

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11006

研究課題名(和文)胆汁鬱滞による脂質代謝異常に対する小腸の役割の解明

研究課題名(英文)Role of the small intestine in dyslipidemia associated with cholestasis

研究代表者

田中 裕滋(TANAKA, Yuji)

近畿大学・大学病院・講師

研究者番号：00465650

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：末梢組織に蓄積するコレステロールは胆管経路以外にTICE(transintestinal cholesterol efflux)により血中から腸管へ直接排泄される。本研究では薬剤誘発性胆汁鬱滞や総胆管結紮により小腸LDLレセプターとAbcg5/g8が増加しTICEが増強した。さらに高脂血症治療薬であるエゼチミブやペマフィブラート投与により小腸Abcg5/g8の増加とTICEの亢進が認められた。ペマフィブラートでは吸収を担うNPC1L1とSR-B1が低下し、コレステロール吸収を抑制する可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで如何なる分子がTICEを担うか一定の結論は得られていない。本研究では総胆管を結紮する動物モデルで小腸LDLレセプターとAbcg5/g8の増加およびTICEの亢進が確認された。この結果からLDLレセプターによる小腸上皮細胞内への取り込みとAbcg5/g8による腸管への排泄がTICEの中心分子機構と考えられた。さらに高脂血症治療薬の投与によりAbcg5/g8を介してTICEが増強したことから小腸を標的とした動脈硬化予防の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Any excessive cholesterol is transported back to the liver from the peripheral tissues and excreted in bile. In addition to the biliary route, transintestinal cholesterol efflux (TICE), a mechanism wherein cholesterol enters the small intestinal epithelial cells from the blood and is directly excreted into the intestinal lumen, was recently reported as a route of cholesterol excretion. In the present study, drug-induced cholestasis and bile duct ligation (BDL) induced intestinal expression of LDL receptor as well as Abcg5/g8 and enhanced fecal cholesterol excretion. Similarly, TICE pathway can be stimulated by lipid-lowering drugs ezetimibe and pemafibrate by increasing intestinal cholesterol efflux transporters Abcg5/g8. Furthermore, pemafibrate may suppress intestinal cholesterol absorption by reducing NPC1L1 and SR-B1. These data indicated that the small intestine may be a target organ for the prevention of atherosclerosis.

研究分野：病態代謝学

キーワード：胆汁鬱滞 総胆管結紮 脂質代謝異常 小腸 コレステロールトランスポーター TICE エゼチミブ ペマフィブラート

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高コレステロール血症は動脈硬化性心血管病のリスクファクターであるが、この予防および治療法の確立は重要な課題である。従来、高コレステロール血症の治療薬は、肝臓のコレステロール合成経路の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチンが主流であったが、小腸コレステロール吸収トランスポーターである NPC1L1(Niemann-Pick C1 Like 1)の阻害剤であるエゼチミブが高脂血症治療薬としてスタチンと併用されるようになった。コレステロールの体内動態は、経口摂取されたコレステロールと肝臓で合成されたコレステロール、およびコレステロールから合成された胆汁酸が胆汁中に排泄されて小腸で合流し、大部分は小腸で吸収されて腸肝循環していると考えられている。コレステロール逆転送系は、末梢組織や動脈壁に沈着したマクロファージに蓄積する過剰なコレステロールを HDL コレステロールが引き抜いて肝臓へ戻し、コレステロールあるいは胆汁酸として胆汁中に排泄する系と考えられてきた。実際のところは、血中コレステロールの排泄経路として胆管を介した経路だけでなく、小腸上皮細胞を介した排泄経路である TICE(transintestinal cholesterol efflux)が報告されている。動物実験においては糞中のコレステロールの約 65%が胆管ルートから排泄されたものであり、残り 35%が TICE を介したものと報告がある。TICE への影響をみた研究では、高脂肪食、スタチン、およびエゼチミブによって TICE が亢進するとの報告があるが、TICE が増強する分子レベルでの機序に関しては一定の結論が得られていない。これまでに肝細胞および小腸上皮細胞においてコレステロール輸送を担うトランスポーターが同定されている。肝細胞の血管側膜には、LDL コレステロールを血中から肝細胞内へ取り込む LDL レセプターと末梢組織から HDL コレステロールが受け取ったコレステロールを肝細胞内へ取り込む SR-B1 が発現している。一方、肝細胞の毛細胆管側膜には、コレステロールを胆汁中へ排泄する Abcg5/g8 と胆汁酸を排泄する Bsep が発現している。肝細胞と同様に小腸上皮細胞においても腸管の管腔側膜に NPC1L1、SR-B1、Abcg5/g8 が発現し、血管側膜には LDL レセプターが発現しているが、これらトランスポーターと TICE との関連について完全には解明されていない。

