

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04167

研究課題名(和文) ヒト型胆汁酸マウスの作製と表現型解析

研究課題名(英文) Production and phenotype analysis of mouse models with humanized bile acid composition

研究代表者

本多 彰 (Honda, Akira)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：10468639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの胆汁酸組成はヒトと大きく異なっている。原因遺伝子であるマウスの Cyp2c70 と Cyp2a12 をダブルノックアウト(DKO)し、様々な疾患モデル作成に利用可能なヒト型の胆汁酸組成を有するマウスを作成した。DKOマウスはヒト同様、ミュリコール酸(MCA)が認められず、ケノデオキシコール酸(CDCA)、デオキシコール酸(DCA)、リトコール酸(LCA)が増加していた。また、胆汁酸プールが著明に減少していたが、farnesoid X receptor(FXR)は活性化されておらず、サイトカインやpregnane X receptor(PXR)を介した経路によって胆汁酸合成が抑制されていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化器系疾患の病態モデルをマウスで作成するにあたり、マウスとヒトの胆汁酸組成の違いによって、ヒトの病態との決定的な種差を生じる可能性が指摘されている。本研究で開発したヒト型の胆汁酸組成を有するマウスは、今後多くの消化器疾患モデルの作成に利用可能であると考えられ、病態の解明のみならず治療法の開発においても有用なツールになることが予想される。

研究成果の概要(英文)：The bile acid (BA) composition in mice is substantially different from that in humans. We generated Cyp2a12^{-/-}(2a12KO), Cyp2c70^{-/-}(2c70KO) and Cyp2c70^{-/-}-Cyp2a12^{-/-}(DKO) mice using the CRISPR-Cas9 system to study the regulations of BA metabolism under humanized BA composition. 2a12KO mice showed the accumulation of deoxycholic acids (DCAs), whereas 2c70KO mice lacked muricholic acids (MCAs) and exhibited markedly increased hepatobiliary proportions of chenodeoxycholic acid (CDCA). In DKO mice, not only DCAs or CDCAs but DCAs, CDCAs and lithocholic acids (LCAs) were all elevated. The BA pool was markedly reduced in 2c70KO and DKO mice, but the farnesoid X receptor (FXR) was not activated. It was suggested that the cytokine/c-Jun N-terminal kinase signaling pathway and the pregnane X receptor-mediated pathway are the predominant mechanisms, preferred over the FXR/SHP and FXR/FGF15 pathways, for controlling BA synthesis under hydrophobic BA composition.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胆汁酸 ノックアウトマウス Cyp2c70 Cyp2a12

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪肝、NASH、肝癌、薬物性肝障害、自己免疫性肝疾患、炎症性腸疾患など、代謝・免疫異常が関与する消化器疾患のモデル動物としてマウスが頻用されている。しかし、ヒトとマウスでは代謝機構に様々な種差があることが指摘されてきた。

(2) 種差の原因の一つとして、マウスの胆汁酸組成がヒトと大きく異なることが挙げられる。マウスには疎水性で細胞障害性のあるケノデオキシコール酸 (CDCA) やデオキシコール酸 (DCA) が極めて少ない。代わりに、ヒトで肝保護作用が証明されているウルソデオキシコール酸 (UDCA) よりもさらに親水性のミュリコール酸 (MCA) が 50% 近くを占める。すなわち、マウスの肝疾患モデルは最初から UDCA を大量に投与されているのと同じ様な状態であると考えられる。

(3) マウスで CDCA や DCA が極めて少ない理由は、マウスの肝臓に CDCA を MCA に、DCA をコール酸 (CA) に代謝する齧歯類特有の酵素が存在するためである。我々はこれまでの科学研究費補助金を用いて、それぞれが Cyp2c70 と Cyp2a12 であることを同定した。

