

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380071

研究課題名(和文)胆汁を介さない新たなコレステロール排泄機構の解明と食品成分による制御

研究課題名(英文) Studies on biliary and non-biliary pathways of cholesterol excretion and its regulation by food factors

研究代表者

池田 郁男 (Ikeda, Ikuo)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40136544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：体内からのコレステロール(Chol)排泄に関わる胆汁と非胆汁経路を別々に測定する方法をラットを用いて確立し、両経路のChol排泄量を測定した。一晚絶食では摂食ラットに比べ胆汁へのChol排泄は約2倍となったが、非胆汁経路での排泄は減少した。LXR agonistを投与すると、非胆汁経路のChol排泄のみが増加し、胆汁経路は増加しなかった。高Chol食摂取では胆汁及び非胆汁経路の両方が増加した。これらの変化はChol排泄に関わるABCG5/G8の発現では必ずしも説明できなかった。従って、胆汁及び非胆汁経路のChol排泄がどのように調節されているかを明らかにするには、更なる検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We tried to establish an experimental method to compare biliary and non-biliary excretion of cholesterol in rats. Cholesterol excretion through bile in overnight fasting rats was about two times higher than that in the feeding rats. Cholesterol excretion through non-biliary pathway was lower in the fasting rats compared with the feeding rats. The administration of LXR agonist increased non-biliary cholesterol excretion, but not biliary cholesterol excretion. Both biliary and non-biliary cholesterol excretion were increased in the feeding of a high cholesterol diet. These changes in biliary and non-biliary cholesterol excretion could not be necessarily explained by the mRNA expression of ABCG5 and ABCG8. Therefore, more studies are necessary to establish mechanisms of the regulation of cholesterol excretion through biliary and non-biliary pathways.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：コレステロール 胆汁 非胆汁 小腸内腔 コレステロール排泄 ABCG5/ABCG8 胆汁酸

1. 研究開始当初の背景

コレステロールは動脈硬化性心疾患発症に関連しており、コレステロール代謝調節機構の解明は、ひいては心筋梗塞や脳梗塞の予防に繋がる重要な基礎研究となる。生体内に存在するコレステロールは食事コレステロールからの吸収および体内での生合成により供給される。一方、体内コレステロールは主に胆汁に分泌され、その約 50%は糞便へ排泄されると見積もられている。大動脈壁のマクロファージや末梢組織に蓄積し余剰となったコレステロールは血中の高密度リポタンパク質 (HDL) に渡され、いわゆる「コレステロール逆転送」により肝臓へ戻ったのち、胆汁を経由して排泄されると考えられており、この経路は動脈壁へのコレステロールの沈着を防ぎ、動脈硬化症を防止する極めて重要な経路と考えられている。しかし、最近のいくつかの研究で、胆汁へのコレステロール排泄が障害されている条件でも、糞便へのコレステロール排泄がそれほど低下しないことなどから、胆汁経路以外のコレステロール排泄経路 (非胆汁経路) が存在することが示唆され、いくつかの報告が成されている。しかしながら、非胆汁経路からのコレステロール排泄に関しては十分な研究は行われておらず、未知の部分が多く残している。この経路を解明することは、動脈硬化性心疾患発症機構の解明に繋がる可能性があり、この疾患の予防あるいは治療に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、体内からのコレステロール排泄の主要経路と考えられる胆汁経路と、これまでほとんど研究されてこなかった、胆汁経路以外に小腸内腔へ排泄される非胆汁経路を別々に測定する試験方法を確立し、いくつかの食事条件下で両経路からのコレステロール排泄がどのように変化するかを探ることで、コレステロール排泄系の調節機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

非胆汁経路でのコレステロール排泄を調べたほとんどの研究はマウスを用いて行われている。我々は長年ラットを用いて、コレステロールの吸収、排泄機構を調べてきた。従って、ラットで非胆汁経路でのコレステロール排泄を調べることは、これまでの研究結果との比較が可能となる。そこで、我々はラットを用いて研究することとした。しかし、ラットでの非胆汁経路のコレステロール排泄を調べる方法は確立されていない。そこで、まず、試験方法の確立を行うこととした。

