

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02146

研究課題名(和文)腸管上皮細胞における脂質代謝異常の改善は、脂肪肝や肥満を改善できるか？

研究課題名(英文)Can the improvement of intestinal abnormalities in lipid metabolism cause the improvement of fatty liver and obesity?

研究代表者

高橋 信之(Takahashi, Nobuyuki)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：50370135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪肝や肥満は動脈硬化性疾患発症の重要なリスク要因である。同時に、食後に血中中性脂肪濃度が上昇する食後高脂血症についても空腹時血中中性脂肪濃度よりも高い相関を持つ動脈硬化性疾患発症リスクとして注目されている。これまで申請者は、食後高脂血症悪化のメカニズム解明に取り組み、食後高脂血症悪化を改善する食品成分を同定してきたが、食後高脂血症悪化の改善が脂肪肝や肥満といった他のリスク要因にどう影響するかは明らかになってない。そこで本研究において、食後高脂血症悪化メカニズムをより詳細に検討するとともに、遺伝子改変マウスを用いて食後高脂血症が長期に良好な場合に脂肪肝や肥満がどのように影響されるかを検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで動脈硬化性疾患の発症リスクとしての食後高脂血症は、消化器内科の分野では早くから注目されている。しかし詳細な作用メカニズムはもちろん食後高脂血症の悪化メカニズムの検討は行われていない。したがって本研究での成果は、食後高脂血症への注目を高めることに加え、脂肪肝や肥満の予防・改善を目的に食後高脂血症の悪化改善をターゲットとした薬剤・機能性食品成分の開発への動機付けを強めることが期待される。また食後高脂血症悪化を改善する新規食品成分の同定により、新たな機能性食品の開発や創薬シーズのスクリーニングにも寄与しうるため、創造性も高いと考えている。

研究成果の概要(英文)：Fatty liver and obesity are important risk factors for the development of arteriosclerotic diseases. At the same time, postprandial hyperlipidemia, a postprandial increase in blood triglyceride concentration, is also attracting attention as a risk factor for the development of atherosclerotic disease with a higher correlation than that of fasting blood triglyceride concentration. However, it is not clear how the improvement of postprandial hyperlipidemia affects other risk factors such as fatty liver and obesity. In this study, we will examine the mechanism of postprandial hyperlipidemia exacerbation in more detail and examine how fatty liver and obesity are affected by long-term favorable postprandial hyperlipidemia using genetically modified mice.

研究分野：分子代謝生理学

キーワード：食後高脂血症 肥満 脂質代謝 高脂肪食 消化管 炎症

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化性疾患患者の増加：動脈硬化性疾患は日本人の死因の約 1/4 を占めており、その治療ならびに発症リスク低減は急務の課題である。糖尿病・高血圧・脂質異常症といった生活習慣病が重要な発症リスク要因であり、こうした生活習慣病は動脈硬化性疾患の治療においても、治療効果を上げるため同時に治療する必要が生じ、課題解決を複雑にしている。

食後高脂血症改善の必要性：近年、食後に血中中性脂肪濃度が上昇する食後高脂血症におけるピークの高さが、空腹時の血中中性脂肪濃度の上昇よりも相関が高い動脈硬化性疾患発症リスク要因として注目されている。この食後高脂血症の悪化は健康診断などではスクリーニングできず、いわゆる「隠れリスク」として問題となる。つまり健康診断で測定される空腹時血中中性脂肪濃度が正常値であっても、脂質を経口負荷した後の血中中性脂肪濃度が高くなる集団があり、そうした集団は知らず知らずのうちに動脈硬化性疾患の発症リスクが高い状態となる。こうした点から、食後高脂血症悪化を予防・改善することは発症リスク低減のために大変、重要である。

食後高脂血症の他の生活習慣病への影響：一方、肥満や糖尿病が他の生活習慣病を併発しやすくするなど、生活習慣病の間で相互に関連がある。しかし食後高脂血症悪化については他の生活習慣病との関連は不明である。研究代表者がこれまで食後高脂血症悪化メカニズム解明を試みた中で、腸管炎症が深く関わっていることが示唆された。炎症は、肝臓での脂肪蓄積や脂肪組織でのインスリン抵抗性の発症などに深く関わっており、食後高脂血症悪化が他の生活習慣病と相互作用を持つ可能性は極めて高い。

