2版

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ５ 月 ２８ 日現在

機関番号：３２６６５

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：１６Ｋ１９０６２

研究課題名（和文）肥満モデルマウスの腸内環境及び胆汁酸代謝変動におけるビタミンD受容体の役割

研究課題名（英文）Roles of vitamin D receptor in the gut microbiota and bile acid metabolism in diet-induced obesity mice.

研究代表者

石澤　通康（ISHIZAWA, Michiyasu）

日本大学・医学部・助教

研究者番号：３０６４６５４２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：肥満病態における胆汁酸代謝と腸内細菌の関係性に対する、ビタミンD受容体（VDR）の役割を明らかにすることを目的とし、野生型マウス或いは体重増加の起こらないVDR欠損マウスにて食事性肥満モデルを作成した。高脂肪食はいずれの遺伝子型マウスにおいても糞中総胆汁酸量及び二次胆汁酸量を増加させたが、VDR依存性の量的、質的変化は認められなかった。上部小腸でVDRを活性化するビタミンDと異なり、二次胆汁酸であるリトコール酸(LCA)は下部小腸でVDRをより活性化することを明らかにした。肥満病態で増加したLCAは下部小腸以下でVDRのリガンドとしては腸管免疫の恒常性などに寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
＜学術的意義＞VDR欠損マウスでは腸内細菌組成、胆汁酸組成が変化するが、これらは高脂肪食によるVDR欠損マウスの体重が増えないことへの関わりは弱かった。二次胆汁酸LCAが下部小腸選択的にVDRを活性化することは、近年報告されているLCAの免疫調節作用や大腸炎抑制作用を仲介するメカニズムの一つと考えられた。＜社会的意義＞高脂肪、高コレステロール状態に反応したLCAの排出量増加と、LCA依存性のVDR活性化部位を同定したことは、肥満等生活習慣病に伴う腸内環境の変化、免疫系の変化によって増加する全身性の疾患リスクに対して、これらを調節する機能を有するVDRを標的とした治療・健康維持戦略を提案できた。

研究成果の概要（英文）：　The aim of our research is to elucidate roles of vitamin D receptor (VDR) in the bile acid metabolism and gut microbiota in diet-induced obesity (DIO) mice. First, we confirmed that high fat diet (HFD) feeding didn’t increase body weight in VDR knockout (VDRKO) mice. Although HFD increased fecal total bile acids and secondary bile acids (e.g. lithocholic acid (LCA)) contents both wild type mice and VDRKO mice, VDR deficiency didn’t change bile acid contents and compositions. These data reveal that VDR deficiency represses weight gain by feeding HFD, but doesn’t change bile acid contents or compositions.
I next examined VDR activation by injecting LCA or vitamin D3 (VD3), the active form of vitamin D, to the wild type mice. VD3 activated VDR mainly in the proximal part of small intestine, while LCA activated VDR in the distal part of small intestine. My data suggest that VDR plays a role in maintenance of intestinal homeostasis in DIO mice via secondary bile acids.

研究分野：生化学

キーワード：ビタミンD　胆汁酸　核内受容体　肥満　腸内細菌

※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。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

ビタミンＤ受容体(Vitamin D receptor; VDR)は、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性転写因子であり、骨カルシウム代謝の恒常性に重要な働きをする活性型ビタミンD(VD3)の受容体である。更にVDRは腸内細菌によって産生される胆汁酸の受容体でもあるが、胆汁酸受容体としての生理機能は明らかになっていない。VDR欠損マウスでは脂肪が蓄積しにくく、脂肪細胞特異的なビタミンＤ受容体トランスジェニックマウスは肥満になる。しかし、ビタミンＤ受容体の脂肪蓄積における作用点は未だ不明瞭である。一方、胆汁酸は、腸内細菌の過剰増殖を抑制し、肥満病態に特徴的な腸内細菌組成を改善する。

研究代表者らは、外科的胆汁うっ滞モデルマウスにおいて、VDRと腸内細菌を含む腸内環境との相互作用に関する着想を得たのち、平成２６年度採択の若手(B)研究（課題番号26860222）において、VDR欠損マウスの血中では抱合化胆汁酸が増加することを確認し、高脂肪食摂取では血中の二次胆汁酸比率が増加することを明らかにした。本研究課題は前回の研究課題における解析を継続、発展させたものである。

２．研究の目的

前研究課題では、血中の生化学的成分及び血中、尿中、肝臓中の胆汁酸組成解析までを完了したので、本研究課題では、（１）野生型マウス及びVDR欠損マウスを利用し、肥満病態におけるマウス糞中の胆汁酸組成変化に関して更に詳細に解析し、VDRがどのように関与するか、またVDR依存性の変化が認められた場合、腸内細菌の存在が必要であるかどうかを明らかにすること。更に、（２）野生型マウスにおいて、胆汁酸によるVDRの活性化部位を明らかにし、ビタミンＤ型VDRアゴニスト或いは胆汁酸型VDRアゴニストの作用が肥満病態における糖尿病症状及び胆汁酸代謝変動にどのような影響を及ぼすか、またその現象に腸内細菌は関与するかどうかを明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

