

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11653

研究課題名（和文）高感度新規胆汁酸分析法を用いたNASH肝線維化に関わる胆汁酸種の解明

研究課題名（英文）Elucidation of bile acids involved in the development of liver fibrosis in NASH using a new highly sensitive analysis method

研究代表者

浅野 友美（Asano, Tomomi）

金城学院大学・生活環境学部・講師

研究者番号：90637951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：高脂肪・高コレステロール（HFC）食摂取により肝線維化の重症度が異なる SHRSP5/Dmcr ラット（重度線維化）、SHR ラット（軽度線維化）、WKY ラット（線維化殆どなし）の肝臓中胆汁酸の分析を実施した。3系統ともHFC食の摂取により、グリシン抱合型胆汁酸（G-BA）の増加とタウリン抱合型胆汁酸（T-BA）の減少を示した。特に、SHRSP5/Dmcr でT-BA値が低値であった。胆汁酸抱合化能やHFC食摂取によるG-BAの合成・蓄積と、T-BA合成の低下がNASHの肝線維化に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、capillary LC/MS/MSによる高分離かつ高感度な分析方法を構築し、HFC食摂取による肝線維化の重症度が異なる3系統ラットの胆汁酸プロファイリング分析を行った。3系統を比較することで、HFC食摂取による肝臓中胆汁酸組成の変化とWKY、SHR、SHRSP5/Dmcrの垂系統化の過程における肝臓中胆汁酸組成の変化が示され、これらの組成変化が肝線維化の進展と重症化に関与していることが明らかとなった。本研究によりNASHの予防や早期診断、重症化予防のための食事法や診断方法開発の一助となる知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：The SHRSP5/Dmcr rat and the parental strain rats, SHR and WKY, differ in the severity of high-fat and cholesterol (HFC) diet-induced liver fibrosis. In this study, we analyzed liver bile acids in these three strains of rats.

All strains of rats showed an increase in glycine-conjugated bile acids (G-BA) and a decrease in taurine-conjugated bile acids (T-BA) by administration of the HFC diet. In particular, T-BA values were the lowest in SHRSP5/Dmcr compared with SHR and WKY.

It was suggested that the ability to conjugate bile acids and the synthesis and accumulation of G-BA by HFC diet are involved in liver fibrosis in NASH.

研究分野：健康科学

キーワード：胆汁酸 ラット肝臓 NASH LC/MS/MS

### 1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis; NASH) はメタボリックシンドロームの肝病変と考えられ、我が国でも肥満人口の増加に伴い患者数が急増している。

我々はこれまでに、高脂肪・高コレステロール (HFC) 食摂取により、重度の肝線維化を発症する NASH モデルラット SHRSP5/Dmcr を開発<sup>1)</sup>している。肝線維化を起こした SHRSP5/Dmcr の肝臓では、胆汁酸動態に関わる因子に変化が生じ、その結果として胆汁酸組成が変化していることを確認している<sup>2-5)</sup>。胆汁酸はコレステロールの異化産物であり脂質栄養の消化吸收を助ける一方、その合成・代謝・排泄の過程で多種の胆汁酸を生成し、中には細胞毒性を示す種もある。肝線維化には胆汁酸種の毒性強度や組成が強く影響することから、NASH の更なる詳細な病態解析のためには、より多くの胆汁酸種を定量することが必要であり、発症や重症化に関わる胆汁酸種や組成変化を捉えることが重要である。

申請者は、より高分離かつ高感度な胆汁酸分析が可能な capillary LC (cLC) /MS/MS による胆汁酸分析法を構築しており、本システムを用いることで定量不可だった胆汁酸の検出が可能となり、より詳細な胆汁酸プロファイルが可能である。また、SHRSP5/Dmcr は、Wister Kyoto (WKY) から高血圧発症ラット (SHR) を経て作成されたモデル動物である。3 系統の肝線維化に対する HFC 食の感受性には差があり、WKY では肝線維化は殆ど見られず、SHR では軽度、SHRSP5/Dmcr では重度の肝線維化に至る。先行研究にて 3 系統の胆汁酸動態に関わるタンパクの発現には差があることは確認している<sup>6)</sup>が、実際の胆汁酸組成の変化は確認おらず、系統化のどの過程でどのように胆汁酸組成が変化し、いずれの胆汁酸種が肝線維化の重症度を明らかにすることは、発症機序や重症化のメカニズム解析の一助となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、NASH モデルラット SHRSP5/Dmcr に加え、HFC 食摂取により肝線維化の重症度が異なる系統基ラットの SHR および WKY の 3 系統ラットを用い、それぞれの肝臓中胆汁酸のより詳細な胆汁酸分析プロファイル分析を行い、NASH における肝線維化の発症や重症化に関わる肝臓中の胆汁酸種や組成変化との関連を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 動物の飼育と試料

