

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11811

研究課題名（和文）脂肪性肝疾患に対する消化管胆汁酸代謝制御を標的とした新たな食事性予防戦略

研究課題名（英文）A new dietary preventive strategy targeting regulation of gastrointestinal bile acid metabolism for fatty liver disease

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：水産物由来成分のタウリンによるコレステロール低下作用の機序が消化管胆汁酸組成変動を介する消化管の核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) シグナルの減弱に由来するという新規機序を明らかにした。タウリンが肝臓で直接作用するだけでなく、消化管を介する機序の存在を明らかにした。さらにマグロ等に多く含まれるセレン化合物のセレノネインが脂肪性肝疾患モデルマウスの肝障害と脂肪肝を軽減することを示した。さらにセレノネイン添加食を摂取するとセレノネインが肝臓に蓄積することでこれらの作用が発現することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タウリンのコレステロール低下作用の新規機序を解明したということにとどまらず、この作用機序は他の食事成分にも当てはまる可能性があり、これらの作用を持つ食事成分の探索や開発のための手段を提供することができた。セレノネインはマグロ等に大量に含まれ、これらの魚をふんだんに摂取することにより脂肪性肝疾患の改善や予防ができる可能性を示した。さらに本試験結果はセレノネインの機能性食品への応用が有効であることを示した。

研究成果の概要（英文）：We proposed a novel mechanism that the cholesterol-lowering effect of taurine, a component derived from marine products, is due to the attenuation of the nuclear receptor FXR signaling in the gastrointestinal tract mediated by changes in the bile acid composition of the gastrointestinal tract. It was clarified that taurine acts not only by a direct mechanism in the liver but also by a mechanism through the gastrointestinal tract. It was also shown that selenoneine, a selenium compound abundantly contained in tuna, alleviates liver damage and fatty liver in fatty liver disease model mice. Furthermore, it was suggested that selenoneine accumulates in the liver of mice fed a selenoneine-supplemented diet, resulting in these effects.

研究分野：食品機能学

キーワード：タウリン セレノネイン コレステロール 脂肪性肝疾患 FXR 胆汁酸 セレン 水産食品

1. 研究開始当初の背景

生体内の胆汁酸は近年、シグナル伝達物質としての役割が明らかになり、その生理作用が注目されている。生体内では腸肝循環しており、肝臓や消化管の核内受容体 FXR 等を介して様々な脂質代謝、糖代謝調節に関与するとされている。胆汁酸は肝臓で一次胆汁酸として複数種合成されるとともに、消化管内で腸内細菌による代謝を受けることで、10種類以上存在する。それら個々の胆汁酸分子種はそれぞれ、アゴニストあるいはアンタゴニストとして、分子種に依存した強さで個々の受容体に作用することが近年明らかになっており、生体内の胆汁酸分子種の量的質的変動が受容体シグナルの強度を決定している。近年腸内細菌に影響を与える抗菌薬や酸化剤の摂取が、消化管の胆汁酸組成を変動させ、消化管の FXR シグナルを減弱させることが、脂肪性肝疾患を改善させることが報告された(J. Clin. Invest., 125,386-401 (2015); Gastroenterology, 151, 845-859 (2016))。さらにお茶の成分が腸内細菌叢を変化させ、胆汁酸の組成とアミノ酸抱合型胆汁酸の割合を変化させることで、肝臓や血清中のコレステロール、トリグリセリドレベルを低下させることが報告された(Nat. Commun.10, 4971 (2019))。これらの作用は腸内細菌叢の胆汁酸代謝に起因する消化管の胆汁酸組成変動による消化管の FXR/fibroblast growth factor(FGF)15/19 シグナルの減弱が関与すると考えられた。FGF15/19 は FXR により誘導されるエンドクラインホルモンで肝臓に移行し、肝臓の FGF 受容体を介して肝臓の胆汁酸、脂質合成を抑制するとされている。このように、腸内細菌叢に影響を与える食事成分は胆汁酸代謝を変化させ、胆汁酸組成を変動させることで、肝臓の脂質代謝を制御出来ることが示されている。これらの知見を背景にすると、既存の脂質代謝調節成分も、肝臓の脂質代謝調節受容体に直接作用する以外に、胆汁酸代謝に関与する腸内細菌に作用したり、消化管胆汁酸吸収に作用して消化管胆汁酸受容体シグナルを変化させることで、脂質代謝を調節している可能性を考えた。これらの機序を考慮することでこれまで未解明であったり、十分説明出来なかった脂質代謝調節成分の作用機序を理解できる可能性を考えた。