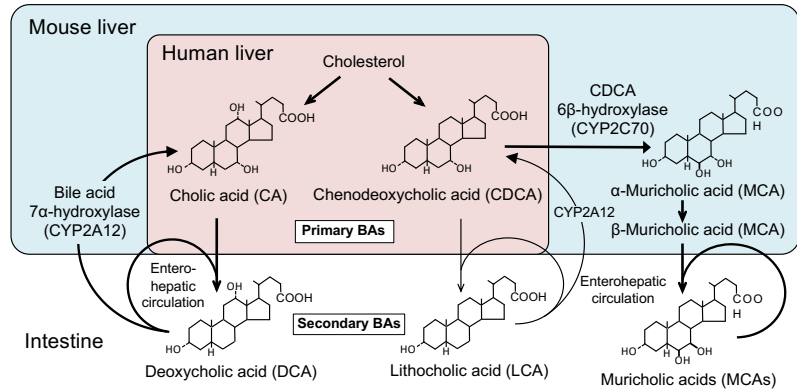


図1 ヒトとマウスの胆汁酸合成経路の比較(J Lipid Res. 61:54-69,2020 より引用)

2. 研究の目的

マウスの Cyp2c70 と Cyp2a12 をノックアウトすることによってヒト型の胆汁酸組成を有するマウスを作成し、その表現型解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Cyp2c70^{-/-} (2c70K0)、Cyp2a12^{-/-} (2a12K0)、Cyp2c70^{-/-}Cyp2a12^{-/-} (DKO) マウスの作成

標的とする Cyp2c70 または Cyp2a12 のプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) の上流 20 塩基を pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 プラスミドの BbsI 制限酵素部位に挿入することにより、Cas9 発現ノックアウトベクターを作製した。C57BL/6J マウス由来の体外受精卵前核に pX330-Cyp2c70 intron 1 と pX330-Cyp2c70 intron 2、または pX330-Cyp2a12 intron 2 と pX330-Cyp2a12 intron 4 をマイクロインジェクションし、偽妊娠 CD1 マウスの輸卵管へ移植した。誕生したマウスの尻尾数ミリを採取して得られた DNA を用いて、標的配列を含むプライマーと共に PCR 増幅し、さらに精製した PCR 産物のダイレクトシーケンシングを行い、導入変異の有無を解析し、ファウンダー (F0) マウスを同定した。

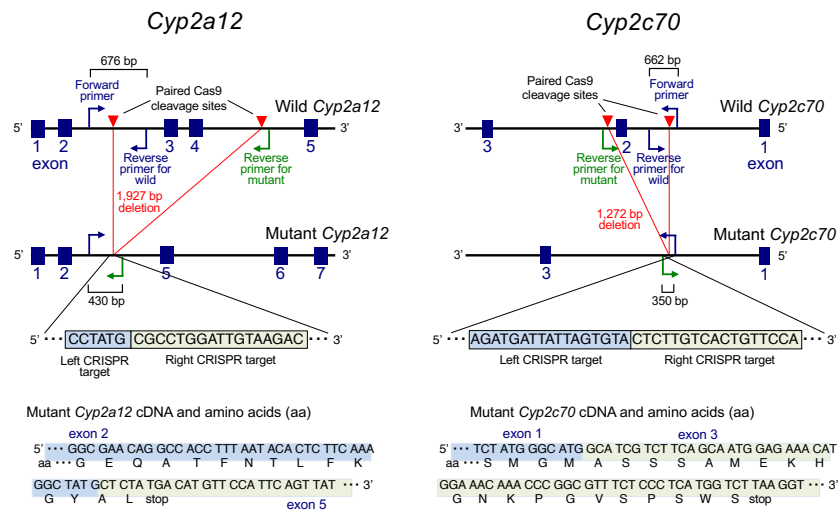


図2 Cyp2a12, Cyp2c70におけるCRISPR target site(J Lipid Res. 61:54-69,2020 より引用)

目的通りの変異が導入されている F0 マウスを野生型 C57BL/6J マウスと自然交配させ、Cyp2c70^{+/-}および Cyp2a12^{+/-}ヘテロ (F1) マウスを作製した。さらに、それぞれの F1 マウス同士を交配させて Cyp2c70^{+/-}Cyp2a12^{+/-}ダブルヘテロ (F2) マウスを作製し、最終的に F2 マウス同士の交配によって、2c70K0、2a12K0 および DKO マウスを得た。

(2) ステロール・胆汁酸分析

血清中のステロールは、5 μL の血清に内部標準を添加し、1N KOH エタノール中で 37°C、1 時間加水分解した後ヘキサン抽出した。蒸発乾固後にピコリン酸にて誘導体化し、HPLC-MS/MS に

