

平成30年6月11日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15300

研究課題名(和文) ヒト型胆汁酸マウスの作製を目的とした標的遺伝子の探索

研究課題名(英文) Identification of bile acid 6beta-hydroxylase in mouse liver

研究代表者

平山 剛 (Hirayama, Takeshi)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：30449219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスは医学研究において最も広く使用される動物である。しかし、マウスの胆汁酸組成はヒトと大きく異なる。最も顕著な違いは、マウスの肝臓はケノデオキシコール酸(CDCA)の6-水酸化酵素活性を有するため、CDCAをほとんど認めず、ミュリコール酸(MCA)に置き換わっていることである。本研究において我々は、CDCAの6-水酸化酵素を肝酵素の中から探索し、その本態がCyp2c70であることを明らかにした。さらに我々は、Cyp2c70のノックアウトマウスを作製し、そのマウスはMCAの代わりにCDCAを有していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Mouse is the most commonly used animal for biomedical research. However, bile acid composition in mice is very different from that in humans. The most striking difference is a lack of chenodeoxycholic acid (CDCA) and the presence of muricholic acid (MCA) due to the activity of CDCA 6beta-hydroxylation in mice liver. In this study, we explored the enzyme that catalyzed 6beta-hydroxylation of CDCA and identified it as Cyp2c70. In addition, we made a mouse disrupted Cyp2c70 and confirmed that the mouse has CDCA instead of MCA.

研究分野：消化器病学

キーワード：胆汁酸 ミュリコール酸 マウス

1. 研究開始当初の背景

(1) 脂肪肝, NASH, 肝癌, 薬物性肝障害, 自己免疫性肝障害など, 代謝・免疫異常が関与する肝疾患のモデル動物として, マウス, ラットなどの齧歯類が用いられている。しかし, ヒトと齧歯類では代謝機構に様々な種差があり, ヒトの肝疾患の完全なモデルとはならないことが指摘されてきた。この問題を少しでも克服するために, 免疫不全肝障害マウスにヒトの肝細胞を移植したキメラマウスなどが開発され, 薬物動態や肝炎ウイルス研究などに利用されている。

(2) 過去のモデル動物を用いた肝疾患の研究を通じて, 動物実験の有用性と共に種差による限界も感じてきた。特に graft versus host response によるマウスの肝炎モデルでは肝障害が早期に自然軽快し, その原因の1つがマウスの胆汁酸組成がヒトと大きく異なり, 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)が極めて少なく, 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%近くを占めるためと考えられた。

(3) キメラマウスでは免疫不全状態にあり, 免疫が関与する肝疾患の研究には使いにくいほか, 残存するマウスの肝細胞が, ヒト肝細胞が生成したCDCAをMCAに代謝してしまう。従って, 新たにヒト型胆汁酸マウスを開発することが, 肝の代謝・免疫研究にとって極めて有用であると考えた。

2. 研究の目的

ヒトと異なりマウスの肝には, CDCAの6位に水酸基を付加してMCAを生成する酵素が存在することがわかっているが, その酵素は未だ同定されていなかった。従って本研究では, 同酵素を同定し, 責任遺伝子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CDCA/UDCA 6 水酸化酵素活性測定法の開発

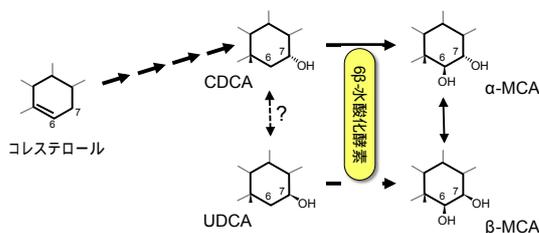


図1 ケノデオキシコール酸(CDCA)からミュリコール酸(MCA)の合成経路

図1に示すように, マウスの肝臓で合成されるMCAには -MCAと -MCAの2種類がある。CDCAまたはUDCAを基質としてミクロソーム分画の酵素で合成されると推測される。従って, ミクロソームとNADPH存在下に37でインキュベーションを行い, 基質としてCDCAを用いた場合の -MCAの生成量, およ

