

機関番号：11301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590137

研究課題名 (和文) 血中コレステロールレベルの調節における回腸胆汁酸吸収の役割

研究課題名 (英文) Role of ileal bile acid absorption on regulation of serum cholesterol levels

研究代表者 宮田 昌明 (MIYATA MASAOKI)
東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90239418

研究成果の概要 (和文)：核内受容体 farnesoid X receptor に依存しないコレステロールを介する回腸胆汁酸吸収の抑制機序の存在が明らかとなった。また回腸 ASBT のタンパクレベルでの発現変動が回腸胆汁酸吸収の抑制機序の一因である事が示唆された。腸内細菌に依存する胆汁酸の変換により回腸 ASBT の発現が調節されており、これにより消化管の胆汁酸吸収が制御されていることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Intestinal bile acid absorption is negatively regulated through cholesterol signaling in an FXR-independent manner. Intestinal bile acid absorption is also regulated through enterobacteria-mediated bile acid transformation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ASBT, コレステロール, 胆汁酸, FXR, 腸内細菌, 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

脂質代謝異常症のうち高コレステロール血症の治療薬として胆汁酸吸着剤や胆汁酸吸収阻害剤が使用されている。よって消化管からの胆汁酸の吸収と血中コレステロールレベルには密接な関連があることが示唆されている。ところがこれらの両者を結びつける機序についてはいまだ多くの知見はなく、消化管からの胆汁酸吸収がどのような機序により調節されているかについてもほとんど知見がない。

2. 研究の目的

血中コレステロールレベルは多くの脂質代謝異常症と関連があり、その調節は健康維持のために重要である。このコレステロールレベルの調節に生体内胆汁酸レベルは密接に関わっており、そのレベルは消化管からの胆汁酸吸収に依存している。これらの観点から、消化管からの胆汁酸吸収の調節機序を明らかにすることにより生体内胆汁酸、コレステロールレベルの制御機構を理解する。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

用いた胆汁酸は Sigma-Aldrich (St. Louis,

Missouri, USA)あるいはSteraloids

(Newport, Rhode Island, USA)より購入した。抗ASBT抗体はDr. Paul A. Dawson (Wake Forest University School of medicine)より供与された。Fxr 欠損マウスは米国国立衛生研究所(Dr. Frank J. Gonzalez)より供与された。

(2)動物への薬物処置

雄性のC57BL/6NマウスあるいはFxr 欠損マウスを用いる。コレステロールと胆汁酸の併用投与実験ではコレステロール(0.5%, 1.25%)と胆汁酸(0.5%)を混餌で6日間投与した。抗菌薬(アンピシリン)投与実験ではアンピシリン(100 mg/kg)、胆汁酸(500 mg/kg)を強制経口投与した。アンピシリンは3日、7日、14日投与、胆汁酸はアンピシリン投与最終日に一度投与した。

(3)胆汁酸組成解析

HPLCを用いて組成解析を実施した。分離カラムはL-column ODS 2.1×150 mm (5 μm) (財団法人 化学物質評価研究機構)を反応カラムはEnzymepak 3α-HSD column 4.0×20 mm (日本分光)を用いた。胆汁酸は3- α -hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD)による反応で生成する β -NADHをEx 365 nm, Em 470 nm (FP-920S) (日本分光)で検出した。

(4)mRNAレベルの定量

Power SYBR® Green PCR mix (Applied Biosystems)を用いABI PRISM®7000で解析した。

(5)Asbt タンパクレベルの定量

一次抗体としてPBSで500倍希釈したanti-rodent Asbt抗体(produced in rabbit)、二次抗体としてPBSで3000倍希釈したanti-rabbit IgG-alkaline phosphatase(produced in goat)と順次反応させ、発色液で反応させた。検出されたバンドはスキャナー(EPSON Colorio GT-8700)で読み取り、NIH Image(Ver. 1.59)を用いて定量した。

4. 研究成果

(1)Fxr 欠損マウスへのコレステロールあるいはコール酸投与の消化管胆汁酸吸収への影響

Fxr 欠損マウスに1.25%コレステロールあるいは0.5%コール酸を投与すると肝内の胆汁酸レベルはコール酸投与で上昇したが、コレステロール併用によってその上昇は抑制された。この抑制の程度はコレステロールの投与容量に依存した。このことからコレステロール投与はFxrに依存せずに胆汁酸レベルの