2. 研究の目的

「食生活により食後高脂血症悪化を改善することで動脈硬化性疾患発症リスクを効果的に低減することができるのか？」これが本研究の核心をなす学術的な問いであり、その問いに答えるために本研究では以下のような、より具体的な二つの問いに答える検討を行う。

(研究目的 1)「食後高脂血症の長期的な悪化は脂肪肝や肥満をもたらすか？」

これまで研究代表者は腸管上皮細胞での脂肪酸酸化を亢進させることで食後高脂血症悪化を改善できることを明らかにしてきた。例えば肝臓や骨格筋で脂肪酸酸化を亢進させることが知られているペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 α (PPAR α) や AMP 依存性タンパク質リン酸化酵素 (AMPK) を薬剤により腸管上皮細胞で活性化させると脂肪酸酸化亢進を介して食後高脂血症の悪化が改善されることを見出した。そこで PPAR α や AMPK を腸管上皮特異的にノックアウトすることで、他の臓器での脂質代謝を変化させることなく、長期にわたり食後高脂血症を悪化させることができる。また PPAR α や AMPK には遺伝子組み換えによってドミナントアクティブフォーム (DA 体) にすることができ、そうした DA 体を腸管上皮細胞特異的に発現させることで、食後高脂血症悪化が改善された状態を長期間、維持できる。こうした遺伝子改変マウスを作製し、高脂肪食摂取条件下で食後高脂血症の変化が脂肪肝や肥満にどのような影響を与えるかを検討することを研究目的 1 とする。

(研究目的 2)「食後高脂血症はどのようにして悪化するのか？」

高脂肪食摂取により血中リポ多糖 (LPS) 濃度が上昇するという現象に着目することにした。一般に腸内細菌由来の LPS は、腸管上皮細胞に発現する各種トランスポータにより取り込まれ、血中に放出されているが、このトランスポータが高脂肪食摂取により増加し、血中 LPS 濃度が上昇する。この腸管上皮細胞から血中に放出される LPS が腸管上皮細胞の TLR-4 を活性化し、腸管上皮組織の内側から腸管炎症を引き起こすのではないかと考えた。このことは腸管上皮細胞での TLR-4 のタンパク質レベルが頂端膜側よりも基底膜側の方が高いという報告とも合致する。そこでこの高脂肪食摂取による血中 LPS 濃度上昇が高脂肪食による腸管炎症の誘導にどのように関係するかを明らかにすることを目的とする。加えて、明らかにした食後高脂血症悪化メカニズムを考慮して、食後高脂血症悪化を改善する新規食品成分の同定と機能解析も行う。

3. 研究の方法

(研究目的 1)「食後高脂血症の長期的な悪化は脂肪肝や肥満をもたらすか？」

腸管上皮細胞特異的ノックアウトマウスの作製：PPAR α もしくは AMPK を腸管上皮細胞特異的にノックアウト (KO) することで食後高脂血症が常に悪化したマウスを作製することができる。そのためにはそれぞれの遺伝子を loxP 配列で挟んだ flox マウスと loxP で挟まれた領域を切り出す DNA 組み替え酵素 Cre を腸管上皮細胞特異的に発現させたトランスジェニック (Tg) マウスが必要となる。PPAR α の flox マウスについてはオリエンタル酵母株式会社を通じて理化学研究所に外注し、AMPK の flox マウスについては Jackson Laboratory から供与・購入可能である。腸管上皮特異的 Cre-Tg マウスについては購入済みであるため、すべてのマウスが十分な量確保できれば、flox マウスと Cre-Tg マウスを交配させ、腸管上皮特異的 KO マウスを準備する。

腸管上皮細胞特異的 DA 体 Tg マウスの作製：逆に PPAR α や AMPK の DA 体を腸管上皮細胞

特異的に発現させることで、食後高脂血症が常に改善しているマウスを作製することができる。PPAR α の DA 体は、リガンド非存在下でも核内受容体を活性化できる酵母 VP-16 タンパク質を PPAR α の DNA 結合ドメインに融合させることで作製することができ、既に構築を完了している。AMPK の DA 体についても変異を導入することで常にタンパク質リン酸化活性を持つものが報告されており、自然科学研究機構生理学研究所・箕越靖彦教授のラボから既に供与を受けている。これらの DA 体遺伝子を腸管上皮特異的な発現調節領域である Villin プロモータに連結し、Tg マウスを作製する。Tg マウス作製はオリエンタル酵母株式会社に外注する。

