

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17343

研究課題名（和文）胆汁酸再吸収阻害薬を用いた子宮内発育遅延由来の非アルコール性脂肪性肝疾患予防研究

研究課題名（英文）Prevention research of Nonalcoholic Fatty Liver Disease due to Intrauterine growth restriction Using Bile Acid Reabsorption Inhibitors

研究代表者

中野 聡（Nakano, Satoshi）

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70826453

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：子宮内発育遅延モデルを作成するために、妊娠18日目のラットに子宮動脈結紮術を試みたが、Control群と比較して有意な体重減少が得られなかった。次に、実験動物をラットからマウスに変更し、妊娠中のタンパク質制限食負荷による子宮内発育遅延モデルの作成に励んだ。当初、タンパク質制限母体のストレスによる出産後の不育・捕食などがあり、出生仔体の評価が進まなかったが、生育環境の調整により仔体の安定した発育を実現させた。子宮内発育遅延モデル母体児は有意差はつかなかったものの、出生体重はControl群と比較して、低体重であり、肝臓でのCyp7a1発現量も減少していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦では、出生数が減少傾向にあるにも関わらず、全出生児に占める低出生体重児の割合は年々増加し、10%前後を占める。LBWIの主要な原因の一つに子宮内発育遅延がある。近年、IUGRによるLBWIが、将来の非アルコール性脂肪性肝疾患、2型糖尿病、慢性腎臓病などの疾患リスクを上げることが判明した。食生活の欧米化と飽食の影響で、非アルコール性脂肪性肝疾患は増加しており、特に小児期・思春期の増加が顕著である。以上の背景から、申請者は、IUGR児のNAFLD発症を未然に防ぐことが重要と考え、本研究の課題とした。

研究成果の概要（英文）：To create a model of intrauterine growth retardation, uterine artery ligation was attempted on the 18th day of pregnancy in rats, but no significant weight loss was obtained compared to the Control group. Next, the experimental animals were changed from rats to mice to try to create a model of intrauterine growth retardation due to protein-restricted dietary stress during pregnancy. Initially, the evaluation of the birth pups did not proceed due to postnatal failure and predation caused by stress from the protein-restricted mother, but stable development of the pups was achieved by adjusting the growth environment. Although the intrauterine growth retardation model mothers' offspring did not differ significantly, their birth weight was lower and Cyp7a1 expression in the liver was also reduced compared to the Control group.

研究分野：小児栄養消化器病学

キーワード：子宮内発育遅延 低出生体重児 低栄養 非アルコール性脂肪性肝疾患 胆汁酸再吸収阻害薬

## 1. 研究開始当初の背景

「子宮内発育遅延児の非アルコール性脂肪性肝疾患発症を未然に防げるか？」

本邦では、出生数が減少傾向にあるにも関わらず、全出生児に占める低出生体重児(Low Body Weight Infant: LBWI)の割合は年々増加し、10%前後を占める(厚生労働省 周産医療体制の現状について)。LBWIの主要な原因の一つに子宮内発育遅延(Intrauterine Growth Retardation: IUGR)がある。IUGRとは、在胎期間に相当する胎児の発育が得られない状態を指し、約70%は胎盤機能不全や母体糖尿病や高血圧などの母体・胎盤因子である。このような母胎環境で発育する胎児は、低栄養・低酸素状態に晒されるため、LBWIになりやすい。近年、IUGRによるLBWIが、将来の非アルコール性脂肪性肝疾患(Nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD)、2型糖尿病、慢性腎臓病などの疾患リスクを上げることが判明した。NAFLDとは、組織/画像診断で脂肪肝を認め、アルコール性脂肪性肝障害などを除外した病態であり、その一部は肝癌へ進展する。食生活の欧米化と飽食の影響で、NAFLDは増加しており、特に小児期・思春期の増加が顕著である。我が国の人口動態を踏まえると、今後IUGRによるNAFLD症例が、加速度的に増加することが予想される。IUGRによるNAFLD症例では、胎児期の低栄養・低酸素状態による多臓器発育・機能不全に加えて、(通常の成人症例と比較して)より早期に生活習慣病が多発するため、既存治療への反応性が乏しく、しばしば治療に難渋する。以上の背景から、申請者は、IUGR児のNAFLD発症を未然に防ぐことが重要と考え、本研究の課題とした。