びUDCAを用いた場合の -MCAの生成量をLC-MS/MSにて定量する方法を開発した。

(2) CDCA/UDCA 6 水酸化酵素活性の性質の検討

ヒト肝ミクロソーム(pooled sample), 雌雄のマウス肝ミクロソーム, 雌雄のラット肝ミクロソーム, および雄ラットの腎ミトコンドリアおよびS9分画を使用し, (1)で開発した方法により6 水酸化酵素活性の測定を行った。さらに, チトクロームP450(CYP)のspecific inhibitorであるProgesterone(Cyp2>3), Troleandomycin(Cyp3)およびHET-0016(Cyp4>2,3)を添加した条件で酵素活性を測定した。

(3) CDCA/UDCA 6 水酸化酵素活性の探索

上記により得られたデータを基に, 図2に示す方法によって, マウスのCyp遺伝子102個の中から目的の遺伝子の探索を行った。



図2 マウスのCyp遺伝子群からのCDCA/UDCA 6 水酸化酵素の探索

(4) ノックアウトマウスの作製

pX330プラスミドのBbsI制限酵素部位に, 標的とするCyp遺伝子のプロトスペーサー隣接モチーフ(PAM)の上流20塩基を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にpX330プラスミドをマイクロインジェクションし, 翌日, 正常に卵割した2細胞を偽妊娠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, 標的配列を含むプライマーと共にPCR増幅し, 精製したPCR産物を電気泳動にかけて, 遺伝子型を決定した。さらに内部に設計したプライマーを用いて, ダイレクトシーケンシングを行い, 導入変異の遺伝子配列を解析した。得られたF0マウスの雌雄を交配し, 簡易的なノックアウトマウスの作製と表現型の解析を行った。

4. 研究成果

(1) CDCA/UDCA 6 水酸化酵素活性測定法の開発

リン酸バッファー(pH7.4)中, NADPHの存在下, 37で20分のインキュベーションにより, CDCAは -MCAへ, UDCAは -MCAへ変換し, 酵素活性を測定することができた。

(2) CDCA/UDCA 6 水酸化酵素活性の性質の検討

CDCAを基質とした場合の6 水酸化酵素



種	性	臓器	細胞分画	7epimerize 6βOH		7epimerize 6αOH	
				α-MCA	β-MCA	γ-MCA	ω-MCA
ヒト	pool	肝	ミクロソーム	0	0	0	0
マウス	♂	肝	ミクロソーム	126	0	0	0
				♀	肝	ミクロソーム	124
ラット	♂	肝	ミクロソーム	234	3	0	0
				♀	肝	ミクロソーム	125
♂	腎	腎	ミトコンドリア	0	0	0	0
			S9	0	0	0	0

Mean of duplicate assay. 単位はpmol/min/mg protein

図3 CDCAを基質とした場合の6β水酸化酵素活性の比較

活性を図3に比較する。ヒトでは -MCA の生成は全く認められなかった。マウスの肝では有意な活性を認め、雌雄で活性値に違いはなかった。ラットでも有意な活性を認め、雌よりも雄のほうが活性が高かった。一方、ラット腎のミトコンドリアおよび S9(ミクロソーム+サイトソール)では活性を認めなかった。また、UDCA を基質とすると -MCA が生成され、CDCA を基質とした場合と同様の性差が認められたが、その活性は CDCA を基質とした場合よりも低かった。

図4に CDCA 6 水酸化酵素活性に対する CYP 阻害剤の影響を示す。Cyp2 群の阻害剤である Progesterone によって CDCA 6 水酸化酵素活性は強く抑制され、CDCA/UDCA 6 水酸化は Cyp2 群の酵素によって触媒される可能性が示唆された。