2. 研究の目的

肝臓から胆管を介した腸管へのコレステロール排泄経路以外に血液から小腸上皮細胞に取り込まれ、腸管の管腔に直接排泄する経路 TICE が発見された。生理的な状況でも、TICE から排泄されるコレステロールは約 35%もあり、高コレステロール血症の治療標的になると考えられる。これまでの研究では小腸上皮細胞において TICE を担っている分子機構は明らかになっていないが、腸管の管腔側に関してはコレステロールの排泄を担う Abcg5/g8 が TICE における排泄に関わっていると考えられている。一方、血管側から小腸上皮細胞内へのコレステロールの取り込みを担う候補として LDL レセプターが考えられ、LDL レセプターのノックアウトマウスを用いた報告があるが、予想外にもノックアウトマウスでむしろ TICE の増加傾向が認められた。これらの結果はノックアウトマウスという恒常的なトランスポーターの欠損下では、他に代償機構が働くことによってトランスポーターの TICE における役割を正しく評価できていないと考えられる。本研究では総胆管結紮 (BDL) モデルを利用して肝臓から胆汁へのコレステロール排泄経路を遮断し、TICE への影響と小腸上皮細胞におけるトランスポーターの変動を明らかにする。また、完全に胆汁の流れを止める BDL モデルだけでなく肝内胆汁鬱滞を引き起こす ANIT(-Naphthyl isothiocyanate)を投与し、BDL モデルと同様に TICE への影響と小腸トランスポーターの発現変動を明らかにする。さらには既報よりスタチンやエゼチミブなどの高脂血症治療剤による TICE の亢進が報告されていることより、エゼチミブ以外に新規のフィブラート系薬剤であるペマフィブラートによる TICE および小腸トランスポーターへの影響も明らかにする。

3. 研究の方法

これまでに TICE を担う分子機構の探求はなされてきたが完全な結論には至っていない。例えば、TICE を担う分子の候補と考えられる LDL レセプターや SR-B1 のノックアウトマウスを用いた研究が行われたが、これらのノックアウトマウスではむしろ TICE の増加傾向や有意な増加が認められた。本研究では、恒常的な変化と考えられるノックアウトマウスを用いるのではなく、コレステロールの体内動態に動的に影響を及ぼすと考えられる動物モデルを利用する。

実験 1

肝内胆汁鬱滞の TICE および小腸上皮細胞に発現するコレステロールトランスポーターへの影響を明らかにするために C57BL/6 マウスに ANIT(-Naphthyl isothiocyanate)75mg/Kg を投与して 72 時間後に血液、肝臓、空腸、および糞を収集する。

(1)コントロール群

(2)ANIT 投与群

実験 2

総胆管結紮 (BDL) モデルを利用することでコレステロール排泄経路の一つである胆管ルートを遮断した際の肝臓と空腸のコレステロール代謝と TICE への影響を明らかにするために SD ラットに AIN93M(コ

ントロール食)を2週間摂取させたのち Sham 術と BDL を施行して 72 時間後に血液、肝臓、空腸、および糞を収集する。さらには NPC1L1 阻害剤であるエゼチミブを投与した際の肝臓と空腸のコレステロール代謝と TICE への影響を明らかにするために SD ラットにエゼチミブ添加食を 2 週間摂取させたのち同様に手術しサンプルを収集する。

- (1) Sham 群; AIN93M(コントロール食)を2週間+Sham
- (2) BDL 群; AIN93M(コントロール食)を2週間+BDL
- (3) E-Sham 群; AIN93M に 0.005%エゼチミブを添加した食餌を2週間+Sham
- (4) E-BDL 群; AIN93M に 0.005%エゼチミブを添加した食餌を2週間+BDL

実験 3

選択的 PPAR modulator であるペマフィブラートを投与した際の肝臓と空腸のコレステロール代謝と TICE への影響を明らかにするために SD ラットにペマフィブラート添加食を 2 週間摂取させたのち実験 2 と同様に手術しサンプルを収集する。

- (1) Sham 群; AIN93M(コントロール食)を2週間+Sham
- (2) BDL 群; AIN93M(コントロール食)を2週間+BDL
- (3) P-Sham 群; AIN93M に 0.001%ペマフィブラートを添加した食餌を2週間+Sham
- (4) P-BDL 群; AIN93M に 0.001%ペマフィブラートを添加した食餌を2週間+BDL

実験 1~3 において解析する項目

血液検査; オートアナライザーによる測定
肝脂質と糞中脂質; Folch 法による脂質抽出と酵素法にて測定
肝と空腸の脂質関連遺伝子の mRNA 発現定量; リアルタイム PCR 法

