

令和 7 年 6 月 11 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K08662

研究課題名（和文）胆汁酸・脂質エステル体産生に寄与する腸内細菌叢同定と生理学的作用機序の探索

研究課題名（英文）Identification of intestinal microbiota that contribute to bile acid and lipid ester production and exploration of physiological mechanisms

研究代表者

鈴木 光幸（Suzuki, Mitsuyoshi）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90449059

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：糞便中には非共有結合型に加え、鹸化可能な胆汁酸（BA）が存在し、その一部は脂肪酸とエステル結合したイソ型BA（FA-isoBA）であることが明らかとなった。分析標準物質の合成とLC/MS解析により、FA-isoBAsは2歳以降のヒト糞便中に常在し、特にC16・C18鎖が優勢であることが判明した。また、FA-isoBAの一種であるLinoleoyl-isoLCAは炎症性サイトカイン産生を抑制し、短鎖FA-isoBAsは腸管ホルモンGLP-1の分泌促進およびTGR5受容体活性を示した。今後はその生理作用や産生菌の同定を進める。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、これまで定量が困難であった糞便中の脂肪酸エステル型イソ胆汁酸（FA-isoBAs）を世界で初めて非鹸化のまま定量し、その存在実態と生理作用を明らかにした点にある。FA-isoBAsは年齢を問わず存在し、炎症性サイトカインの抑制、GLP-1分泌促進、TGR5活性化など多様な生理機能を有することが示された。また、FA-isoBAsが腸内細菌由来の内因性リガンドとして機能する可能性を初めて示し、腸内代謝物を基盤とした新たな疾患予防・治療法の開発につながる重要な知見を提供した。

研究成果の概要（英文）：Fecal matter contains non-covalently bound bile acids (BAs) as well as saponifiable BAs, and it has been revealed that some of these are iso-type BAs (FA-isoBAs) esterified with fatty acids. Through the synthesis of analytical standards and LC/MS analysis, it was determined that FA-isoBAs are present in human feces from the age of 2 years onwards, with C16 and C18 chains predominating. Furthermore, one type of FA-isoBA, linoleoyl-isoLCA, was found to inhibit the production of inflammatory cytokines, while short-chain FA-isoBAs demonstrated a promotion of GLP-1 secretion and TGR5 receptor activity. Future studies will focus on elucidating their physiological effects and identifying the bacteria responsible for their production.

