

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17014

研究課題名(和文)胆汁酸トランスポーターBSEP遺伝子改変マウスを活用したNASH病態の解明

研究課題名(英文) Investigation of a novel mechanism of NASH pathogenesis focused on bile acid transporters

研究代表者

奥新 和也 (Okushin, Kazuya)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40753918

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)：非アルコール性脂肪肝炎の病態解明を目的として、肝臓のみに発現している胆汁酸トランスポーターbile salt export pump (BSEP) の発現を抑制したマウスモデルを作成して検討を行った。本マウスに高脂肪食を摂取させたところ、体重増加の抑制および肝脂肪化の低減が確認され、肝臓および腸管における幅広い代謝関連遺伝子の発現にも変化を生じることが明らかとなった。さらには腸内細菌叢にも特徴的な変化が確認できた。これらの結果は、BSEPがGut-Liver axisと称される肝臓から腸管、そして全身の臓器の働きをつなぐ重要な役割を行っていることを示唆する重要な知見であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非アルコール性脂肪肝炎は肝臓のみならず、糖尿病や大血管イベントにも関与が示唆される重大な疾患であるが、その病態は未だに不明な点が多く、有効な治療は確立していない。本研究成果は、胆汁酸トランスポーターであるbile salt export pump (BSEP) が、肝臓における胆汁酸代謝のみならず、腸管や腸内細菌叢、そして全身まで影響を及ぼすことを示した重要な知見と考えられる。BSEPがこれらの変化を生じる詳細なメカニズムの解明は、科学的に重要な知見であるのみならず、BSEPを標的として非アルコール性脂肪肝炎に加えて全身の代謝性疾患の病態解明および治療法の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis, a mouse model was investigated in which the expression of the bile acid transporter bile salt export pump (BSEP), which is expressed only in the liver, was suppressed. When the mice were fed a high-fat diet, they presented reduced body weight gain and liver steatosis, as well as changes in the expressions of a wide range of metabolism-related genes in the liver and intestinal tract. Furthermore, characteristic changes in the gut microbiota were also observed. These results suggest that BSEP plays an important role in the Gut-Liver axis, which is a functional link among the liver, the intestinal tract, and all the organs in the body.

研究分野：肝臓病学

キーワード：胆汁酸トランスポーター bile salt export pump Gut-Liver axis 腸内細菌叢

1. 研究開始当初の背景

- (1) 肝臓は代謝中枢臓器であり、急増する非アルコール性脂肪性肝疾患である **NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease)**、**NASH (Non-Alcoholic Steatohepatitis)** は肝病変の進行に加え、糖尿病や大血管疾患にも関与が示唆されているが、その病態は未だに不明な点が多く残されている。また、**NASH** に対する有効な治療薬は未だに確立されておらず、非侵襲的な診断方法や、**NASH** へと進展するリスクファクターの解明、そして治療法の開発は急務である。
- (2) 胆汁酸は従来では脂肪吸収を補助する乳化剤としての作用のみ認識されていたが、核内受容体である **farnesoid X receptor (FXR)** のリガンドとしての役割が示されたことを契機に研究が急速に進展し、脂質代謝や糖質代謝を中心とした全身の代謝中枢機構への関与が示されてきた。そして **FXR** を中心とする胆汁酸代謝は、脂質代謝・糖質代謝と密接な関連を有する **NAFLD・NASH** の治療標的として有望視され、臨床試験で **Phase III** まで進展する薬剤も出現してきている。
- (3) 研究代表者らは、病理組織学的に **NAFLD** と診断されたヒト肝生検組織の遺伝子発現を検討し、**NAFLD** の病期進行と胆汁酸トランスポーター、特に主要な排泄型トランスポーター **bile salt export pump (BSEP)** の発現が有意に負の相関を示すことを明らかにしてきた (**Okushin K, et al. J Gastroenterology 2016**)。
- (4) ヒト肝生検検体での検討から得られた知見から、**BSEP** の発現低下が栄養過多と協調して **NAFLD・NASH** の病態形成に関与するという仮説を立て、そのメカニズムの解明を目的として動物モデルを検討し、**NASH** での **BSEP** 発現低下をより良く模倣したモデルとして高脂肪食摂取 **BSEP** ヘテロノックアウトマウス (**Bsep^{+/-}**マウス) を作成した。

