

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08889

研究課題名(和文)胆汁酸トランスポーターを介した糖代謝・脂質代謝制御機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文)The Mechanisms of Glucose and Lipid Metabolism Regulation via Bile Acid Transporters

研究代表者

石井 規夫 (Ishii, Norio)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：10599111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により胆汁酸を腸管腔から再吸収するIBAT (ileal bile acid transporter)の阻害薬(Elobixibat)が血中胆汁酸の量的変化と胆汁酸分画の量的・質的变化をもたらし、胆汁酸シグナル伝達経路を介して糖・脂質代謝異常を改善することを明らかにすることができた。IBAT阻害により胆汁酸分画を変化させることや胆汁酸分画と腸内細菌叢が相互作用する可能性も報告されている。IBAT阻害による腸内細菌叢と胆汁酸分画の変化が糖・脂質代謝異常の新たな治療ターゲットとなる可能性を示した臨床的にも極めて有益な研究となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、IBAT阻害薬が糖代謝・脂質代謝異常の改善に有効であり、その作用機序を胆汁酸シグナル伝達経路を介して明らかにした点で学術的に極めて意義深い。また、IBAT阻害による腸内細菌叢と胆汁酸分画の変化が、新しい糖・脂質代謝異常治療のターゲットになる可能性が示せた点で医学的な学術的意義が大きい。IBAT阻害薬による治療法の確立は、安全かつ効果的な新しい治療法の開発に繋がり、患者のQOLの向上や医療費削減につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that the inhibition of the ileal bile acid transporter (IBAT), which reabsorbs bile acids from the intestinal lumen, by the drug elobixibat, leads to quantitative changes in blood bile acid levels and quantitative/qualitative changes in bile acid profiles, improving glucose and lipid metabolism abnormalities via the bile acid signaling pathway. It has also been reported that the modulation of bile acid profiles by IBAT inhibition may interact with the gut microbiota. This clinically beneficial study demonstrated that changes in gut microbiota and bile acid profiles resulting from IBAT inhibition could be a new therapeutic target for glucose and lipid metabolism abnormalities.

研究分野：内科系臨床医学 脂質代謝異常 動脈硬化症

キーワード：胆汁酸トランスポーター

腸内細菌叢

動脈硬化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆汁の主要構成成分である胆汁酸は、肝で Cyp7a1 (cholesterol 7 α -hydroxylase) を律速酵素としてコレステロールより生合成されるステロイド核を有する炭素数 24 のカルボン酸である。両親媒性の物質であり、小腸内で脂溶性物質とミセルを形成し可溶化することで、食事に含まれる脂溶性物質の消化・吸収に重要な役割を果たしている。肝で合成された胆汁酸(コール酸(CA)とケノデオキシコール酸(CDCA))は一次胆汁酸と呼ばれ、主としてタウリンあるいはグリシンがアミド結合した抱合型胆汁酸として胆嚢に蓄積され、食事摂取に応答して胆管を通じ十二指腸に分泌される。

一次胆汁酸が腸管腔内で腸内細菌によって脱水素化され水酸基が減ることで相対的に疎水性が強くなったものは二次胆汁酸と呼ばれる。CA・CDCA の 7 α 水酸基が脱水酸化されると、それぞれデオキシコール酸(DCA)・リトコール酸(LCA)となり比較的強い細胞傷害性をもつが、CDCA の 7 β 異性体のウルソデオキシコール酸(UDCA)は親水性であり細胞傷害性は低い。以上の 5 種類の胆汁酸には、それぞれ、遊離型、グリシン抱合型、タウリン抱合型の 3 型が存在し、胆汁酸抱合体分画は、合計 15 分画がヒトの主要胆汁酸として知られている。

