

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11115

研究課題名(和文)食餌中の脂質組成が小腸からのコレステロール排泄に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of dietary lipid composition on trans-intestinal cholesterol excretion

研究代表者

上裕 俊法 (KAMISAKO, Toshinori)

近畿大学・大学病院・教授

研究者番号：20233934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：小腸には血中から直接小腸管腔にコレステロール(CH)を排泄している経路(TICE)が存在する。本研究では3脂肪酸含有の多い魚油や薬物による血中CHを低下作用にTICEが関与するかをラットに魚油、エゼチミブ(EZ)を投与し、その効果を検討した。魚油投与で糞便中CH排泄は41%増加し小腸Abcg5/g8発現量は増加した。EZは小腸Abcg5/g8発現量と糞便中CH排泄を増加させなかったが肝Abcg5/g8の発現を増加させた。魚油とEZの併用投与は脂肪肝を顕著に改善した。以上から、魚油はTICEを促進し、EZは肝臓からのCH排泄促進作用があり、これらの併用は肝脂質沈着抑制に働いたと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)は非飲酒者におけるメタボリック症候群の肝臓における表現型であり、我が国においては増加傾向にある。またNAFLDの20%では非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)を引き起こし5年の経過観察で10～25%が肝硬変に進行する。さらにNASH肝硬変では肝細胞癌が5年で10%発生することから、NAFLDに対しては、食事や運動に加え、積極的なNAFLDの治療が注目されている。本研究における成果は食事中の3脂肪酸含有量がエゼチミブの脂質改善作用に影響を及ぼし、魚油とエゼチミブの併用がNAFLDの治療に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Small intestine has a pathway for the excretion of cholesterol from blood into the lumen (TICE). In the present study, we investigated whether the TICE is involved in the cholesterol-lowering effects of fish oil and ezetimibe, in rodent. Fish oil increased faecal cholesterol excretion by 41%, and increased the expression of Abcg5/g8 in the small intestine, which is thought to be associated with faecal cholesterol excretion, suggesting that fish oil may be associated with TICE. Ezetimibe did not increase intestinal Abcg5/g8 expression or faecal cholesterol excretion, but increase hepatic Abcg5/g8 expression. The combination of fish oil and ezetimibe markedly improved fatty liver. The improvement was associated with increased hepatic Abcg5/g8 and Mdr2 expression. These results suggest that fish oil promotes TICE and ezetimibe promotes cholesterol excretion from the liver into bile. The combination was efficient for the reduction of hepatic lipid.

研究分野：消化器病学

キーワード：経小腸コレステロール排泄 魚油 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

わが国では食生活の西欧化に伴うコレステロールや油脂の摂取量増加が高脂血症や糖尿病などの生活習慣病患者を引き起こしているが、食事の脂質組成(脂肪酸組成)の違いが肝臓や小腸における脂質代謝に影響を及ぼす事も知られている。血清コレステロール濃度は、肝臓でのコレステロール/リポ蛋白合成、小腸からの吸収、生体内での利用率によって規定される。これらに關与する遺伝子産物の発現は食品成分である脂肪酸やコレステロール代謝産物をリガンドとする核内レセプターである PPAR や LXR などにより制御されている。コレステロール吸収機構に関しては、小腸上皮細胞膜からの単純拡散以外に小腸上皮細胞膜上のコレステロール輸送蛋白質である Nieman Pick C1 like protein 1 (NPC1L1)を介した吸収機構が存在する事が明らかとなった(1)(2)。さらに小腸上皮細胞に存在するスカベンジャー受容体クラス B1(SR-B1) ATP-binding cassette (ABC) transporter のファミリーである ABCA1、Apolipoprotein A も複合的に關与する事が知られている。これらの小腸上皮細胞における発現はコレステロール吸収効率を調整している(1)(2)。我々は現在までに小腸上皮細胞に存在するコレステロール輸送蛋白などの脂質代謝に關与する遺伝子産物の発現が薬物や食事の脂質組成により容易に変化し、コレステロール吸収が外的要因により分子レベルで調節されている事を見出した(3)(4)。近年の研究によれば小腸は血中から直接小腸管腔にコレステロールを排泄している経路(TICE)が存在する事が明らかとなり(5)、小腸がコレステロールを排泄する臓器である事が明らかとなった。