増加を抑制することが示唆された。そこでこの時の消化管からの胆汁酸吸収能について解析した。門脈中胆汁酸濃度はコレステロール併用により低下した。In situ ループ法により胆汁酸吸収能を評価したところコレステロール併用により吸収能の減少が認められた。回腸Asbt mRNAレベルはコレステロール併用によって変動は認められなかったが、回腸刷子縁膜中のAsbtタンパクレベルの有意な減少が認められた(図1)。この結果よりコレステロール投与はFxrに依存せずにAsbt

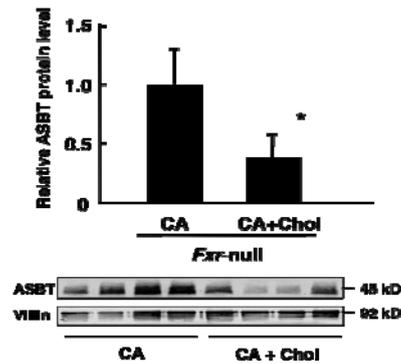


図1 コール酸(CA)投与マウスの回腸Asbtタンパクレベルへのコレステロール(Chol)併用投与の影響

タンパクレベルを低下させ、回腸からの胆汁酸吸収を減少させることが示唆された。

(2)抗菌薬投与による胆汁酸動態の変動

胆汁酸プールサイズは、肝臓でのコレステロールからの胆汁酸合成、胆汁中への胆汁酸排泄および消化管から肝臓への胆汁酸吸収の3つの要因のバランスによって厳密に調節されている。我々は、マウスへの3日間のアンピシリン投与による腸内細菌数の減少とそれに起因する胆汁酸組成変動が、肝臓における胆汁酸の合成および胆汁中排泄を亢進することを見出した。したがって、胆汁酸プールサイズが上昇し、糞中胆汁酸排泄量も増加することが予想された。しかし、実際には糞中胆汁酸排泄量が減少することが確認された。これらの事実は、ABPCの投与により、

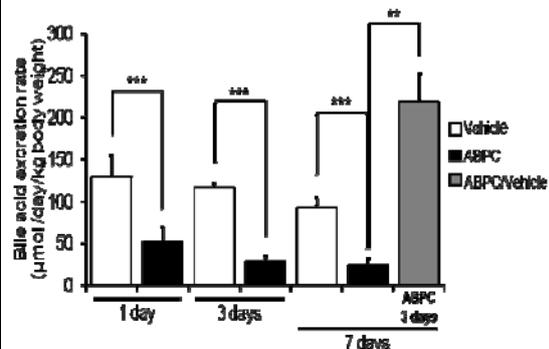


図2 糞中胆汁酸排泄速度におけるアンピシリン(ABPC)投与の影響

消化管から肝臓への胆汁酸吸収が亢進していることを示唆するものである。

本研究では、C57BL/6 雄性マウスに1日、3日間、7日間とABPCを継続的に投与し、胆汁酸吸収の亢進を確認するために門脈血中胆汁酸濃度および糞中胆汁酸排泄量を測定した。ABPC投与によって胆汁酸吸収が亢進することを確認するために、1日、3日間、7日間と100 mg/kgでABPCを継続的に投与したマウスより、門脈血を採取し、HPLCを用いてその胆汁酸濃度を測定した。また3日間のABPC投与の後、投与を中止して4日目以降はVehicleを投与したABPC投与中止群も実施した。門脈血中胆汁酸濃度は3日間、7日間のABPC投与群で対照群に対して有意に上昇した。また、ABPC投与中止群では対照群と同程度であった。

糞中胆汁酸排泄量がABPC投与により減少するかどうかを検討した。ABPC最終投与後24時間でマウスが排泄した糞を個体ごとに採取し、HPLCを用いて糞中胆汁酸排泄量を測定した。その結果、これまでの知見と一致して、糞中胆汁酸排泄量はABPC投与群で対照群に対して大きく減少した(図2)。一方で、新規な知見としてABPC投与中止群では対照群に対して増加することが確認された。ABPC投与後1日ですでに糞中胆汁酸排泄量が有意に減少しており、ABPC投与中止群では糞中胆汁酸排泄量が対照群に対して増加するという新たな知見も得られた。

ABPC投与中止群で、門脈血中胆汁酸濃度が対照群と同程度に戻り、糞中胆汁酸排泄量が対照群に対して増加した。このとき糞中の腸内細菌DNAレベルは溶媒対照群のレベルまで回復していた。これは本研究において得られた新たな知見であり、腸内細菌が胆汁酸吸収に関与している可能性を強く示唆するものである。