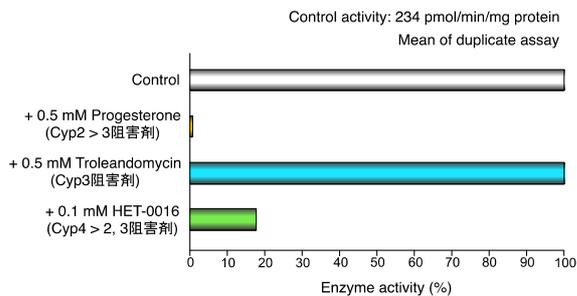


図4 肝ミクロソームCDCA6β水酸化酵素活性に対するCYP阻害剤の影響

(3) CDCA/UDCA 6 水酸化酵素活性の探索

図5にマウスの Cyp 遺伝子 102 個およびヒト遺伝子との同一性の一覧を示す。この中から、方法の(3)に示す手法により、ヒトとの相同遺伝子を除外、肝で発現していない遺伝子を除外、腎で発現している遺伝子を除外、発現に性差のある遺伝子を除外し、最終的に図6に示される6個の候補遺伝子が抽出された。

マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト
1a1	1A1	2b23		2c70		2j9		3a57	3A43	4f17	4F8	17a1	17A1
1a2	1A2	2c29		2d9		2j13		3a59	3A43	4f18	4F3	19a1	19A1
1b1	1B1	2c37	2C19	2d10		2ab1		4a10	4A11	4f37		20a1	20A1
2a4	2A13	2c38		2d11		2r1	2R1	4a12a	4A22	4f39	4F22	21a1	21A1
	2A6	2c39		2d12		2s1	2S1	4a12b	4A22	4f40	4F11	24a1	24A1
		2A7	2c40		2d22	2D6	2t4	4a14		4v3	4V2	26a1	26A1
2a5	2A13	2c44		2d26		2u1	2U1	4a29		4x1	4X1	26b1	26B1
		2A6	2c50	2C19	2c34	2w1	2W1	4a30b		5a1	5A1	26c1	26C1
		2A7	2c54	2C19	2c40	3a11	3A4	4a31		7a1	7A1	27a1	27A1
2a12		2c55	2C18	2e1	2E1	3a13	3A7	4a32	4A11	7b1	7B1	27b1	27B1
2a22		2c65	2C8	2f2	2F1	3a16	3A4	4b1	4B1	8a1	8A1	39a1	39A1
2b9		2c66	2C8	2g1		3a25	3A43	4f13		8b1	8B1	46a1	46A1
2b10	2B6	2c67		2j5		3a41a	3A4	4f14	4F12	11a1	11A1	51a1	51A1
2b13		2c68		2j6	2J2	3a41b	3A4	4f15	4F2	11b1	11B1		
2b19		2c69		2j7		3a44	3A4	4f16		11b2	11B2		

図5 マウスとヒトのCYPの対応表

マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト		
1a1	1A1	2b23		2c70		2j9		3a57	3A43	4f17	4F8	17a1	17A1
1a2	1A2	2c29		2d9		2j13		3a59	3A43	4f18	4F3	19a1	19A1
1b1	1B1	2c37	2C19	2d10		2ab1		4a10	4A11	4f37		20a1	20A1
2a4	2A13	2c38		2d11		2r1	2R1	4a12a	4A22	4f39	4F22	21a1	21A1
	2A6	2c39		2d12		2s1	2S1	4a12b	4A22	4f40	4F11	24a1	24A1
		2A7	2c40		2d22	2D6	2t4	4a14		4v3	4V2	26a1	26A1
2a5	2A13	2c44		2d26		2u1	2U1	4a29		4x1	4X1	26b1	26B1
		2A6	2c50	2C19	2c34	2w1	2W1	4a30b		5a1	5A1	26c1	26C1
		2A7	2c54	2C19	2c40	3a11	3A4	4a31		7a1	7A1	27a1	27A1
2a12		2c55	2C18	2e1	2E1	3a13	3A7	4a32	4A11	7b1	7B1	27b1	27B1
2a22		2c65	2C8	2f2	2F1	3a16	3A4	4b1	4B1	8a1	8A1	39a1	39A1
2b9		2c66	2C8	2g1		3a25	3A43	4f13		8b1	8B1	46a1	46A1
2b10	2B6	2c67		2j5		3a41a	3A4	4f14	4F12	11a1	11A1	51a1	51A1
2b13		2c68		2j6	2J2	3a41b	3A4	4f15	4F2	11b1	11B1		
2b19		2c69		2j7		3a44	3A4	4f16		11b2	11B2		