2. 研究の目的

TICE を亢進させる分子メカニズムとしては、小腸上皮での LXR を介した ABCG5/G8 活性化、FXR 刺激、Pcsk9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9)の減少などが知られている。また TICE を活性化する物質としては親水性胆汁酸やエゼチミブ、スタチンなどの薬物が報告されている。3 脂肪酸含有の多い魚油の摂取は血中コレステロールを低下させることが知られている。我々の過去の検討ではマウスに魚油を摂取させると小腸の ABCG5/G8 発現が増加する事が確認されている(4)。これらの事は 3 脂肪酸含有の多い魚油や薬物による血中コレステロールを低下作用に TICE が關与している可能性を示唆する。そこで本研究は、「摂取する油脂の違いや脂質組成や脂質吸収に影響を及ぼす薬物が TICE に如何なる影響をするか？」を肝臓への脂質沈着をアウトカムに検討した。

3. 研究の方法

本研究では脂質吸収に影響を及ぼす食餌中の脂質組成や脂質吸収に影響を及ぼす薬物が TICE に如何なる影響を及ぼすのかを系統的に検討した。6 週令雄性 SD ラットを標準飼料(AIN-93)に準拠して作成し、以下の 4 群を作成した。10%大豆油投与群(C 群)、10%魚油投与群(F 群)、10%大豆油投与+0.005%ezetimibe 投与群(EZ 群)、10%魚油投与群+0.005%ezetimibe 投与群、(EZ+F 群)を作成した。各々の飼料で 4 週(10 週令)飼育した後に実験に供した。血液、肝、小腸、盲腸内容物と大腸中の糞便を採取した。体重、肝臓重量、下記の血清中生化学分析、肝臓組織像、肝臓の各種脂質、胆汁中脂質、糞便コレステロールを測定する。肝臓および小腸の脂質代謝関連 mRNA の発現を定量した。

4. 研究成果

(1) 血清脂質への影響(表 1)

コントロール群と比較して、魚油群では血清トリグリセリド(TG)濃度が 73%(95%CI:67%~79%, P<0.001), EZ 群で 39%(95%CI:19%~58%, P=0.033), F+EZ 群では 83%(95%CI:78%~88%, P<0.001) 低下した。

血清総コレステロール(TC)と HDL コレステロール(HDL-C)は、C 群と EZ 群ではほぼ同じであっ

たが、F群ではTCが33% (95%CI: 24%-41%; P<0.001)、HDL-Cは41% (95%CI: 34%-48%、P<0.001)減少し、F+EZ群ではTCは36% (95%CI: 27%-46%、P<0.001)、HDL-Cは23% (95%CI: 13%-32%、P=0.002)減少した。血清中のHDL-Cは、F群がEZ群よりも45% (95%CI: 38%~51%、P<0.001)低かった。

(2) 肝脂質への影響 (表1)

C群に比較しF群では肝TG含有量が48% (95%CI: 31%~66%、P=0.026)減少したが、肝臓TG濃度は低下しなかった。EZ群では肝TG濃度と全含有量を減少させなかったが、F+EZ群では肝TG濃度を84% (95%CI: 80~88%、P<0.001)、肝TG含有量を86% (95%CI: 82~91%、P<0.001)、顕著に減少させた。

C群、F群、EZ群間には肝CH濃度および肝CH含量は差がなかったが、F+EZ群では肝CH濃度が86% (95%CI: 83%-89%; P=0.001)、肝CH含量が88% (95%CI: 85%-91%; P<0.001)と著しく減少した。

(3) 糞便中脂質への影響 (表1)

C飼料をF飼料に置き換えると、糞便中TGが47% (95%CI: 33%-61%、P=0.002)減少した。また、C飼料を与えたラットでは、エゼチミブによる糞便中TGの減少は見られなかったが、F飼料にエゼチミブを添加すると、糞便中TGが55% (95%CI: 44%-66%、P<0.001)減少した。糞便中CH排泄量は、F飼料を与えたラットで41% (95%CI: 25%-57%、P=0.005)高く、EZ飼料を与えたラットではC飼料よりも高い傾向にあった(絶対平均差28%、95%CI: 9%-48%、P=0.078)が、F群でのこの糞便中CH排泄量の上昇は、F+EZ群では弱まった。

