

マウスにおける肝脂質蓄積とステロール代謝変動に及ぼす

## 12 水酸化胆汁酸の役割

北海道大学 大学院農学院

生命フロンティアコース 博士後期課程

岩崎 若菜

# 目次

目次	2
略語一覧	5
図リスト	9
表リスト	10
緒言	11
第1章 HF食摂取マウスでの肝脂質蓄積における 12OH BA の関与	27
第1節 背景および目的	28
第2節 実験材料および方法	29
2.1 動物実験	29
2.2 血漿トランスアミナーゼ活性解析	29
2.3 脂質解析	29
2.4 酸化 Chol 組成解析	30
2.5 遺伝子発現解析	30
2.6 BA 組成解析	30
2.7 メタボロミクス	31
2.8 統計解析	32
第3節 結果	33
3.1 摂食量・重量・血漿トランスアミナーゼ活性	33
3.2 Chol代謝変動	33
3.3 BA 組成変動	33
3.4 BA 組成と肝 TG 及び TC 蓄積量の相関解析	34
3.5 肝臓のメタボロミクス解析	34

3.6	食餌効率	35
第4節	考察	49
第2章	Chol及びCA添加食摂取マウスにおける肝脂質蓄積とステロール代謝変動の関係	53
第1節	背景および目的	54
第2節	実験材料および方法	56
2.1	動物実験	56
2.2	脂質解析	56
2.3	BA組成解析	56
2.4	酸化Chol組成解析	57
2.5	遺伝子発現解析	57
2.6	血漿トランスアミナーゼ解析	57
2.7	血漿LCN2測定	57
2.8	脂肪酸組成解析	57
2.9	メタボロミクス	58
2.10	統計解析	59
第3節	結果	60
3.1	摂食量・重量・脂質代謝	60
3.2	BA組成変動	61
3.3	酸化Chol変動	61
3.4	脂質代謝に関わる遺伝子発現変動	61
3.5	血中トランスアミナーゼ活性・炎症性サイトカイン発現	62
3.6	グルタチオン代謝及びステロール代謝の関連解析	62
3.7	脂肪酸解析	62

3.8 LCN2 関連のパラメータ評価	63
第4節 考察	82
総括	85
引用文献	94
参考論文	110
その他の論文	111
国内学会	112
国際学会	113
謝辞	114

## 略語一覽

12OH	12-Hydroxylated
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin
ABCG5	ATP binding cassette subfamily G member 5
ABCG8	ATP binding cassette subfamily G member 8
ACC1	Acetyl-CoA carboxylase 1
ALT	Alanine aminotransferase
ANOVA	Analysis of variance
ApoA-I	Apolipoprotein A-I
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter
AST	Aspartate aminotransferase
B6	C57BL/6J
BA	Bile acid
BBOX1	$\gamma$ -Butyrobetaine hydroxylase 1
BMI	Body mass index
BMP6	Bone morphogenetic protein 6
BSEP	Bile acid export pump
BW	Body weight
c-Jun	Proto-oncogene c-Jun
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CAR	Constitutive androstane receptor
CCL2	CC motif chemokine ligand 2
Chol	Cholesterol
CPT1 $\alpha$	Carnitine palmitoyl transferase 1 $\alpha$
CPT2	Carnitine palmitoyl transferase 2
CYP27A1	Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1
CYP2C70	Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 70
CYP3A11	Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 11
CYP7A1	Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1
CYP8B1	Cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1
DMT1	Divalent metal transporter 1
DNL	De novo lipogenesis
DPEP1	Dipeptidase1
ER	Endoplasmic reticulum
eWAT	Epididymal white adipose tissue
FASN	Fatty acid synthase
FC	Free cholesterol