2. 研究の目的

NASH での **BSEP** 発現低下を模倣した動物モデルとして高脂肪食摂取 **Bsep^{+/-}**マウスを用いて、

- (1) **BSEP** 発現調節による **NASH** 病態の再現とそのメカニズムの解明、特に栄養負荷との協調により肝細胞の恒常性が破綻する要因の解明
- (2) 腸内細菌叢の変化に着目して **Gut-Liver axis** と称される肝臓と腸管の相互作用のメカニズム本体を解き明かすこと

を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

オスの野生型マウス (**C57BL/6J**) と **Bsep** ヘテロノックアウトマウス (**Bsep^{+/-}**マウス) を通常食 (**ND**) または高脂肪食 (**32.0%** の動物性脂質含有) で生後 **8** 週から **20** 週にかけて飼育した。組織学的評価は **HE** 染色および **Azan** 染色で行い、肝臓および回腸末端における胆汁酸・脂質代謝に関わる遺伝子発現をリアルタイム **PCR** 法で評価した。さらに肝内脂質および総胆汁酸の測定に加えて、胆汁酸分画を液体クロマトグラフ飛行時間型質量分析 (**LC-TOFMS**) を用いて測定した。そして、高脂肪食摂取前後の腸内細菌叢の **16S rRNA** メタゲノム解析を行った。

4. 研究成果

(1) **Bsep** ヘテロノックアウトマウスにおける表現型の変化について

高脂肪食摂取下の **Bsep^{+/-}**マウス (図 1B) は野生型マウス (図 1A) に比較して、体重増加が緩やかとなり肝脂肪化も軽減していたが、一方で部分的な炎症細胞の浸潤が認められた。通常食摂取群では同様の変化を認めなかった。

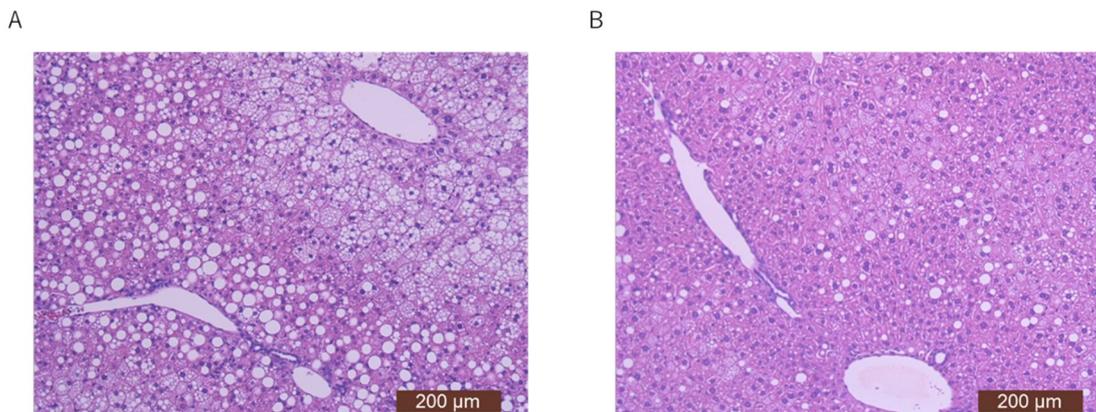


図 1. 野生型マウスと **Bsep^{+/-}**マウスにおける高脂肪食での肝表現型の変化

(2) 肝臓および腸管における胆汁酸および脂質代謝の変化について
 肝内の **Fxr** (図 2B) や他の胆汁酸排出型トランスポーターである **Multi-drug resistance protein 2** (図 2C) の遺伝子発現は高脂肪食摂取 **Bsep^{+/-}** マウスで野生型マウスと比較して亢進していた。