腸内細菌の BSH (bile salt hydrolase)により抱合型胆汁酸からアミノ酸が外され脱抱合が起こる。脱抱合は小腸を下るに従い徐々に起こるのに対し、二次胆汁酸への変換は腸内細菌が豊富に存在する盲腸で速やかに行われる。また二次胆汁酸は乳酸菌の増殖を抑制するなど胆汁酸が腸内細菌叢へ影響する可能性も報告されており、胆汁酸と腸内細菌は相互に作用していると考えられる。最近、胆汁酸自体が様々な核内受容体や G タンパク共役受容体のリガンドとして作用し、様々な遺伝子発現調整を介して脂質代謝や糖代謝を調節する機能を有することが明らかとなっているが、胆汁酸の分画の違いによりそれぞれの受容体へのリガンド親和性が異なると報告されている。胆汁酸は腸管腔内においても腸管上皮細胞や腸管内分泌細胞(L 細胞含む)の核内受容体(FXR: farnesoid X receptor)や各細胞の管腔側の G タンパク共役受容体(TGR5: the G protein-coupled receptor)のリガンドとして作用し、FGF 15/19(fibroblast growth factor 15/19)などのサイトカインやインクレチン(GLP-1、GIP)の分泌調整を介して糖代謝・脂質代謝に関与することが報告されている。

IBAT (ileal bile acid transporter または ASBT: apical sodium-dependent bile salt transporter)は 7 回膜貫通型の膜タンパク質で腸管上皮細胞の管腔側に局在し、Na と胆汁酸(主に抱合型)の共役輸送を行い、小腸に分泌された胆汁酸の 90~95%を再吸収することで胆汁酸の腸肝循環に寄与している(図 1)。IBAT 阻害薬であるエロピキシバット(Elobixibat)は、IBAT 阻害により大腸に流入する胆汁酸の量を増加させることにより大腸内水分分泌し大腸運動を促進する作用を有することから本邦でのみ慢性便秘症の治療薬として臨床応用されている。IBAT 阻害薬は創薬段階からコレステロール低下作用を認めることが報告されている。

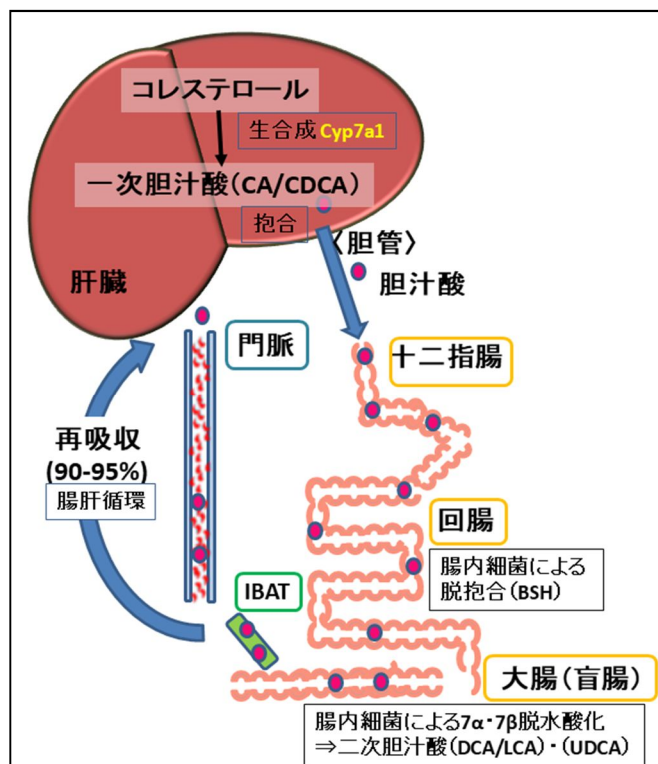


図 1.胆汁酸の腸肝循環と分画

一次胆汁酸(CA・CDCA)、二次胆汁酸(DCA・LCA・UDCA)のそれぞれに遊離型・グリシン抱合型・タウリン抱合型があり 15 分画となる

糖尿病治療の第一選択薬であるメトホルミンの投与により腸内細菌 *B. fragilis* が減少し、腸管腔内の UDCA が低下し抱合型二次胆汁酸のうち本来微量にしか腸管腔内に存在しないグリコウルソデオキシコール酸(GUDCA)とタウロウルソデオキシコール酸(TUDCA)が著明に増加することがメトホルミンの血糖降下作用の機序の一つである可能性が報告されている(*Nature Medicine* 2018;24:1919–1929)。さらに肥満手術(Bariatric surgery)により体重減少に先行して糖代謝異常が著明に改善することが分かっているが、その機序として腸内細菌叢の変化や胆汁酸シグナルの関与を示唆する報告も散見される。このように腸内細菌叢の変化や胆汁酸と糖代謝・脂質代謝との関連が注目されている。

