

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860222

研究課題名(和文)肥満モデルマウスにおけるビタミンDシグナルと胆汁酸代謝の関係

研究課題名(英文)The relationship between vitamin D signaling and bile acid metabolism in obesity mice.

研究代表者

石澤 通康 (ISHIZAWA, Michiyasu)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：30646542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肥満病態における胆汁酸代謝に、ビタミンD受容体がどのように関与するかを明らかにすることを目的とした。4週間の高脂肪食摂取は野生型マウス、ビタミンD受容体欠損マウスいずれの血中タウロコール酸濃度を減少させた。高脂肪食摂取によって糞中非抱合型コール酸、デオキシコール酸、ムリコール酸、ムリコール酸が増加したが、ビタミンD受容体欠損マウスではこれらの胆汁酸はさらに増加した。本研究結果よりビタミンD受容体は血中タウロコール酸の代謝に関与することと、ビタミンD受容体欠損マウスでは非抱合型胆汁酸が増加することが明らかになり、腸内細菌による脱抱合化反応が活発に起こっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：My research goal is to elucidate how vitamin D receptor (VDR) involves in the bile acid metabolism in obesity. Wild-type mice and VDR knockout mice took high fat diet (HFD) or control diet for four weeks. I collected blood plasma, liver, urine and feces samples, and analyzed bile acid composition. HFD decreased plasma taurocholic acid contents and increased contents of unconjugated cholic acid, deoxycholic acid, alpha muricholic acid and beta muricholic acid in feces. Interestingly, VDR deficiency further increased these unconjugated bile acids. The results indicate that VDR is involved in the metabolism of taurocholic acid and that VDR deficiency enhances deconjugation of fecal bile acids, suggesting intestinal bacterial activation.

研究分野：生化学

キーワード：ビタミンD 胆汁酸 核内受容体 肥満 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

ビタミン D 受容体は、核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性転写因子であり、骨カルシウム代謝の恒常性に重要な働きをする活性型ビタミン D の受容体である。また、ビタミン D 受容体は腸内細菌によって産生される胆汁酸の受容体でもあるが、胆汁酸受容体としての生理機能は明らかになっていない。ビタミン D 受容体欠損マウスでは脂肪が蓄積しにくく、脂肪細胞特異的なビタミン D 受容体トランスジェニックマウスは肥満になることが報告されているが、ビタミン D 受容体の脂肪蓄積作用の詳細は未だ不明瞭である。一方、胆汁酸は、腸内細菌の過剰増殖を抑制し、肥満病態に特徴的な腸内細菌組成を改善する。研究代表者は、外科的胆汁うっ滞モデルマウスにおいて、ビタミン D 受容体欠損は全身性の慢性炎症を促進することを示したが、腸管のみ効果が逆転し、ビタミン D 受容体非依存性に炎症が抑制される現象を見出し、ビタミン D 受容体と腸内細菌を含む腸内環境との相互作用を想定した。これらのことより、ビタミン D 受容体、胆汁酸、腸内細菌の相互作用が肥満病態に関与しているとの仮説をたてた。

2. 研究の目的

活性型ビタミン D 及び、腸内細菌によって産生される生体内胆汁酸は、ビタミン D 受容体のリガンドである。ビタミン D 受容体は、肥満等生活習慣病との関連が深い、胆汁酸代謝、腸内細菌との相互作用が示唆されている。そこで、肥満病態における胆汁酸代謝の変化に対するビタミン D 受容体の関与を明らかにする。更に、ビタミン D 受容体依存性の胆汁酸代謝に腸内細菌が関与するかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

高脂肪食摂取マウスにおける胆汁酸代謝に、ビタミン D 受容体がどのように関与するかを明らかにするため、野生型マウス及びビタミン D 受容体欠損マウスに高脂肪食を摂取させ、体重、臓器重量、血漿成分(グルコース、中性脂肪、コレステロール、カルシウム)を定量し、胆汁酸蓄積部位(血漿、肝臓、便、尿)の胆汁酸組成を分析した。