（１）野生型マウス又はVDR欠損マウスに2mM塩化カルシウム溶液と通常食(CE-2，日本クレア)又は高脂肪食(HFD32，日本クレア)を自由摂取させ、４週間後、又は８週間後の胆汁酸蓄積部位(血漿、肝臓、胆汁、尿、糞)を回収し、LC/MSにて胆汁酸組成を分析した。胆汁酸代謝変動に関する体内の代謝メカニズムの変動を評価するため、肝臓、回腸における胆汁酸代謝酵素、トランスポーター、その他胆汁酸代謝制御因子の遺伝子発現解析を行った。

（２）野生型マウスにVD3、リトコール酸（LCA）或いは溶媒コントロールを経口投与し、１４時間後に腸管各部位（十二指腸、空腸、回腸、大腸）及び腎臓を回収。各部位におけるVDRの活性化マーカー分子の遺伝子発現解析を行い、各VDRアゴニストの標的部位を比較した。

４．研究成果

（１）肥満病態モデルマウスにおける血中成分の評価と胆汁酸組成解析及び関連遺伝子の発現解析

①４週間及び８週間の高脂肪食摂取は、いずれも野生型マウスの体重増加と、血中グルコース、トリグリセリド、総コレステロールといった糖尿病症状を認めた。VDR欠損マウスにおいても同様の傾向を示した。

②血中及び尿中では、通常食の際に総胆汁酸量の増加を認めたが、高脂肪食摂取で野生型よりもむしろ減少傾向を示し、肝臓においても高脂肪食摂取は総胆汁酸量の減少を認めた。いずれの組織においても VDR 欠損による影響は軽微であった。一方、糞中の総胆汁酸量は通常食において VDR 欠損マウスでは増加傾向を示した。高脂肪食摂取では野生型マウス、VDR 欠損マウスいずれにおいても総胆汁酸量の有意な増加を認めたが、VDR 依存性の変化は認められなかった。

③糞中胆汁酸組成を詳細に解析した結果、デオキシコール酸、LCA、ヒオデオキシコール酸及びケノデオキシコール酸、ムリコール酸類(α、β、ωの総和)の有意な増加を認めた（図１）。糞中の総胆汁酸量及び各種胆汁酸量の増加は VDR 欠損マウスにおいても同様に認められたが、野生型マウスとの大きな違いは認められなかった。

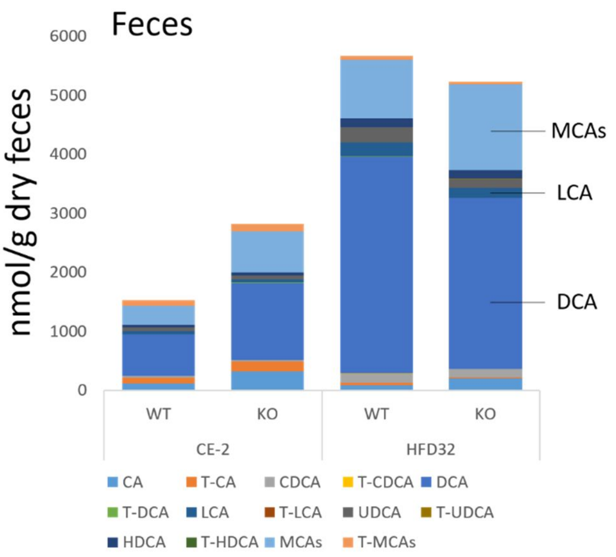

図１　野生型マウス、VDR欠損マウスに４週間高脂肪食を摂取させた際の1g乾燥糞中あたりの胆汁酸組成

④肝臓及び回腸における胆汁酸代謝関連分子の遺伝子発現解析を行った。VDR欠損マウスの肝臓

では胆汁酸の生合成酵素である CYP7A1，CYP8B1 及び CYP27A mRNA が高発現を認めたが、高脂肪食摂取では CYP8B1、CYP27A1 の発現は野生型と同レベルまで戻った。CYP7A1 mRNA のみ、高発現を維持した。一方、回腸で産生され、血中を介して肝臓で胆汁酸生合成の抑制にはたらく FGF15 は高脂肪食摂取で発現増加傾向を示した。VDR 依存性の変化は認められなかった。FGF15 と同様に胆汁酸受容体 FXR の標的遺伝子である SHP mRNA も高脂肪食摂取で同様の発現増加傾向を示した。