(3) ABPC投与による回腸 *Asbt* 発現の変動

ABPC投与により消化管からの胆汁酸吸収が亢進する可能性が示された。この理由を明らかにするために、胆汁酸再吸収の律速段階であると考えられている胆汁酸吸収トランスポーターの *Asbt* 発現がABPCの投与によりどのように変動するのかを検討した。

まず、回腸刷子縁膜上の *Asbt* タンパク質発現量はABPC投与回数依存的に増加し、それぞれ対照群に対し、ABPC投与1日で1.3倍、3日間で2.8倍、7日間で6.3倍にまで増加することが示された。また、これまでの結果から予想される通り、ABPC投与中止群ではその発現量が対照群と同程度にまで減少することが確認できた(図3)。これらの結果からABPC投与による消化管からの胆汁酸吸収の亢進には回腸刷子縁膜の *Asbt* タンパク質

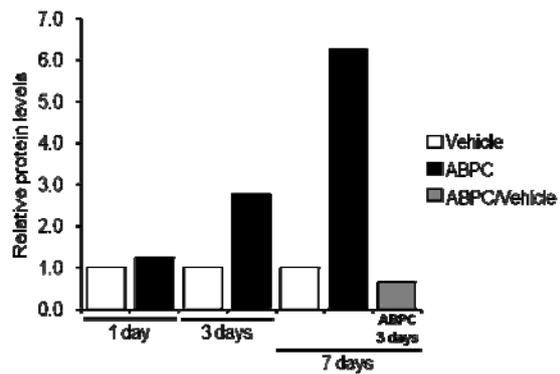


図3 タンパク発現へのアンピシリン (ABPC) 投与の影響

発現量の増加が関与することが示唆された。

そこで、*Asbt* タンパク質発現量の増加が、mRNA発現レベルの増加に起因するものなのかどうかを調べるために、回腸末端部における *Asbt* mRNA発現レベルを測定した。その結果、3日間、7日間のABPC投与群でmRNA発現レベルは対照群に対して有意に上昇し、一方で、ABPC投与中止群のmRNA発現レベルは対照群と同程度であり、タンパク質発現量の変動とほぼ一致する結果が得られた(図4)。以上の結果から、ABPC投与による消化管からの胆汁酸吸収の亢進には、回腸刷子縁膜にお

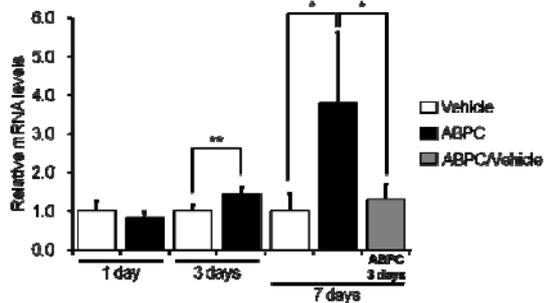


図4 回腸 *Asbt* mRNA発現におけるアンピシリン (ABPC) 投与の影響

ける *Asbt* タンパク質発現量の増加が関与するが、その発現量増加には *Asbt* mRNA発現レベルの上昇が一部寄与することが明らかとなった。

しかし、1日のABPC投与群では、*Asbt* タンパク質発現量が増加しているにもかかわらず、mRNA発現レベルには有意な上昇が見られなかった。これより、回腸における *Asbt* タンパク質発現量増加の原因として、*Asbt* mRNA発現レベルの上昇だけではなく、タンパク質レベルの調節も寄与している可能性が考えられた。したがって今後は、こちらの可能性についても検討する必要があると考えられた。

(4) ABPC投与による回腸 *Asbt* 発現上昇の機序解析

肝臓から排泄された消化管管腔内の胆汁酸は、消化管細胞に取り込まれると、胆汁酸の核内受容体である farnesoid X receptor (FXR) と結合し、FXR を活性化する。この FXR は、胆汁酸やコレステロールのホメオスタシスに関与する様々な遺伝子の転写を活性化することが知られている。ASBT の発現調節に寄与する FXR 標的遺伝子には、*small heterodimer partner (SHP)* や、*fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19)* などが存在し、これらはいずれも ASBT 発現を抑制的に制御することがこれまでに報告されてきた。しかし近年、胆汁酸が FXR を介さずに FGF15/19 発現を調節する機序を示唆する事実も数多く報告されているため、FXR に依存しない FGF15/19 による ASBT 発現抑制機序が存在する可能性も考えられている。本研究においては Fxr シグナルおよび Fgf15 mRNA 発現レベルの変動に着目した。Fxr シグナルの変動を評価する指標としては、そのリガンドとなる小腸管腔内の胆汁酸の組成変動を解析した。

