

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32728

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07048

研究課題名(和文) コレステロール胆石症発症性差の解明

研究課題名(英文) Sex differences in the development of cholesterol cholelithiasis

研究代表者

山崎 泰広 (Yamazaki, Yasuhiro)

湘南医療大学・薬学部医療薬学科・准教授

研究者番号：80415330

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)：コレステロール胆石症は、胆汁中で発生したコレステロール結石により引き起こされる疾患である。本疾患は中年以降の女性で好発することが知られているが、その発症性差のメカニズムは明らかでない。本研究では、脂質生合成・代謝系や胆汁脂質分泌能の性差が胆石症発症率の差を生み出す可能性について検討した。胆石症誘発食により作成した胆石症モデルマウスを解析した結果、雌では胆汁酸トランスポーター・Abcb11タンパク質の毛細胆管膜上への局在が不十分であり、胆汁酸分泌量が足りない結果、コレステロール結石が発生しやすい状態であることを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個別化療法の進展に伴い、性別による発症率の違いや、それを考慮した治療戦略の開発が必要であるという認識は、近年急速に広まっている。中でも、コレステロール胆石症は出産経験のある40歳以降の女性が多く発症すると言われているが、なぜ発症率に性差があるのかに関してはいまだ不明な点が多く、解明すべき問題である。本研究では、コレステロール・胆汁酸の生合成系、および胆汁酸トランスポーターの機能性差が、胆石発症性差の要因である可能性を見出した。本研究の成果は、コレステロール胆石症の予防・治療における個別化医療を実現するための基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cholesterol cholelithiasis is a disease caused by cholesterol stones resulting from an imbalance of bile lipid components, known to be more prevalent in women. Differences in cholesterol metabolism and bile secretion machinery may be factors contributing to the sex differences, but the details have not been elucidated. Here, we investigated the sex differences in the expression of molecules related to hepatic cholesterol metabolism and hepatobiliary excretion in mouse at the gene and protein levels. Additionally, biliary outputs of three bile lipids, i.e. cholesterol, phospholipids and bile acids, were also determined in male and female mouse. These results suggest that insufficient induction of canalicular Abcb11 protein expression resulted in the failure to increase the concentration of bile acids and subsequent cholesterol supersaturation in lithogenic diet-fed female mouse.

研究分野：生理学

キーワード：性差 コレステロール胆石症 胆汁分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物療法の基盤となる基礎研究において、性別を考慮することが肝要であるという認識は、近年急速に広まっている。中でも、コレステロール胆石症は出産経験のある 40 歳以降の女性が多く発症すると言われていたが、なぜ発症率に性差があるのかに関してはいまだ不明な点が多く、解明すべき問題である。コレステロール胆石症の発症性差に関するこれまでの報告としては、ER (エストロゲンレセプター) 過剰発現マウスでは、肝臓でのコレステロール合成および胆汁分泌が亢進すること、また逆に ER 欠損マウスでは、胆石発生率、およびコレステロール分泌能が低下するというものがあり、エストロゲンの関与が指摘されている。しかしながら、ホルモン補充療法によるエストロゲン投与が必ずしも胆石発生率を上昇させないという報告もあり、今後さらなる検証が必要な状況である。

2. 研究の目的

コレステロール胆石症発生の最大の要因は、胆汁中の脂質成分比の不均衡がもたらすコレステロール過飽和であるため、肝臓におけるコレステロール合成系やそれを胆汁中で可溶化するのに必要な胆汁酸、リン脂質の合成系、さらにこれら胆汁脂質成分の分泌を担う ABC トランスポーターの発現・機能変化を調べることは、疾患発症のメカニズムを解明するうえで極めて重要である。前述のように、女性ホルモンであるエストロゲンはコレステロールの生合成や胆汁分泌を促進する作用があり、胆石発生に対しても優位に働く。本研究の目的は、オミックス解析や胆汁分泌能測定、および生化学的解析を組み合わせることにより、胆汁分泌能の性差が胆石発生に及ぼす影響を包括的に調べることである。

3. 研究の方法

(1) 動物、およびサンプル調製

全ての動物実験は静岡県立大学動物実験委員会、および湘南医療大学動物実験委員会の承認の下で実施した。6 週齢の同腹の雄性および雌性 C57BL/6J マウスを日本 SLC 株式会社から購入し、1 週間の環境馴化後に、1 週間高脂肪食 (F2HFD1) または普通食を摂餌させ、8 週齢で実験に使用した。高脂肪食はオリエンタル酵母から購入した。飼育環境については、食餌および水は自由に摂取させ、12 時間サイクルで点灯、消灯を行った。また胎児、および新生児マウスは、発情期雌性マウスと雄性マウスを同ケージで飼育し交配させることにより作成した。妊娠確認後、その仔マウスを胎生 17.5 日及び生後 8.5 日で実験に使用した。

