

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08017

研究課題名(和文) ウルソデオキシコール酸より優れた肝細胞保護作用を持つ胆汁酸の探索と臨床応用

研究課題名(英文) Comparative effect of ursodeoxycholic acid and more hydrophilic bile acids on hepatoprotection

研究代表者

平山 剛 (Hirayama, Takeshi)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30449219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ウルソデオキシコール酸(UDCA)は肝保護作用を有する親水性胆汁酸であるが、より親水度の高い胆汁酸(ミュリコール酸, MCAs)がより肝障害に有効か否かを検討した。MCAsを持つ正常マウスと、Cyp2c70/Cyp2a12をダブルノックアウト(DKO)してMCAsを作れなくしたマウスを用いた。DKOマウスは肝障害を認め、UDCA投与で肝障害は軽減したが、正常マウスの様に正常化しなかった。DKO+UDCAマウスでは、肝組織中コレステロール、中性脂肪、リトコール酸が上昇し、肝障害が消失しない一因と考えられた。以上より、UDCAよりもMCAsの方が肝保護作用の点から有効性が高い可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウルソデオキシコール酸(UDCA)は、古くから広く肝障害の治療に使われている薬剤であるが、その効果は限定的である。UDCAの効果をさらに高めた新しい薬剤の開発を行うことが一連の研究の目的であり、本研究ではミュリコール酸(MCAs)が有力な候補物質のひとつであることを明らかにした。また、マウスを用いた胆汁酸製剤の効果判定のために、ヒトと類似の胆汁酸代謝経路を持つヒト型胆汁酸マウスを用いた検討を行ったが、胆汁酸製剤以外にも、胆汁酸代謝に影響を与える、あるいは胆汁酸によって影響を受ける様々な薬剤のスクリーニングに、本マウスを応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ursodeoxycholic acid (UDCA) is a hydrophilic bile acid (BA) that has hepatoprotective activity. The present study was undertaken to prove the superiority of more hydrophilic muricholic acids (MCAs) on hepatoprotection than UDCA. We used Cyp2c70/Cyp2a12 double knockout (DKO) mice with human-like hydrophobic BA composition and chronic liver injury. In DKO mice treated with UDCA, the proportion of UDCA increased to more than 60% of the total BA pool, and liver injury ameliorated somewhat. However, UDCA treatment did not completely normalize liver function tests or hepatic expressions of inflammatory cytokines. Furthermore, UDCA treatment increased hepatic concentrations of cholesterol, triglycerides, and lithocholic acid (LCA) compared with untreated DKO and wild type (WT) mice, which appears to prevent the further improvement of liver injury by UDCA. Thus, hepatoprotection by UDCA is limited, and MCAs appear to be more effective BAs for the treatment of liver injury, at least in mice.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胆汁酸 ウルソデオキシコール酸 ミュリコール酸 肝障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ウルソデオキシコール酸 (UDCA) は肝機能改善、利胆、コレステロール胆石の溶解などの効能効果を有する薬剤である。一定の有効性が認められることと少ない副作用によって、60年前にわが国で初めて発売されて以来、現在では全世界で広く用いられている。肝・胆道系の臨床にはなくてはならない薬ではあるが、原発性胆汁性胆管炎 (PBC) での有効率は約 70%にとどまり、自己免疫性肝炎 (AIH)、原発性硬化性胆管炎 (PSC)、非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に対する効果は、臨床的に満足できるものではない。

(2) UDCA はその水酸基の位置より、親水性の特徴を有する胆汁酸であり、ヒトで多くを占める疎水性の胆汁酸との置換作用によって肝・胆管細胞を保護し、肝機能を改善させると考えられる。従って UDCA より親水性の (図 1 で Hydrophobicity index が UDCA より小さい) 胆汁酸によって肝保護作用をさらに高めることができれば、UDCA 不応性病態の克服につながる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

UDCA より親水性の胆汁酸のうち、腸内細菌または肝臓によって疎水性の胆汁酸に変換されにくい構造を有するものとして、マウスなど齧歯類が有するミュリコール酸類 (MCAs) に着目した。本研究では UDCA と MCAs の肝保護作用を比較し、MCAs の有効性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Cyp2c70^{-/-}Cyp2a12^{-/-}マウスの準備

CRISPR-Cas9 システムを用いて、齧歯類特有の MCAs を持たない Cyp2c70^{-/-}Cyp2a12^{-/-} (DKO) マウスを作製し (J Lipid Res 61:54-69, 2020)、飼育繁殖させて実験に用いた。