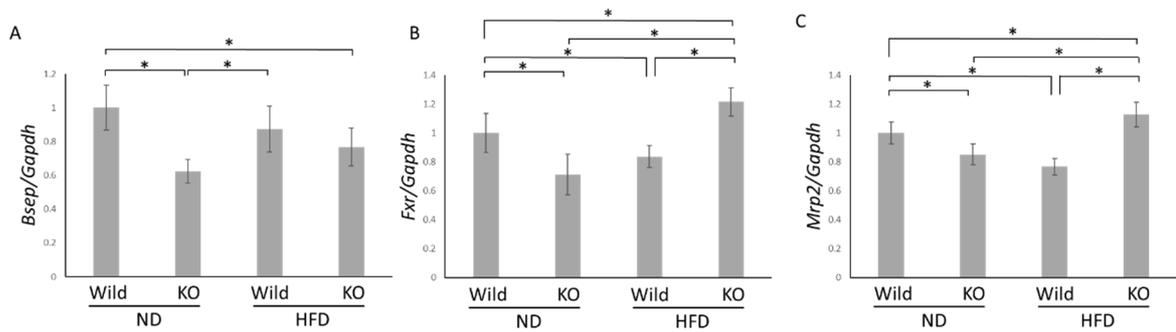


図 2. 肝臓における胆汁酸代謝関連遺伝子の発現変化

回腸末端での **Fxr** (図 3A) およびその下流で作用して胆汁酸を輸送する **Intestinal bile acid-binding protein** (図 3B) の発現も、高脂肪食摂取 **Bsep^{+/-}** マウスで野生型マウスと比較して亢進していた。エネルギー代謝に中心的な役割を果たす **Transmembrane G protein-coupled Receptor 5** (図 3C) の発現は、通常食および高脂肪食で飼育した **Bsep^{+/-}** マウスでは、野生型マウスと比較して有意に上昇していた。

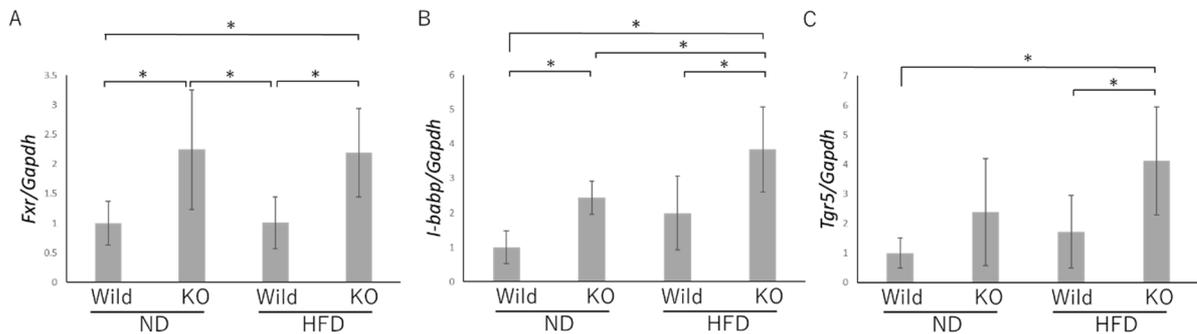


図 3. 腸管における胆汁酸代謝関連遺伝子の発現変化

(3) 肝内総胆汁酸、胆汁酸分画および脂質の変化

ヒト肝生検サンプルのデータに基づき、**Bsep^{+/-}** マウスでは肝臓で胆汁酸が過剰であると想定していたが、**Bsep^{+/-}** マウスでは、野生型マウスに比べて肝臓の総胆汁酸レベルが減少していた。

さらに肝内胆汁酸分画を **LC-TOFMS** で解析し、一次胆汁酸 (**CA, GCA, TCA, TCDCA**) と二次胆汁酸 (**TDCA, TLCA, TUDCA**) の濃度に注目した (図 4)。高脂肪食で飼育した **Bsep^{+/-}** マウスでは、野生型マウスに比べて一次胆汁酸のレベルが低下する傾向を示したが、二次胆汁酸のレベルはこれらのマウスで差がなかった。