てステロールおよびオキシステロールを定量した。また、血清、糞便および組織中の胆汁酸については、血清中、胆汁中ではアルカリ加水分解せずに、また小腸内、盲腸内および糞便中胆汁酸は、1N KOH 水溶液中で 80°C 20 分間アルカリ加水分解した後に、0.5 M Potassium phosphate buffer (pH 7.5) を添加して、Bond Elute C18 カートリッジ(200 mg, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で抽出・精製した。蒸発乾固後に 20 mM 酢酸アンモニウムバッファー (pH 7.5) / メタノール (1:1, v/v) に再溶解し、その一部を HPLC-MS/MS に導入して分析した。HPLC カラムは Hypersil GOLD column (200 x 2.1 mm, 1.9 μ m, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用し、移動相は Ando らの方法に従った (J Pharm Biomed Anal. 2006, 40:1179-1186)。

(3) 酵素活性の測定

CYP2C70、CYP2A12活性のほか、コレステロール・胆汁酸代謝に関する鍵酵素である肝の HMG-CoA reductase, CYP7A1, CYP8B1活性は、いずれも肝ミクロソームと基質を 37°C で反応させ、内部標準添加後に生成した反応物を抽出し、LC-MS/MS で定量することによって行った。

(4) mRNA の発現解析

RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて、肝および回腸末端組織から RNA を抽出した。Reverse transcription により cDNA を生成後、LightCycler (Roche) と FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I を用いて mRNA の発現定量を行った。

(5) 血清 FGF15 の定量

血清 fibroblast growth factor 15 (FGF15) の濃度は、マウス FGF15 ELISA kit (MyBiosource, Inc., San Diego, CA) を用いて測定した。

(6) 病理組織学的検討

肝組織の一部は 10% 中性ホルマリンで固定し、パラフィンブロックの薄切標本をヘマトキシリン/エオジンで染色して検鏡した。

4. 研究成果

(1) 2c70KO、2a12KO、DKO マウスの作成

CRISPR-Cas9 システムを用いて Cyp2c70、Cyp2a12 それぞれの F0 マウスを作製し、F1 マウスを経てダブルヘテロの F2 マウスが作製された。最終的に雌雄それぞれ 28 匹の F2 マウスの交配によって、129 匹の産仔 (F3) が得られ、内訳は 2c70KO (n = 14)、2a12KO (n = 5)、DKO (n = 13)、WT (n = 3) であり、他はダブルヘテロ、ホモヘテロ、ヘテロワイルド等であった。最終的に 2c70KO 同士、2a12KO 同士、DKO 同士の交配によって 3 群のコロニーを維持した。

各群および WT マウスの肝ミクロソームを用いて CYP2C70 および CYP2A12 活性を測定し、それぞれの酵素がノックアウトされていることを確認した。ただし、CYP2A12 活性については僅かに活性が残っており、Cyp2a12 と mRNA レベルで 96.2% の相同性がある Cyp2a22 によるものと推察された。

(2) 2c70KO、2a12KO、DKO マウスにおける胆汁酸の組成とプールサイズ

胆汁中胆汁酸の組成を比較すると、2a12KO は WT と類似していたが、WT に比べて CA が少なく DCA が著増していた。一方 2c70KO では MCA は認めず、CA もやや減少して、80% 以上が CDCA であった。さらに DKO では CDCA (50%)、DCA (30%)、リトコール酸 (LCA) (10%)、CA (10%) 程度であった。

胆汁酸のプールサイズは、2a12KO では WT と有意な差を認めなかったが、2c70KO と DKO では約半分程度に減少していた。

(3) 2c70KO、2a12KO、DKO マウスにおけるコレステロール・胆汁酸代謝

肝の胆汁酸合成系主経路の律速酵素である CYP7A1 は、2c70KO と DKO で有意に低下しており、プールサイズの減少を説明することができた。一方、CA 合成系の鍵酵素である CYP8B1 は、2c70KO で著明に低下していたが、DKO では変化がないか軽度の低下に留まっていた。これは 2c70KO で CDCA 比率が著明に増加していることを説明できる所見と考えられた。