FFA	Free fatty acid
FGF15	Fibroblast growth factor 15
FGF19	Fibroblast growth factor 19
FGFR4	FGF receptor 4
FOXO1	Forkhead box O1
FPN1	Ferroportin 1
FTH1	Ferritin heavy chain 1
FXR	Farnesoid X receptor
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCLC	Glutathione-cysteine ligase catalytic subunit
GCLM	Glutathione-cysteine ligase modifier subunit
GGT1	$\gamma$ -Glutamyl transferase 1
GPBAR1	G protein-coupled bile acid receptor 1
GPCR	G protein coupled receptor
GPX1	Glutathione peroxidase 1
GPX2	Glutathione peroxidase 2
GR	Glucocorticoid receptor
GR1	Glutathione synthase 1
GSH	Reduced glutathione
GSS	Glutathione synthase
GSSG	Oxidized glutathione
GSTA1	Glutathione S-transferase $\alpha$ 1
GSTM1	Glutathione S-transferase $\mu$ 1
GSTP1	Glutathione S-transferase $\pi$ 1
GSTT1	Glutathione S-transferase $\theta$ 1
HAMP	Hepcidin antimicrobial peptide
HC	High cholesterol
HDL	High density lipoprotein
HF	High fat
HFHC	High fat high cholesterol
HFE2	Hemojuvelin
HMGCR	3-Hydroxyl-3-methylglutaryl-CoA reductase
HMOX1	Heme oxygenase 1
HNF4 $\alpha$	Hepatocyte nuclear factor 4
HP	Haptoglobin
HPX	Hemopexin
IL1 $\beta$	Interleukin 1 $\beta$
IL6	Interleukin 6

INSIG	Insulin-induced gene 1 protein
LCN2	Lipocalin-2
LCN2R	Lipocalin-2 receptor
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	LDL receptor
LRH1	Liver receptor homolog-1
LXR	Liver X receptor
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MASH	Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis
MASL	Metabolic dysfunction-associated steatotic liver
MASLD	Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease
MDR2	Multidrug resistance-associated protein 2
MMP9	Matrix metalloproteinase-9
MRP1	Multidrug resistance protein 1
MRP2	Multidrug resistance protein 2
mTORC1	Mechanistic target of rapamycin complex 1
n12OH	Non-12 hydroxylated
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like intracellular cholesterol transporter 1
NTCP	Sodium taurocholate cotransporting polypeptide
OATP	Organic anion transporter
OST $\alpha$	Organic solute transporter $\alpha$
OST $\beta$	Organic solute transporter $\beta$
PCSK9	Proprotein convertase subtilisin kexin 9
PGC1- $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ coactivator 1
PPAR $\alpha$	Peroxisome proliferator-activated receptor $\alpha$
PXR	Pregnane X receptor
qRT-PCR	Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction
ROS	Reactive oxygen species
RXR	Retinoid X receptor
SCAP	Sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein
SDGs	Sustainable development goals
SHP	Small heterodimer partner
SIC	Small intestinal contents
SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1

SREBF2	Sterol regulatory element binding transcription factor 2
STAR	Steroidogenic acute regulatory protein
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TC	Total cholesterol
TFR1	Transferrin receptor 1
TFR2	Transferrin receptor 2
TG	Triacylglycerol
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
UHPLC-MS	Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry
VLDL	Very low density lipoprotein
ZIP14	ZRT/IRT-like protein 14



## 図リスト

**Figure 0-1.** History of terminology related to MASLD

**Figure 1-1.** Distribution of cholesterol-related molecules in mice fed control or HF diet

**Figure 1-2.** BA compositions in the liver, small intestine contents, and feces of mice fed control and HF diet

**Figure 1-3.** Correlation between the ratio of 12OH BAs/n12OH BAs and hepatic TG concentration

**Figure 1-4.** Correlation between the ratio of 12OH BAs/n12OH BAs and hepatic total cholesterol concentration

**Figure 1-5.** Composition of various metabolites in the liver of the mice fed control and HF diet

**Figure 1-6.** Composition of various metabolites in liver of the mice fed control and HF diet

**Figure 1-7.** Difference in feed efficiency between mice and rats

**Figure 1-8.** Graphical abstract in Chapter 1

**Figure 2-1.** Lipid parameters in liver, feces, and portal plasma

**Figure 2-2.** BA composition in liver, bile, SIC, and feces

**Figure 2-3.** Concentration of total and the proportions of 12OH and n12OH BAs in the liver, bile, SIC, and feces

**Figure 2-4.** BA compositions in aortic plasma and portal plasma

**Figure 2-5.** Hepatic oxysterol compositions

**Figure 2-6.** Hepatic gene expressions

**Figure 2-7.** Plasma transaminase activities and hepatic inflammation-related gene expression

**Figure 2-8.** Relationships between glutathione metabolism and oxysterol metabolism in the liver

**Figure 2-9.** Alterations of amino acid abundance in the liver

**Figure 2-10.** Alterations of fatty acid compositions in the liver

**Figure 2-11.** Hepatic gene expression related with iron metabolism and LCN2 transcription

**Figure 2-S1.** Lipid parameters and hepatic mRNA expression in mice fed a higher level of cholesterol supplementation to the diet