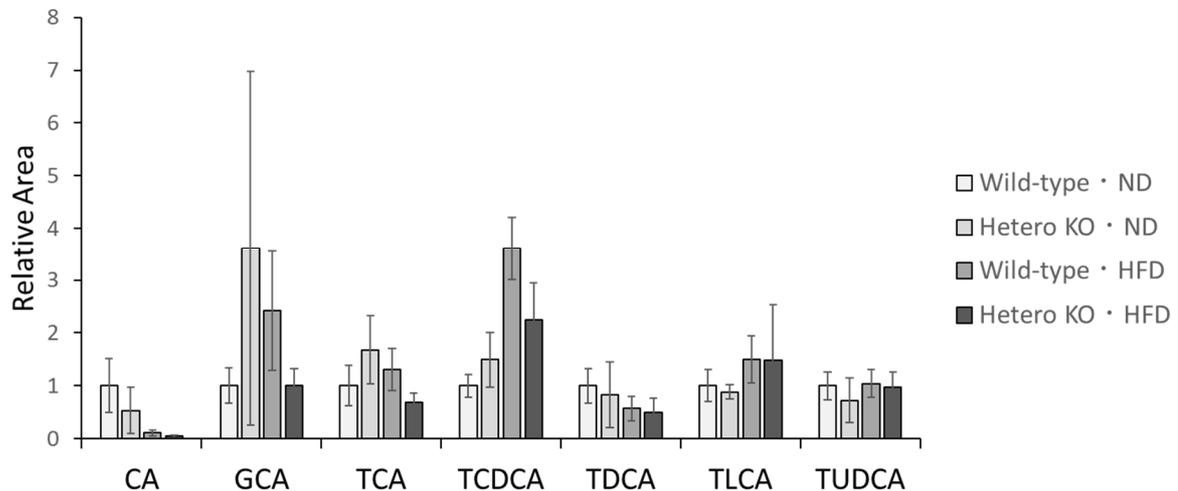


図 4. 主な肝内胆汁酸分画の変化

(4) 高脂肪食摂取前後での腸内細菌叢の変化について
 高脂肪食摂取により細菌叢の多様性を示す検出菌種数(図5A)および Shannon Index (図5B)が著しく低下していたが、特に **Bsep**^{+/−}マウスでの低下が目立った。

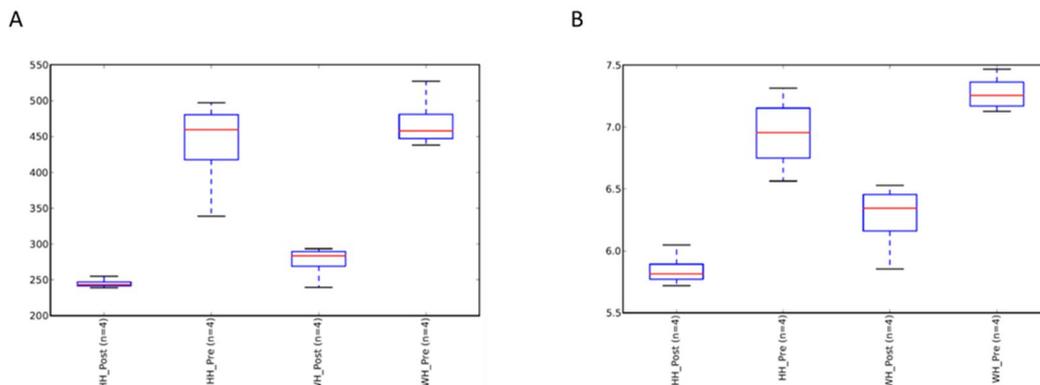


図 5. 高脂肪食摂取前後での腸内細菌叢の多様性の変化

各分類レベル(門から種レベル)において各群の変化を評価したところ、門レベルでの評価では、高脂肪食を摂取後の **Bsep**^{+/−}マウスにおいて、**Actinobacteria** が増加していた。さらに綱・目・科での腸内細菌叢の変化を確認すると **Actinobacteria** 内の **Coriobacteria** が増加していることが明らかとなった。最終的に、種レベルにおいて高脂肪食摂取 **Bsep**^{+/−}マウスでは **Actinobacteria** 門の **Coriobacteria** の一種が増加していることが明らかとなった(図6)。