2. 研究の目的

トリグリセリドやコレステロールなどの脂質の代謝異常は、心血管系の疾患を引き起こし、主要な生活習慣病の原因となっている。これらの疾患を食生活により予防、改善する事は、予防医学の観点から非常に重要な課題となっている。これらの観点から脂質代謝調節する食事成分の作用機序を理解し、有効に食事に取り入れていくことが脂質異常症の予防のために重要となる。本研究の目的はこれらの予防機序のうち、標的を消化管の胆汁酸組成変動とそれに起因する FXR シグナル変動に特化し、肝臓を直接の標的とする既存の機序とは異なる新規機序をタウリンにより実証し、その他の成分における新規作用機序の解明につなげることを目的とする。本研究の学術的独自性と創造性は、これまで中心に解析されて来た肝臓のシグナルを直接の標的とする機序とは異なる概念で、食事成分の脂質代謝調節機序を明らかにする点である。すなわち、これまでの脂質代謝改善成分の多くは直接的に肝臓の脂質代謝関連核内受容体あるいは転写因子(PPAR α , LXR, FXR, SREBP1c, SREBP2 等)に作用する機序を中心に研究されてきた。多くの成分はそのような機序で説明できるが、それらだけでは説明がつかない成分が多々存在する。それらの未解明の機序を明らかにする場合、生体成分の組成変化を起こすことで、間接的に受容体シグナルを変動させる場合が存在すると考えられる。この考えに基づき、さらに食事成分が生体に作用するために必ず通過する消化管での作用に注目し、受容体のアゴニストあるいはアンタゴニストとなりうる生体成分で、de novo 合成以外に腸内細菌による代謝変換され多成分で消化管に存在する胆汁酸とその消化管受容体 FXR シグナルに着目した。これらの着眼点が、本研究の学術的独自性と創造性である。本研究ではタウリンについて消化管 FXR シグナルの関与について検討するとともに魚介類に多く存在するセレン化合物のセレノネインの脂質代謝改善作用について検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物への処置

8~9 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% タウリン水を 10 日間摂取させた。飼料は AIN-93M (オリエンタル酵母) を用いた。

8~9 週齢の雌性の *Fxr* 欠損マウス及び野生型マウス(C57BL/6N)に 2% タウリン水を 10 日間摂取させた。飼料として 1% コレステロールを添加した AIN-93M を用いた。

16 週齢の雄性 *Fxr* 欠損マウスに 0.3ppm (0.3 mg Se/kg) セレノネインを添加した MF (オリエンタル酵母) 飼料を 4 か月間摂取させた。一か月おきに尾採血を実施した。

(2) 肝障害マーカーと脂質レベルの解析

肝障害マーカーの血清中 alanine aminotransferase (ALT)、aspartate aminotransferase (AST) 活性はトランスアミナーゼ CII-テストワコー (富士フィルム和光純薬株式会社)、alkaline phosphatase (ALP) 活性は LabAssay™ ALP (富士フィルム和光純薬株式会社) で測定した。トリグリセリド (TG)、総コレステロール (TC) 及び遊離脂肪酸 (NEFA) は各々トリグリセリド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコー及び NEFA-C テストワコー (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて測定した。

(3) 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 3α-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。各々の胆汁酸で検量線を作成し定量した。