肝のコレステロール合成系律速酵素である HMG-CoA reductase や、コレステロール合成の血清マーカーであるラソステロール、デスモステロールには各群で有意な差は認めなかったが、コレステロール吸収の血清マーカーであるシトステロールとカンペステロールは、2c70KO と DKO で有意に低下していた。すなわち、これらのマウスでは、胆汁酸プールサイズの減少によってコレステロール吸収が低下しているものと推測された。通常、コレステロール吸収が低下するとコレステロール合成が亢進するフィードバックが働くが、2c70KO と DKO でコレステロール吸収が低下してもコレステロール合成が亢進していないのは、胆汁酸合成が低下しているため肝組織中に十分なコレステロールが存在していることが理由と考えられた。

(4) 2c70KO、2a12KO、DKO マウスにおける FXR の活性化状態

胆汁酸のプールサイズを一定に保つために、胆汁酸合成を制御している最も重要なメカニズ

ムは、核内レセプターfarnesoid X receptor (FXR)を介する調節機構である。胆汁酸のうち CDCA は最も強力な FXR のアゴニストであり、MCA は FXR のアンタゴニストであることがわかっている。従って当然、2c70KO と DKO マウスでは FXR が活性化され、そのことが両マウスモデルで胆汁酸プールサイズが減少している原因であると予想された。ところが、FXR の直接的な標的遺伝子である肝の small heterodimer partner (Shp) や bile salt export pump (Bsep) の発現亢進は認められなかった。また、回腸末端の FXR 標的遺伝子である Fgf15 の発現および血清 FGF15 濃度にも有意な変化は認めなかった。以上より、2c70KO と DKO マウスにおける胆汁酸プールサイズの減少は、FXR の活性化が原因ではないと結論づけられた。

(5) 2c70KO と DKO マウスにおける胆汁酸プール減少(CYP7A1 抑制)のメカニズム

FXR 以外の胆汁酸合成抑制メカニズムとして、核内レセプターpregnane X receptor (PXR)、peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) などの活性化や、サイトカインによる c-Jun N-terminal kinase signaling pathway を介した CYP7A1 の抑制機構がある。まず、PXR の標的遺伝子である肝 Cyp3a11 の発現とその血清マーカーである 4 β -hydroxycholesterol を測定したところ、両者は DKO マウスでのみ上昇していた。また、PPAR α の標的遺伝子である肝 multidrug resistance protein 2 (Mdr2) の発現も、DKO マウスでのみ上昇していた。一方、肝における Tnf α と Tgf β 1 の発現は、性差はあるが平均すると、2c70KO と DKO マウスの両者で上昇し、病理組織所見でも両群のマウスでは肝の炎症所見を認めた。

以上より、2c70KO マウスでは CDCA (特に非抱合型) による炎症を発端とした c-Jun N-

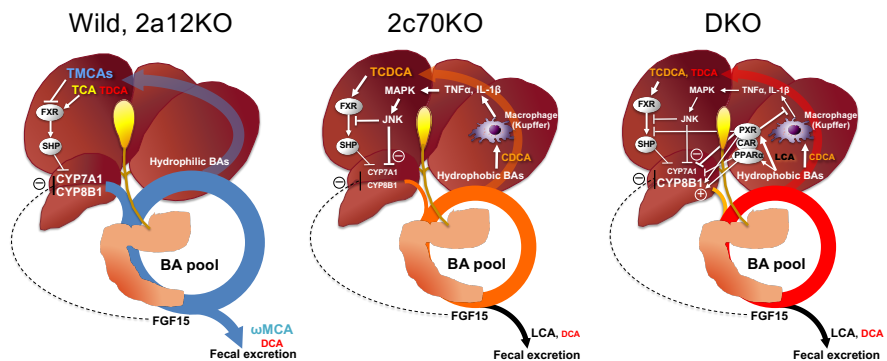


図3 各種マウスにおける胆汁酸代謝の比較(J Lipid Res. 61:54-69,2020 より引用)

terminal kinase signaling pathway の活性化によって胆汁酸合成が抑制されている可能性が強く示唆された。一方、DKO マウスでは炎症の程度は 2c70KO マウスより軽い、PXR や PPAR α のリガンドになる LCA が増加しているため、LCA によってこれらの核内レセプターが活性化されることも重なって、胆汁酸合成が抑制されているものと考えられた。