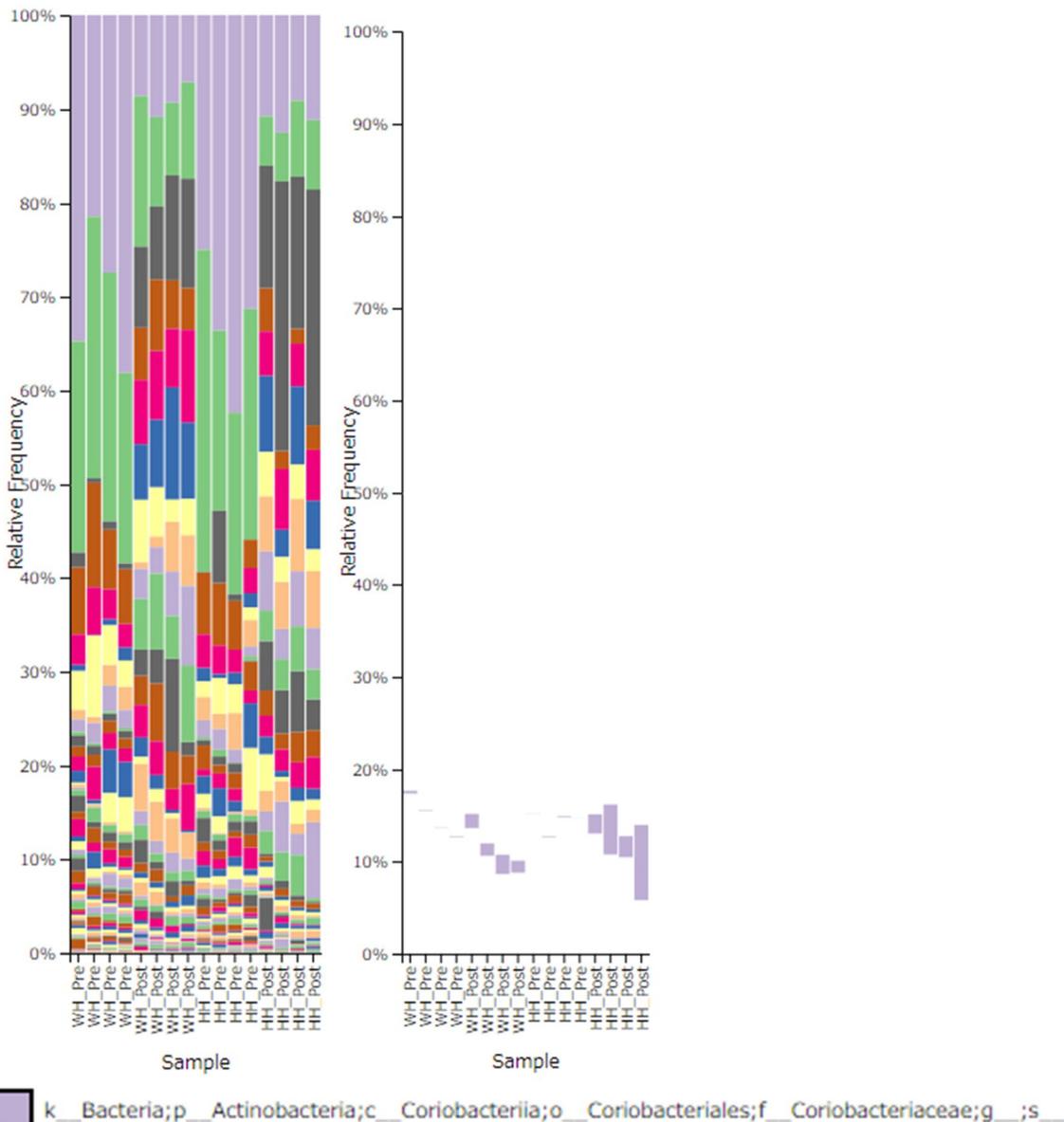


図 6. 種レベルでの腸内細菌叢の変化

(5) 成果のまとめと考察

(1)から(4)で示したように **Bsep**^{+/+}マウスは高脂肪食摂取下において、予想外に体重増加の抑制および肝脂肪化の低減を示す一方で、肝臓のみならず腸管における胆汁酸を含む代謝関連遺伝子の発現に多様な変化を生じることが明らかとなった。

BSEP は肝臓、特に胆管側の細胞膜に発現しているが、腸管には発現していない。本研究では、肝臓における人為的な **BSEP** の発現抑制が、肝臓のみならず腸管においても胆汁酸および脂質代謝に変化をもたらすことを示すことができたが、これは **BSEP** が腸肝循環や **Gut-Liver axis** と密接に関連していることを示唆する重要な知見である。

さらに、**Bsep**^{+/+}マウスでは高脂肪食摂取下において腸内細菌叢の多様性が失われる一方で特定の菌種の増加も確認できた。このような腸内細菌叢の特異的な変化が、本モデルにおける肝炎症の悪化、肝脂肪化および体重増加の抑制といった表現型の変化に関与している可能性が考えられる。