(2) DKO マウスへの UDCA 投与

DKO マウスを 2 群に分け、半分は通常食+通常水で飼育、残りの半分は通常食+UDCA 添加水で飼育した。飲料水への UDCA 添加量は 75 mg/100 mL とした。マウスの飲水量は約 5 mL/day であることから、UDCA の投与量は 150 mg/kg/day に相当すると考えられる。20 週齢で安楽死させ、血清、肝臓、胆嚢、小腸、糞便を採取した。

(3) 胆汁酸分析

血清、糞便および組織中の胆汁酸は、血清中と胆汁中はアルカリ加水分解せずに、また肝臓、小腸および糞便中胆汁酸は、1N KOH 水溶液中 80°C で 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 (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 (150 x 2.1 mm, 3 μm, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用し、移動相は既報に従った (J Lipid Res 61:54-69, 2020)。

(4) ステロール分析

血清および肝組織中のステロール類は、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にヘキサン抽出した。蒸発乾固後にピコリン酸にて誘導体化し、HPLC-MS/MS にてステロール類を一斉分析した (J Steroid Biochem Mol Biol 121:556-564, 2010)。

(5) mRNA の発現解析

RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて、肝組織から 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 (J Lipid Res 61:54-69, 2020)。

(6) 病理組織学的検討

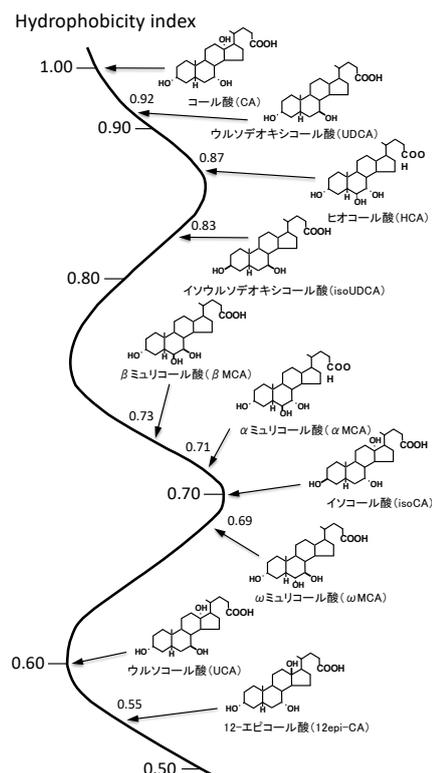


図1 UDCAよりも親水性の(疎水性が低い)胆汁酸
コール酸の疎水性を1.0とした場合の比較

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) UDCA 投与による胆汁酸組成の変化

図 2 に示すように、DKO マウス (UDCA 非投与) では通常のコル酸 (CA) が減少し、デオキシコル酸 (DCA) が増加していた。このマウスに UDCA を投与すると、投与前に胆汁酸分画の大部分を占めていた CDCA や DCA が著減し、UDCA に置換された。また、UDCA の腸内細菌による代謝物であるリトコル酸 (LCA) も増加したが、その増加の程度には個体差が非常に大きかった。胆汁酸のプールサイズおよび糞便中の胆汁酸量は、UDCA 投与群で増加していた。

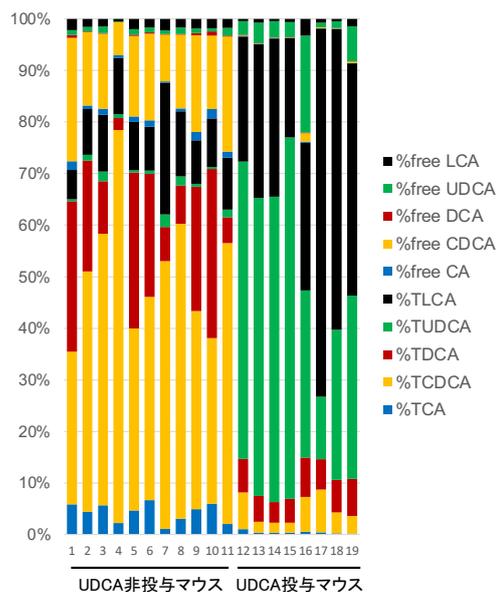


図 2 DKO マウスへの UDCA 投与による肝組織中胆汁酸組成の変化

(2) DKO マウスの肝障害に対する UDCA 投与の影響

DKO マウスでは親水性の MCAs が減少し、疎水性の CDCA と DCA が増加しているため、図 3 に示すように血清 ALT 活性が上昇していた。これに UDCA を投与すると、ALT の有意な低下を認めると共に病理組織学的にも炎症の改善を認めた。しかし、UDCA 投与によっても WT マウスと完全に同じレベルまで肝障害は改善しなかった。