(6) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

マウスの Cyp2c70 と Cyp2a12 をノックアウトすることによってヒト型の胆汁酸組成を有するマウスを世界に先駆けて作成し、その表現型解析を行った。また、マウス作成に関する情報とコレステロール・胆汁酸代謝に関する表現型解析データの詳細な記録を残すために、文字数や図表数の制限がない専門誌に発表して公開した (J Lipid Res. 61:54-69, 2020)。発表内容は同雑誌翌月号の commentary で取り上げられ (J Lipid Res. 61:269-271, 2020)、当該分野に与えたインパクトは大きいと考えられる。

(7) 今後の展望

ヒト型の胆汁酸組成を有するマウスを用いることにより、多くの疾患の病態解明と治療法の開発に応用できる可能性がある。今後は以下のような研究への発展を考えている。

- ① これまで良いマウスモデルがない原発性胆汁性胆管炎 (PBC) のほか、マウスモデルはあるがヒトとの大きな違いが指摘されている消化器疾患 (原発性硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎、NASH、薬物性肝障害、炎症性腸疾患、大腸癌など) について、よりヒトに近いマウスモデルの作製を試みる。
- ② 二次胆汁酸を投与しても一次胆汁酸に変換されてしまうことがないため、二次胆汁酸が病因に関係しているとの仮説がある疾患 (大腸癌、肝細胞癌、コレステロール胆石症、炎症性腸疾患など) について、二次胆汁酸の役割を明らかにする。
- ③ 親水性のMCAを有しない本マウスを用いて作成した各種疾患モデルにおいて、親水性のUDCAやMCAなどの治療効果を評価する。
- ④ 腸内細菌叢は胆汁酸組成によって影響を受けるため、本マウスを用いてよりヒトに近い腸内細菌叢を有するマウスの作成を試みる。
- ⑤ 胆汁酸は消化器疾患のみならず、核内および膜受容体を介して脂肪細胞、筋細胞、免疫細胞などの代謝にも影響を与えることが明らかになっている。ヒト型胆汁酸マウスモデルは、消化器系のみならず、他分野の研究の発展にも貢献できると考えられる。

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 Honda Akira, Miyazaki Teruo, Iwamoto Junichi, Hirayama Takeshi, Morishita Yukio, Monma Tadakuni, Ueda Hajime, Mizuno Seiya, Sugiyama Fumihiro, Takahashi Satoru, Ikegami Tadashi	4. 巻 61
2. 論文標題 Regulation of bile acid metabolism in mouse models with hydrophobic bile acid composition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Lipid Research	6. 最初と最後の頁 54 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1194/jlr.RA119000395	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 Miyazaki Teruo, Sasaki Sei-ich, Toyoda Atsushi, Wei Fan-Yan, Shirai Mutsumi, Morishita Yukio, Ikegami Tadashi, Tomizawa Kazuhito, Honda Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 Impaired bile acid metabolism with defectives of mitochondrial-tRNA taurine modification and bile acid taurine conjugation in the taurine depleted cats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61821-6	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 Miyazaki Teruo, Honda Akira, Ikegami Tadashi, Iida Takashi, Matsuzaki Yasushi	4. 巻 64
2. 論文標題 Human-specific dual regulations of FXR-activation for reduction of fatty liver using <i>in vitro</i> cell culture model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 112 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcfn.18-80	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Honda A, Miyazaki T, Ikegami T.
2. 発表標題 Roles of bile acids in hepatobiliary diseases: a novel approach using mouse models with humanized bile acid composition.
3. 学会等名 日本消化器関連学会週間2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本多 彰, 宮崎照雄, 岩本淳一, 平山 剛, 池上 正
2. 発表標題 ヒト型胆汁酸マウスにおける胆汁酸代謝
3. 学会等名 第41回胆汁酸研究会
4. 発表年 2019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	岩本 淳一 (Iwamoto Junichi) (10384950)	東京医科大学・医学部・准教授 (32645)	
研究分担者	池上 正 (Ikegami Tadashi) (40439740)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	
研究分担者	宮崎 照雄 (Miyazaki Teruo) (60532687)	東京医科大学・医学部・講師 (32645)	