

令和元年6月7日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K12337

研究課題名(和文)カイロミクロン形成制御による脂質および脂溶性薬物の小腸吸収コントロール

研究課題名(英文) Regulation of intestinal absorption of lipids and lipophilic drugs via chylomicron formation

研究代表者

森田 真也 (Morita, Shin-ya)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20449870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：リポタンパクの一種であるカイロミクロンは、小腸上皮においてリン脂質やトリアシルグリセロールから形成される粒子であるが、その形成制御メカニズムはほとんど分かっていない。本研究では、小腸上皮モデル細胞におけるリポタンパク粒子形成について検討を行った。培地に脂肪酸と胆汁酸を加えることにより、細胞からのリポタンパク分泌が増加し、脂肪酸と胆汁酸は、リポタンパク粒子分泌に重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、胆汁酸が、肝臓から腸管へのリン脂質分泌を促進することが示された。胆汁酸は、リン脂質の腸管への排出ならびに脂肪酸の腸管吸収促進を通じて、カイロミクロン分泌を活性化させていることが推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小腸におけるカイロミクロン形成は、生命の維持に欠かせず、メタボリックシンドロームにも関わる重要な事象であり、また、細胞内で巨大な脂質タンパク複合粒子が会合して分泌されるという物理化学的にも極めてダイナミックで興味深い現象であるにもかかわらず、世界を見渡してもカイロミクロン形成メカニズムを分子レベルで研究しているのは、卓越した技術を有する数グループのみであった。本研究では、特に胆汁酸が、カイロミクロン形成ならびに分泌において重要な役割を果たしていることが示唆された。これらの知見が、脂質異常症やメタボリックシンドロームの改善を目的とした小腸脂質吸収抑制薬の開発などにつながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Chylomicrons are the lipoprotein particles consisting of phospholipids and triacylglycerols and formed in the intestinal epithelia. However, the mechanism for chylomicron formation remains largely unknown. In this study, we investigated the lipoprotein formation in the intestinal model cells. The lipoprotein secretion from the cells was increased by the addition of fatty acids and bile salts into culture medium, suggesting that fatty acids and bile salts play important roles in the lipoprotein secretion. In addition, we showed that bile salts enhanced the phospholipid secretion from the liver into the intestinal lumen. It is conceivable that bile salts stimulate the chylomicron secretion by enhancing the phospholipid secretion into the intestinal lumen and the intestinal absorption of fatty acids.

研究分野：脂質生化学

キーワード：脂質 リポタンパク 小腸吸収 トリアシルグリセロール リン脂質 胆汁酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

- (1) 食事として摂取された中性脂質(トリアシルグリセロール)は、小腸管腔内で胆汁酸とミセルを形成し、リパーゼによって脂肪酸とモノアシルグリセロールに分解される。脂肪酸とモノアシルグリセロールは小腸上皮細胞に吸収された後、細胞内でトリアシルグリセロールに再合成されて、アポリポタンパク B (ApoB) とミクロゾームトリグリセライド輸送タンパク (MTP) の働きによりカイロミクロンとしてリンパへと移行する。また、食事由来ならびに胆汁由来のリン脂質は、小腸管腔内で胆汁酸とミセルを形成し、ホスホリパーゼによって脂肪酸とリゾリン脂質に分解される。リゾリン脂質も小腸上皮細胞に吸収された後、細胞内でリン脂質に再合成され、カイロミクロン表面を形成する。カイロミクロンとは、リポタンパクの一種で、コア脂質であるトリアシルグリセロールやコレステロールエステルを、表面脂質であるリン脂質とコレステロールが包み込んだ直径 80~500nm の脂質粒子であり、その表面に ApoB をはじめとする種々アポリポタンパクが結合している。しかし、このカイロミクロン形成に関する研究は、実験的に極めて困難であるため、そのメカニズムの分子レベルでの解明は進んでいない。
- (2) トリアシルグリセロールは、カイロミクロンの主要構成成分である。このため、小腸細胞からのカイロミクロン分泌を調べるためには、正確なトリアシルグリセロール定量法が不可欠である。しかし、従来のトリアシルグリセロール定量法では、特異性あるいは感度・精度が不十分であった。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では、カイロミクロンを分泌する小腸上皮モデル細胞を樹立し、カイロミクロン形成制御メカニズムの解明を目指す。そして、カイロミクロン形成と脂質・脂溶性薬物の吸収との関連を探る。
- (2) 新たなトリアシルグリセロール定量法の開発を行う。この定量法は、様々な脂質代謝研究で有益なツールとなることが期待される。