研究分野：小児科学

キーワード：便中胆汁酸 胆汁酸脂肪酸エステル 腸内細菌叢 GLP1

### 1. 研究開始当初の背景

胆汁酸は、主に脂質の消化吸収を助ける消化液の成分であり、肝臓でコレステロールから複数の酵素反応を経て合成され、食事に伴って胆嚢から十二指腸へ分泌される。近年、胆汁酸は単なる消化液成分にとどまらず、代謝や免疫などの多様な生理機能に関与することが明らかとなってきた。特に、回腸で再吸収されず大腸に到達した胆汁酸は、腸内細菌により脱抱合、脱水素化、脱水酸化、エピマー化などの代謝を受け、リトコール酸 (LCA) やデオキシコール酸 (DCA) といった二次胆汁酸へと変化する。これら胆汁酸の代謝分析は、従来は誘導体化や脱抱合などの前処理を必要としたが、近年の LC-MS/MS 技術の発展により、非誘導化のまま精密な分析が可能となった。この技術を用いた研究により、特定の腸内細菌がフェニルアラニンやロイシンなどのアミノ酸と結合した新規の抱合型胆汁酸を産生し、これらが炎症性腸疾患や嚢胞性線維症といった疾患と関連し、FXR アゴニストとして宿主に影響を及ぼすことが示されている。さらに我々の研究では、長寿者の便中に特異的に存在する isoallo-LCA が、多剤耐性菌に対して強力な抗菌活性を示すとともに、制御性 T 細胞 (Treg) の分化を促進する免疫調節機能を有することが明らかとなった。加えて、LC-MS/MS による詳細な胆汁酸分析により、腸内に存在する iso-LCA および iso-DCA の一部が脂肪酸と結合していることが新たに見出された。腸内で産生される短鎖脂肪酸は腸内細菌の代謝産物として知られ、遊離脂肪酸受容体 (FFARs) を介して宿主の代謝に影響を与える。中・長鎖脂肪酸も同様に、FFAR1 や FFAR4 を介してインスリンやインクレチンの分泌に関与することが知られている。便中でのみ確認された胆汁酸・脂肪酸エステル体は、特定の腸内細菌群により産生されると推定され、これらが新たな内因性リガンドとして宿主のエネルギー代謝や免疫応答に関与している可能性があるかと我々は考え、本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 胆汁酸・脂肪酸エステル体を産生する腸内細菌叢の同定と、(2) それらが宿主のエネルギー代謝および免疫機能に与える影響の解明である。リトコール酸 (LCA) やデオキシコール酸 (DCA) は、腸内細菌により産生される二次胆汁酸であり、特に LCA は吸収されにくく、下部腸管で局所的に作用することが知られている。脂肪酸受容体 (FFAR) 群は、さまざまな脂肪酸を認識する生体センサーとして機能し、とりわけ FFAR4 は大腸などに発現しており、代謝疾患への関与が注目されている。また、高脂肪食により LCA や DCA の腸内濃度が上昇し、これが炎症や発がんリスクと関連することも報告されている。しかしながら、iso-LCA や iso-DCA と脂肪酸が結合した「胆汁酸・脂肪酸エステル体」の存在やその生理的意義については、これまで明らかにされてこなかった。本研究では、これら新規化合物の生理機能および作用機序を明らかにすることで、腸疾患や生活習慣病に対する新たな治療戦略の構築を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 脂肪酸と isoLCA または isoDCA との結合体である胆汁酸・脂肪酸エステル体 10 種 (表 1) について、新生児から成人までの便中濃度を LC-MS/MS で測定し、年齢に伴う変動を明らかにする。

(2) マウスマクロファージ RAW264.7 細胞を用いて、FA-isoBAs の抗炎症作用について検討した。12 穴培養プレートに RAW264.7 細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells で播種し、48 時間培養した。その後、GW9508 (遊離脂肪酸受容体 Ffar4 のリガンド)、リノール酸、LCA、iso-LCA、Linoleoyl-isoLCA を用いて 1 時間処理した後、Escherichia coli 由来リポ多糖 (LPS) を添加し、24 時間後に上清および細胞を回収した。上清中の炎症性サイトカイン濃度 (IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 など) を測定し、細胞溶解液から cDNA を作成し、各種サイトカインの mRNA 発現量を解析した。

(3) 腸管内分泌細胞株である STC-1 細胞を用いて、主要な胆汁酸・脂肪酸エステル体の添加が GLP-1 産生に与える影響を評価した。STC-1 細胞を 12 ウェルプレートに  $6 \times 10^3$  cells/mL の濃度で播種し、37°C、5% CO2 条件下で 72 時間培養した。培養後、脂肪酸胆汁酸エステル体を最終濃度  $10 \mu\text{M}$  で添加し、1 時間後に培養上清を回収した。得られた上清は、Wako 社製 GLP-1 ELISA Kit を用いて 10 倍に希釈し、GLP-1 濃度を測定した。

(4) 胆汁酸受容体 TGR5 に対する活性を評価するため、ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞を 96 ウェルプレートに  $3.0 \times 10^4$  cells/well で播種し、cAMP 応答性 Firefly luciferase レポーター、Renilla luciferase コントロールベクター、およびヒト TGR5 発現ベクターを共に形質導入した。形質導入から 16 時間後、各種脂肪酸胆汁酸エステル体、胆汁酸、または脂肪酸を種々の濃度で処理 (処理時間 5 時間)、各ルシフェラーゼ活性を測定した。Firefly luciferase 活性は Renilla luciferase 活性で補正し、Banyu 社製 TGR5 アゴニスト ( $0.1 \mu\text{M}$ ) 処理時の活性に対する相対活性 (Relative Luciferase Activity, %) として示した。

