

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11740

研究課題名(和文)植物ステロールの効能と毒性における小腸コレステロール排泄機構の役割

研究課題名(英文)Role of TICE in the efficacy and toxicity of plant sterols

研究代表者

田中 裕滋(TANAKA, Yuji)

近畿大学・大学病院・講師

研究者番号：00465650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：過剰な植物ステロールは、生体に動脈硬化性変化や胆汁鬱滞性肝障害などの毒性を引き起こす。血清コレステロールは、胆汁排泄経路以外にTICE(transintestinal cholesterol efflux)により腸管へ直接排泄される。本研究では、植物ステロール含有量の多い植物性油脂や植物ステロールを摂取したラットにおいて胆汁排泄が総胆管結紮により遮断されると、体内に高濃度に蓄積する植物ステロールの毒性から生体を防御するために腸管へ解毒排泄する経路としてTICEが適応して増強したと考えられた。また、小腸のLDLレセプターとAbcg5/g8は、TICEの中心分子の役割を担っている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高濃度の植物ステロールは生体に毒性を引き起こすため、肝臓には植物ステロールを胆汁中に排泄する解毒機構が存在する。一方、小腸には血清中のコレステロールを直接腸管腔へ排泄する機構としてTICEの存在が知られている。これまで生体内に蓄積する植物ステロールの毒性に対するTICEの役割は解明されていない。本研究では、植物ステロールを摂取したラットに総胆管結紮を施行することで胆汁排泄経路を遮断したところ、小腸のLDLレセプターとAbcg5/g8の増加およびTICEの亢進が確認された。これらの結果から、肝臓だけでなく小腸も過剰な植物ステロールの毒性に対して解毒排泄臓器として機能する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Excessive plant sterols cause toxic effects in the body, including atherosclerotic changes and cholestatic liver injury. In addition to the biliary excretion route, serum cholesterol is directly excreted into the intestinal lumen by transintestinal cholesterol efflux (TICE). In the present study, when biliary excretion was blocked by bile duct ligation (BDL) in rats fed phytosterol-rich plant oils or phytosterols, TICE appeared to be adaptively enhanced as a route for detoxification and excretion into the intestinal lumen to protect the body from the toxicity of phytosterols accumulated at high concentrations in the body. In addition, intestinal LDL receptor and Abcg5/g8 may play a central role in TICE.

研究分野：病態代謝学

キーワード：TICE 植物ステロール 総胆管結紮 胆汁鬱滞 毒性 小腸 コレステロールトランスポーター エゼチミブ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小腸におけるコレステロールや植物ステロールの吸収は、ステロール輸送蛋白である NPC1L1 が担っている。コレステロールは小腸上皮細胞に取り込まれたのちカイロミクロンを合成しリンパ管へ流入するが、植物ステロールの多くは ABCG5/G8 によって腸管へ排泄されるため植物ステロールの小腸における吸収は少ない。従来、小腸で吸収された食物由来のコレステロールや肝臓で合成されたコレステロールは肝臓から末梢組織へ輸送され、その後、余剰なコレステロールは各組織から肝臓へ逆輸送されて胆汁中へ排泄される経路が唯一の排泄ルートと考えられてきたが、近年の研究によれば血中から直接腸管腔へコレステロールを排泄する経路 (TICE ; trans-intestinal cholesterol efflux) が小腸に存在することが発見され、小腸がコレステロールを排泄する臓器であることが明らかとなった。我々はラットに魚油を摂取させると糞中コレステロールおよび小腸のステロール排泄を担う Abcg5/g8 の発現が増加することを確認した。このことは食餌成分が TICE に影響を及ぼしている可能性を示唆する。植物性油脂に含まれる植物ステロールを摂取することで高コレステロール血症が改善することが知られている。一方で植物ステロールの生体への毒性に関する知見が報告されている。シトステロール血症という遺伝性疾患では ABCG5/G8 の遺伝子変異があるため小腸で吸収された植物ステロールは、腸管や胆汁中へ排泄されずに血液中に蓄積することで血管壁の動脈硬化プラークが形成される。また、Abcg5 に変異を認める脳卒中易発症性高血圧自然発症ラットを用いた実験で植物ステロール含有量の多い植物性油脂を摂取すると脳卒中発症が早まり寿命が短縮することが報告された。さらには、中心静脈栄養の点滴脂肪製剤では植物ステロールを含有した大豆油由来のものが使用されることが多く、しばしば胆汁鬱滞性肝障害を起こすことがあり、植物ステロールが肝障害の原因の一つと考えられている。これらの植物ステロールの生体への毒性に対して、排泄臓器である小腸における TICE の役割は十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