ABPC 投与による *Asbt* 発現上昇の原因を明らかにするために、*Asbt* 発現抑制系の変動に関して種々の解析を行った。

まず、Fxr のリガンドとなる小腸管腔内の胆汁酸に変動があるのではないかと考え、ABPC 投与による小腸管腔内胆汁酸組成の変動を解析したところ、非抱合型一次胆汁酸であるコール酸 (CA) や、二次胆汁酸であるタウロデオキシコール酸 (TDCA) の胆汁酸量が、ABPC 投与群

表 1 消化管管腔内の胆汁酸組成におけるアンピシリン投与の影響

		Bile acid amounts (pmol/g)			
		THCA	CA	TCA	TDCA
1 day	Vehicle	3.18 ± 0.41	0.12 ± 0.11	4.99 ± 0.62	0.99 ± 0.62
	ABPC	3.78 ± 2.08	N.D.	4.67 ± 0.94	N.D.
3 days	Vehicle	2.91 ± 0.99	0.11 ± 0.02	4.29 ± 1.86	0.98 ± 0.65
	ABPC	6.98 ± 1.67	N.D.	5.88 ± 0.52	N.D.
7 days	Vehicle	2.89 ± 0.98	0.31 ± 0.22	3.32 ± 0.86	0.96 ± 0.63
	ABPC	6.86 ± 1.63	N.D.	5.89 ± 1.78	N.D.
	ABPC / Vehicle	3.28 ± 0.46	0.42 ± 0.14	3.98 ± 0.25	0.16 ± 0.11

で検出限界以下にまで減少し、投与中止群では回復することを見出した (表 1)。消化管に排泄される胆汁酸はほとんどが抱合型一次胆汁酸である。腸内細菌はこの抱合型一次胆汁酸の脱抱合反応や、一次胆汁酸から二次胆汁酸への変換反応を行うことから、ABPC 投

与による腸内細菌数の減少が、これらの非抱合型一次胆汁酸や二次胆汁酸の減少を引き起こしたと考えられる。そして、これらの胆汁酸は代謝前の抱合型一次胆汁酸と比較して一般的に Fxr との親和性が高いとされており、さらに当研究室の研究により、これらの胆汁酸が FXR シグナルを強く活性化することが示唆されている。したがって、ABPC 投与による *Asbt* 発現の上昇には、これら CA や TDCA の減少に起因する Fxr シグナルの抑制が関与する可能性が示された。

次に、Fxr の標的遺伝子である *Fgf15* の mRNA 発現レベルを測定したところ、ABPC 投与群ではその発現が対照群に対して約 50 分の 1 から約 5 分の 1 まで有意に減少し、投与中止群では対照群に対

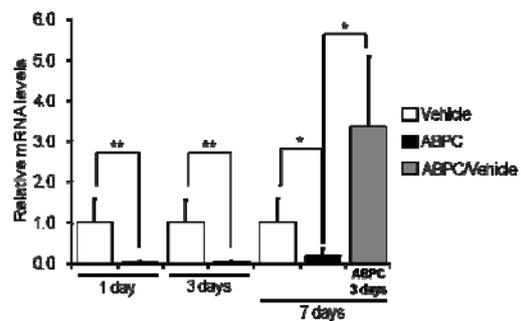


図 5 回腸 Fgf15 mRNA 発現におけるアンピシリン投与の影響

して上昇傾向にあることが確認された (図 5)。この事実は、ABPC 投与により Fxr シグナルの抑制が起こっていることを支持するものである。さらに、前述のように Fgf15 自身も *Asbt* 発現を抑制的に調節することから、ABPC 投与による *Asbt* 発現の上昇には、管腔内胆汁酸組成変動に起因する *Fgf15* 発現抑制も関与する可能性が示された。

しかし、本研究において、これらの可能性を決定づける明確な証拠はなく、今後、更なる研究が必要であると考えられた。

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 5 件)

- ① M. Miyata, H. Yamakawa, M. Hamatsu, H. Kuribayashi, Y. Takamatsu and Y. Yamazoe Enterobacteria modulate intestinal bile acid transport and homeostasis through apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2) expression *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 188-196 (2011) 「査読有」
- ② M. Miyata, M. Nomoto, F. Sotodate, T. Mizuki, W. Hori, M. Nagayasu, S.