(表1)

	C群	F群	EZ群	F+EZ群
血清TG (mg/dl)	392.4 ± 157.1	106.3 ± 31.8	241.0 ± 102.0	68.0 ± 27.4
血清TC (mg/dl)	74.3 ± 11.5	50.1 ± 8.7	66.7 ± 6.9	47.4 ± 9.5
血清HDL-C (mg/dl)	25.9 ± 3.1	15.3 ± 2.4	27.8 ± 1.2	20.0 ± 3.3
肝TG濃度 (mg/g tissue)	23.0 ± 8.7	13.9 ± 5.4	32.2 ± 10.6	3.6 ± 1.2
総肝TG量 (mg/whole liver)	524.0 ± 228.6	270.5 ± 115.4	624.3 ± 172.6	70.8 ± 28.4
肝CH濃度 (mg/g tissue)	1.6 ± 0.5	1.2 ± 0.7	1.9 ± 0.9	0.2 ± 0.1
総肝CH量 (mg/whole liver)	36.0 ± 10.2	23.4 ± 14.2	36.3 ± 12.5	4.4 ± 1.3
Fecal TG (mg/g feces)	0.8 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1
Fecal CH (mg/g feces)	2.5 ± 0.5	3.6 ± 0.5	3.2 ± 0.7	2.6 ± 0.4

(4) 病理組織学的所見

C群とEZ群では、肝小葉に巨細胞性の脂肪沈着が認められ、脂肪沈着の程度は軽度または中等度であった。F群では、C群やEZ群と比べ脂肪沈着が少なかった。F+EZ群では肝臓に脂肪沈着が見られなかった。これらの結果は、肝臓全体のTG量と同様であった。

(5) 肝臓での脂肪酸、コレステロール、胆汁酸関連遺伝子発現 (表2)

SREBP-1cとその標的となる脂質合成酵素のmRNAの発現: SREBP-1cのmRNAの発現は、F+EZ群で55%(95%CI: 51%-59%; P=0.005)減少した。また、FAS、ACC、SCDのmRNAの発現は、F+EZ群で78% (95%信頼区間: 70~86%、P<0.001)、87% (95%信頼区間: 81~92%、P<0.001)、76% (95%信頼区間: 69~83%、P<0.001)減少した。001) F+EZ群では85% (95%CI: 79%-90%、P<0.001)

60% (95%CI : 40%-80%、P = 0.003) 90% (95%CI : 83%-97%、P < 0.001) であった。しかし、これらの遺伝子の mRNA 発現量は、F 群と F+EZ 群の間で差がなかった。

脂肪酸酸化遺伝子の mRNA 発現量 : PPAR 標的遺伝子 Acox1 の mRNA 発現は、F 群では C 群に比べて 38% (95%CI : 18%~59%、P = 0.038) 増加した。

コレステロールの取り込み、合成、異化、排出に関する遺伝子の mRNA 発現 : C 群と比較して、F+EZ 群では、コレステロール排出トランスポーター Abcg5 および Abcg8 の mRNA 発現が 1380% (95% CI : 965%~1795%、P < 0.001) および 442% (95%CI : 270%~613%、P < 0.001) 誘導された。リン脂質トランスポーター Mdr2 の mRNA の発現は F+EZ 群では C 群に比べて 92% (95%CI : 45%-140%、P = 0.006) 増加した。コレステロール合成遺伝子 HMG-CoA synthase の mRNA の発現は、F+EZ 摂取ラットで C 群と比較して 481% (95% CI : 391%-571% ; P < 0.001) 増加した。

胆汁酸合成に関する遺伝子の mRNA 発現 : Cyp7a1 の mRNA の発現は、F+EZ 群では F 群に比べて 66% (95% CI : 51%-82% ; P = 0.022) 減少していた。胆汁酸合成の代替酸性経路の主要酵素である Cyp27a1 の mRNA の発現は、F+EZ 群では F 群に比べて減少する傾向にあった (絶対平均差 19%、95% CI : 10%~27%、P = 0.065)。一方 Cyp8b1 の mRNA 発現量は、C 群と F 群を比較すると、F + EZ 群でそれぞれ 89% (95%CI : 61%~117%、P < 0.001)、45% (95%CI : 23%~67%、P = 0.006) 増加していた。