## 2. 研究の目的

「目的：胆汁酸再吸収阻害薬が、IUGR由来のNAFLD発症を抑制するかを検証する」

IUGRラットはLBWIで出生するが、通常の食餌でも高脂血症、肥満傾向となる。さらに、IUGRラットに高脂肪食を与えると、正常妊娠群(Normal Pregnancy: NP)よりも高率にNAFLDを発症する(Zinkhan EK et al. *Pediatr Res* 2014)。このIUGR-NAFLDラットは肝内コレステロール量増加、高脂血症というヒトNAFLDと同所見を呈し(Puri P et al. *Hepatology* 2007)、肝内コレステロール増加はNAFLD発症を誘発する(Mitsuyoshi H et al. *Hepatol Res* 2009)。また、高脂肪食負荷によるNPのNAFLDではCyp7a1発現は増強する(Yamada S et al. *Oncotarget* 2018)が、IUGRラットでは、胎生期から肝臓でのCyp7a1発現が抑制され(Liu X et al. *J Clin Biochem Nutr* 2014)、NAFLDを発症しても肝臓のCyp7a1発現は抑制されたままである。CYP7A1は肝臓で胆汁酸を生成することで、コレステロール排泄を促す酵素である。実際、Cyp7a1欠損マウスでは肝内コレステロール量増加と高脂血症(Erickson SK et al. *J Lipid Res* 2003)となるが、対照的にCyp7a1過剰発現マウスでは高脂肪食負荷による肥満、脂肪肝が抑制され、インスリン抵抗性が改善される(Li T et al. *Hepatology* 2010)。これらの知見から申請者は、IUGRによる胎生期からのCYP7A1発現抑制がコレステロール排泄能低下を招き、肝内コレステロール量が増加することでNAFLD発症リスクが上昇すると考え、CYP7A1発現を増強させればIUGRをベースとするNAFLD発症リスクを抑制できる、と仮定した。CYP7A1によってコレステロールから生成される胆汁酸は、胆管を經由して十二指腸に分泌され、その95%が回腸末端部の腸管上皮細胞のapical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT)によって再吸収され、門脈を介して肝臓へ戻る(腸肝循環)。2018年4月にASBT阻害薬であるelobixibat(A3309)が本邦で発売された。その適応症は慢性便秘症で、回腸での胆汁酸再吸収阻害により大腸へ流入した胆汁酸が、TGR5と結合し大腸の水分分泌と消化管運動を促す。一般的に腸肝循環する胆汁酸プール量が減少すると、胆汁酸合成を促進させるためにCYP7A1発現は増強し、コレステロール排泄能は上昇する(Lorbek G et al. *FEBS J* 2012)。実際、慢性便秘症患者への第Ⅰ相試験において、elobixibatは便中胆汁酸濃度を上昇させ、血清LDLコレステロール値を低下させた(Nakajima A et al. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2018)。動物実験ではASBT阻害による肝臓Cyp7a1発現の増強が確認されており(Rao A et al. *Sci Transl Med* 2016)、欧米では他のASBT阻害薬であるvolixibatを使用した非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の治療試験が進行中である(<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02787304>)。以上の考察から、Cyp7a1発現増強効果が期待できるelobixibat(ASBT阻害薬)を投与することで、IUGR出生によるCyp7a1発現抑制を改善させ、NAFLD発症を抑制することを目的とし、ラットでの検証実験を行うこととした。

## 3. 研究の方法

### 【動物実験】

自然交配させたラットを妊娠18日目に両側子宮動脈結紮を行うIUGR群と、Sham手術(開腹と閉腹のみ)を行うNP(Normal Pregnancy)群を作成する。両群共に妊娠22日に自然分娩で出生させる(NP

群と比較して、IUGR 群は出生時体重が 20-25%低下する)。生後 3 週までは母体下で哺育し、以後、両群を(1)通常食群(Harlan Teklad, RD.8640)、(2)高脂肪食群(0.2%コレステロール含有:Harlan Teklad, custom diet TD.120330)、(3)高脂肪食+elobixibat 群に 3 分割し、28 週齢まで飼育する。

#### 【検体採取】

<1>在胎 21 日(帝王切開)、<2>生後 3 週((1)-(3)への分割前)、<3>生後 15 週、<4>生後 28 週を Endpoint とし、検体(血液、尿、便、胆汁、肝臓、回腸、大腸)を採取する。検体採取する個体は IUGR 群 NP 群ともにオスを用い、各ポイント(<1>-<4>)で使用する個体数は、<1>n=5×2( , )=total n=10、<2>n=5×6( -(1), -(2), -(3), -(1), -(2), -(3))=total n=30、<3>total n=30 (<2>と同じ)、<4> total n=30 (<2>と同じ)とする。なお、生後 25-27 週に Glucose 負荷試験・Insulin 感受性試験( )を実施する。

< Glucose 負荷試験・Insulin 感受性試験( ) >

Glucose 負荷試験: 6 時間絶食ラットに glucose(2g/kg)を腹腔内投与

0,15,30,60,90,120min に簡易血糖測定器で尾静脈血から血糖測定

Insulin 感受性試験: 4 時間絶食ラットに human regular insulin(0.1U/kg)を腹腔内投与

0,15,30,45,60min に簡易血糖測定器で尾静脈血から血糖測定

#### 【測定・観察・評価】

飼育中の個体もしくは採取された検体を用いて以下の測定・観察・評価を行う。

A 体重: 生後から 1 週おきに測定

B 肝臓: 重量、肝重量/体重(%), 肝臓内の中性脂肪濃度、総コレステロール濃度、遊離コレステロール濃度、飽和脂肪酸濃度、胆汁酸濃度 (μg/mg liver)