（２）VDR アゴニストの投与による VDR 作用部位の比較

野生型マウスに VD3、LCA 又は溶媒コントロールを経口投与し、１４時間後の腸管各部位、腎臓における VDR の活性化を評価した。VD3 は上部小腸（十二指腸）及び腎臓において効果的に VDR 活性化指標 CYP24A1 mRNA レベルを増加させたが、下部腸管（回腸、大腸）での効果は上部小腸に比べ弱かった。一方、LCA は上部小腸での CYP24A1 発現誘導は VD3 に及ばなかったが、下部腸管においては同程度に作用した。腎臓での効果は認められなかった。以上の結果より、活性型ビタミン D は主に上部小腸と腎臓をはじめとする血中を介した標的臓器で作用し、LCA は下部小腸以降で VDR リガンドとして作用することを明らかにした。

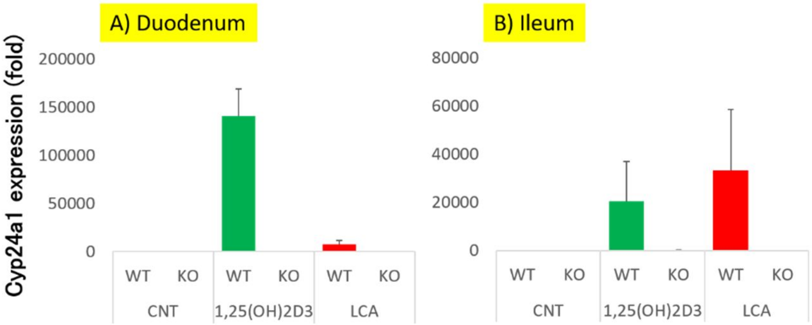

図2　野生型マウス及びVDR欠損マウスにおける各VDRリガンドのCYP24A1 mRNA誘導能

（３）総括

高脂肪食摂取は肝臓胆汁酸量を減少させ、糞中胆汁酸量を増加させた。これは高脂肪食摂取によって腸内細菌組成の中で、バクテロイデス門からファーミキューティス門へと優位性が移行したことを示唆しており、高脂肪食摂取では腸内細菌の胆汁酸脱抱合化酵素 bsh 遺伝子と、一次胆汁酸から二次胆汁酸を産生する７αデヒドロキシラーゼ baij 遺伝子の発現増加が報告されている。VDR 欠損マウスは、肝臓 CYP7A1 発現を亢進し、糞中胆汁酸組成に高脂肪食と同様の傾向（二次胆汁酸の増加）を示した。VDR 依存性の変化は高脂肪食摂取による変化に相加的でないことから、高脂肪食摂取と同様のメカニズムで糞中胆汁酸量、胆汁酸組成に影響することが示唆された。しかし、高脂肪食摂取時に認められる VDR 欠損マウスでの体重増加の抑制メカニズムに VDR 依存性の腸内細菌及び胆汁酸組成変化の関与は軽微と考えられた。

外来性の LCA 投与によって LCA 依存性の VDR 活性化部位が下部小腸以下であることを明らかにした。近年、適切な濃度調節を行った際の LCA の投与実験では、腸管免疫細胞の制御、大腸炎の抑制効果が報告されている。生活習慣病等で体内の脂質が増加した際、これらの体外への排泄に伴い胆汁酸合成、二次胆汁酸産生が亢進し、生活習慣病に伴う腸の疾患リスクに対して VDR が胆汁酸受容体として機能し、防御的にはたらくと考えられる。本研究は、今後、腸管を標的とした大腸炎モデル等疾患モデルにおいて、高脂肪食などを付加した際、種々VDR アゴニストによる治療効果と胆汁酸代謝や腸内細菌組成の変動を評価する研究に発展させる予定である。

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 Michiyasu Ishizawa, Daisuke Akagi, Makoto Makishima	４．巻 19(7)
２．論文標題 Lithocholic Acid Is a Vitamin D Receptor Ligand That Acts Preferentially in the Ileum.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 International journal of molecular sciences.	６．最初と最後の頁 1975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19071975	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4件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 石澤 通康、槇島 誠
２．発表標題 食事性肥満における胆汁酸組成変動とビタミンD受容体の関与
３．学会等名 第３９回　胆汁酸研究会
４．発表年 2017年

１．発表者名 石澤 通康、槇島 誠
２．発表標題 ビタミンD受容体の糞中胆汁酸代謝への関与
３．学会等名 日本レチノイド研究会 第28回学術集会
４．発表年 2017年

１．発表者名 石澤 通康、槇島 誠
２．発表標題 食事性肥満における胆汁酸組成変動とビタミンD受容体の関与
３．学会等名 第38回 胆汁酸研究会
４．発表年 2016年

１．発表者名 Michiyasu Ishizawa, Makoto Makishima
２．発表標題 Lithocholic acid selectively induces ileal CYP24A1 mRNA via Vitamin D receptor.
３．学会等名 Keystone Symposia, Bile Acid Receptors as Signal Integrators in Liver and Metabolism.（国際学会）
４．発表年 2017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
研究協力者	槇島　誠 (MAKISHIMA Makoto)	日本大学医学部・教授	
研究協力者	本多　彰 (HONDA Akira)	東京医科大学・教授	