図6 候補遺伝子の抽出

さらに、2016年に米国のグループより、Cyp2c 群すべての遺伝子をノックアウトしたマウスで、MCA が作られていないことが報告された。さらに同グループは、Cyp2c70 が6水酸化酵素の可能性が高いとの考察を行った。我々の推察と一致していたことより、Cyp2c70 が6水酸化酵素であると断定し、早速 Cyp2c70 のノックアウトマウス作製に着手した。

(4) Cyp2c70 ノックアウトマウスの作製

Cyp2c70 のイントロン1と2に切断部位が来るようにガイドRNA(gRNA)を設定した Cas9 発現ノックアウトベクターを作成し、F0 マウスを作製した。さらに、雌雄の F0 マウス同士の交配による簡易的な Cyp2c70 ノックアウトマウスを作製して胆汁中の胆汁酸分画を分析したところ、Cyp2c70 ノックアウトマウスでは、MCA を有さず、代わりに通常のマウスではわずかししか認められない CDCA を多く有していることが確認された。

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4件)

Murakami M, Iwamoto J, Honda A, Tsuji T, Tamamushi M, Ueda H, Monma T, Konishi N, Yara S, Hirayama T, Miyazaki T, Saito Y, Ikegami T, Matsuzaki Y. Detection of gut dysbiosis due to reduced *Clostridium* subcluster XIVa using the fecal or serum bile acid profile. 査読有, *Inflamm Bowel Dis* 2018; 24: 1035-1044. DOI:10.1093/ibd/izy022.

Hirayama T, Ikegami T, Honda A, Miyazaki T, Yara S, Kohjima M, Nakamuta M, Matsuzaki Y. Differences in the serum 4-hydroxycholesterol levels of patients with chronic HCV infection: a possible impact on the efficacy and safety of IFN-free treatment. 査読有, *Intern Med* 2018; 57: 1219-1227. DOI:10.2169/internalmedicine.9479-17.

Ikegami T, Honda A. Reciprocal interactions between bile acids and

gut microbiota in human liver diseases. 査読有, Hepatol Res 2018; 48: 15-27. DOI:10.1111/hepr.13001.
Higashimura Y, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Ushiroda C, Ohnogi H, Kudo Y, Yasui M, Inui S, Hisada T, Honda A, Matsuzaki Y, Yoshikawa T. Protective effect of agaro-oligosaccharides on gut dysbiosis and colon tumorigenesis in high-fat diet-fed mice. 査読有, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2016; 310: G367-G375. DOI:10.1152/ajpgi.00324.2015.

東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：10468639

(3)研究分担者

宮崎 照雄 (MIYAZAKI, Teruo)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：60532687

〔学会発表〕(計4件)

本多 彰, 宮崎照雄, 平山 剛, 池上 正, 松崎靖司. マウスにおけるデオキシコール酸7-hydroxylaseの探索. 第38回胆汁酸研究会, 久留米 11/26, 2016.

高科庸子, 田岡広樹, 谷垣龍哉, 平木稜太, 中村杏菜, 本多 彰, 北村奈穂, 渡辺光博. 異なる系統のマウスにおける胆汁酸と脂質代謝作用機序の比較解析. 第16回日本抗加齢医学会総会, 横浜 6/10, 2016.

本多 彰, 宮崎照雄, 平山 剛, 宮本和宜, 池上 正, 松崎靖司. 齧歯類におけるミュリコール酸合成酵素の探索 (その1). 第37回胆汁酸研究会, 横浜 11/7, 2015.

池上 正, 本多 彰, 松崎靖司. NASH-HCC患者における血清胆汁酸プロファイルの特徴. 日本消化器関連学会週間2015(ワークショップ)東京 10/8, 2015.

〔図書〕(計1件)

Honda A, Ikegami T, Matsuzaki Y. Chapter 3: Intestinal Digestion and Absorption. Bile Acids in Gastroenterology: Basic and Clinical. (S. Tazuma and H. Takikawa eds.), Springer 2017; 27-41.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

平山 剛 (HIRAYAMA, Takeshi)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：30449219

(2)研究分担者

本多 彰 (HONDA, Akira)