10 週齢の雄性 SHRSP5/Dmcr、SHR、WKY ラットを、それぞれ control 群と HFC 群に分けた。各群 6 匹とし、室温 (25±1°C)、12 時間の明暗サイクルにて 8 週間 (SHRSP5/Dmcr における肝線維化期) 飼育した。ラットは麻酔下にて解剖し、採血の後、肝臓を採取した。動物の飼育と実験は金城学院大学実験動物委員会に承認され、動物実験の倫理ガイドラインに従い実施した。

#### 2) ラット肝臓中胆汁酸分析用サンプルの調製

20 mg の肝臓に 5 倍容のメタノール (MeOH) /アセトニトリル (ACN) 溶液 (1:1, v/v) を加えホモジナイズ (2500 rpm, 40sec) し、遠心分離 (13,000 g, 10 min) した。得られた上清 50 µL に内部標準液 (4 種の重水素標識 (d<sub>4</sub>-) 胆汁酸 (表 1 参照) 各 250 ng/mL の混液) を 10 µL 添加し、室温にて 1 時間真空遠心濃縮した。得られた濃縮乾固物を 10% MeOH/10 mM 酢酸アンモニウム (NH<sub>4</sub>OAc) 溶液 50 µL で再溶解し、フィルトレーション (0.22 µm) した溶液を cLC/MS/MS 分析用サンプルとした。

#### 3) cLC/MS/MS 分析条件

分析対象胆汁酸とその略号を表 1 に示した。装置は DiNa-2A nano LC (KYA Tech) および 4000 Q-TRAP (Sciex) を用いた。LC 分析のカラムは L-column2 ODS (300 µm i.d. × 50 mm, 3 µm) とし、移動相 A に 10% MeOH/ 10 mM NH<sub>4</sub>OAc、移動相 B に 98% MeOH/ 10 mM NH<sub>4</sub>OAc を用いた。MS/MS は ESI-negative モードで実施し、SRM (Selected reaction monitoring) にて分析した。

表 1. 分析対象胆汁酸と略号

Bile acid (BA)	Free-BA	Glycine conjugated-BA	Taurine conjugated-BA	D <sub>4</sub> -BA (internal standard)
Cholic acid	CA	G-CA	T-CA	D <sub>4</sub> -CA
Chenodeoxycholic acid	CDCA	G-CDCA	T-CDCA	D <sub>4</sub> -CDCA
Deoxycholic acid	DCA	G-DCA	T-DCA	D <sub>4</sub> -DCA
Ursodeoxycholic acid	UDCA	G-UDCA	T-UDCA	D <sub>4</sub> -UDCA
Lithocholic acid	LCA	G-LCA	T-LCA	
Hiodeoxycholic acid	HDCA	G-HDCA	T-HDCA	
α-Muricholic acid	α-MCA		T-α-MCA	
β-Muricholic acid	β-MCA		T-β-MCA	

#### 4) 解析

各群のラット肝臓中胆汁酸組成の差は、各胆汁酸のピークエリア (PA) / 内部標準の PA から得られた相対度で比較し、データ解析 web アプリケーション: PiT MaP<sup>7)</sup> を用いて評価した。

#### 4. 研究成果

すべての群の肝臓で LCA を除く 21 種の胆汁酸が検出された。3 系統とも、HFC 食摂取により、グリシン抱合型胆汁酸の増加と、タウリン抱合型胆汁酸の減少を示した。特に、SHRSP5/Dmcr では SHR および WKY と比較してタウリン抱合型胆汁酸値が低かった。

また、PiTMAP による解析で得られた PLS-DA スコアプロットおよびローディングプロットの結果を図 1 に示した。

PLS-DA スコアプロットより、各系統の control 群と HFC 群は第一主成分軸に沿って分離した。また、3 系統の比較では control 食、HFC 食とも第二主成分軸に沿って分離する傾向にあった。PLS-DA ローディングプロットから、第一主成分軸での分離には、毒性が比較的高いグリシン抱合型胆汁酸とグリシン抱合体より毒性が低いタウリン抱合型胆汁酸が関与していた。また、第二主成分軸は抱合型胆汁酸と遊離型胆汁酸が分離に寄与する傾向にあった。さらに、変数重要度 VIP 値を求めたところ、VIP 値  $\geq 1$  であった胆汁酸は高い順に T- $\beta$ -MCA, T- $\alpha$ -MCA, T-LCA, T-CDCA, G-DCDA, G-CA, T-UDCA, UDCA, G-CDCA, T-CA であった。