(3) UDCA 投与による中性脂肪代謝の変化

DKO マウスでは WT マウスよりも肝組織中の中性脂肪 (TG) が上昇傾向にあったが (J Lipid Res 61:54-69, 2020)、UDCA を投与するとさらに有意な上昇が認められた (図 3)。インスリン抵抗性に関与すると考えられている肝組織中の free fatty acid (FFA) にも同様の増加が認められた。肝組織の mRNA 発現を見ると、脂肪酸合成系を制御する Srebp1, Acc1, Fas などは、いずれも UDCA 投与で有意に低下し、脂肪酸β酸化に関与する Cpt1a には上昇を認めた。このことから、UDCA 投与は中性脂肪の消化吸収を促進し、肝組織中の脂肪酸と中性脂肪を増加させている可能性が示唆された。WT マウスの MCAs が UDCA に置換されるとこのような中性脂肪の変化が認められることから、インスリン抵抗性の予防という点では UDCA よりも MCAs の方が優れている可能性が示唆された。

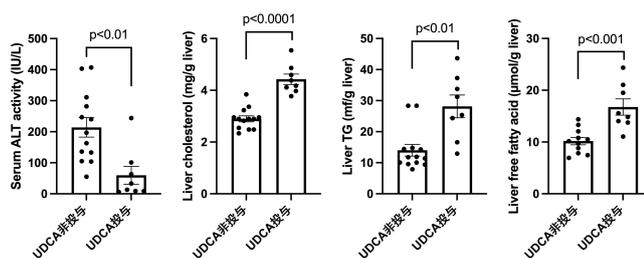


図 3 DKO マウスへの UDCA 投与による肝障害と肝脂質の変化

(4) UDCA 投与によるコレステロール代謝の変化

中性脂肪と同様に、UDCA 投与によって肝組織中の総コレステロールの有意な上昇を認めた。肝組織の mRNA 発現では、胆汁酸合成系の律速酵素である Cyp7a1 の発現に有意な低下を認めたが、Shp の発現や血清 FGF15 の濃度には有意な変化を認めなかった。UDCA は FXR のリガンド活性が弱く、胆汁酸合成系にフィードバックをかけないと考えられているが、FXR に依存しない経路によって胆汁酸合成が抑制されている可能性が考えられた。一方、UDCA 投与群では、コレステロール合成系の律速酵素である Hmgcr の発現も低下傾向であり、コレステロール吸収マーカーである血清植物ステロール (Campesterol, Sitosterol) も減少していたことより、胆汁酸合成の抑制が UDCA 投与による肝組織中コレステロール濃度上昇の主因であると考えられた。以上のような UDCA 投与による胆汁酸合成の抑制が、UDCA そのものによるのか UDCA 代謝物 (LCA など) によるのかは、今後の検討を要する。WT マウスの MCAs が UDCA に置換されると、肝のコレステロール蓄積も認められることから、生体内のコレステロールを減少させる点でも MCAs の方が UDCA より優れている可能性が示唆された。

(5) 今後の展望

MCAs が UDCA よりも優れた肝保護作用を持つ候補胆汁酸のひとつであることを明らかにしたが、ヒトへの応用にはまだ幾つかのハードルがある。MCAs にも α -, β -, ω -と種類があり、どれが最も肝保護作用に優れているか、また、経口投与した場合の吸収効率を考えると、非抱合型よりもグリシンまたはタウリンと抱合したほうが良いのか否かなど、現在検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Honda A, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, Morishita Y, Monma T, Ueda H, Mizuno S, Sugiyama F, Takahashi S, Ikegami T.	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 2020年
3. 雑誌名 J Lipid Res	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 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.	4. 巻 24
2. 論文標題 Detection of Gut Dysbiosis due to Reduced Clostridium Subcluster XIVa Using the Fecal or Serum Bile Acid Profile	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflamm Bowel Dis	6. 最初と最後の頁 1035-1044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ibd/izy022.	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 -

〔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 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

1. 発表者名 上田 元、本多 彰、宮崎照雄、平山 剛、池上 正
2. 発表標題 ヒト型の胆汁酸組成を有するマウスモデルにおけるウルソデオキシコール酸の影響
3. 学会等名 第57回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021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	本多 彰 (HONDA Akira) (10468639)	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・准教授 (32645)	

	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	上田 元 (UEDA Hajime)		
研究協力者	池上 正 (IKEGAMI Tadashi)		

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
---------	---------