(1) 胆汁を介するおよび介さないコレステロール排泄の試験法の確立

雄性 SD ラットを用いて、実験方法の確立を行った。多くの予備試験を行った結果、体重 400g 以上のラットでないと、試験が難し

いことが分かった。さらに種々の予備試験を実施し、最終的に以下に述べる方法で試験を行うこととした。

ラットはソムノペンチル麻酔下開腹し、まず胆管にカニューレを挿入、胆汁を迂回し、胆汁回収用とした。次に、十二指腸最上部より洗浄液および胆汁酸含有液流入用のチューブを挿入し、回腸最下部には流出用のチューブを挿入した。流入用チューブから洗浄用に生理食塩水 100mL を注入し、小腸内容物を流出用チューブから流出させ、小腸内腔を洗浄した。その後、胆汁酸含有液を 20mL 注入し小腸内腔を満たし、流出用チューブは塞いだ (予備試験の結果、以下の速度で胆汁酸含有液を注入しても、回腸の流出用チューブからは全く流出しないことが確認されたことから、塞ぐこととした)。腹部を縫合し、直ちに、胆汁酸含有液を 3mL/hr で連続注入した。胆汁は経時的に採取した。一定時間後に麻酔し採血後、小腸全体を取り出し、胆汁酸含有液を小腸内腔に注入することで、小腸内腔液を集めた。胆汁中のコレステロール量は、胆汁経路のコレステロール排泄とし、小腸内腔液に含まれるコレステロールは非胆汁経路のコレステロール排泄とした。実験開始当初は生存率が低かったが、手術の成熟と共に、生存率は上昇し、死亡することはほとんどなくなった。

飼育飼料：飼料は、実験法確立時には市販固形飼料を用いたが、飼育試験では、基本的に対照食として AIN93G 食を用いた。その他の摂食条件は、以下の結果と共に記した。

(2) 半永久胆管カニューレーション法の試験

上記の試験法とは別に、一日当たりどれだけのコレステロールが胆汁に排泄されるのかを把握するための試験法の検討を行った。1 日当たりどれだけの胆汁が分泌されるのかを測定することは、通常ではかなり困難である。胆管にカニューレを挿入し、連続的に胆汁を採取することは容易であるが、この方法では、胆汁酸が体外に失われるため、経時的に胆汁中の胆汁酸濃度が低下し、到底生理的な測定とは言いがたい。そこで、ラットに半永久胆管カニューレーション法を施し、一定時間ごとに、少量の胆汁を集めコレステロール量を測定することで、24 時間のコレステロール分泌量を推定する方法を確立することを試みた。しかしながら、以下の点において、大きな問題があり、最終的に方法を確立することはできなかった。

もっとも大きな問題は、半永久胆管カニューレーション手術終了後、血流に胆汁が遺漏しており、採取した胆汁がどの程度生理的な分泌量なのかが分からない点であった。半永久胆管カニューレーションの手法がいくら上達しても、胆汁の遺漏は改善しなかった。半永久胆管カニューレーション法では、胆管に挿入したカニューレを頭頂部から露出させ、胆汁を集める時だけ採取用のチューブを連結さ

せる。そのチューブの先端は胆管のカニューレの位置よりも下げて、サイホンの原理で胆汁を集めるが、頭頂部が胆管のカニューレの位置よりも高い位置にあるので、一定の負荷がかかるようであり、そのため、肝臓へ圧力がかかり、血中へ胆汁が遺漏していると推察された。この点に関しては、どうしても改善点が見つからず、実験を断念せざるを得なかった。

(3) 分析

コレステロールの定量分析は、コレステロールを TMS 化後、経費で購入した GC を用いて行った。また、胆汁酸は酵素法を用いた。遺伝子発現量は real time PCR を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 胆汁および非胆汁経路からのコレステロール排泄の経時的変化

試験方法を確立する段階では、小腸内容物をできるだけ減らすため、一晚絶食後に手術を行った。これは、手術法の検討開始時には、小腸内容物が多いと、それを流出されることが困難であったことによる。ある程度手術法が確立し、非胆汁経路のコレステロール排泄量が、胆汁経路に匹敵する程度は存在することが明らかとなった。そこで、胆汁経路および非胆汁経路のコレステロール排泄が経時的に増加するかを検討した。