(表 1) 新たに同定された胆汁酸・脂肪酸エステル体

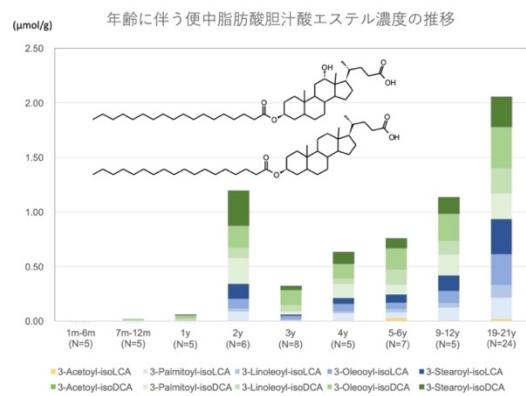
1.	3-Acetoxy-isoLCA
2.	3-Palmitoyl-isoLCA
3.	3-Linoleoyl-isoLCA
4.	3-Oleoyl-isoLCA
5.	3-Stearoyl-isoLCA
6.	3-Acetoxy-isoDCA
7.	3-Palmitoyl-isoDCA
8.	3-Linoleoyl-isoDCA
9.	3-Oleoyl-isoDCA
10.	3-Stearoyl-isoDCA

#### 4. 研究成果

##### (1) 年齢に伴う胆汁酸・脂肪酸エステル体の変動

脂肪酸抱合イソ型胆汁酸 (FA-isoBAs) が2歳から成人まで常に存在しており、C16 および C18 鎖の FA-isoBA エステルが年齢に関係なく優勢であることも判明した。FA-isoBA 濃度は糞便中の FA 濃度と相関がなく、FA-isoBA を持たない成人も存在することが示唆された (図 1)。本研究はヒト糞便中の脂肪酸エステル化胆汁酸を鹸化せずに初めて定量化したことが特筆すべき点である。

図 1



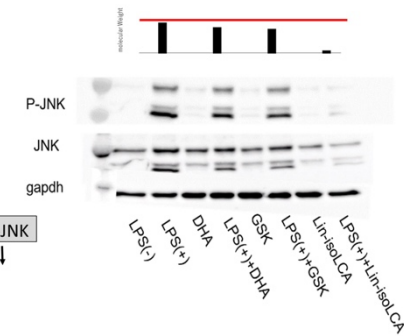
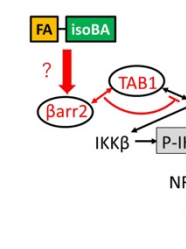
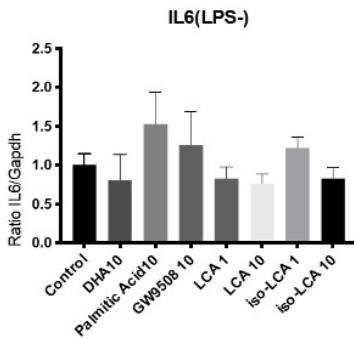
##### (2) 抗炎症作用の検討

RAW264.7 細胞において、Linoleic acid または isoLCA を単独で処理した場合と比較して、Linoleoyl-isoLCA を添加すると、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が有意に抑制された。この結果は、FA-isoBA の一種である Linoleoyl-isoLCA が腸管内で抗炎症作用を発揮する可能性を示唆している (図 2)。また、この抗炎症作用のメカニズムとして、TAK1 を介した炎症反応経路が関与している可能性が示されており、現在その詳細な作用機序について検討を進めている (図 3-1, 3-2)。