(表 2)

肝	C 群	F 群	EZ 群	F+EZ 群
SREBP-1c	1 ± 0.17	0.93 ± 0.23	0.88 ± 0.10	0.43 ± 0.03
HMGCoAR	1 ± 0.12	0.61 ± 0.05	1.12 ± 0.09	1.48 ± 0.27
LDLreceptor	1 ± 0.15	1.09 ± 0.13	0.67 ± 0.09	1.04 ± 0.05
ABCA1	1 ± 0.07	1.00 ± 0.09	1.08 ± 0.04	1.29 ± 0.14
ABCG5	1 ± 0.14	5.63 ± 0.67	8.83 ± 3.15	15.31 ± 3.71
ABCG8	1 ± 0.09	1.32 ± 0.20	2.60 ± 0.75	5.42 ± 0.87
MTTP	1 ± 0.08	0.98 ± 0.05	0.87 ± 0.03	0.74 ± 0.03
SR-B1	1 ± 0.09	0.99 ± 0.10	1.30 ± 0.06	1.05 ± 0.10
NPC1L1	1 ± 0.23	0.28 ± 0.11	0.71 ± 0.16	0.42 ± 0.18
Ntcp	1 ± 0.09	1.09 ± 0.08	1.16 ± 0.06	1.08 ± 0.04
Bsep	1 ± 0.05	1.18 ± 0.12	1.29 ± 0.04	1.26 ± 0.05
Ostalpha	1 ± 0.15	1.20 ± 0.17	1.29 ± 0.21	1.27 ± 0.14
Ostbeta	1 ± 0.60	0.81 ± 0.28	0.61 ± 0.13	0.66 ± 0.11
Asbt	1 ± 0.15	1.10 ± 0.09	1.26 ± 0.15	1.29 ± 0.14
BAAT	1 ± 0.05	1.17 ± 0.10	0.98 ± 0.08	0.77 ± 0.02
SHP	1 ± 0.21	2.01 ± 0.53	0.96 ± 0.31	1.76 ± 0.85
Cyp7a1	1 ± 0.28	1.42 ± 0.28	0.64 ± 0.11	0.48 ± 0.11
Cyp27a1	1 ± 0.03	1.04 ± 0.06	0.95 ± 0.06	0.85 ± 0.05
Mrp2	1 ± 0.06	1.14 ± 0.15	1.07 ± 0.12	1.02 ± 0.06
Mrp3	1 ± 0.16	1.58 ± 0.18	0.99 ± 0.03	1.41 ± 0.11
Mrp4	1 ± 0.17	1.03 ± 0.12	0.96 ± 0.05	1.22 ± 0.05
Oatp1a1	1 ± 0.06	1.14 ± 0.13	0.93 ± 0.04	0.66 ± 0.05
Oatp1a4	1 ± 0.05	1.77 ± 0.23	1.21 ± 0.07	1.01 ± 0.05
Oatp1b2	1 ± 0.08	1.16 ± 0.15	1.45 ± 0.16	0.88 ± 0.11
Sult2a1	1 ± 0.12	0.74 ± 0.13	0.96 ± 0.12	0.87 ± 0.11

(6)空腸でのコレステロールおよび胆汁酸代謝関連遺伝子発現 (表3)

空腸における Abcg5 および Abcg8 の mRNA の発現は、F+EZ 群では C 群に比べて 244% (95%CI : 77% -411%、P=0.006) および 841% (95%CI : 302%-1381%、P=0.008) 増加した。胆汁酸取り込みトランスポーター Asbt の mRNA の発現は、C 群に比べて F+EZ 群で 970% (95%CI : 345%~1602%、P=0.004) 増加した。HDL 受容体 SR-B1 の mRNA の発現は、EZ 群に比べて F 群で 56% (95%CI : 48%~65%、P=0.044) 減少した。