その結果、胆汁経路ではコレステロール排泄は、経時的に直線的に増加した。しかし、非胆汁経路では、2、4、6 時間と経時的に屠殺し、小腸内容物を分析したが、経時的増加が認められなかった。この試験は再度繰り返したが、やはり、経時的には増加しなかった。

この原因として、手術前にラットを一晚絶食させているため、コレステロール排泄が弱まった可能性が考えられたので、摂食状態での手術の検討を開始した。摂食状態では、小腸内容物が多いため、流出用チューブに工夫を施し、試験方法を確立した。そこで、まず、以下の試験を行った。

(2) 絶食および摂食の影響

ラットに AIN93G 食を 1 週間与え、絶食群では、ラットを前夜の 20 時から絶食し、摂食群では自由摂取させて、朝から手術を行った。4 時間後に小腸内容物および胆汁の分析を行った。

その結果、胆汁及び小腸内容物の合計の総コレステロール排泄量には差がなかった(図 1)。胆汁への排泄量は、絶食群では、摂食群の 2 倍近く高かった。一方、胆汁を介さない小腸内容物でのコレステロール量は、摂食群で 1.5 倍高かった。結果的に、絶食群ではコレステロール排泄量の 47% が非胆汁経路で排泄されたのに対して、摂食群では、71% に増加した。従って、非胆汁経路でのコレステロール排泄は、絶食時よりも摂食時で高いことが明らかとなったが、一方、胆汁への排泄

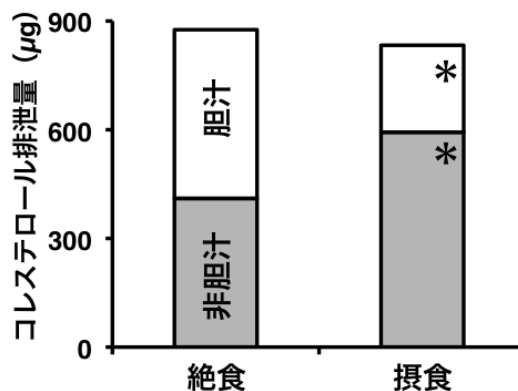


図1. 胆汁および非胆汁経路でのコレステロール排泄に及ぼす絶食、摂食の影響

n=6

*: P<0.05 vs 絶食群

はその逆となることも明らかとなった。

糞便は手術前の 2 日間で集めて分析した。4 時間あたりで換算すると、コレステロール排泄量は、絶食群で 1000µg 程度、摂食群で 790µg 程度であった。この数字は、胆汁および非胆汁経路の合計にある程度近似した(図 1)。

以上の結果を踏まえて、摂食条件下での非胆汁経路のコレステロール排泄の経時的変化を調べた。しかしながら、0 時間よりも 2 時間、4 時間では、排泄量は増加したが、2 時間と 4 時間では差がなく、経時的増加が認められなかった。以上のことから、非胆汁経路での経時的なコレステロール排泄増加が認められないのは、絶食、摂食の影響ではなく他の要因が関与すると考えられた。

(3) Liver X Receptor(LXR)アゴニストの影響

LXR アゴニストは、小腸及び肝臓のコレステロール排泄に関わる ATP-binding cassette transporter (ABC)G5/G8 の発現を亢進することが知られており、胆汁および非胆汁経路のコレステロール排泄に影響する可能性がある。そこで、AIN93G 食を与えた SD ラットにアゴニストを 1 週間 5mg/kg 体重で毎日与え、一晚絶食した後手術を行った。4 時間後に採血屠殺し、小腸内容物および胆汁分析を行った。また、手術前に糞便を 2 日間採取した。その結果、胆汁および非胆汁経路の合計の総コレステロール排泄量は、LXR アゴニスト投与で有意に高く、1.4 倍増加した(図 2)。この増加は、小腸内容物すなわち非胆汁経路のコレステロール排泄に増加によるものであり、1.9 倍の増加が見られたが、胆汁経路でのコレステロール排泄量はアゴニスト投与の影響はなかった。これまでに、アゴニスト投与により、肝臓および小腸の ABCG5/G8 の発現が増加することを観察しており、コレステロール排泄能力は肝臓、小腸共に増加しているはずである。しかし、胆汁へのコレステロール排泄が増加しなかったことは、コレ

