

論文内容要旨

東北大学大学院 薬学研究科

薬物動態学分野 栗林秀明

胆汁酸は、肝臓でコレステロールから **cholesterol-7 α -hydroxylase (CYP7A1)**などによる代謝を受けて合成される。胆汁酸は合成後に胆嚢に溜められ、食餌刺激などにより十二指腸内へ分泌される。分泌された胆汁酸は生体にとって必要な脂質成分や脂溶性ビタミンなどと共にミセルを形成し、それら脂質成分の吸収を促進した後、回腸及び大腸からその約**95%**以上が再吸収される。再吸収された胆汁酸は、門脈を経て再び肝臓に戻る。このように胆汁酸は腸肝循環する。胆汁酸は、肝臓で生合成後すぐにアミノ酸 (タウリンやグリシン等)で抱合される。アミノ酸抱合された胆汁酸は、十二指腸内へ分泌されると小腸や大腸において一部腸内細菌により脱抱合され、非抱合型胆汁酸となる。非抱合型胆汁酸は回腸及び大腸で再吸収され肝臓に戻ると再びアミノ酸抱合される。このように、胆汁酸は腸肝循環する間にアミノ酸抱合・脱抱合を繰り返すが、胆汁酸のアミノ酸抱合・脱抱合の生理的意義は不明である。**Farnesoid X receptor (FXR)**は、胆汁酸を内因性のリガンドとする核内受容体であり、回腸・肝臓などに高発現する。**FXR** は、肝胆道系における総胆汁酸レベルの増加を感知することで生体内の胆汁酸レベルを厳密に調節している。さらに、**FXR** のリガンドをマウスに投与した時は、脂質・糖などのエネルギー代謝に影響を与えることが報告されており、胆汁酸/**FXR** シグナルの重要性が高まっている。しかし、内因性の胆汁酸による **FXR** の活性化機序についてその全容は明らかでない。 β ラクタム系抗菌薬である **ampicillin (ABPC)**をマウスに経口投与し、腸内細菌数を減少させると、消化管腔内の総胆汁酸レベルが増加するにもかかわらず、回腸 **FXR** 標的遺伝子の発現レベルが減少することを見出した。この時、消化管腔内における非抱合型胆汁酸である **cholic acid (CA)**のレベルが減少していたため、**CA** レベルの変動が **FXR** の活性化に影響を及ぼす可能性が考えられた。本研究では、非抱合型 (**CA**)あるいはアミノ酸抱合型胆汁酸である **taurocholic acid (TCA)**の回腸及び肝臓における **FXR** シグナルに与える影響について解析することで、胆汁酸のアミノ酸抱合・脱抱合と **FXR** シグナルの活性化との関連について明らかにすることを目的とした。

1. マウスに抗菌薬を投与した時の生体における **FXR** シグナルへの影響

ABPC を 100 mg/kg/day で 3 日間経口投与した時の回腸 FXR 標的遺伝子 (Fgf15、Shp、Ibapp、Osta) の mRNA レベルは、Vehicle 群と比較して有意に減少した。この時、消化管管腔内に存在する総胆汁酸レベルは有意に増加し、主にアミノ酸抱合型胆汁酸である taurocholic acid (TCA) 及び tauro- β -muricholic acid (T β MCA) レベルが増加した。一方、腸内細菌による胆汁酸脱抱合反応を受けて生成される非抱合型胆汁酸 cholic acid (CA) 及び β -muricholic acid (β MCA) レベルは検出限界以下 ($< 0.01 \mu\text{mol}$) に減少した。これらの結果から、生体における FXR (回腸及び肝臓) の活性化は、非抱合型胆汁酸レベルの変動により影響を受ける可能性が考えられた。つまり、腸内細菌による胆汁酸脱抱合は回腸 FXR を活性化し、肝臓における胆汁酸アミノ酸抱合反応は、肝 FXR を不活化する役割を担っているのではないかという仮説が立てられた。