これまでの報告から植物ステロールにはコレステロール低下作用があることが知られている。一方で過剰な植物ステロールによる動脈硬化性変化や胆汁鬱滞性肝障害などの生体への毒性も明らかになっている。しかしながら、これらの作用あるいは副作用に関して、肝臓や小腸における機序は十分に解明されていない。近年、血中コレステロールの排泄経路として肝臓から胆管を介した経路だけでなく、新規の排泄経路として腸管に直接排泄する経路である TICE が発見された。生理的な状況でも TICE からの排泄コレステロールは約 35% もあり、高脂血症の治療標的になると考えられる。また、胆汁鬱滞などの病態時には、解毒機構を担う臓器として肝臓だけでなく小腸にも代償的な解毒機構の役割があると推測される。そのため、本研究では、植物ステロールの生体への毒性に対する TICE の解毒機構としての役割を明らかにすることを目的とする。まず、植物ステロールの含有量の異なる油脂として大豆油添加食と魚油添加食を摂取させたのち、総胆管結紮 (BDL) モデルを利用して肝臓から胆汁へのコレステロールや植物ステロールの排泄経路を遮断することで体内に植物ステロールが蓄積した際に遠隔臓器である小腸の TICE への影響と小腸上皮細胞におけるコレステロールトランスポーターの発現変動を明らかにする。次に、植物ステロールの含有量が異なる植物性油脂として大豆油添加食とナタネ油添加食、および、それぞれの油脂添加食に植物ステロールを添加した食餌を摂取させたのち BDL を施行し、植物ステロールそのものの TICE や小腸コレステロールトランスポーターの発現への影響を明らかにする。さらには、Abcg5 に変異を認める Wistar-Kyoto ラットを用いることで、BDL 下で植物ステロールの生体内蓄積に伴う毒性に対する TICE や Abcg5/g8 の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、植物ステロールを摂取したラットに BDL を施行することで植物ステロールの胆汁排泄経路を遮断して体内に蓄積する植物ステロールの毒性に対する TICE の役割を明らかにする。

実験 1 : 食餌中の植物ステロールの含有量の異なる油脂を摂取させたのち BDL を施行し、体内に蓄積した成分が TICE および小腸上皮細胞に発現するコレステロールトランスポーターへの影響を明らかにするために 6 週令雄性 SD ラットにおいて、標準飼料 (AIN-93) に準拠して作成した飼料に 10%大豆油; コントロール食、10%魚油、10%大豆油+0.005%エゼチミブ (NPC1L1 阻害剤) を添加した群を作成する。各々の飼料を開始し、4 週間飼育したのち Sham 術と BDL を施行して、72 時間後に血液、肝臓、空腸、および糞を収集する。

(1) Sham Soybean oil (SS) 群; 10%大豆油食を 4 週間+Sham

(2) BDL Soybean oil (BS) 群; 10%大豆油食を 4 週間+BDL

(3) Sham Fish oil (SF) 群; 10%魚油食を 4 週間+Sham

(4) BDL Fish oil (BF) 群; 10%魚油食を 4 週間+BDL

(5) E-Sham Soybean oil (SSE) 群; 10%大豆油食に 0.005%エゼチミブを添加した食餌を 4 週間+Sham

(6) E-BDL Soybean oil (BSE) 群; 10%大豆油食に 0.005%エゼチミブを添加した食餌を 4 週間+BDL

実験 2 : 大豆油添加食と大豆油より植物ステロールの含有量の多い植物性油脂としてナタネ油を

添加した食餌とそれぞれの油脂に植物ステロールを添加した食餌を摂取させたのち BDL を施行し、体内に蓄積した植物ステロールの TICE および小腸上皮細胞に発現するコレステロールトランスポーターへの影響を明らかにするために6週令雄性 Wistar ラットにおいて、標準飼料(AIN-93)に準拠して作成した飼料に 10%大豆油;コントロール食、10%なたね油、10%大豆油+0.5%-シトステロール、10%なたね油+0.5% -シトステロールを添加した群を作成する。各々の飼料を開始し、2週間飼育したのちに Sham 術と BDL を施行して、72 時間後に血液、肝臓、空腸、および糞を収集する。

- (1)Sham Soybean oil(SS)群;10%大豆油食を2週間+Sham
- (2)BDL Soybean oil(BS)群;10%大豆油食を2週間+BDL
- (3)Sham Soybean oil+0.5% -Sitosterol(SSP)群;10%大豆油+0.5%plant sterol(PS)2週間+Sham
- (4)BDL Soybean oil+0.5% -Sitosterol(BSP)群;10%大豆油+0.5%PS 2週間+BDL
- (5)Sham Rapeseed oil(SR)群;10%なたね油食を2週間+Sham
- (6)BDL Rapeseed oil(BR)群;10%なたね油食を2週間+BDL
- (7)Sham Rapeseed oil+0.5% -Sitosterol(SRP)群;10%なたね油+0.5%PS 2週間+Sham
- (8)BDL Rapeseed oil+0.5% -Sitosterol(BRP)群;10%なたね油+0.5%PS 2週間+BDL