(2) DNA マイクロアレイ用試料の調整

RNAlater™ 処理を行った肝臓を 1 mm 四方になるようにハサミでミンチ状にした。ミンチ状の組織片からランダムに組織片を取り、合計で 15-20 mg の組織を Total RNA の抽出に使用した。Total RNA の抽出は、RNeasy Mini™ Kit (QIAGEN) を用い、添付のプロトコールに従って行った。その後、サンプル間の個体差を小さくするために同腹仔の雌雄それぞれ 3 匹ずつの肝臓から抽出した total RNA を、600 ng ずつ計 1800 ng になるように雌雄それぞれで混ぜて Total RNA サンプルとした。Total RNA の質の評価は Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent, Santa Clara, CA) とシリーズ RNA6000 ナノキット (Agilent) を用いて行った。Total RNA を 100-200 ng/μL となるように調製し、添付のプロトコールに従って分析した。

(3) 網羅的遺伝子発現解析

網羅的遺伝子発現解析には Affymetrix Clariom™ D Array, mouse (Thermofisher scientific) を用いた。試料の調製は、GeneChip™ WT PLUS Reagent Kit (Thermofisher scientific) の添付のプロトコールに従って行った。具体的には、Total RNA をそれぞれ 200 ng 分取し、逆転写反応によ

り二本鎖 cDNA に変換した。次に、二本鎖 cDNA から T7 RNA Polymerase を用いて 16 時間 cRNA を生成・増幅し、生成した cRNA から逆転写反応により一本鎖 cDNA に変換した。この逆転写反応に用いる試薬には、dNTP 中に dUTP が含まれており、これをもとに UDG を用いて cDNA を断片化し、ビオチン標識でラベリングした。ハイブリダイズからスキャンまで GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit (Thermofisher scientific) の添付のプロトコールに従って行った。Affymetrix Clariom™ D Array, mouse と断片化ビオチン標識 cDNA を GeneChip™ Hybridization Oven 645 (Thermofisher scientific) でハイブリダイズさせた (45、16 時間)。ハイブリダイズ後の Affymetrix Clariom™ D Array, mouse を Fluidics Station 450 (Thermofisher scientific) で洗浄・染色した。その後、GeneChip scanner 3000 (Thermofisher scientific) でスキャンし、蛍光強度データを CEL file として得た。作成した CEL file は Transcriptome Analysis Console ver 4.0 (Thermofisher scientific) を用いて RMA 法で正規化し、発現変動遺伝子を得た。パスウェイ解析は、DAVID Bioinformatics Resources 6.8 の Functional Annotation Tool を用いて解析した (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>)。パスウェイ解析に使用するデータベースには KEGG_PATHWAY を使用した。

(4) リアルタイム PCR による発現遺伝子の定量

マウス肝臓から mRNA を抽出し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて cDNA を調製した。PCR 反応は Thunderbird qPCR SYBR Mix (TOYOBO) を用いて行った。

(5) 毛細胆管膜画分の調製

マウス肝臓を粗調製用ペストルですりつぶした後、40 倍量の低張液に再懸濁したものをガーゼで 2 回濾した。その後、遠心分離 (4、1,500g、10 分間) し、上清を除いた。沈殿物に低張液を加え、ピペティングにより懸濁させ、55% スクロース溶液を加えることにより 47% スクロース懸濁液を作成した。この懸濁液を遠心用チューブに移し、その上から 42.9% スクロースを重層した。遠心分離 (4、40,000rpm、70 分間) した後、二層のスクロース溶液間にある白濁層を採取し、さらに低張液を 5mL 加えた後に遠心分離 (4、40,000rpm、30 分間) することで毛細胆管膜画分を得た。

(6) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウェスタンブロット

粗膜画分と毛細胆管膜画分を、SDS-ポリアクリルアミドゲルに電気泳動した。タンパク質を PVDF 膜に転写後、5% スキムミルクでブロッキングした。一次抗体を反応後、HRP 標識二次抗体を反応させた。ECL ウェスタンブロットングキットを用いて発光後、バンドを検出した。

(7) 胆汁分泌能の測定

マウスを麻酔下固定し、肝臓および胆嚢を露出させた。総胆管の末端を結紮した後、胆嚢管からカニューレを差し込んで総胆管まで到達させ、カニューレを胆嚢ごと 2 カ所で結紮して固定した。胆汁は最初の 10 分間は廃棄し、その後の 30 分間分を直接採取した。胆汁脂質成分の解析は市販のキット (総コレステロール E-テストワコー、総胆汁酸テストワコー、リン脂質 C-テストワコー) を用いた。