血漿成分の定量はテストワコーによる比色法を用いた。胆汁酸の組成分析には、液体クロマトグラフィ質量分析法を用いた。サンプルはリン酸緩衝液にて希釈し、固相抽出法にて精製後、窒素ガスにて乾固、メタノールと酢酸アンモニウムの混合液に溶解し、分析を行った。内部標準として各胆汁酸の重水素体をすべてのサンプルに追加し、サンプル作成過程のばらつきを補正した。すべての定量値は、血漿及び尿は nmol/ml、肝臓及び便は nmol/mg に換算した。

4. 研究成果

(1) 肥満病態モデル実験系の確立とサンプル回収

肥満病態モデル実験系の確立

高脂肪食は、日本クレア社より購入可能な HFD32 を採用した。まず、8 週齢から 14 週齢の野生型 C57BL6/J 系統のオスマウスに代謝ケージ内にて高脂肪食を摂取させると、一週間後には体重増加、血中グルコース、中性脂肪、総コレステロールの増加が認められた。血中パラメータは 4 週間後まで維持され、体重は増加し続けた。

ビタミン D 受容体欠損マウスにおける高脂肪食摂取実験

全身性のビタミン D 受容体欠損マウスは、低カルシウム血症を呈する。血中カルシウム濃度の正常化のために、一般的な飼育には高カルシウム食或いは塩化カルシウム添加飲料水が用いられる。本研究ではすでに確立された高脂肪食を用いるため、塩化カルシウム添加飲料水によって血中カルシウム濃度の正常化をおこなった。次に、C57BL6/J 系統のビタミン D 受容体欠損マウスにて高脂肪食摂取をおこなったところ、野生型マウスと同様に血中パラメータの上昇が認められたが、4 週間後までに体重増加は認められなかった(図 1)。また、野生型及びビタミン D 受容体欠損マウスの血中カルシウム濃度に差は認められなかった。低カルシウム血症の影響を除外した 4 週間の高脂肪食摂取条件を採用し、胆汁酸組成解析用サンプルを回収した。

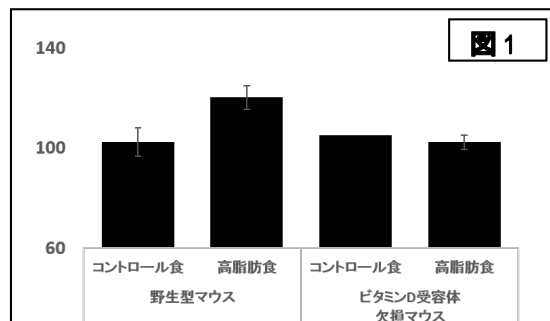


図 1. 高脂肪食又はコントロール食を 4 週間摂取させたマウスの体重変化 (%)

(2) 胆汁酸組成分析

胆汁酸組成分析では、コール酸、デオキシコール酸、ケノデオキシコール酸、リトコール酸、ムリコール酸、ムリコール酸とそれらのタウリン抱合化体の定量をおこなった。

血漿中胆汁酸組成変化に対するビタミン D 受容体の関与

高脂肪食摂取は、野生型マウスの血漿中タウロコール酸濃度を低下させた。ビタミン D 受容体欠損マウスの血漿中タウロコール酸濃度も低下したが、野生型マウスよりも高濃度を維持した(図 2、上)。腸内細菌によるコール酸の代謝産物であるデオキシコール酸類においても同様の傾向がみられた(図 2、下)。