2. 胆汁酸脱抱合と回腸 FXR 活性化

非抱合型胆汁酸 (CA、 β MCA) あるいはアミノ酸抱合型胆汁酸 (TCA、T β MCA) それぞれの回腸 FXR 活性化作用を解析するために、ABPC を 3 日間投与し、腸内細菌による胆汁酸脱抱合反応を抑制した系に、胆汁酸を処置する実験を行った。まずは CA あるいは TCA 投与による回腸 FXR 活性化への影響について解析した。ABPC を 3 日間投与したマウスに、最終投与時に CA あるいは TCA を 500 mg/kg で併用投与した時の回腸 FXR 標的遺伝子 (Fgf15、Shp、Ibapp、Osta) の mRNA レベルについて解析したところ、CA の併用投与によってのみこれら遺伝子の mRNA レベルは有意に増加し、TCA の併用投与では変動は認められなかった。ABPC を投与していないコントロールマウスに CA あるいは TCA をそれぞれ経口投与すると、CA 及び TCA 投与群双方において回腸 FXR 標的遺伝子の mRNA レベルの有意な増加が認められた。上記の実験において、消化管管腔内及び門脈血中における胆汁酸組成について解析したところ、ABPC を投与したモデルでは、CA の併用投与により CA 及び TCA レベルの増加が認められたが、TCA の併用投与では TCA レベルの増加のみ確認された。一方、コントロールマウスの系では、CA あるいは TCA を経口投与すると、双方の群で CA 及び TCA レベルの増加が確認された。これらの結果から、消化管管腔内及び門脈血中において非抱合型胆汁酸である CA が存在することが、回腸 FXR を活性化させる一因になることが示唆された。消化管管腔内及び門脈血中における CA レベルの増加による回腸 FXR 標的遺伝子の発現レベルの増加が FXR 依存的か解析するために、FXR 欠損型マウスに ABPC を前投与したモデルに、CA を経口投与する実験を行った。CA の経口投与による回腸 FXR

標的遺伝子 (Shp、Ibabp、Osta) の mRNA レベルの増加は認められなかった。つまり、非抱合型胆汁酸 CA の増加による FXR 標的遺伝子の発現増加は FXR 依存的であることが示唆された。次に、CA のレベルを生理的レベルにまで戻した時の回腸 FXR 標的遺伝子への影響について解析するため、ABPC 投与マウスに CA を 100 mg/kg 投与する実験を行った。消化管管腔内の CA レベルは ABPC 群で検出限界以下に減少したが、ABPC+CA (100 mg/kg) 群では Vehicle 群程度にまで増加し、生理的レベルにまで回復させることに成功した。この時、回腸 FXR 標的遺伝子 (Fgf15、Shp) の mRNA レベルについて、ABPC 投与により Vehicle 群と比較して有意に減少したこれら遺伝子の mRNA レベルは、CA (100 mg/kg) の経口投与によって回復した。これらの結果から、消化管管腔内の CA レベルは、生理的に存在するレベルで回腸 FXR の活性化に影響を与えることが示唆された。

3. 胆汁酸アミノ酸抱合反応と肝 FXR 活性化

消化管管腔内で非抱合型胆汁酸である CA が存在することが、回腸 FXR の活性化に寄与することが示唆された。この結果を受けて、肝臓でも同様に非抱合型胆汁酸である CA レベルが増加すれば、肝 FXR の活性化が認められるか解析した。CA あるいは TCA (500 mg/kg) をそれぞれマウスに経口投与したときの肝 FXR 標的遺伝子 (Shp、Ost β 、Bsep) の mRNA レベルに変動は認められなかった。この時、肝内胆汁酸組成について、CA あるいは TCA を経口投与しても肝内では TCA レベルの増加のみ確認された。つまり、CA をマウスに投与しても、肝内ではアミノ酸抱合反応が進行し、TCA レベルのみ増加するという結果を得た。そこで、マウスの胆汁酸アミノ酸抱合反応に必要なアミノ酸 (タウリン) を枯渇させ、アミノ酸抱合反応を阻害した条件下で非抱合型胆汁酸である CA を経口投与したときの肝 FXR 標的遺伝子への影響について解析した。タウリン枯渇剤である β -Alanine を 3% の濃度で水と共に 1 週間摂取させ、その後 CA を 500 mg/kg で経口投与した (β -Alanine/Vehicle 群、 β -Alanine/CA 群)。また、コントロールとして通常の水を摂取させたマウスに CA を投与した (Control/Vehicle 群、Control/CA 群)。肝 FXR 標的遺伝子の mRNA レベルは、Control/Vehicle 群と比較して、Control/CA 群、 β -Alanine/Vehicle 群では変動しなかったのに対し、 β -Alanine/CA 群では有意な増加が認められた。この時、Control/CA 群において肝内では TCA レベルの増加のみ確認されたが、 β -Alanine/CA 群では TCA レベルのみではなく、非抱合型胆汁酸である CA レベルの増加も確認された。これらの結果から、肝臓においてアミノ酸抱合型胆汁酸 (TCA) ではなく非抱合型胆汁酸 (CA) レベルの増加が、肝 FXR の