(4) 遺伝子発現解析

定量 PCR は SYBR Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ株式会社) を使用し、Thermal Cycler Dice Real Time System Single (TP850、タカラバイオ株式会社) を用いて行った。反応は、95°C で 30 秒処理後、変性を 95°C で 5 秒間、アニーリングおよび伸長反応を 60°C で 30 秒間とした。変性、アニーリングおよび伸長反応は 40 サイクル行った。

(5) 総セレンとセレノネイン含量の解析

総セレン含量は蛍光法 (励起光波長 379 nm、蛍光波長 521 nm) で測定した。セレノネイン含量は分離カラム (MSPak GF-310 4D, 4.6 x 150 mm) (昭和電工) を用いた ICP-MS (Agilent 7500) (Agilent Technologies) により測定した。

4. 研究成果

(1) タウリン単独処理

タウリンによるコレステロール低下作用における消化管の FXR シグナルの関与を明らかにするため、*Fxr* 欠損マウスと野生型マウスに 10 日間 2% タウリン水を摂取させたところ、血中と肝内のコレステロールレベルに有意な変動はいずれのマウスにおいても認められなかった。肝臓と消化管腔内の胆汁酸組成も有意な変化は認められなかった。

(2) コレステロールとタウリンの併用処理

タウリン単独処理では有意な変動が認められなかったため、飼料中に 1% コレステロールを添加して、タウリンによるコレステロール低下作用を解析した。1% コレステロールの添加により、タウリンによるコレステロール低下作用が認められた。肝臓においては両マウスともに有意な ($p < 0.001$) コレステロールレベルの低下が認められた (図 1)。一方血清中では野生型マウスにおいてのみコレステロールレベルの有意な ($p < 0.05$) 低下が認められた。このことよりタウリンによるコレステロール低下作用に FXR 依存的な機序が存在することが示唆された。FXR のリガンドとなる胆汁酸組成を解析すると、肝臓においては両マウスで胆汁酸組成に有意な変動は認められなかったが、小腸管腔内では野生型マウスで tauro-β-muricholic acid (TβMCA) ($p < 0.001$), tauro-

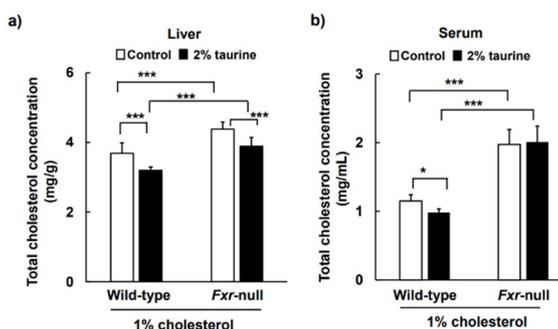


図 1 タウリン摂取によるコレステロールレベルの変動

murideoxycholic acid (TMCA) ($p < 0.01$), ursodeoxycholic acid (UDCA) ($p < 0.01$)の有意な減少が認められた(図2)。これらの胆汁酸はいずれも FXR のアンタゴニストとなることから、消化管の FXR シグナルが減弱することが考えられた。そこで消化管の FXR 標的遺伝子の *small heterodimer partner (Shp)* と *fibroblast growth factor (Fgf)15* の mRNA レベルを定量 PCR で測定した。野生型マウスの小腸で *Shp* ($p < 0.001$) と *Fgf15* ($p < 0.01$) の有意な発現低下が認められ、FXR シグナルの減弱を支持した(図3)。一方肝臓においてはコレステロール合成酵素の *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (Hmgcr)* の発現変動は認められなかったが、FGF15 で負に調節されている胆汁酸合成酵素の *Cyp7a1* レベル($p < 0.01$)が有意に増加した。*Fxr* 欠損マウスではいずれの遺伝子発現も変動は認められなかった。以上の結果よりタウリンは消化管での胆汁酸組成を変化させることで、消化管の FXR シグナルを減弱させ、FGF15 シグナルを介して肝臓での胆汁酸合成(コレステロール分解)を増加させることが示唆された。この機序がタウリンによるコレステロール低下の機序が実証された。