実験3: Abcg5 に変異を認める6週令雄性 Wistar-Kyoto(WKY)ラットにおいて、大豆油より植物ステロール含有量が多いなたね油、およびなたね油に植物ステロールを添加した食餌を摂取させたのち BDL を施行し、体内に蓄積した植物ステロールの TICE および小腸上皮細胞に発現するコレステロールトランスポーターへの影響と Abcg5/g8 の役割を解明するために標準飼料(AIN-93)に準拠して作成した飼料に 10%なたね油;コントロール食、10%なたね油+0.5% -シトステロールを添加した群を作成する。各々の飼料を開始し、2週間飼育したのちに実験2と同様に手術しサンプルを収集する。

- (1)Sham Rapeseed oil WKY rat(SRW)群;10%なたね油食を2週間+Sham
- (2)BDL Rapeseed oil WKY rat(BRW)群;10%なたね油食を2週間+BDL
- (3)Sham Rapeseed oil+0.5% -Sitosterol WKY rat(SRPW)群;10%なたね油+0.5%PS 2週間+Sham
- (4)BDL Rapeseed oil+0.5% -Sitosterol WKY rat(BRPW)群;10%なたね油+0.5%PS 2週間+BDL

実験1~3において解析する項目

血液検査;オートアナライザーによる測定

肝脂質と糞中脂質;Folch 法による脂質抽出と酵素法にて測定

肝と空腸のコレステロール代謝関連遺伝子の mRNA 発現定量;リアルタイム PCR 法

#### 4. 研究成果

実験1: Sham 各群に比較して、BDL により 血清コレステロールの上昇を認め、TICE を反映する糞中コレステロールは BS 群で増加したが、BF 群と BSE 群では増加しなかった。肝 Abcg5/g8 は BDL により減少した。肝 Abca1 と小腸 Abcg5/g8 は BS 群で誘導されたが、BF 群と BSE 群では誘導されなかった。エゼチミブは BS 群における肝 Abca1 の誘導を抑制し、小腸 Abcg8 の誘導を抑制する傾向であった。TICE に関連している可能性がある LDL レセプターや SR-B1 では群間に差は認められなかった。これらの結果から、BDL 下では、大豆油に含まれる毒性物質の蓄積から生体を防御するために TICE が適応的に増強している可能性が示唆された。

実験2: BDL により血清ビリルビンと GT の上昇を認めたが、BSP 群に比較して BRP 群で抑制されていた。糞中コレステロールは Sham 群では SS 群と SR 群に比較して SSP 群と SRP 群で著明に増加していた。一方、BDL により胆汁排泄ルートが閉ざされるため、糞中コレステロールは SSP 群に比較して BSP 群では低下したが、SS 群、SR 群、SRP 群に比較して BS 群、BR 群、BRP 群の各群では抑制されなかった。BDL 群間での比較では、BSP 群や BR 群と比較して BRP 群では増加していた。肝臓では SS 群と SR 群に比較して SSP 群と SRP 群で LXR と Abcg5/g8 の増加を認めた。Abca1 は Sham 各群に比較して BDL 全群で増加していた。BSP 群と BR 群に比較して BRP 群で HMGCoAR の増加を認めた。小腸では SS 群に比較して SSP 群で LXR と Abcg5/g8 の増加を認め、SR 群では加えて LDL レセプターの増加も認めた。LDL レセプターは Sham 各群に比較して BS 群、BSP 群、BR 群で増加した。Abcg5/g8 は Sham 各群に比較して BSP 群と BR 群で低下したが、BS 群と BRP 群では低下しなかった。以上の結果から、Sham 群では植物ステロールにより TICE より胆管ルートから優位にコレステロールが排泄されることが示唆された。BDL 群では小腸の LDL レセプターと Abcg5/g8 の TICE への関与が示唆された。

実験3: WKY ラットにおいて、SRPW に比較して BRPW で小腸 Abcg5/g8 の低下と LDL レセプターの増加および糞中コレステロールの低下が認められたが、実験2の Wistar ラットにおいては SRP に比較して BRP で同様の変化は認められなかった。

本研究の結果から、BDL 下では、植物ステロールが高濃度に蓄積する毒性から生体を防御するために腸管腔へ解毒排泄する経路として TICE が適応して増強したと考えられた。TICE を担う中心分子としては、小腸の LDL レセプターや Abcg5/g8 の関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中裕滋, 上裕俊法
2. 発表標題 油脂成分の体内蓄積が小腸コレステロール排泄機構に及ぼす影響-大豆油と魚油の比較
3. 学会等名 第62回日本栄養・食糧学会 近畿支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuji Tanaka, Toshinori Kamisako
2. 発表標題 Differential regulation of intestinal sterol efflux transporters and non-biliary cholesterol excretion by dietary oil in bile duct-ligated rats.
3. 学会等名 The Society of Toxicology (SOT) 63rd Annual Meeting and ToxExpo (国際学会)
4. 発表年 2024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	上裕 俊法  (KAMISAKO Toshinori)  (20233934)	近畿大学・大学病院・教授    (34419)	

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