2. 研究の目的

上記背景から IBAT 阻害は糖代謝・脂質代謝を改善すると考えられるが、その程度や機序については解明が不十分である。これまでの報告からは IBAT 阻害により腸管上皮細胞や L 細胞の細胞内胆汁酸濃度は低下し、腸管腔内の胆汁酸濃度は増加することでシグナル経路が変化し糖代謝・脂質代謝を改善させていることが想定される。さらに IBAT は主に抱合型胆汁酸に作用するとされ、IBAT 阻害は胆汁酸分画の変化や腸内細菌叢の変化を誘導する可能性がある。

本研究では胆汁酸の量的な変化のみでなく胆汁酸分画の変化や腸内細菌叢の変化が相互作用し腸管上皮細胞や腸管内分泌細胞における核内受容体や G タンパク共役受容体のリガンドとしての作用を変化させ、糖代謝・脂質代謝を改善させているという仮説を検証する。

これまで腸内細菌叢の変化と糖代謝・脂質代謝の影響に関する研究は多いが、胆汁酸分画と腸内細菌叢の変化との関連に着目した糖代謝・脂質代謝研究は乏しい。特に IBAT 阻害薬が腸管腔内の抱合型胆汁酸の変化や腸内細菌叢の変化についての検討は未だ報告は見かけない。

本研究は IBAT 阻害薬 Elobixibat が慢性便秘症の治療薬として本邦でのみ臨床応用されているという優位性を活かし IBAT 阻害による胆汁酸分画の変化と腸内細菌叢の変化を包括的にとらえ糖代謝・脂質代謝への影響を検討する

3. 研究の方法

【実験】IBAT 阻害薬投与による糖代謝・脂質代謝の解析(臨床研究の一部として)

上述の臨床研究の Elobixibat 投与群および対照薬(Lubiprostone)投与群の 4 週間投与前後の便サンプルで腸内細菌叢の構成を解析(16S rRNA PCR 法)する。また便中の胆汁酸分画を解析(HPLC:high performance liquid chromatography)し、各種臨床データと比較する。

【実験】IBAT 阻害薬投与による糖代謝・脂質代謝の解析(基礎研究)

C57BL/6J マウスへ高脂肪食負荷により耐糖能異常を誘導しつつ IBAT 阻害薬(Elobixibat)および Vehicle を経口投与し、下記の解析を行う。

- ・体重、摂餌量、体組成の変化
- ・血液生化学・脂質プロファイル、FGF15/19・GIP・GLP-1 など
- ・運動量の測定(質量分析マウス用呼気ガス運動量 12 チャンネルシステム)
- ・経腹腔糖負荷試験およびグルコースクランプ試験による耐糖能、インスリン抵抗性の評価
- ・腸内細菌叢解析(16S rRNA PCR 法を用いて総菌量, Clostridium cluster XI and XIVa, Bacteroides fragilis, など)
- ・糞便、血清、肝組織中の胆汁酸分画を解析(HPLC: high performance liquid chromatography))
- ・腸管組織および腸管内分泌細胞(enteroendocrine cells)の単離 による western blot および免疫組織染色による解析(FXR、I-BABP、OSTα/β、TGR5 の発現量など)

腸管内分泌細胞単離：claudin-4 の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体を用いて FACS で単離(予備実験施行中)