ステロール排泄が ABCG5/G8 だけに依存しているわけではないことを示唆した。

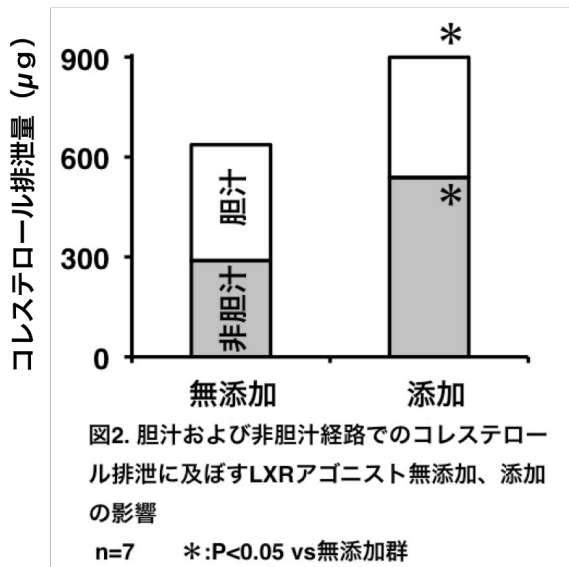


図2. 胆汁および非胆汁経路でのコレステロール排泄に及ぼすLXRアゴニスト無添加、添加の影響

糞便への4時間あたりのコレステロール排泄量は、アゴニスト非投与群で1000μg程度、投与群で1100μg程度であり、有意差がなかった。すなわち、LXRアゴニストは、糞便へのコレステロール排泄を高めるほどには、コレステロールを排泄していないことが示唆された。また、胆汁および非胆汁経路の排泄量の合計よりも高値であり、この排泄の傾向は必ずしも糞便の排泄量とは一致しなかった。

次に、LXRアゴニストを投与し、コレステロール排泄が刺激された条件下で、非胆汁経路でのコレステロール排泄量の経時的変化を調べた。その結果、0時間に対して、3および6時間で高い値となった。3時間よりも6時間で高い傾向にあったものの、有意差は認められなかった。このように、非胆汁経路でのコレステロール排泄の経時的変化を、いくつかの条件で調べたが、有意な増加は認められなかった。この原因は、明確ではないが、小腸内腔へ分泌されたコレステロールが、内腔から再び吸収されているため増加が起こらない可能性が考えられた。もしこのことが正しいとすると、結果に重大な影響をもたらす。再吸収を防止すれば、非胆汁経路のコレステロール排泄量はもっと多いと考えられる。しかし、本試験方法では、再吸収を防止することは困難であり、別の試験方法を検討する必要がある。

(4) 高コレステロール食の影響

高コレステロール食により、コレステロールの吸収量が高まり、肝臓にコレステロールが蓄積することが知られている。コレステロールから生じる酸化物はLXRの刺激剤として作用し、ABCG5/G8の発現を亢進すると考えられる。従って、コレステロールの蓄積はコレステロール排泄系を刺激するはずである。そこで、AIN93G食にコレステロールを

0.5%添加し、2週間飼育した。最終日、絶食せずに手術を行い、4時間のコレステロール排泄量を測定した。また、手術前に糞便を2日間採取した。その結果、胆汁および非胆汁経路の両方で、コレステロールの排泄量は増加した。いずれも約1.5倍の増加であった(図3)。コレステロール無添加および添加群で、コレステロールの排泄の約2/3が非胆汁経路で1/3は胆汁経路であった。高コレステロール食による排泄量の増加は4時間あたりで300μg程度であった。