食後高脂血症の長期的影響の検討：作製した遺伝子改変マウス(いずれも食事誘導性肥満モデルマウス C57BL/6J 系統で作製)を高脂肪食摂取条件下でコントロールである野生型マウスとともに長期間飼育する。飼育期間は、予備的検討により肝臓での脂肪蓄積が有意に増加し、また脂肪組織での炎症が誘導される 18 週間を予定している(必要に応じて飼育期間は変更する)。解剖前に経口脂肪負荷試験(Oral Lipid Tolerance Test: OLTT、オリーブオイルを経口投与し、30 分ごとに 240 分まで経時的に血中中性脂肪濃度を測定する実験)を実施し、遺伝子改変による食後高脂血症の悪化・改善が起きているかどうかを確認する。検討項目としては、肝脂肪蓄積量と脂肪組織等の臓器重量、各種血液パラメータ(血糖値や血中中性脂肪濃度等)、肝臓・脂肪組織・腸管上皮組織での各種炎症マーカーや脂質代謝関連の遺伝子発現、免疫染色等の組織レベルでの解析などを予定している。こうした検討を通じて食後高脂血症の悪化・改善が脂肪肝・肥満にどのような影響を与えるか明らかにする。

(研究目的 2)「食後高脂血症はどのようにして悪化するのか？」

食後高脂血症悪化と血中 LPS 濃度上昇との関連：食後高脂血症を評価するプロトコールと同様にマウス C57BL/6J に 1 週間高脂肪食摂取後、空腹時の血中 LPS 濃度を測定する。またその際、OLTT を実施し、中性脂肪濃度とともに血中 LPS 濃度も定量する。高脂肪食摂取により腸管上皮細胞での LPS 輸送担体(CD14)の遺伝子発現が増加するという報告があるため、同じ条件で腸管上皮組織での炎症マーカーとともに LBP 等の遺伝子発現も定量的 PCR で解析する。これらの実験により高脂肪食もしくは飽和脂肪酸摂取による食後高脂血症悪化と血中 LPS 濃度上昇との関連を明らかにする。

遺伝子改変マウスを用いた食後高脂血症悪化メカニズムの検討：高脂肪食摂取による血中 LPS 濃度上昇が腸管炎症誘導に関わっている場合、LPS 取り込みに関わる CD14 やその受容体である TLR-4 のノックアウトマウスでは高脂肪食摂取による腸管炎症は誘導されないことが予想される。また腸管炎症の際に発現が増加する TNF α が食後高脂血症悪化に関わっている場合、TNF α ノックアウトマウスでは高脂肪食摂取や LPS 経口投与では食後高脂血症が悪化しないと考えられる。こうした遺伝子改変マウスは既に入手済みであるため、そうしたマウスにおいて食後高脂血症がどのような影響を受けるか OLTT を実施し、また腸管上皮組織での炎症マーカーの遺伝子発現や血中 LPS 濃度などの血中パラメータを検討する。

抗炎症作用を有する食品成分による食後高脂血症悪化改善作用の確認：これまでに食後高脂血症悪化を改善する作用を持つことを明らかにした食品成分(魚油・レスベラトロール等)に加えて、現在、新たに抗炎症作用を確認している複数の食品抽出物について、血中 LPS 濃度変化にも着目した食後高脂血症に対する作用の検討を実施する(1 週間高脂肪食摂取条件下での OLTT および腸管上皮組織での遺伝子発現解析)。そうした検討を通じて、本研究で検討する高脂肪食摂取による血中 LPS 濃度上昇を介した腸管炎症誘導を標的とした食品成分の同定と機能解析を行う。