BSEP を起点として、肝臓から腸管、腸内細菌叢、そして全身における代謝メカニズムへと視野を広げ、複雑性を有する **NASH** の病態解明および新規治療法の開発に向けてさらなる検討を加えていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Okushin Kazuya, Tateishi Ryosuke, Takahashi Arata, Uchino Koji, Nakagomi Ryo, Nakatsuka Takuma, Minami Tatsuya, Sato Masaya, Fujishiro Mitsuhiro, Hasegawa Kiyoshi, Eguchi Yuichiro, Kanto Tatsuya, Kubo Shoji, Yoshiji Hitoshi, Miyata Hiroaki, Izumi Namiki, Kudo Masatoshi, Koike Kazuhiko	4. 巻 57
2. 論文標題 Current status of primary liver cancer and decompensated cirrhosis in Japan: launch of a nationwide registry for advanced liver diseases (REAL)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 587 ~ 597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-022-01893-5	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 -
1. 著者名 Yamamichi Nobutake, Shimamoto Takeshi, Okushin Kazuya, Nishikawa Takako, Matsuzaki Hirotaka, Yakabi Seiichi, Takahashi Mami, Wada Ryoichi, Koike Kazuhiko, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Fibrosis-4 index efficiently predicts chronic hepatitis and liver cirrhosis development based on a large-scale data of general population in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24910-2	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 Saito Katsuki, Shimamoto Takeshi, Takahashi Yu, Okushin Kazuya, Takahashi Mami, Masuda Yukari, Nishikawa Takako, Kakushima Naomi, Wada Ryoichi, Yamamichi Nobutake	4. 巻 12
2. 論文標題 Gender-specific factors contributing to visceral obesity including the sleep-obesity relationship: a large-scale cross-sectional study from East Asia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-24863-6	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 Kado Akira, Inoue Yukiko, Moriya Kyoji, Tsutsumi Takeya, Ikeuchi Kazuhiko, Okushin Kazuya, Yotsuyanagi Hiroshi, Koike Kazuhiko, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Triglyceride level and soft drink consumption predict nonalcoholic fatty liver disease in nonobese male adolescents	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hepatology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/hepr.13889	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 -