活性化に寄与することが示唆された。

4. マウス初代培養肝細胞での胆汁酸による FXR 活性化

肝臓においては、非抱合型胆汁酸である CA の増加に伴い肝 FXR の活性化が認められ、TCA の増加では肝 FXR の活性化は *in vivo* では認められなかった。CA 及び TCA については、ライン化された肝細胞を用いた *in vitro* の結果から、どちらの胆汁酸も FXR 活性化作用を持つことが報告されている。なぜ *in vivo* において TCA のレベルが増加しても FXR の活性化が認められないのか明らかにするためにマウス初代培養肝細胞を用いて、胆汁酸による肝 FXR 活性化について解析した。マウス肝臓から肝細胞を初代培養し、TCA を処置すると、肝 FXR 標的遺伝子 (Shp、Ost β) の mRNA レベルの有意な増加が認められ、*in vivo* での結果とは異なることが明らかとなった。In *vivo* では様々な胆汁酸が共存しており、マウスに特異的に存在する T β MCA は、FXR のアンタゴニストとして機能することが報告されている。この報告から、TCA による FXR 活性化は、T β MCA の共存により阻害される可能性が考えられた。そこで、マウス初代培養肝細胞に TCA 及び T β MCA を共処置すると、TCA 単独処置で認められた肝 FXR 標的遺伝子の mRNA レベルの増加作用は減弱した。これらの結果から、*in vivo* において TCA が肝内で増加しても FXR が活性化されない理由の一つとして、T β MCA の共存が考えられる。

本研究において、抱合型及び非抱合型胆汁酸の間で、回腸及び肝 FXR シグナルの活性化作用が *in vivo* で異なることを初めて明らかにし、抱合・脱抱合反応が、胆汁酸の体内動態制御だけでなく、FXR シグナル制御要因として機能する可能性が示された。本研究成果が、胆汁酸/FXR シグナルの全容解明に繋がることを期待する。

論文提出者: 栗林 秀明

論文審査委員 (主査): 青木 淳賢

論文題目: 胆汁酸抱合・脱抱合反応を介した核内受容体 farnesoid X receptor の
シグナル制御

コレステロール異化産物である胆汁酸は、肝臓で合成され、アミノ酸抱合を受けて腸管腔内へ排出される。この抱合型胆汁酸の一部は、腸内細菌により脱抱合され、肝臓に戻る。このように胆汁酸は、腸肝循環過程において抱合・脱抱合反応を受けるが、この抱合・脱抱合反応の生理的意義は明確になっていない。胆汁酸は回腸や肝臓で高発現している核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) のリガンドとして機能する。胆汁酸/FXR シグナルは脂質・糖などのエネルギー代謝、炎症反応等の制御に関与することが明らかになり、生体内における胆汁酸/FXR シグナルの重要性が認識されている。しかし、各種胆汁酸分子種の FXR に対する作用の相違に関しては不明な点が多い。以上のことから本研究では、胆汁酸の抱合・脱抱合反応の生理的意義を明らかにするため、抱合型及び非抱合型胆汁酸の回腸及び肝の FXR シグナルに対する作用を解析した。

腸内細菌による脱抱合反応を抑制した抗菌薬 (ampicillin) 投与マウスを用い、非抱合型胆汁酸 cholic acid (CA) と抱合型胆汁酸 taurocholic acid (TCA) の回腸 FXR シグナルへの影響を比較解析した。CA の経口投与では、腸管腔内の CA 及び TCA レベルの増加と共に、回腸 FXR 標的遺伝子の mRNA レベルの増加が認められた。一方 TCA の経口投与では、腸管腔内の TCA レベルは増加したが、CA レベルは増加せず、上記 mRNA レベルも変動しなかった。同様の実験において、肝臓の FXR 標的遺伝子の mRNA レベルは、CA 又は TCA のいずれの投与によっても変動せず、肝臓では TCA レベルは増加したが、CA は検出されなかった。次にタウリン枯渇剤 (β -alanine) をマウスに投与して肝臓でのアミノ酸抱合を阻害した後に CA を経口投与したところ、肝内 CA レベルは増加し、肝 FXR 標的遺伝子の mRNA レベルも増加した。以上の結果から、マウスでは非抱合型胆汁酸 CA は、回腸及び肝 FXR シグナルの活性化作用を有するが、抱合型の TCA にはそのような作用がないことが示唆された。

本研究において、抱合型及び非抱合型胆汁酸の間で、回腸及び肝 FXR シグナルの活性化作用が異なることを初めて明らかにし、抱合・脱抱合反応が、胆汁酸の体内動態制御だけでなく、FXR シグナル制御要因として機能する可能性が示された。本研究結果が、胆汁酸/FXR シグナルの全容解明に繋がることが期待できる。よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。