4. 研究成果

(1) 成体マウス肝臓における発現変動遺伝子の雌雄差解析

普通食群、高脂肪食群の雌雄マウス肝臓から抽出した Total RNA を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。各サンプルにおける遺伝子発現パターンを視覚化するため、解析に使用した全遺伝子での PCA mapping を作成した。4 つのサンプルは離れた位置にプロットされたことが

ら、それぞれ独立した性質を持っていることが示された。普通食群では、雌雄間で差のあった遺伝子として全体で 1294 個（雄優位:583 個、雌優位:711 個）また高脂肪食群では、雌雄間で差のあった遺伝子として全体で 773 個（雄優位:401 個、雌優位:372 個）同定された（fold change > |1.5|）。高脂肪食群よりも普通食群の発現変動遺伝子数の方が多かった。また、発現変動遺伝子には性染色体上の遺伝子のみならず、常染色体上の遺伝子も多数含まれており、性別の違いが遺伝子発現に強い影響を与えている可能性が示唆された。普通食群の雌雄の比較で得られた発現変動遺伝子と高脂肪食群の雌雄の比較で得られた発現変動遺伝子のうち、双方に共通する遺伝子が雄優位なもので 136 個、雌優位なもので 148 個同定された。雌優位の共通遺伝子には X 染色体不活性化に不可欠である Xist が含まれていた。

（ 2 ）発現変動遺伝子のパスウェイ解析

発現変動遺伝子がどのような機能を担っているかを包括的に解析するため、パスウェイ解析を行った。その結果、雄優位、雌優位のどちらにも肝臓の機能である代謝や生合成、胆汁酸の生成に関わるパスウェイが多く含まれており、肝臓の機能面において遺伝子発現レベルで雌雄差があることが示唆された。得られたパスウェイから胆汁分泌に関与する項目について着目すると、普通食群の比較においてコレステロール生合成に関与する酵素群（Hmgcs1, Hmgcr, Dhcr24, Dhcr7, Nsdhl, Cyp51, Fdft1, Hsd17b7, Lss, Msmo1, Sqle, Sc5d）およびコレステロールから胆汁酸への異化の律速酵素である Cyp7a1 の発現が雌優位であった。一方で、雄ではこれらに関わる遺伝子で優位なものはなかったことから、雌において胆汁酸合成・胆汁分泌能が高い可能性が示唆された。同様に、高脂肪食群の発現変動遺伝子で解析を行ったところ、普通食群に比べて雌雄差のある分子数が減少しており、高脂肪食負荷時には胆汁分泌の機能性差が消失する可能性が示唆された。以上の結果は、定量的 RT-PCR による遺伝子解析からも確認された。

（ 3 ）胎児、および新生児マウス肝臓における発現変動遺伝子の雌雄差解析

胎児期・新生児期のマウスは内分泌・環境の違いの影響が少ないと考えられるため、染色体由来の性差を観察するために最適なモデルであると考えられる。そこで、性分化が済んでおり、成体の肝臓同様に肝内胆管や成熟肝細胞が出現し始めている胎生 17.5 日（E17.5）のマウス、出生後経口での食事を行なっている出生後 8.5 日（P8.5）のマウスから肝臓を摘出し、同様に DNA マイクロアレイによる解析を行った。無作為に選んだマウス雌雄を交配させ、生まれた胎児・新生児の雌雄それぞれ 3 匹分の肝 total RNA をミックスし、サンプルとした。雌雄間で発現差のあった遺伝子として、E17.5 マウス肝臓では全体で 480 個（雄:357 個、雌:123 個）、P8.5 マウス肝臓では全体で 681 個（雄:396 個、雌:285 個）同定した（fold change > |1.5|）。E17.5 マウスよりも P8.5 マウスの発現変動遺伝子数の方が多かった。また、全発現変動遺伝子に占める性染色体上の遺伝子の割合が成体マウスの結果よりも多かった。成体マウスで見出した胆汁分泌能の性差が胎児や新生児でも見られるか確認するため、胆汁分泌、およびコレステロール生合成系パスウェイに含まれる遺伝子群について解析したところ、E17.5 では Slc10a1, Cyp7a1, Cel の遺伝子が雄で有意であったが、他の遺伝子では雌雄差がみられなかった。また、P8.5 では、Baat, Nr0b2 の遺伝子が雌で優位であったが、他の遺伝子では雌雄差はみられなかった。このことから、成体マウスで見られたコレステロール合成能、および胆汁分泌能の性差は発生初期にはほとんど存在しないことがわかった。