C 血清: T-Chol, HDL-C, LDL-C, vLDL-C, TG, AST, ALT, Glu, IRI, Alb, アミノ酸分析など

D mRNA 発現: (肝) *Cyp7a1, Cyp8b1, Cyp27a1, Fxr, Shp, Lxra, Bsep, Srebp1c, Srebp2, Tgr5, Hmgr* など

(回腸) *Fgf15, Fxr, Tgr5, Shp, Ibabp* など

(大腸) *Fxr, Fgf15, Shp, Tgr5* など

E 肝病理: HE 染色、Azan 染色、Masson trichrome 染色、Oil Red O 染色

脂肪化、肝細胞の風船様変性、小葉内炎症、門脈域炎症、線維化、架橋形成を  
観察し、Brunt 分類と NAFLD Activity Score (NAS)で評価

F 胆汁酸分析: 血清、肝臓、胆汁、尿、糞(胆汁酸研究所にて LC/MS/MS で解析)

#### 【データ解析】

28week<4>における IUGR-高脂肪食群( -(2))と IUGR-高脂肪食+elobixibat 群( -(3))の、肝病理 (E)を比較することで、elobixibat による IUGR 由来の NAFLD 発症予防効果を検証し、(A)-(F)で得られた結果を活用して、その抑制機序を考察する。

## 4. 研究成果

血流障害による子宮内発育遅延 (Intrauterine Growth Retardation: IUGR) 仔体ラットの作製を行った。まず、IUGR 環境を模倣するために妊娠後期に子宮動脈結紮し、人工的に子宮低血流とする方法で低出生体重児 (Low Body Weight Infant: LBWI) の作成を試みたが、control 群と比較して有意な体重差を得られなかった。次に妊娠 17 日目のラットを吸入麻酔下で開腹し、4 本の子宮動脈にアミロイドコンストラクター(水分吸収による徐々に内腔が狭窄するリング)を装着する方法で LBWI の作成を試みたが、仔体の出生体重にバラツキが生じたため、安定した LBWI 児を得ることができなかった。

次に実験動物をラットからマウス (B57BL/6J) に変更し、カロリー制限食を投与するプロトコルで IUGR 児作成を試みた。雄雌交配し自然妊娠成立後、低たんぱく食群 (LP 群、蛋白 8%含有) とコントロール食群 (NP 群、蛋白 20%含有) に分け出産まで各栄養食で管理した。E19.5 (出産直前)における母マウスの平均体重は LP 群: 30.6g (n=3) と NP 群: 38.6g (n=4) であった (p<0.05)。一方、仔マウスの出生平均体重は LP 群で低値であったものの統計学的には有意差を認めなかった [NP 群: 1.57g (n=32)、LP 群: 1.29g (n=33)、p=0.34]。まず、耐糖能検索のためグルコース負荷試験を行った。12 週齢マウス (NP 群: n=10、LP 群 n=5) を 12 時間絶食管理した後、グルコース 1g/体重(kg)を腹腔内投与し、0 分、15 分、30 分、60 分、90 分、120 分で血糖値を測定した。NP 群と LP 群でそれぞれ 96.5±7.9 mg/dL vs. 95.6±17.9 mg/dL (0 分)、279±29.1mg/dL vs. 239.4±41.1mg/dL (30 分)、183.2±30.9mg/dL vs. 162.2±46.9mg/dL (60 分)、109.5±17.2mg/dL vs. 93±26.1mg/dL (120 分) と推移した。両群間で耐糖能に相違は認めなかった。マウス肝における *Cyp7a1* RNA 発現量 (qPCR) 比は、NP 群と比べて LP 群では 0.73 (each, n=3) に低下していた。IUGR モデルマウスでは、*Cyp7a1* 発現が抑制されており、このような仔体に脂質負荷が加わると、非アルコール性脂肪性肝疾患発症のリスクが高まると予想された。

現在、Cyp7a1 発現抑制が確認された IUGR モデルマウスに脂質負荷食を与え、胆汁酸再吸収阻害薬（胆汁酸再吸収阻害による腸肝循環する胆汁酸プール量減少によって、肝臓での CYP7A1 発現を増強し、コレステロール排泄能を改善する効果）の脂肪肝発症抑制効果を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平井沙依子、中野 聡、箕輪 圭、村野弥生、遠藤 周、春名英典、鈴木光幸、清水俊明
2. 発表標題 非アルコール性脂肪性肝疾患と慢性腎臓病の発症にD0HaD仮説の関与が考えられた学童例
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------