に端側吻合した。これらの操作により、小腸は食物のみの通る alimentary limb (A-limb; 3cm), 胆

汁膵液のみの通る biliopancreatic limb (BP-limb; 30cm), 両者が混じり合う common channel (CC; 約 60cm) の 3 つの部分に分けられる。一方 sham 手術では、DJB と同部位で十二指腸、空腸を切離し、再吻合を行った。

(3) 胆汁酸濃度測定

血漿中の総胆汁酸濃度を総胆汁酸テストワコー (和光純薬工業、大阪) を用いて酵素法で測定した。標識胆汁酸を含む各種胆汁酸濃度は、質量分析装置 (Liquid

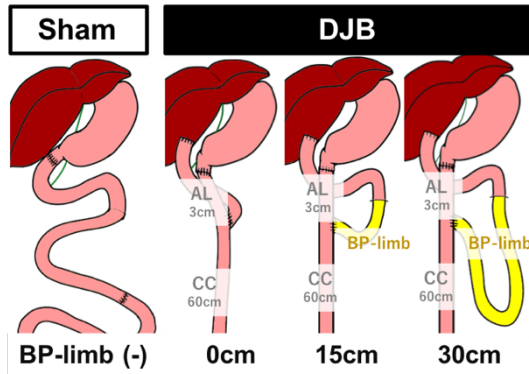
Chromatography - tandem Mass Spectrometry: LC-MS/MS) にて測定した。

(4) 定量 PCR

腸管粘膜から total RNA を抽出し、RNA 濃度を測定した。cDNA を合成し、real-time PCR を行った。

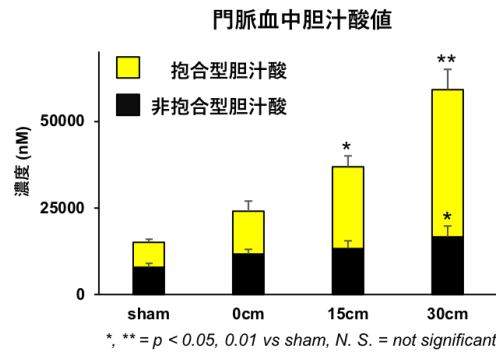
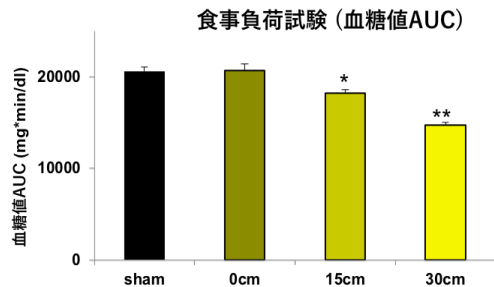
4. 研究成果

(1)BP-limb の長さの違いが DJB 術後の糖代謝・門脈血中胆汁酸値に与える影響



BP-limb の長さを異なる長さ (0cm、15cm、30cm) としたモデルを下図のごとく作成した。

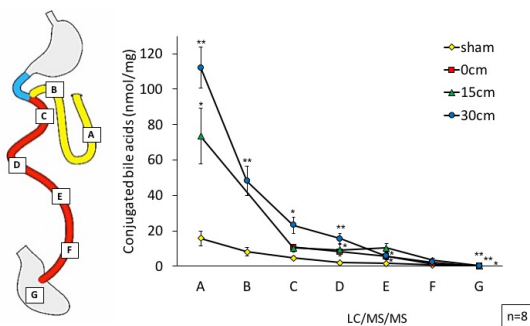
術後 8 週目に食餌負荷試験を行ったところ、BP-limb が 30cm の群、15cm の群で、sham 群と比較して有意に食餌負荷後の血糖値の波形下面積が小さく、耐糖能の改善を認めた。BP-limb を切除 (0cm) した群では、糖代



謝改善効果は認められなかった。

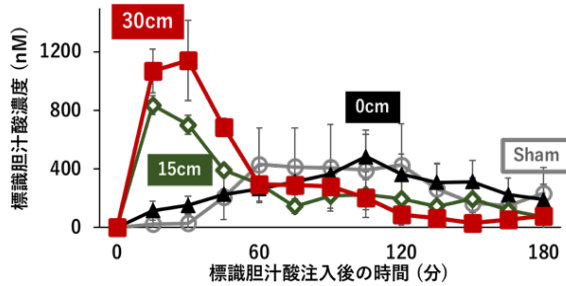
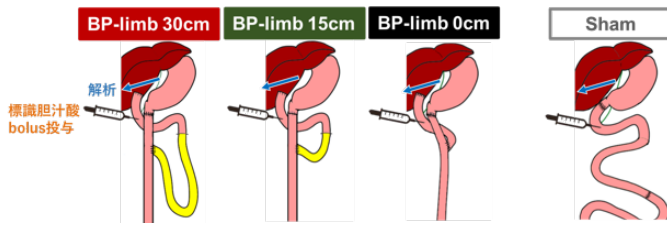
食餌負荷 1 時間後に採取した門脈血中抱合型胆汁酸濃度は、BP-limb が長いほど高かった。これらの結果から、BP-limb が DJB 術後の耐糖能や血中胆汁酸値上昇に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