【実験】腸管上皮細胞特異的 IBAT 欠損マウスの作成および糖代謝・脂質代謝の解析
 Cre-loxP 相同組み替え法により IBAT が欠損するようにターゲティングベクターを構築し、常法に従いキメラマウスを作製する。生まれてきたキメラマウスと腸管上皮細胞特異的に発現する遺伝子 villin1 のプロモーター下に Cre リコンビナーゼ遺伝子を挿入したトランスジェニックマウスと交配することで腸管上皮細胞特異的 IBAT 欠損マウスを作製する。この腸管上皮細胞特異的 IBAT 欠損マウスに高脂肪食負荷を行い【実験】と同様の解析をする。

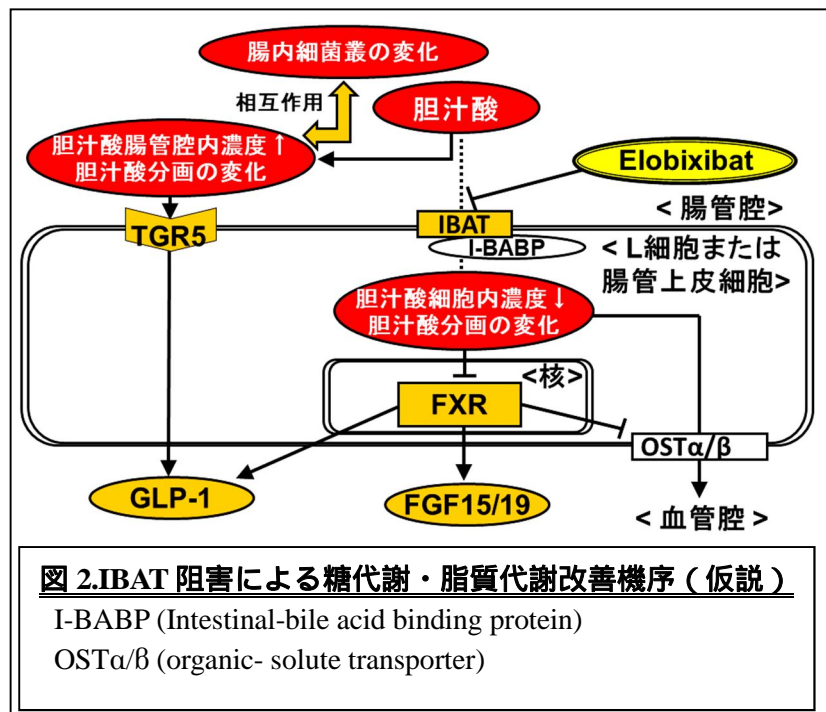
【実験】腸管上皮細胞特異的 IBAT 欠損マウスの NASH/NAFLD および動脈硬化症の評価
 腸管上皮細胞特異的 IBAT 欠損マウス(高脂肪食負荷)の肝組織の TG 含有量および顕像により NASH/NAFLD の進行度を評価する。また同マウスと動脈硬化症モデルマウス(apo E ノックアウトマウス)を交配し、大動脈弁輪部の組織薄切切片及び大動脈全体を enface した組織サンプルを Oil-red O 染色し粥状動脈硬化病変のサイズを定量化することで動脈硬化症の程度を評価する。

4. 研究成果

【実験】IBAT 阻害薬投与による糖代謝・脂質代謝の解析(臨床研究の一部として)：臨床研究の Elobixibat 投与群および対照薬(Lubiprostone)投与群の 4 週間投与前後の便サンプルで腸内細菌叢の構成を解析(16S rRNA PCR 法)し各種臨床データと比較した。

【実験】IBAT 阻害薬投与による糖代謝・脂質代謝の解析(基礎研究)：C57BL/6J マウスへ高脂肪食負荷により耐糖能異常を誘導しつつ IBAT 阻害薬(Elobixibat)および Vehicle を経口投与し、以下の解析を行っている。
 ・体重、摂餌量、体組成の変化・血液生化学・脂質プロファイル、FGF15/19・GIP・GLP-1 など・運動量の測定(質量分析マウス用呼気ガス運動量 12 チャンネルシステム)・経腹腔糖負荷試験およびグルコースクランプ試験による耐糖能、インスリン抵抗性の評価・腸内細菌叢解析(16S rRNA PCR 法を用いて総菌量, Clostridium clusterXI and XIVa, Bacteroides fragilis, など)・糞便、血清、肝組織中の胆汁酸分画を解析(HPLC: high performance liquid chromatography)・腸管組織および腸管内分泌細胞(enteroendocrine cells)の単離による western blot および免疫組織染色による解析(FXR、I-BABP、OST α/β 、TGR5 の発現量など)を行った。以上の解析により IBAT 阻害により糖代謝および脂質代謝の改善を示唆する結果が出ている。