4. 研究成果

(研究目的 1)「食後高脂血症の長期的な悪化は脂肪肝や肥満をもたらすか？」

腸管上皮細胞特異的ノックアウトマウスの作製：令和 4 年度後半に、まず AMPK の組織特異的 KO マウスが完成した。そこで食後高脂血症に対する AMPK の組織特異的 KO の作用を検討したところ、AMPK 活性化剤であるメトホルミン(Met)による食後高脂血症悪化改善作用は AMPK 組織特異的 KO マウスにおいて消失した。したがって、Met 投与による食後高脂血症悪化改善作用は腸管上皮細胞での AMPK に依存していることが示された。しかし、Met を投与しない高脂肪食摂取のみの条件では、AMPK の組織特異的 KO マウスと野生型マウスとは食後高脂血症に差は認められなかった。その原因として、遺伝子発現解析などにより、AMPK をノックアウトすることで、そもそも腸管上皮細胞に脂肪を取り込むための輸送担体タンパク質などの発現が低下してしまい、腸管上皮細胞での脂肪酸酸化の低下が食後高脂血症にどのような作用をもたらすか検討することができない可能性が考えられた。現在、さらなる検討を行っている。また PPAR α の組織特異的 KO マウスについては作製が遅れてしまい、令和 5 年度後半によりやく完成したため、現在、食後高脂血症悪化における腸管上皮細胞での PPAR α の KO の影響を検討中である。

腸管上皮細胞特異的 DA 体 Tg マウスの作製：腸管上皮細胞特異的な発現調節領域である Villin プロモータが 10 kbp 以上もある巨大 DNA であったため、DA 体発現ベクターを作製することに時間がかかり、実験を行うに至らなかった。現在、DA 体発現ベクターを完成させ、Tg マウスを作製中であり、令和 6 年度中には実験を開始できる予定である。

食後高脂血症の長期的影響の検討：令和 4 年度後半に完成した AMPK 腸管上皮細胞特異的 KO

マウスについて、現在、高脂肪食を摂取させ、食後高脂血症が悪化する条件下で飼育を続けている。現在までのところ、体重には差が認められないが、引き続き、長期飼育を行う予定である。**PPAR** 腸管上皮細胞特異的 **KO** マウスについては、ようやく実験可能なマウスが確保出来たため、現在、長期飼育を開始した状況である。

(研究目的2)「食後高脂血症はどのようにして悪化するのか？」

食後高脂血症悪化と血中 LPS 濃度上昇との連関：予備的検討の結果と同様に、1 週間の高脂肪食摂取により血中 **LPS** 濃度が上昇することを確認した。この条件下で腸管粘膜層にマクロファージなどの免疫細胞が集積するかどうか、東京医科歯科大学難治疾患研究所の安達貴弘准教授の協力の下、**FACS** を用いて検討したところ、高脂肪食摂取によってマクロファージ・好中球・好酸球などの集積は認められなかった。しかし、腸管上皮組織での炎症性サイトカインの **mRNA** 発現レベルは増加しており、何らかの炎症応答は認められた。一方、高脂肪食摂取によって上皮細胞間のタイトジャンクションが壊れることでリーキーガット状態となることが知られており、高脂肪食を 1 週間摂取したマウスの腸管上皮組織でその過程を検討しようと試みたが困難であったため、現在、腸管オルガノイド平面培養系を用いて各種脂肪酸添加や炎症誘導刺激などによるリーキーガットの評価系を構築し、高脂肪食摂取による体内への **LPS** の移動増加と食後高脂血症との関連を検討中である。

遺伝子改変マウスを用いた食後高脂血症悪化メカニズムの検討：高脂肪食摂取による血中 **LPS** 濃度の上昇が腸管炎症を惹起もしくは増強する場合、腸管上皮細胞での **LPS** 受容体である **TLR-4** の発現が重要となる。そこで、**TLR-4** の全身 **KO** マウスをオリエンタル酵母より購入し、高脂肪食摂取による食後高脂血症悪化にどのような影響があるか検討を試みた。しかし、この **TLR-4** 全身 **KO** マウスは、通常食を摂取した場合であっても肥満状態となり、脂肪組織での炎症が惹起された。そのため、**OLTT** によって食後高脂血症を評価したが、野生型と比べて、著しく悪化するという結果が得られた。この **KO** マウスが肥満する原因は不明であるが、**TLR-4** を全身で **KO** することで、脂肪組織を含む全身性の慢性炎症が惹起されているため、食後高脂血症悪化が認められたと考えられることから、**TLR-4** の食後高脂血症悪化における役割を明らかにするためには、**TLR-4** 腸管上皮細胞特異的 **KO** マウスを作製する必要があると考えられる。しかし、**TLR-4** 全身 **KO** マウスから腸管オルガノイドを作製することは可能であるため、腸管上皮細胞での **TLR-4** の役割を培養系で明らかにする実験を計画している。