3. 研究の方法

- (1) ヒト結腸癌由来の Caco-2 細胞は、頂側膜やタイトジャンクションを形成することから、多孔性メンブレンフィルター上で培養することにより小腸上皮モデル細胞として用いられている。カイロミクロン (リポタンパク) 分泌のモデル細胞として、Caco-2 細胞を用いることで検討する。
- (2) 酵素と化合物を組み合わせて、高感度特異的トリアシルグリセロール酵素定量法の開発を行う。研究代表者がこれまで種々のリン脂質酵素蛍光定量法を開発してきたノウハウを生かす。

4. 研究成果

- (1) 酵素数種類と化合物を組み合わせた反応を原理とする高感度かつ特異的なトリアシルグリセロール酵素定量法の考案ならびに開発を行った。また、その定量法の妥当性を、添加回収試験により確認し、良好な結果が得られた。
- (2) 腸上皮モデル細胞である Caco-2 細胞におけるリポタンパク粒子形成について、多孔性メンブレンフィルター上で培養した Caco-2 細胞を用いて検討を行った。Caco-2 細胞は、多孔性メンブレンフィルター上での単層培養により分化し、細胞表面が微絨毛を形成する頂側膜と側底膜に分かれる。頂側膜側の培地に脂肪酸と胆汁酸を加えることにより、Caco-2 細胞から側底膜側培地へのトリアシルグリセロールの分泌が増加した。また、脂肪酸と胆汁酸は、Caco-2 細胞の側底膜側培地へ分泌されるリポタンパク粒子のサイズを大きくした。このことから、脂肪酸と胆汁酸は、リポタンパク粒子分泌に重要な役割を果たすことが明らかとなった。このように、Caco-2 細胞によるカイロミクロンを含むリポタンパク粒子の形成ならびに分泌制御が可能となった。
- (3) カイロミクロン形成において重要な働きをする胆汁酸とリン脂質とコレステロールの親和性について検討したところ、胆汁酸の中でも非抱合型胆汁酸がリン脂質やコレステロールと混合ミセルを形成しやすいことが明らかとなった。
- (4) カイロミクロンの形成ならびに分泌の調節に関わるリン脂質の肝臓から腸管への排出調節について、培養細胞ならびにマウスを用い検討を行ったところ、肝細胞の毛細胆管膜表面に存在するトランスポーター ABCB4 のリン脂質排出を胆汁酸が促進していることを見出した。そして、リン脂質との混合ミセル形成をしやすいグリシン抱合型の胆汁酸が、リン脂質の肝臓から腸管への排出を強く促進することを明らかにした。胆汁酸は、リン脂質の腸管への排出ならびに脂肪酸の腸管細胞への吸収促進を通じて、カイロミクロン分泌を活

性化させていることが推察される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Shin-ya Morita*. Metabolism and modification of apolipoprotein B-containing lipoproteins involved in dyslipidemia and atherosclerosis. *Biol. Pharm. Bull.*, 39 (1), 1-24 (2016) *Corresponding author, 査読あり
DOI: 10.1248/bpb.b15-00716
- ② 森田真也*. 酵素蛍光定量法による細胞内リン脂質代謝機能解析. *膜*, 41 (5), 202-208 (2016) *責任著者, 査読あり
DOI: 10.5360/membrane.41.202
- ③ 森田真也*. 脂質異常症治療薬. *医薬ジャーナル*, 54 (S-1), 607-614 (2018) *責任著者, 査読なし
- ④ Shin-ya Morita*, Yoshito Ikeda, Tokuji Tsuji, Tomohiro Terada. Molecular mechanisms for protection of hepatocytes against bile salt cytotoxicity. *Chem. Pharm. Bull.*, 67 (4), 333-340 (2019) *Corresponding author, 査読あり
DOI: 10.1248/cpb.c18-01029
- ⑤ Yoshito Ikeda, Shin-ya Morita*, Ryo Hatano, Tokuji Tsuji, Tomohiro Terada. Enhancing effect of taurohyodeoxycholate on ABCB4-mediated phospholipid efflux. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, in press *Corresponding author, 査読あり
DOI: 10.1016/j.bbali.2019.06.001