【実験】腸管上皮細胞特異的 IBAT 欠損マウスの作成および糖代謝・脂質代謝の解析：Cre-loxP 相同組み替え法により IBAT が欠損するようにターゲティングベクターを構築し、常法に従いキメラマウスを作製中である。



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 2件）

1. 著者名 Nishida S, Matsumura T, Senokuchi T, Murakami-Nishida S, Ishii N, Morita Y, Yagi Y, Motoshima H, Kondo T, Araki E.	4. 巻 524(1)
2. 論文標題 Inhibition of inflammation-mediated DPP-4 expression by linagliptin increases M2 macrophages in atherosclerotic lesions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 8-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.01.027.	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 Morita Y, Senokuchi T, Yamada S, Wada T, Furusho T, Matsumura T, Ishii N, Nishida S, Nishida S, Motoshima H, Komohara Y, Yamagata K, Araki E.	4. 巻 8(1)
2. 論文標題 Impact of tissue macrophage proliferation on peripheral and systemic insulin resistance in obese mice with diabetes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Res Care	6. 最初と最後の頁 e001578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/bmjdr-2020-001578.	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 4.Yagi Y, Matsumura T, Nishida S, Senokuchi T, Ishii N, Maeda S, Nishida S, Takeshita M, Yoshinaga T, Araki E.
2. 発表標題 Dulaglutide, one of GLP-1 receptor agonists suppresses atherosclerotic lesion formation through the regulation of MCP-1 in vascular endothelial cells.
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis, (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 6.Shi Y, Senokuchi T, Yamada S, Morita Y, Wada T, Furusho T, Kazihara N, Fukuda K, Ishii N, Matsumura T, Araki E.
2. 発表標題 Impacts of Local Macrophage Proliferation on Atherosclerotic Plaque Progression and Insulin Resistance in Obesity-associated Adipose Tissue.
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis, (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松村 剛, 西田周平, 西田彩子, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 福田一起, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 和田敏明, 八木善崇, 荒木栄一
2. 発表標題 DPP-4阻害薬リナグリプチンによるマクロファージの極性変化を介した糖尿病大血管症進展抑制効果の検討
3. 学会等名 第35回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西田周平, 松村 剛, 西田彩子, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 山田沙梨恵, 守田雄太郎, 和田敏明, 八木喜崇, 荒木栄一
2. 発表標題 DPP-4阻害薬リナグリプチンによるマクロファージM2誘導効果の機序解析.
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 3. 八木喜崇, 松村 剛, 西田周平, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 山田沙梨恵, 西田彩子, 守田雄太郎, 和田敏明, 荒木栄一
2. 発表標題 デュラグルチドによる糖尿病大血管症進展抑制効果の解析
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 16. 西田周平, 松村 剛, 西田彩子, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 守田雄太郎, 八木善崇, 和田敏明, 荒木栄一
2. 発表標題 DPP-4阻害薬リナグリプチンは大動脈においてM2 M を増加させ動脈硬化進展抑制作用を発揮する
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 20.八木喜崇, 松村 剛, 西田周平, 瀬ノ口隆文, 石井規夫, 山田沙梨恵, 西田彩子, 竹下 実, 吉永智昭, 荒木栄一
2. 発表標題 デュラグルチドによる糖尿病大血管症進展抑制効果
3. 学会等名 第58回日本糖尿病学会九州地方会
4. 発表年 2020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	瀬ノ口 隆文 (senokuchi takafumi) (00530320)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任講師 (17401)	
研究分担者	近藤 龍也 (kondou tatsuya) (70398204)	熊本大学・病院・講師 (17401)	

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