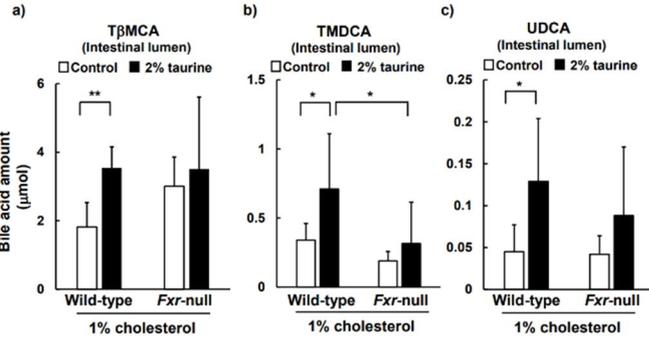


図2. タウリン摂取による小腸管腔内胆汁酸変動

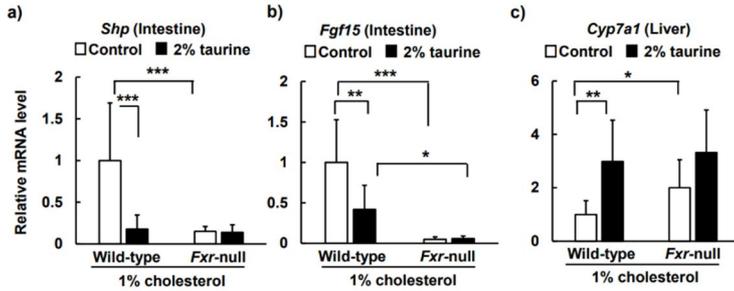


図3. タウリン摂取によるFXR標的遺伝子発現の変動

(3)セレノネイン処理

脂肪性肝疾患に対するセレノネインの効果を明らかにするため、雄性 *Fxr* 欠損マウスに 0.3 mg Se/kg 添加食を 4 か月間摂取させると、肝障害パラメーターの ALT ($p < 0.05$), ALP ($p < 0.05$) 活性がコントロール群に比べ有意に低値を示した(図4)。ALP 活性においては 2 か月目より有意に低値を示した。同様に AST 活性、血中ビリルビンレベル、肝内胆汁酸レベルも有意に低値を示した。肝臓と血餅中のセレンとセレノネイン含量はセレノネイン群で有意に増加した(図5)。肝内の脂質レベルにおいては、セレノネイン群で TG レベル($p < 0.05$)が有意に低値を示し(図6)、肝臓の H & E 染色においても、脂肪滴に由来すると思われる空胞の減少が認められた。肝臓のセレノネインレベルと TG レベルの間に負の相関関係が認められた。肝臓の TC と NEFA においては差異は認められず、血清中の各々の脂質レベルも変動しなかった。肝臓の遺伝子発現解析により、脂肪酸合成に参与する *acetyl-CoA carboxylase 1 (Acc1)* ($p < 0.05$), *stearoyl CoA desaturase 1 (Scd1)* ($p < 0.01$), *fatty acid synthase (Fasn)* ($p < 0.05$) レベルの有意な低下が認められた。以上の結果よりセレノネインは肝臓に蓄積し、肝臓の脂肪酸合成を抑制することにより脂肪肝を改善させるとともに、肝障害レベルも改善させることが示唆された。魚介類の脂質低下作用についてはこれまで魚油成分が注目されて