[学会発表] (計 17 件)

- ① Shin-ya Morita, Yoshito Ikeda, Tomohiro Terada. Novel enzymatic fluorometric assays for quantifying cellular phospholipid classes. 12th International Congress of Cell Biology (Czech Republic) (2016)
- ② 森田真也. 酵素蛍光定量法による細胞内リン脂質代謝機能解析. 日本膜学会第 38 年会 (2016)
- ③ 森田真也, 池田義人, 寺田智祐. 胆汁酸に対するリン脂質の細胞保護作用のコレステロールによる低下. 医療薬学フォーラム 2017 (2017)
- ④ 森田真也, 池田義人, 辻徳治, 寺田智祐. リン脂質排出トランスポーターABCB4 を活性化する胆汁酸の探索とメカニズムの解明. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017 (2017)
- ⑤ 森田真也, 池田義人, 辻徳治, 寺田智祐. 胆汁酸による ABCB4 リン脂質排出の促進. 日本薬物動態学会第 32 回年会 (2017)
- ⑥ 池田義人, 森田真也, 寺田智祐. リン脂質が有する胆汁酸細胞毒性減弱作用に及ぼすコレステロールの影響. 日本膜学会第 39 年会 (2017)
- ⑦ 池田義人, 森田真也, 寺田智祐. 胆汁酸毒性に対するリン脂質の細胞保護作用に及ぼすコレステロールの影響. 第 59 回日本脂質生化学会 (2017)
- ⑧ 池田義人, 森田真也, 辻徳治, 寺田智祐. ABCB4 によるリン脂質排出を促進するアクセプター分子の探索. 第 12 回トランスポーター研究会年会 (2017)
- ⑨ 池田義人, 森田真也, 辻徳治, 寺田智祐. 毛細胆管膜トランスポーターABCB4 によるリン脂質排出を促進する分子の探索. 第 11 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2017)
- ⑩ 池田義人, 森田真也, 辻徳治, 寺田智祐. ABCB4 のリン脂質排出を促進する分子の探索. 第 39 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム (2017)

- ⑪ Shin-ya Morita, Yoshito Ikeda, Tokuji Tsuji, Tomohiro Terada. Enhancing effects of bile salts on ABCB4-mediated phospholipid efflux. 7th FEBS Special Meeting ABC Proteins (Austria) (2018)
- ⑫ 池田義人, 森田真也, 辻徳治, 寺田智祐. タウリン抱合型ヒオデオキシコール酸による ABCB4 を介したリン脂質排出の促進. 日本薬学会第 138 年会 (2018)
- ⑬ 池田義人, 森田真也, 辻徳治, 寺田智祐. ABCB4 リン脂質排出を促進する分子の探索とメカニズムの解明. 日本膜学会第 40 年会 (2018)
- ⑭ 池田義人, 森田真也, 辻徳治, 寺田智祐. タウロヒオデオキシコール酸による ABCB4 リン脂質排出の促進. 第 60 回日本脂質生化学会 (2018)
- ⑮ 池田義人, 森田真也, 波多野亮, 辻徳治, 寺田智祐. タウロヒオデオキシコール酸によるリン脂質排出トランスポーター ABCB4 の活性化. 第 13 回トランスポーター研究会 (2018)
- ⑯ 池田義人, 森田真也, 波多野亮, 辻徳治, 寺田智祐. ABCB4 によるリン脂質排出を強力に促進する分子の探索. 第 12 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (2018)
- ⑰ 池田義人, 森田真也, 波多野亮, 辻徳治, 寺田智祐. 胆汁リン脂質促進作用による新規肝機能改善薬の探索. 第 28 回日本医療薬学会年会 (2018)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ (滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部)

<http://www.sums-pharm.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：池田 義人

ローマ字氏名：Yoshito Ikeda

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：医学部

職名：特任助教

研究者番号 (8 桁)：40736980

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：辻 徳治

ローマ字氏名：Tsuji Tokuji

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。