図 2

図 3-2

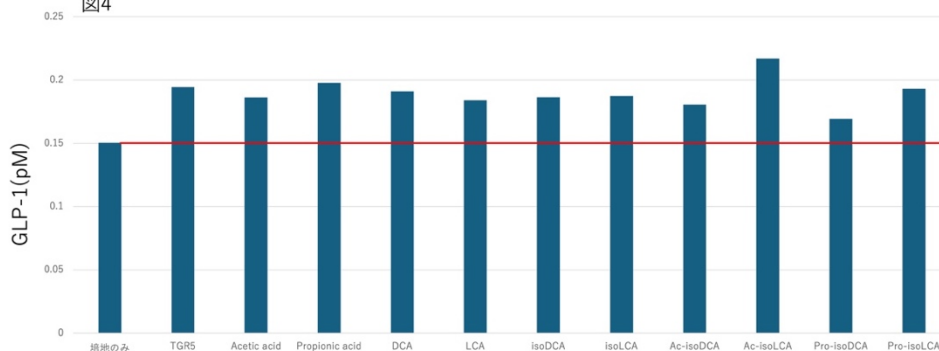
図 3-2



##### (3) 生理学的機能の検討

STC-1 細胞に FA-isoBA を添加して GLP-1 分泌への影響を検討した結果、炭素鎖が短い Ac-isoLCA の添加により GLP-1 産生が有意に上昇することが確認された (図 4)。

図 4



##### (4) 内分泌機能に影響を与えるメカニズムの解明

4 種の胆汁酸に TGR5 アゴニスト活性が認められ、とくにリトコール酸 (LCA) は最も低い EC<sub>50</sub> 値を示した。評価した 12 種の脂肪酸胆汁酸エステル体のうち、炭素鎖が短い Ac-isoLCA、Pro-isoLCA、Ac-isoDCA および Pro-isoDCA に TGR5 活性が認められた。

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 1件）

1. 著者名 Takei H, Narushima S, Suzuki M, Kakiyama G, Sasaki T, Murai T, Yamashiro Y, Nittono H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of long-chain fatty acid-linked bile acids: a major conjugation form of 3 - hydroxy bile acids in feces	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Lipid Res	6. 最初と最後の頁 100275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jlir.2022.100275	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 Suzuki Hiromi, Suzuki Mitsuyoshi, Jimbo Keisuke, Hibio Musashi, Sasaki Takahiro, Murai Tsuyoshi, Yamashita Yukiko, Une Mizuho, Ogawa Shojiro, Okamoto Toru, Narushima Seiko, Suda Wataru, Kakiyama Genta, Matsuyama Taka-aki, Takei Hajime, Nittono Hiroshi	4. 巻 566
2. 論文標題 Fecal fatty acid-linked bile acid profiles in pediatric patients with ulcerative colitis	5. 発行年 2025年
3. 雑誌名 Clinica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 120060 ~ 120060
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cca.2024.120060	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武井 一、成島 聖子、鈴木 光幸、神保 圭佑、日比生 武蔵、佐々木 隆浩、村井 毅、山下ユキコ、小川 祥二郎、宇根瑞穂、入戸野 博
2. 発表標題 胆汁酸・脂肪酸胆汁酸エステルの同時測定法を用いた小児潰瘍性大腸炎患者の便中分析
3. 学会等名 第44回胆汁酸研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平井沙依子、鈴木光幸、成島聖子、佐々木隆浩、村井毅、武井一、入戸野博、清水俊明
2. 発表標題 脂肪酸胆汁酸エステルはLPS誘導炎症反応を抑制する -RAW264.7細胞
3. 学会等名 第43回胆汁酸研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井口裕介、山下ユキコ、村井毅、佐々木隆浩、槇島誠、石澤通康、鈴木光幸、平井沙依子、武井一、入戸野博、宇根瑞穂
2. 発表標題 脂肪酸胆汁酸エステルの核内受容体に対するリガンド活性評価
3. 学会等名 第45回胆汁酸研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 菱沼知美、鈴木光幸、武井一、入戸野博、岡本徹
2. 発表標題 胆汁酸-脂肪酸エステル体の病原細菌に対する抗菌効果
3. 学会等名 第45回胆汁酸研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 相原久人、鈴木光幸、鈴木裕美、日比生武蔵、神保圭佑、成島聖子、須田互、佐々木隆浩、村井毅、武井一、入戸野博
2. 発表標題 LC/MSによる小児潰瘍性大腸炎の便中脂肪酸胆汁酸エステル化合物の分析
3. 学会等名 第38回日本小児脂質研究会
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	成島 聖子  (Narushima Seiko)  (80578336)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・ 上級研究員   (82401)	

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