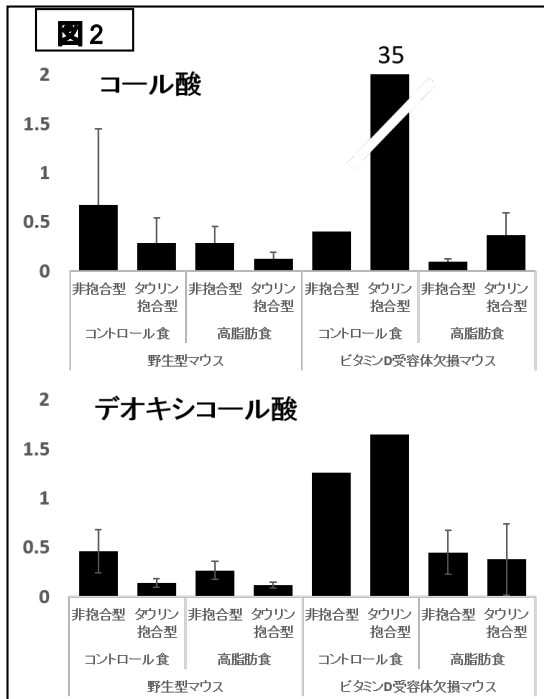


図 2. 4 週間高脂肪食摂取時の野生型マウスとビタミン D 欠損マウスにおける血漿中コル酸類 (上) とデオキシコル酸類 (下) の濃度比較 (nmol/ml)

糞中胆汁酸組成変化に対するビタミン D 受容体の関与

糞中コル酸は、非抱合型が低濃度であったが、ビタミン D 欠損マウスが高脂肪食を摂取した条件でのみ、糞中に高濃度に存在した (図 3-コル酸)。糞中にはコル酸以外の非抱合型胆汁酸が高濃度に存在し、各種抱合化胆汁酸は低濃度であった。高脂肪食摂取は、野生型マウスの糞中デオキシコル酸濃度 (図 3-デオキシコル酸)、ケノデオキシコル酸濃度 (図 3-ケノデオキシコル酸)、リトコル酸濃度 (図 3-リトコル酸)、ムリコル酸濃度を増加させた。ビタミン D 欠損マウスの糞中デオキシコル酸、ケノデオキシコル酸はコントロール食摂取で既に高濃度であったが、高脂肪食摂取で更に増加した。

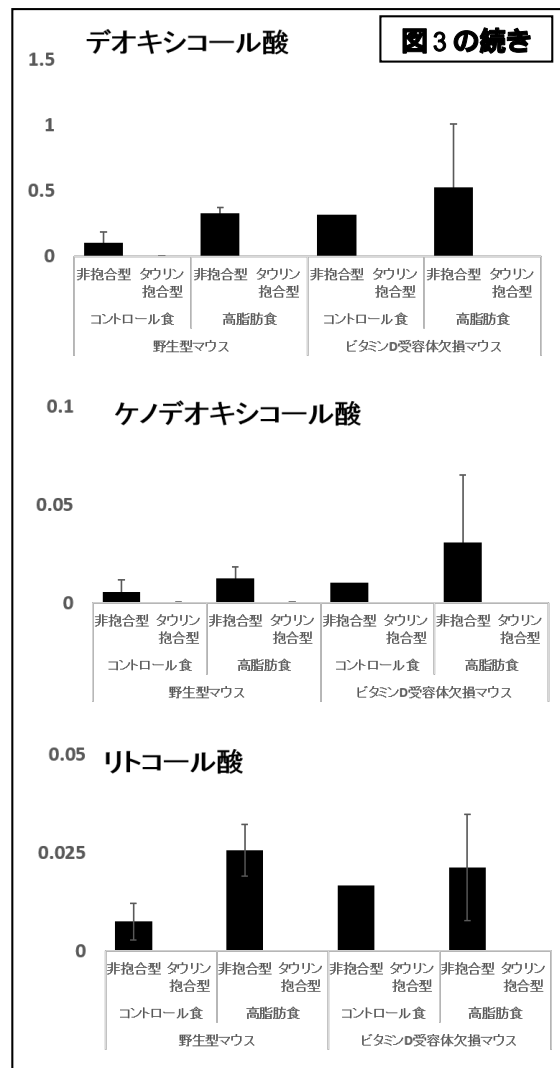
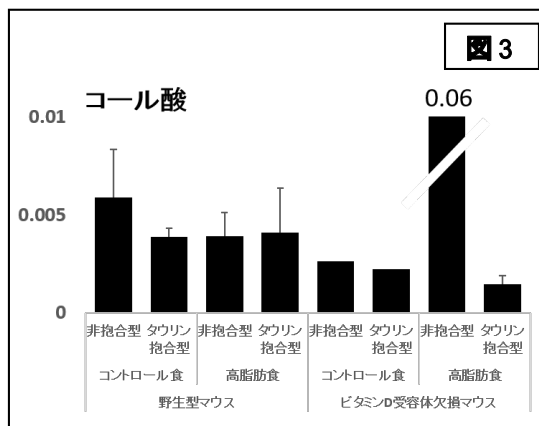
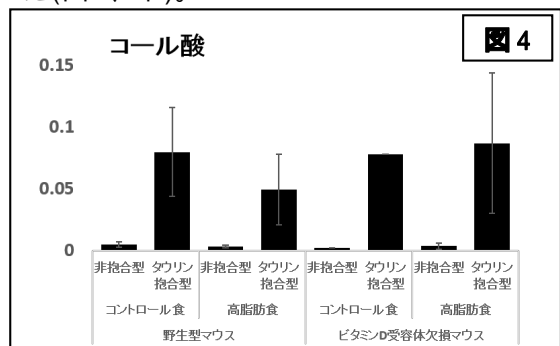