（ 4 ）雌雄間における脂質トランスポーター発現の比較

脂質成分の胆汁分泌を担う ABC トランスポーターの発現雌雄差を解析した。雄雌マウスをそれぞれ 2 群に分け、普通食または高脂肪食のいずれかを 3 日間摂取させ、肝臓における Abcg5、

Abcg8 (コレステロール)、Abcb4 (リン脂質)、Abcb11 (胆汁酸) の mRNA レベル、およびこれらトランスポーターの毛細胆管膜におけるタンパク質レベルを測定した。mRNA レベルは、雌雄ともに、高脂肪摂餌により Abcg5 および Abcg8 の有意な増加が確認された。一方で、Abcb4 および Abcb11 の発現は、雄における Abcb4 の発現を除いて変化しなかった。トランスポーター遺伝子の発現量は、同じ餌を与えた雄雌マウス間で有意な差はなく、マイクロアレイのデータと一致した。

毛細胆管膜におけるトランスポーターの発現をタンパク質レベルで解析するために、シヨ糖密度勾配遠心分離により肝毛細胆管膜画分を調製し、ウェスタンブロット法で解析した。高脂肪食負荷は雌雄ともに Abcg5 と Abcg8 の発現量を顕著に増加させたが、雌雄間での発現量を比較すると両食事群ともに有意差はなかった。一方、高脂肪食により雄マウスの毛細胆管膜における Abcb11 の発現レベルは顕著に増加したのに対し、雌マウスではほとんど変化がなかった。これまでの報告や研究成果から、毛細胆管における脂質分泌量は、膜上のトランスポータータンパク質の発現量に依存することがわかっており、この結果は高脂肪食負荷が雄の肝臓においてのみ胆汁酸の分泌を亢進させることを示唆している。またこの結果は、Abcb11 の雌雄における機能制御が、遺伝子レベルではなく翻訳後レベルで違いがあることも示唆している。

(5) 雌雄間における胆汁分泌能の違い

胆汁分泌関連分子における遺伝子およびタンパク質の発現レベルの性差が、胆汁分泌に反映されているかどうかを検証するために、胆汁分泌能の測定を行った。高脂肪食負荷は雌雄ともに胆汁脂質成分の分泌量を増加させたが、各脂質分泌量の増加率には性差があった。すなわち、高脂肪食によって誘導されるコレステロール、リン脂質の分泌量増加率は雌の方が大きく、一方で胆汁酸の分泌量増加率は雄で大きかった。次に分泌された胆汁中の各脂質成分濃度を比較した。コレステロール、およびリン脂質濃度は、雌の方が高脂肪食による上昇が大きかったが、一方で胆汁酸濃度は雄では他の脂質成分に付随して上昇したのに対し、雌ではほとんど変化がなかった。その結果、普通食群では雌の方が低かった胆汁中のコレステロール飽和指数 (CSI) が、高脂肪食群では逆転していた。この現象は、雌では高脂肪食により胆汁酸トランスポーター・Abcb11 の毛細胆管膜での発現が上昇しなかった結果を反映していると考えられる。

以上の結果をまとめると、普段は雌の方が胆汁酸の合成・分泌ともに高く、コレステロール胆石は発生しにくい状態であるが、高脂肪食負荷により胆石が発生するような生理条件下では、雌での胆汁酸合成能の有意性は消失し胆汁酸分泌能も雄より低くなる結果、胆石の発生率は雌雄で逆転する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大西 あゆみ、三枝 香都貴、吉村 英憲、山崎 泰広、黒川 洵子
2. 発表標題 高脂肪食負荷マウスにおける胆汁分泌能および関連トランスポーターの性差解析
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 泰広、大西 あゆみ、吉村 英憲、三枝 香都貴、黒川 洵子
2. 発表標題 高脂肪食負荷マウスにおけるABCトランスポーターの発現性差解析
3. 学会等名 第92回 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山崎 泰広、吉村 英憲、大西 あゆみ、黒川 洵子
2. 発表標題 卵巣ホルモンが胆石症モデルマウスの胆汁分泌に与える影響についての検討
3. 学会等名 第93回 日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山崎 泰広、吉村 英憲、大西 あゆみ、黒川 洵子
2. 発表標題 卵巣ホルモンが胆汁脂質分泌に与える影響についての検討
3. 学会等名 第14回日本性差医学・医療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山崎 泰広、長谷川 歩惟、黒川 洵子
2. 発表標題 胆汁分泌における性差発生メカニズムの解析
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024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

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