4. 研究成果

実験 1

コントロール群に比較して ANIT 投与群では、血中のビリルビン、胆汁酸、ALP、および総コレステロールの上昇と肝臓の総コレステロールと胆汁酸の増加が認められたことより、ANIT 投与により胆汁鬱滞と高コレステロール血症が誘導されることが確認された。また、ANIT 群では糞中コレステロールの上昇が認められ、胆汁鬱滞下では胆汁中へのコレステロール排泄が低下することより、糞中コレステロール増加の要因としては TICE を介した増加が示唆された。遺伝子発現解析では、ANIT 群の空腸上皮細胞の血管側膜に存在する LDL レセプターの発現の増加が認められ、LDL レセプターが ANIT 誘発性胆汁鬱滞の際の TICE の亢進に関与している可能性が示唆された。

実験 2

Sham(コントロール)群に比較して BDL 群では、血中のビリルビン、胆汁酸、および総コレステロールの上昇と肝臓の総コレステロールおよび胆汁酸の増加が認められた。また、肝コレステロールは Sham 群と BDL 群ともにエゼチミブ添加群でそれぞれ低下していた。糞中コレステロールは、Sham 群に比較して BDL 群での増加傾向と E-Sham 群での増加が認められた。さらに BDL 群に比較して E-BDL 群でも増加が認められた。遺伝子発現に関しては、Sham 群に比較して E-Sham 群で肝 Abcg5 の増加傾向と空腸 Abcg5/g8 の増加が認められた。Sham 群に比較して BDL 群で空腸 Abcg8 の増加傾向が認められたが、BDL 群に比較して E-BDL 群で追加の増加は認められなかった。以上より、Sham 実験の結果からはエゼチミブによるコレステロールの排泄亢進に胆管および TICE の両方の経路が寄与している可能性が示唆された。一方、BDL 実験の結果からはコレステロール排泄に TICE 経路が優位に働いている可能性が示唆された。また、エゼチミブによる TICE 増強作用には小腸 Abcg5/g8 が担っている可能性が示唆された。

実験 3

肝コレステロールは Sham 群と BDL 群の両方においてペマフィブラート添加群でそれぞれ低下した。糞中コレステロールは Sham 群と BDL 群の両方においてペマフィブラート添加群でそれぞれ増加した。遺伝子発現はペマフィブラート投与により肝では Sham 群で Abcg5 と Abca1 の増加を認め、BDL 群では Abca1 の増加を認めた。空腸では Sham 群に比較して P-Sham 群で Abcg8 の増加と SR-B1 の低下および Abcg5 の増加傾向と NPC1L1 の低下傾向を認めた。Sham 群に比較して BDL 群では Abcg5/g8 と LDL レセプターの増加が認められた。BDL 群に比較して P-BDL 群で NPC1L1 の低下傾向と SR-B1 の低下を認めた。また、P-Sham 群に比較して P-BDL 群で LDL レセプターの増加を認めた。これらの結果よりペマフィブラートは Abcg5/g8 だけでなく LDL レセプターを介して TICE を増強し、NPC1L1 と SR-B1 を抑制することで小腸コレステロール吸収を阻害している可能性が示唆された。

本研究の結果から TICE を担う中心分子として小腸の Abcg5/g8 や LDL レセプターの関与が示唆された。また、エゼチミブだけでなく新規の高脂血症治療薬であるペマフィブラートによる小腸を標的とした動脈硬化の予防が期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tanaka Yuji, Ikeda Takanori, Ogawa Hiroshi, Kamisako Toshinori	4. 巻 374
2. 論文標題 Ezetimibe Markedly Reduces Hepatic Triglycerides and Cholesterol in Rats Fed on Fish Oil by Increasing the Expression of Cholesterol Efflux Transporters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 175 ~ 183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/jpet.120.265660	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yuji Tanaka, Takanori Ikeda, Hiroshi Ogawa, Toshinori Kamisako
2. 発表標題 Increased non-biliary cholesterol excretion during alpha-naphthylisothiocyanate (ANIT)-induced cholestasis in mice
3. 学会等名 The 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Tanaka, Takanori Ikeda, Hiroshi Ogawa, Toshinori Kamisako
2. 発表標題 Ezetimibe markedly reduces hepatic triglycerides and cholesterol in fish oil-fed rats
3. 学会等名 The 70th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Tanaka, Takanori Ikeda, Hiroshi Ogawa, Toshinori Kamisako
2. 発表標題 Adaptive regulation of bile acid and cholesterol transporters in mouse kidney and intestine during alphanaphthylisothiocyanate (ANIT)-induced cholestasis
3. 学会等名 The 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology (国際学会)
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	上裕 俊法 (KAMISAKO Toshinori) (20233934)	近畿大学・大学病院・教授 (34419)	

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