表3

空腸	C 群	F 群	EZ 群	F+EZ 群
LDLreceptor	1 ± 0.15	1.09 ± 0.15	1.36 ± 0.24	0.95 ± 0.11
ABCA1	1 ± 0.36	0.93 ± 0.21	0.58 ± 0.06	0.78 ± 0.07
ABCG5	1 ± 0.15	2.10 ± 0.30	1.88 ± 0.17	3.44 ± 0.85
ABCG8	1 ± 0.16	6.37 ± 1.26	3.76 ± 1.38	9.41 ± 2.75
MTTP	1 ± 0.13	1.08 ± 0.17	1.50 ± 0.35	1.29 ± 0.26
SR-B1	1 ± 0.14	0.64 ± 0.06	1.47 ± 0.33	0.72 ± 0.20
NPC1L1	1 ± 0.15	1.09 ± 0.16	1.83 ± 0.43	1.16 ± 0.28
Ostalpha	1 ± 0.18	1.20 ± 0.23	1.88 ± 0.37	1.59 ± 0.48
Ostbeta	1 ± 0.13	1.41 ± 0.29	2.29 ± 0.41	1.74 ± 0.42
Asbt	1 ± 0.18	7.09 ± 1.33	4.13 ± 0.86	10.74 ± 3.21
SHP	1 ± 0.33	1.93 ± 0.35	1.57 ± 0.27	2.48 ± 0.54
Mrp2	1 ± 0.14	4.20 ± 0.73	2.70 ± 0.58	4.90 ± 1.16
Mrp3	1 ± 0.16	1.47 ± 0.14	1.18 ± 0.18	1.39 ± 0.18
Mrp4	1 ± 0.08	0.96 ± 0.11	0.87 ± 0.18	1.25 ± 0.24

結論：

1. 魚油は小腸 Abcg5/g8 発現量を増加させており糞便中コレステロール排泄と関連があると考えられ、魚油の 3 脂肪酸が TICE に関連している可能性が示唆された。
2. エゼチミブは小腸 Abcg5/g8 発現量と糞便中コレステロール排泄を増加させなかったが肝臓の Abcg5/g8 の発現を増加させていた。
3. 魚油とエゼチミブの併用投与は、血清および肝臓のトリグリセリドとコレステロールの値を有意に低下させ、脂肪肝の組織像を顕著に改善した。F+EZ 群の脂肪肝組織像の顕著な改善は、肝臓における Abcg5/g8 と Mdr2 の発現量の増加と関連していると考えられた。
4. 以上の結果から、エゼチミブと魚油製剤の併用療法が NAFLD の治療に有効であることが示唆された。

- 【文献】
- 1) Lammert F, et al. Gastroenterology. 2005;129:718-34.
 - 2) Altmann SW, et al. Science. 2004; 303: 1201-4.
 - 3) Toshinori Kamisako, et al. J Gastroenterol Hepatol. 2007;22: 1832-1837.
 - 4) Toshinori Kamisako, et al. Hepatol Res 2012; 42:321-326.
 - 5) de Boer JF, et al. Gastroenterology. 2017 152:1126-1138.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yuji Tanaka, Takanori Ikeda, Hiroshi Ogawa, Toshinori Kamisako	4. 巻 374
2. 論文標題 Ezetimibe markedly reduces hepatic triglycerides and cholesterol in rats fed on fish oil by increasing the expression of cholesterol efflux transporters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharmacol Exp Ther	6. 最初と最後の頁 175-183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/jpet.120.265660.	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 2件）

1. 発表者名 Yuji Tanaka, Takanori Ikeda, Kazuo Yamamoto, Hiroshi Ogawa, Toshinori Kamisako.
2. 発表標題 Ezetimibe markedly reduces hepatic triglycerides and cholesterol in fish oil-fed rats
3. 学会等名 Liver Meeting 2019, The American Association for Study of the Liver Disease (Boston) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Tanaka, Takanori Ikeda, Hiroshi Ogawa, Toshinori Kamisako
2. 発表標題 Adaptive regulation of bile acid and cholesterol transporters in mouse kidney and intestine during alfa-naphtylisothiocyanate (ANIT)- induces cholestasis
3. 学会等名 The59th Annual Meeting of the Society of toxicology (国際学会)
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
研究分担者	田中 裕滋 (TANAKA Yuji) (00465650)	近畿大学・大学病院・講師 (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
---------	---------