(2) DJB 術後の腸管内胆汁酸濃度



食餌負荷 1 時間後に、小腸を 6 分割し、盲腸を含め腸管内の抱合型胆汁酸濃度を LC-MS/MS を用いて測定した。DJB を行い BP-limb を 30cm とした群では、BP-limb 内で sham 群と比較して有意に胆汁酸濃度が高かった。また、BP-limb の近位部から遠位部 (図中 A→B) で胆汁酸濃度の低下があり、BP-limb 内で胆汁酸が再吸収されている可能性が示唆された。

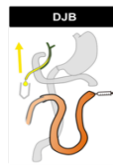
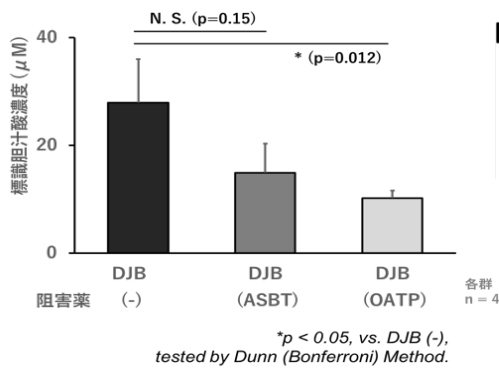
(3) DJB 術後の胆汁酸の腸肝循環の変化



食事負荷を行った1時間後に、標識胆汁酸を bolus で投与し、胆汁中の標識胆汁酸濃度を経時的に観察することによって、DJB 術後の腸肝循環を評価した。

BP-limb が 30cm、15cm の群では、Sham 群に比べて早期に標識胆汁酸の peak が認められており、腸肝循環が短絡化している可能性が示唆された。また、BP-limb を 0cm にした群ではこれらの変化が認められず、DJB 術後の腸肝循環短絡化には BP-limb の存在が重要であると考えられた。

(4) BP-limb における胆汁酸吸収経路 (トランスポーター阻害実験)



前述の腸肝循環評価のモデルを改変し、遊離した BP-limb に標識胆汁酸を持続注入 (肛門側は離断し体外に流出) し、定常状態における胆汁中の標識胆汁酸濃度を値として採用した。

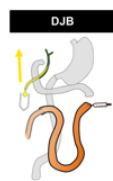
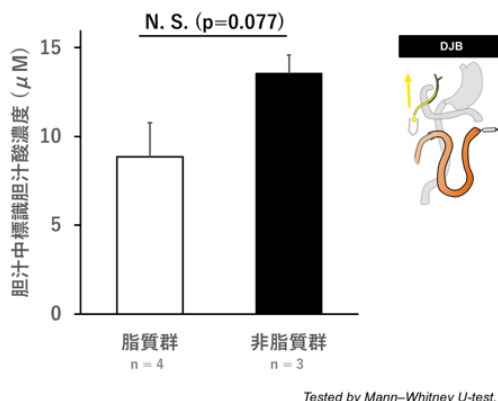
胆汁酸トランスポーター阻害薬として、apical-sodium dependent bile acid transporter (ASBT) 阻害薬と organic anion transporting peptide (OATP) 阻

害薬を使用した。

阻害薬を使用しなかった群に比べて、ASBT 阻害薬で胆汁酸吸収が抑制される傾向にあり、OATP 阻害薬で有意に胆汁酸吸収が抑制された。BP-limb における胆汁酸吸収経路として、ASBT だけでなく OATP が重要な役割を果たしている可能性が示された。

しかしながら、BP-limb における胆汁酸トランスポーターASBT および OATP の mRNA 発現はいずれも変化しておらず、BP-limb における胆汁酸吸収亢進は、BP-limb 自体の胆汁酸を吸収する能力ではなく、腸管内容の変化が重要である可能性が示唆された。

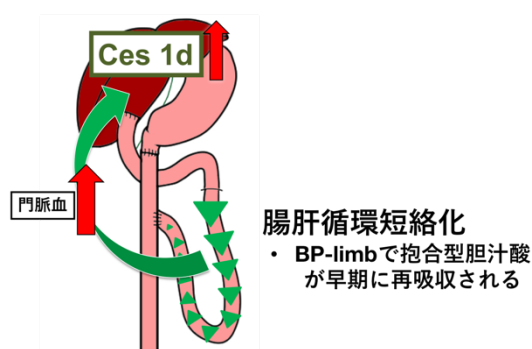
(5) 脂質の有無が BP-limb における胆汁酸吸収に与える影響



食餌中に含まれる脂質に着目し、脂質の有無が BP-limb における胆汁酸吸収に与える影響を評価した。脂質を混ぜた脂質群に比べて、脂質を混ぜない非脂質群で胆汁酸吸収が亢進する傾向を認め、BP-limb に食餌 (脂質) が通過しないことが胆汁酸吸収亢進に寄与している可能性が示唆された。