抗炎症作用を有する食品成分による食後高脂血症悪化改善作用の確認：高脂肪食摂取により何故、腸管上皮組織で炎症が起こるのか、また腸管上皮組織での炎症がどのようにして食後高脂血症を悪化させるのか、明らかにできていないが、1 週間の高脂肪食摂取により食後高脂血症が悪化することは明らかであるため、抗炎症作用を有する食品成分の摂取により、その高脂肪食誘導性の食後高脂血症悪化が改善されるか検討した。抗炎症作用を有することが知られている赤ワイン含有ポリフェノールであるレスベラトロールを高脂肪食と混餌し、1 週間摂取させたところ、食後高脂血症悪化が改善された(論文投稿準備中)。このとき、腸管上皮組織での炎症性サイトカインの **mRNA** 発現レベルは抑制されていた。またレスベラトロールと同様に抗炎症作用を持つ魚油含有高度不飽和脂肪酸であるドコサヘキサエン酸(**DHA**)も同様に、食後高脂血症悪化を改善し、腸管上皮組織での炎症性サイトカイン発現を抑制した。これら食品成分は、抗炎症作用だけでなく、**PPAR** や **AMPK** を活性化させることで食後高脂血症悪化を改善することが明らかとなっているため(研究代表者未発表データ)、抗炎症作用による改善効果がどの程度、寄与しているかは今後、明らかにする必要がある(レスベラトロールについては、科学研究費基盤(**B**) **24K01710** にて検討中)。

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 0件）

1. 著者名 Takahashi Hisako, Morikawa Miori, Ozaki Emi, Numasaki Minami, Morimoto Hiromu, Tanaka Miori, Inoue Hirofumi, Goto Tsuyoshi, Kawada Teruo, Eguchi Fumio, Uehara Mariko, Takahashi Nobuyuki	4. 巻 88
2. 論文標題 A modified system using macrophage-conditioned medium revealed that the indirect effects of anti-inflammatory food-derived compounds improve inflammation-induced suppression of <i>UCP-1</i> mRNA expression in 10T1/2 adipocytes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 679 ~ 688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbae033	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 Takahashi Nobuyuki, Takahashi Hisako, Morimoto Hiromu, Inoue Hirofumi, Goto Tsuyoshi, Kawada Teruo, Uehara Mariko	4. 巻 77
2. 論文標題 慢性炎症による肥満・糖尿病・食後高脂血症の増悪化メカニズム	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi	6. 最初と最後の頁 109 ~ 115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4327/jsnfs.77.109	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 -

〔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 赤松則千夏、大迫祐太、高橋尚子、伊藤圭汰、田中未央里、井上博文、上原万里子、高橋信之
2. 発表標題 「高脂肪食摂取による食後高脂血症悪化メカニズムの解析」
3. 学会等名 2021年度日本フードファクター学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋尚子、尾崎映見、井上博文、田中未央里、後藤剛、河田照雄、上原万里子、高橋信之
2. 発表標題 「炎症による熱産生阻害に対する抗炎症作用を持つ食品成分の機能解析」
3. 学会等名 2021年度日本フードファクター学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤松則千夏、大迫祐太、伊藤圭太、高橋尚子 田中未央里、井上博文、上原万里子、高橋信之
2. 発表標題 高脂肪食誘導性腸管炎症による食後高脂血症悪化のメカニズムの解明」
3. 学会等名 2021年度日本肥満学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋尚子、尾崎映見、井上博文、田中未央里、後藤剛、河田照雄、上原万里子、高橋信之
2. 発表標題 「褐色様脂肪細胞不活性化を解除する新規成分スクリーニング系の確立」
3. 学会等名 2021年度日本肥満学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八尾 成美、榎原 さゆり、木村 優人、富島 七海、高橋 尚子、森本 洋武、井上 博文、上原 万里子、高橋 信之
2. 発表標題 「AMPKの活性化を介した食後高脂血症悪化の改善」
3. 学会等名 2023年度日本栄養食糧学会
4. 発表年 2023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
---------	---------