1. 著者名 Ikeuchi Kazuhiko, Okushin Kazuya, Saito Makoto, Adachi Eisuke, Tsutsumi Takeya, Takura Tomoyuki, Yotsuyanagi Hiroshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Prevalence of HIV infection among non-elderly individuals with hepatitis C in Japan: a population-based cohort study using a health insurance claim data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12879-022-07152-5	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 Sekiba Kazuma, Otsuka Motoyuki, Funato Kazuyoshi, Miyakawa Yu, Tanaka Eri, Seimiya Takahiro, Yamagami Mari, Tsutsumi Takeya, Okushin Kazuya, Miyakawa Kei, Ryo Akihideo, Koike Kazuhiko	4. 巻 76
2. 論文標題 HBx-induced degradation of Smc5/6 complex impairs homologous recombination-mediated repair of damaged DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 53 ~ 62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jhep.2021.08.010	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 Okushin Kazuya, Suzuki Rie, Tsutsumi Takeya, Okamoto Koh, Ikeuchi Kazuhiko, Kado Akira, Minatsuki Chihiro, Minami-Kobayashi Yuka, Satoh Nobuhiko, Ikeda Mahoko, Harada Sohei, Enooku Kenichiro, Fujinaga Hidetaka, Yotsuyanagi Hiroshi, Koike Kazuhiko, Moriya Kyoji	4. 巻 21
2. 論文標題 Change in hepatitis C virus positivity among needle-stick injury source patients: a 10-year experience in a Japanese tertiary hospital	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12879-021-06117-4	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 Okushin Kazuya, Tsutsumi Takeya, Ikeuchi Kazuhiko, Kado Akira, Enooku Kenichiro, Fujinaga Hidetaka, Yamauchi Naoko, Ushiku Tetsuo, Moriya Kyoji, Yotsuyanagi Hiroshi, Koike Kazuhiko	4. 巻 15
2. 論文標題 Heterozygous knockout of Bile salt export pump ameliorates liver steatosis in mice fed a high-fat diet	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0234750
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234750	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 奥新和也, 堤武也, 池内和彦, 門輝, 藤永秀剛, 森屋恭爾, 四柳宏, 小池和彦, 藤城光弘
2. 発表標題 胆汁酸トランスポーター-BSEPヘテロノックアウトマウスの腸内細菌叢は高脂肪食による肝脂肪化に抑制的作用を有する可能性がある
3. 学会等名 第8回肝臓と糖尿病・代謝研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuya Okushin, Ryosuke Tateishi, Arata Takahashi, Koji Uchino, Ryo Nakagomi, Takuma Nakatsuka, Tatsuya Minami, Masaya Sato, Mitsuhiro Fujishiro, Kiyoshi Hasegawa, Yuichiro Eguchi, Tatsuya Kanto, Shoji Kubo, Hitoshi Yoshiji, Hiroaki Miyata, Namiki Izumi, Masatoshi Kudo, Kazuhiko Koike.
2. 発表標題 TRANSITION OF TREATMENT SELECTION FOR PRIMARY LIVER CANCER AND DECOMPENSATED CIRRHOSIS IN MULTIPLE ADMISSIONS: ANALYSIS OF A NATIONWIDE REGISTRY FOR ADVANCED LIVER DISEASES (REAL)
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Diseases The Liver Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuya Okushin, Ryosuke Tateishi, Arata Takahashi, Koji Uchino, Ryo Nakagomi, Takuma Nakatsuka, Tatsuya Minami, Masaya Sato, Mitsuhiro Fujishiro, Kiyoshi Hasegawa, Yuichiro Eguchi, Tatsuya Kanto, Shoji Kubo, Hitoshi Yoshiji, Hiroaki Miyata, Namiki Izumi, Masatoshi Kudo, Kazuhiko Koike.
2. 発表標題 Transition of treatment selection for primary liver cancer and decompensated cirrhosis in multiple admissions: Analysis of a Nationwide Registry for Advanced Liver Diseases (REAL)
3. 学会等名 APASL Oncology 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥新和也, 建石良介, 高橋新, 内野康志, 中込良, 森山慎, 福本剛, 山田友春, 和気泰次郎, 中塚拓馬, 南達也, 佐藤雅哉, 長谷川潔, 江口有一郎, 考藤達哉, 久保正二, 吉治仁志, 宮田裕章, 泉並木, 工藤正俊, 小池和彦
2. 発表標題 複数回の入院情報に基づいた肝がん全国レジストリの構築
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Kazuya Okushin, Ryosuke Tateishi, Arata Takahashi, Koji Uchino, Ryo Nakagomi, Kiyoshi Hasegawa, Yuichiro Eguchi, Tatsuya Kanto, Shoji Kubo, Hitoshi Yoshiji, Hiroaki Miyata, Namiki Izumi, Masatoshi Kudo, Kazuhiko Koike.
2. 発表標題	CURRENT STATUS OF PRIMARY LIVER CANCER AND DECOMPENSATED CIRRHOSIS IN JAPAN: LAUNCH OF A NATIONWIDE REGISTRY
3. 学会等名	American Association for the Study of Liver Diseases The Liver Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Kazuya Okushin, Ryosuke Tateishi, Arata Takahashi, Koji Uchino, Ryo Nakagomi, Kiyoshi Hasegawa, Yuichiro Eguchi, Tatsuya Kanto, Shoji Kubo, Hitoshi Yoshiji, Hiroaki Miyata, Namiki Izumi, Masatoshi Kudo, and Kazuhiko Koike
2. 発表標題	Current treatment selection for primary liver cancer in Japan -Real-world data from a nationwide registry based on multiple hospitalizations-
3. 学会等名	JSH International Liver Conference (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Kado A, Tsutsumi T, Ikeuchi K, Okushin K, Enooku K, Fujinaga H, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K.
2. 発表標題	Diagnostic approach of flow cytometry to identify nonalcoholic steatohepatitis with overlapping autoimmune hepatitis in differential patterns of peripheral lymphocytes
3. 学会等名	American Association for the Study of Liver Diseases The Liver Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	門 輝, 奥新 和也, 榎奥 健一郎, 藤永 秀剛, 堤 武也, 森屋 恭爾, 四柳 宏, 小池 和彦
2. 発表標題	末梢血リンパ球比率を用いた自己免疫性肝炎合併を含む非アルコール性脂肪肝炎の診断アプローチ
3. 学会等名	第25回日本肝臓学会大会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 奥新和也、堤武也、小池和彦
2. 発表標題 胆汁酸トランスポーターBSEPのヘテロノックアウトは高脂肪食摂取マウスの肝脂肪化に対して抑制的作用を有する
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
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

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