本研究では、3 系統のラットを比較することで、HFC 食摂取による肝臓中胆汁酸組成の変化と、WKY、SHR、SHRSP5/Dmcr の亜系統化の過程における肝臓中胆汁酸組成の変化が示され、これらの組成変化が肝線維化の進展と重症化に関与していることが明らかになった。本研究により NASH の予防や早期診断、重症化予防のための食事法や診断方法開発の一助となる知見が得られた。

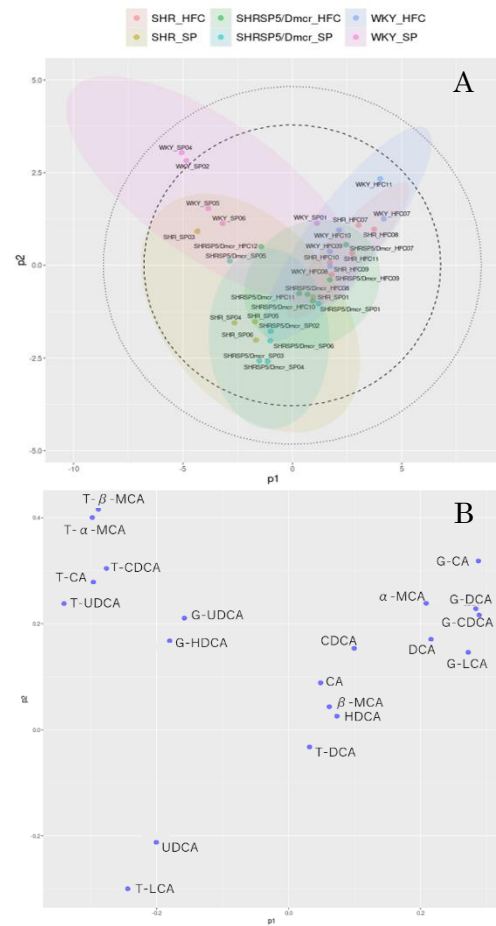


図 1. 3 系統ラット肝臓中胆汁酸の PLS-DA 解析結果  
A) PLS-DA スコアプロット  
B) PLS-DA ローディングプロット

#### [参考文献]

- 1) Kitamori K, et al., Environ. Health Prev. Med., 17, 173-182, 2012
- 2) Jia X, et al., Dig. Dis. Sci., 58, 2212-2222, 2013
- 3) Suzuki Y, et al., Nagoya J. Med. Sci., 75, 57-71, 2013
- 4) Jia X, et al., Dig. Dis. Sci., 59, 1490-1501, 2014
- 5) Yetti H, et al., PLoS One, 13(2), e0192863, 2018
- 6) Naito H, et al., Environ. Health Prev. Med., 21, 368-381, 2016
- 7) Zaitso K, et al., Anal. Chem. 92, 8514-8522, 2020

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Asano Tomomi, Taki Kentaro, Kitamori Kazuya, Naito Hisao, Nakajima Tamie, Tsuchihashi Hitoshi, Ishii Akira, Zaito Kei	4. 巻 6
2. 論文標題 One-Pot Extraction and Quantification Method for Bile Acids in the Rat Liver by Capillary Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 8588 ~ 8597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsomega.1c00403	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅野友美、瀧健太郎、北森一哉、石井晃、財津桂
2. 発表標題 cLC/MS/MSによる肝臓中胆汁酸分析方法の構築とNASHモデルラットへの適用
3. 学会等名 第13回メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内藤久雄、袁媛、北森一哉、橋本沙幸、浅野友美、八谷寛、那須民江
2. 発表標題 降圧剤ヒドララジンは高脂肪食ラットの肝線維化を抑制する
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内藤久雄、北森一哉、橋本沙幸、浅野友美、八谷寛、那須民江
2. 発表標題 ウルソデオキシコール酸添加による講師能誘導性肝炎・線維化の軽減作用
3. 学会等名 第93回日本産業衛生学会
4. 発表年 2020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	那須 民江  (NASU Tamie)  (10020794)	中部大学・生命健康科学部・客員教授   (33910)	
研究分担者	石井 晃  (ISHII Akira)  (30252175)	名古屋大学・医学系研究科・教授   (13901)	
研究分担者	北森 一哉  (KITAMORI Kazuya)  (80387597)	金城学院大学・生活環境学部・教授   (33905)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------