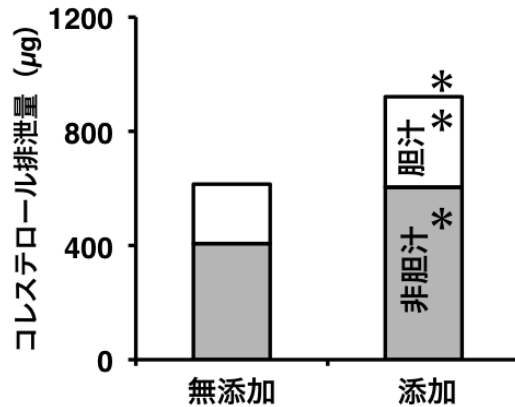


図3. 胆汁および非胆汁経路でのコレステロール排泄に及ぼすコレステロール無添加、添加の影響

n=6 or 7 * : P<0.05 vs 無添加群

糞便へのコレステロール排泄は4時間あたりでコレステロール無添加群で1200μg程度、コレステロール添加群では、15000μg程度であった。無添加群では、胆汁および非胆汁経路の合計の2倍近い値となった。一方、コレステロール添加群では15倍程度となった。コレステロール食では、約50%が吸収され残りは排泄されるため、食事コレステロールの排泄分があり、大きな違いとなったと考えられた。従って、高コレステロール食により増えたコレステロール排泄量300μgは、摂取した食事コレステロールと比較すると、わずか1-2%程度であり、吸収された量と比較すると排泄増加は微々たる量であることが明らかとなった。

(5) 各種食事のコレステロール吸収関連たんぱく質の mRNA 発現への影響

肝臓においては、摂食と比較して絶食では、ABCG5/G8 mRNA 発現は高かった。一方、高コレステロール食では、ABCG5 mRNA のみ高く、ABCG8 は変化しなかった。

空腸では、絶食、摂食および高コレステロール食でハウスキーピング遺伝子の大きな変動が見られた。特に、高コレステロール食では、測定した4つのハウスキーピング遺伝子がいずれも大きく低下した。これらのことから、空腸では、遺伝子発現量の定量的評価が極めて困難であった。

絶食、摂食との比較では、変動しなかった

ハウスキーピング遺伝子で補正した結果、ABCG5/G8mRNA 発現は変化しないと考えられた。一方、高コレステロール食では、ABCG5/G8mRNA 発現量は、補正無しでは変化しなかった。しかし、測定したすべてのハウスキーピング遺伝子が低下したため、これらいずれで補正しても高値となった。これらのことから、高コレステロール食で ABCG5/G8mRNA 発現量が増加するかどうかは判断できなかった。なお、LXR アゴニスト投与では、肝臓、空腸共に ABCG5/G8 の発現は増加することを以前の研究で示している。

(6) 考察

本試験では、試験した3つの条件で、胆汁および非胆汁経路の排泄量は異なる変化を示した。これまでに、ABCG5/G8 は肝臓から胆汁へ、小腸上皮細胞から小腸内腔へコレステロールを排泄することが知られているが、どのように調節されているかは明らかになっていない。絶食では、肝臓の ABCG5/G8mRNA の発現が増加する。今回の試験では、絶食で胆汁へのコレステロール排泄量は増加したことから、発現増加がコレステロール排泄量に影響した可能性が考えられる。しかし、小腸では、発現は変化しなかったにもかかわらず、コレステロール排泄量は減少しており、発現量と排泄は連動しないことは明らかである。このことは LXR アゴニストで ABCG5/G8 の発現を上昇させても、非胆汁経路のコレステロール排泄は増加したものの、胆汁への排泄は増加しなかったことでも示された。高コレステロール食では大量のコレステロールの流入に対して、胆汁、非胆汁経路共に排泄は増加した。しかし、その量は吸収量に対して極めて微量であり、吸収されたコレステロールを排泄するための機構とは考えづらかった。

本試験により、非胆汁経路でのコレステロール排泄の存在が確かめられ、いくつかの条件で排泄が変動することが明らかとなったが、その調節がどのように行われているのかは、十分に明らかにすることはできなかった。今後更なる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

村田みのり、荒井達也、船山明日和、井上奈穂、池田郁男、胆汁を介さない小腸からのコレステロール排泄に影響する因子、日本農芸化学会2014年度大会(川崎市、2014年3月27-30日)

村田みのり、荒井達也、船山明日和、井上奈穂、池田郁男、胆汁を介さないコレステロール排泄機構の解明、第47回日本栄養・食糧学会東北支部大会(秋田市、2013年10月5日)
〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 郁男 (Ikeda, Ikuo)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：40136544