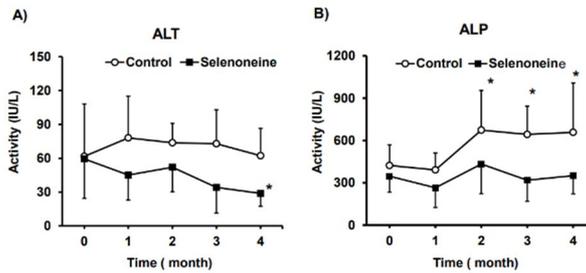


図4. セレノネイン摂取による肝障害マーカーの変動

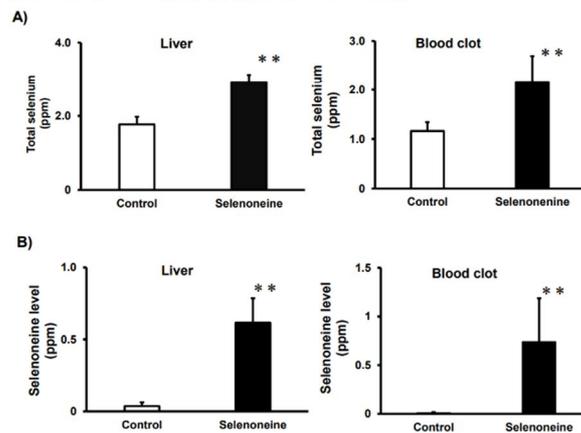


図5. セレノネイン摂取による肝臓と血餅中へのセレノネインとセレンの蓄積

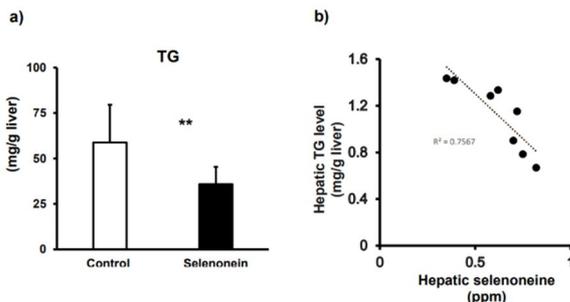


図6. セレノネイン摂取による肝TGレベルの変動とセレノネインレベルとの相関

きたが、本研究によりセレノネインの重要性も示された。

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 2件）

1. 著者名 M. Miyata, T. Tanaka, K. Takahashi, A. Funaki and Y. Sugiura	4. 巻 53
2. 論文標題 Cholesterol-lowering effects of taurine through the reduction of ileal FXR signaling due to the alteration of ileal bile acid composition.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Amino Acids	6. 最初と最後の頁 1523-1532
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00726-021-03068-7.	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 M. Miyata, K. Matsushita, R. Shindo, Y. Shimokawa, Y. Sugiura and M. Yamashita.	4. 巻 12
2. 論文標題 Selenoneine Ameliorates Hepatocellular Injury and Hepatic Steatosis in a Mouse Model of NAFLD	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12061898	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 M. Miyata, A. Funaki, C. Fukuhara, Y. Sumiya and Y. Sugiura	4. 巻 45
2. 論文標題 Taurine attenuates hepatic steatosis in a genetic model of fatty liver disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Toxicol. Sci.	6. 最初と最後の頁 87-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/jts.45.87.	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6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田昌明、進藤龍之介、下川祐太郎、杉浦義正、山下倫明、宮田昌明
2. 発表標題 魚のセレン源のセレノネインは脂肪性肝疾患モデルマウスの肝障害と脂肪肝を軽減する
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮田昌明、田中 知幸、高橋 一帆、船木 萌浩、杉浦 義正
2. 発表標題 小腸胆汁酸組成の変動に起因する小腸FXRシグナルの減弱を介するタウリンのコレステロール低下作用
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松下功暉、進藤龍之介、杉浦義正、世古卓也、山下倫明、宮田昌明
2. 発表標題 魚介類のセレン源であるセレノネインの肝脂質代謝への影響
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮田昌明、進藤龍之介、杉浦義正、山下倫明
2. 発表標題 脂肪性肝疾患モデルマウスにおけるセレノネイン摂取の肝機能への影響
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田昌明、高橋一帆、田中知幸、杉浦義正
2. 発表標題 タウリンのコレステロール低下作用におけるFXRシグナルの役割
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部第56回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田昌明、進藤龍之介、松下功輝、上田裕香子、杉浦義正、山下倫明
2. 発表標題 魚介類のセレン源であるセレノネイン摂取は脂肪性肝疾患モデルマウスの病態を改善させる
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------