Yokokawa, S. Ninomiya and Y. Yamazoe. Possible protective-role of pregnenolone-16 α -carbonitrile in lithocholic acid-induced hepatotoxicity through enhanced hepatic lipogenesis. *Eur. J. Pharmacol.* 636, 145-154 (2010) 「査読有」

- ③ M. Miyata, Y. Takamatsu, H. Kuribayashi and Y. Yamazoe. Administration of ampicillin elevates hepatic primary bile acid synthesis through suppression of ileal FGF15 expression *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 331 1079-1085 (2009) 「査読有」
- ④ M. Miyata, Y. Matsuda, M. Nomoto, Y. Takamatsu, N. Sato, M. Hamatsu, P. A. Dawson, F. J. Gonzalez and Y. Yamazoe. Cholesterol feeding prevents hepatic accumulation of bile acids in cholic acid-fed *Fxr*-null mice: *FXR*-independent suppression of intestinal bile acid absorption *Drug Metab. Dispos.* 37, 338-344 (2009) 「査読有」
- ⑤ J. Inoue, S. Satoh, M. Kita, M. Nakahara, S. Hachimura, M. Miyata, T. Nishimaki-Mogami, R. Sato *PPAR α* gene expression is up-regulated by *LXR* and *PXR* activators in the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371, 675-678 (2008) 「査読有」

〔学会発表〕(計 11 件)

- ① 山川 泰輝、栗林 秀明、宮田 昌明、山添 康 腸内細菌は胆汁酸代謝を介した回腸 ASBT 発現抑制により宿主の胆汁酸吸収を制御する 第 3 2 回胆汁酸研究会 2010. 11. 6 仙台
- ② 宮田昌明、山川泰輝、栗林秀明、濱津真由美、高松裕樹、山添康 抗菌薬投与は胆汁酸トランスポーター、合成酵素の発現亢進を介して胆汁酸ホメオスタシスを変動させる 第 2 5 回日本薬物動態学会 2010. 10. 9 大宮
- ③ 山川泰輝、宮田昌明、栗林秀明、高松 裕樹、濱津真由美、山添康 腸内細菌は回腸 ASBT 発現を介して消化管の胆汁酸吸収を調節する 第 2 5 回日本薬物動態学会 2010. 10. 7 大宮
- ④ 宮田昌明、山川泰輝、栗林秀明、濱津真由美、山添康 抗菌薬による腸内細菌叢の変動は回腸胆汁酸吸収トランスポーター-ASBT の発現上昇に関与する 第 3 7

回日本トキシコロジー学会年会 2010. 6. 17 宜野湾

- ⑤ Yasushi Yamazoe, Yuki Takamatsu, Hideaki Kuribayashi, Hiroki Yamakawa and Masaaki Miyata Enterobacteria alter bile acid homeostasis through *FXR*-*FGF15/19* system Microsomal Drug Oxidation, Beijing, China 2010. 5. 18
- ⑥ Y. Yamazoe, Y. Takamatsu, M. Hamatsu, M. Miyata. Administration of ampicillin increases ileal ASBT protein amounts resulting in reduction of fecal bile acid excretion in mice. 2010 Experimental Biology, Anaheim USA 2010. 4. 27
- ⑦ 宮田昌明、山川泰輝、濱津真由美、高松裕樹、山添 康 アンピシリン投与はマウス回腸の胆汁酸吸収トランスポータータンパク含量を増加させ、糞中胆汁酸排泄を低下させる 日本薬学会第 130 回年会 2010. 3. 28 岡山
- ⑧ 濱津真由美、高松裕樹、宮田昌明、山添 康 アンピシリン投与による肝内胆汁酸濃度上昇における消化管と肝臓の寄与 第 48 回日本薬学会東北支部大会 2009. 10. 18 仙台
- ⑨ 宮田昌明、高松裕樹、山添康 腸内細菌-*FGF* 系による肝胆汁酸レベルの調節 第 36 回日本トキシコロジー学会年会 2009. 7. 8 盛岡
- ⑩ 高松裕樹、宮田昌明、山添 康 抗生物質投与による肝内胆汁酸濃度上昇とその機序 第 4 7 回日本薬学会東北支部会 2008. 10. 26 盛岡
- ⑪ 高松裕樹、宮田昌明、山添 康 アンピシリン併用により生ずるコール酸誘発肝障害と胆汁酸動態 第 3 5 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008. 6. 26 東京

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 昌明 (MIYATA MASAOKI)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：90239418

(2) 研究分担者

吉成 浩一 (YOSHINARI KOUICHI)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：60343399