図 3. 4 週間高脂肪食摂取時の野生型マウスとビタミン D 欠損マウスにおける糞中コル酸類、デオキシコル酸類、ケノデオキシコル酸類、リトコル酸類の濃度比較 (nmol/ml)

肝臓及び尿中胆汁酸組成変化に対するビタミン D 受容体の関与

肝臓の主な胆汁酸はタウリン抱合化体として検出した。高脂肪食摂取、ビタミン D 受容体欠損による変化は認められなかった (図 4、上)。尿中には非抱合型胆汁酸とタウリン抱合化体を同程度検出した。高脂肪食摂取によって各胆汁酸の濃度が低下したが、ビタミン D 受容体欠損による変化は認められなかった (図 4、下)。



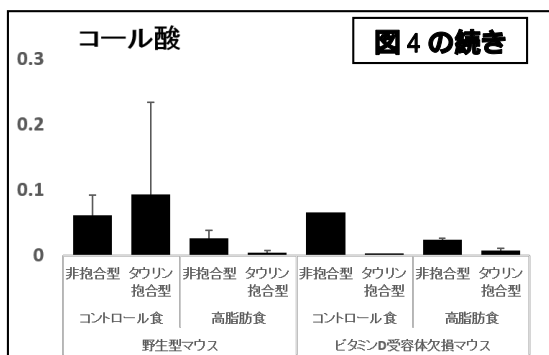


図 4. 4 週間高脂肪食摂取時の野生型マウスとビタミン D 欠損マウスにおける肝臓中コール酸類(上、nmol/mg)及び、尿中コール酸類(下、nmol/ml)の濃度比較

(3)総括

タウロコール酸は、腸内細菌による脱抱合化反応と 7- 脱水酸化反応によってデオキシコール酸に変換される。高脂肪食摂取による血中タウロコール酸濃度の低下と糞中デオキシコール酸濃度の増加より、腸内細菌による脱抱合化反応と 7- 脱水酸化反応が活発になったことが示唆された。ビタミン D 受容体欠損マウスで、高脂肪食依存性の現象がより活発になったことより、ビタミン D 受容体が腸内細菌の胆汁酸代謝機能に直接または間接的に関与することが予想された。ビタミン D 受容体リガンドの投与及び、抗生剤投与や、無菌環境における実験を行い、本研究課題で得られた成果を更に詳細に検討することが今後の課題である。ビタミン D 受容体欠損マウスにおける胆汁酸組成解析は、これまでに一部の研究室が、健康な状態でのプール胆汁酸組成を報告するのみであった。高脂肪食摂取時における各部位(血漿、肝臓、尿、便)での胆汁酸組成変化の解析は世界初の知見であり、VDR の胆汁酸代謝への関与を研究する上で重要な情報の一部といえる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：

国内外の別：
 取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等
 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石澤 通康 (ISHIZAWA, Michiyasu)
 日本大学・医学部・助手
 研究者番号：30646542

(2)研究協力者

槇島 誠 (MAKISHIMA, Makoto)
 日本大学・医学部・教授
 研究者番号：70346146

本多 彰 (HONDA, Akira)
 東京医科大学・茨城医療センター・教授
 研究者番号：10468639

西田 滋 (NISHIDA, Shigeru)
 日本大学・医学部・准教授
 研究者番号：90211458