(6) 肝組織のプロテオーム解析

DJB 術後の代謝改善機序について、肝組織のプロテオーム解析にて検討を行った。1372 のタンパク質が同定され、発現比率 $>1.5x \cdot <0.5x$ 、変動係数 $<30\%$ 、有意差あり($p<0.05$) でタンパク質を 21 個に絞り込んだ。この中で、DJB 群で発現が亢進していた Carboxylesterase 1d (Ces1d) に着目した。Carboxylesterase は主に肝や小腸などに発現し、中性脂肪を加水分解するエステラーゼであるが、胆汁酸が target とする核内受容体 FXR の直接のターゲット遺伝子であることが報告されている。Ces1 は主に肝に発現し、中性脂肪を分解し遊離脂肪酸を増やすことで、PPAR α の活性を亢進させ、インスリン感受性を改善することが報告されている。DJB 術後は BP-limb の長さに比例して肝組織中の胆汁酸濃度も上昇することから、Ces1d 発現の亢進が DJB 術後の代謝改善に寄与している可能性が示唆された。



以上の結果から、DJB 術後の血中胆汁酸値上昇機序として、腸肝循環の短絡化が重要と考えられた。BP-limb における胆汁酸吸収には、ASBT だけでなく OATP が重要な役割を果たしていた。BP-limb には食物が通過しないため、BP-limb 内の胆汁酸が高濃度で存在し脂質と混和しないことが胆汁酸吸収亢進に

寄与している可能性が示唆された。BP-limb で早期に吸収された胆汁酸は、肝組織中で Ces1d の発現亢進を介して DJB 術後の代謝改善に寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ise Ichiro, Tanaka Naoki, Imoto Hirofumi, Maekawa Masamitsu, Kohyama Atsushi, Watanabe Kazuhiro, Motoi Fuyuhiko, Unno Michiaki, Naitoh Takeshi	4. 巻 29(6)
2. 論文標題 Changes in Enterohepatic Circulation after Duodenal-jejunal Bypass and Reabsorption of Bile Acids in the Bilio-Pancreatic Limb	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Obesity Surgery	6. 最初と最後の頁 1901-1910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11695-019-03790-y	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 Ueno T, Tanaka N, Imoto H, Maekawa M, Kohyama A, Watanabe K, Motoi F, Kamei T, Unno M, Naitoh T.	4. 巻 30(7)
2. 論文標題 Mechanism of Bile Acid Reabsorption in the Bilio-Pancreatic Limb after Duodenal-jejunal Bypass in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Obesity surgery	6. 最初と最後の頁 2528-2537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11695-020-04506-3	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7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Naitoh T
2. 発表標題 Anti-diabetic mechanism of duodenal-jejunal bypass and efficacy of sleeve-bypass for obese diabetes patients
3. 学会等名 2018 Annual Meeting of the Taiwan Surgical Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naitoh T, Tanaka N, Imoto H, Tsuchiya T, Kono E, Miyachi T, Ikezawa F, Nagao M, Watanabe K, Motoi F, Kamei T, Ishida T, Unno M
2. 発表標題 Mechanism of the anti-diabetic effect of metabolic surgeries
3. 学会等名 Asia Pacific Metabolic and Bariatric Surgery Society (APMBSS) 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naitoh T, Ise I, Tanaka N, Imoto H, Tsuchiya T, Miyachi T, Motoi F, Kamei T, Unno M
2. 発表標題 Early absorption of bile acids in the biliopancreatic limb is the main mechanism of serum bile acids elevation after duodenal jejunal bypass
3. 学会等名 4th World Congress on Interventional Therapies for Type 2 Diabetes (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ise I, Imoto I, Tanaka N, Maekawa M, Ichikawa H, Ueno T, Kohyama A, Watanabe K, Motoi F, Kamei T, Unno M, Naitoh T
2. 発表標題 The changes of enterohepatic circulation after duodenal-jejunal bypass; reabsorption of bile acids in the bilio-pancreatic limb
3. 学会等名 International Federation of Surgery for Obesity-Asia Pacific Chapter 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ueno T, Tanaka N, Imoto H, Maekawa M, Kohyama A, Watanabe K, Motoi F, Kamei T, Unno M, Naitoh T
2. 発表標題 Mechanism of Reabsorption of Bile Acids in Bilio-Pancreatic Limb after Duodenal-Jejunal Bypass
3. 学会等名 24th World Congress of International Federation for the Surgery of Obesity & Metabolic disorders (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naitoh T
2. 発表標題 Surgical treatments for morbid obesity
3. 学会等名 Korean Digestive Disease Week 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Naitoh
2. 発表標題 Sleeve DJB: the keypoint and blind spots
3. 学会等名 International Federation of Surgery for Obesity-Asia Pacific Chapter 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究分担者	井本 博文 (Imoto Hirofumi) (20754922)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	田中 直樹 (Tanaka Naoki) (60547404)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	