**Figure 2-S2.** Graphical abstract in Chapter 2

## 表リスト

**Table 1-1.** Diet composition

**Table 1-2.** Measured oxysterols in this study

**Table 1-3.** Primer list for qRT-PCR

**Table 1-4.** BAs analyzed in this study

**Table 1-5.** Food intake, weights, and plasma transaminase activities.

**Table 2-1.** Diet composition

**Table 2-2.** Primer list for qRT-PCR

**Table 2-3.** Measured fatty acids in this study

**Table 2-4.** Food intake and growth parameters

**Table 3-1.** Metabolic differences and similarities between mice and rats

## 緒言

## Sustainable development goals (SDGs)

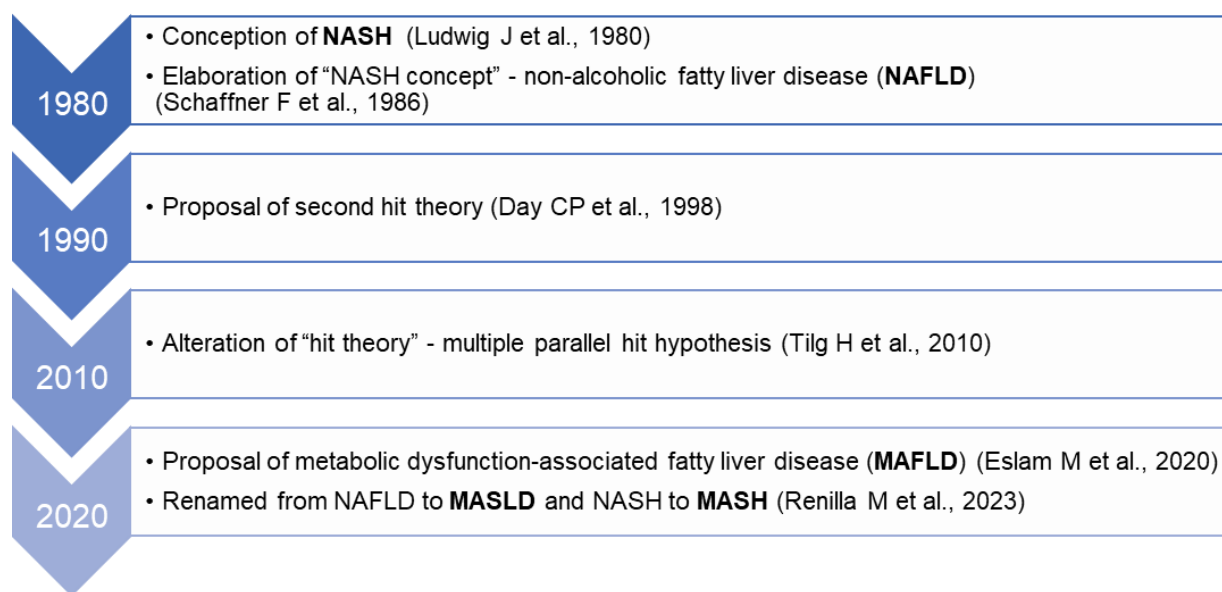
地球温暖化や貧富の差、資源不足等の様々な社会課題への解決に向けて、2015年の国連会議においてSDGsが採択された (UN General Assembly, 2015)。その中で、「すべての人に健康と福祉を」が掲げられ、この目標の達成を目指して「2030年までに、予防または治療によって非感染性疾患による死亡率を1/3に減少させること」が定められた。疾患予防には、発症初期段階で疾患を発見することが必要であると考えられる。疾患の初期症状は「自覚症状はないが検査では異常がある状態」と「自覚症状はあるが検査では異常がない状態」の二つの状態が存在し、これらは共に未病状態と見なされている (福生吉祐, 2018)。自覚症状のある未病状態は、問診で発覚することが多い。しかし、これは主観的かつ非定量的な診断手法であるため、精度の高い診断は難しい。一方、自覚症状のない未病状態は検査を行わない限り発見が困難である。より正確な診断を行うためには、疾患初期に変動する定量的な診断マーカーの確立が不可欠である。近年、分析装置及び技術の向上により様々な網羅的分析手法が確立されつつある。特に生命活動状態を反映する代謝物の変動は、体内の代謝動態を説明する指標になり得る。したがって、疾患発症に関与する代謝物を同定し診断マーカーとして利用することは、効率的な疾患予防に寄与できる。未病状態における生体内の代謝動態を捉えることで、疾患予防のための診断マーカーとなり得る代謝物を見出せる可能性がある。

## Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD)

非感染性疾患は WHO によって定義された疾患分類で、がんや糖尿病、循環器疾患等の慢性疾患の総称である。この非感染性疾患に含まれる MASLD に世界人口の約 30%が罹患している (Younossi ZM et al., 2023)。その有病率は 25.3% (1990~2006 年) から 30.1% (2016 年~2019 年) と年々増加しているため、この疾患の治療または予防法の確立が急務とされる (Younossi ZM et al., 2023)。ウイルス感染及び過剰な飲酒歴がないにも関わらず生じるアルコール性肝炎様の症状を呈する疾患に対して non-alcoholic steatohepatitis (NASH) という概念が Ludwig により提唱された (Figure 0-1) (Ludwig J et al., 1980)。その後の変遷を経て現在では、その発症機構を反映しつつ患者への偏見を生まない MASLD という表現が使われるに至っている (Rinella M et al., 2023)。MASLD は、単純性脂肪肝 (metabolic dysfunction-associated steatotic liver; MASL)、肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis; MASH)、および肝硬変・肝がんへと進行する一連の疾患を包括的に示す名称である (Rinella ME et al., 2023)。この疾患の発症は、生活習慣の乱れ等による代謝異常以外に、エピジェネティクスや遺伝的要素に影響を受けると考えられている (Buzzetti E et al., 2016)。これまで、肝疾患の進行機序として、肝脂質蓄積の増大を first hit、これに続く炎症や線維化である second hit が生じることで段階的に進行すると考えられてきた (Two-hit theory) (Day CP et al., 1998)。しかし、疾患の進行は必ずしもこの順番通りに進行するものではないことが明らかとなり、近年においては様々なイベントが並行して発症に関与する multiple parallel hits hypothesis が広く支持されるようになった (Tilg H et al., 2010; Buzzetti E et al., 2016)。今日までに肝疾患に関する多様な研究が行われてきたが、未だに MASLD のみを対象とした医薬品の確立には至っていない。現在の MASLD に対する治療法としては、進行を抑えるためにインスリン抵抗性改善薬や肝庇護剤、抗酸化剤や生活習慣指導が用いられる (Rinella ME et al., 2023)。肝臓における慢性炎症や慢性肝脂質蓄積は肝臓の線維化につながるため、NASH は肝硬変や肝がんに進展する恐れがある (Younossi ZM et al., 2016)。線維化肝組織やがん化肝細胞では肝機能異常が生じ、その回復は困難である。一方、MASL の場合には、発症後でも肝脂質蓄積を改善することで肝臓の機能を正常に回復させることができる (Romero-Gómez M et al., 2017)。これらの疾患が今後も増加する可能性を考慮すると、MASLD の早期発見・治療が非感染性疾患による死亡率の減少に寄与するものと期待される。

MASLD の未病状態である MASL を診断するためには、肝脂質蓄積に先んじて変化するパラメータ

を見出す必要がある。しかし、現時点では MASL を診断する定義は設定されていないため、MASL が発症した際の特徴的な代謝動態を捉える必要がある。MASL の診断項目の一つになり得るものとして、腹部エコー検査を用いた肝脂質蓄積検査が考えられる。ただし、この手法では軽度の肝脂質蓄積 (肝細胞全体の 30% 以下の脂肪蓄積) を検出できず、MASL を診断することは困難であると考えられる (日本肝臓学会、2021)。さらに、この検査手法は画像を基に診断技師または医師の主観的な判断に依存するため定量的ではない。これらの問題点があるため、腹部エコー検査は血中トランスアミナーゼ活性等の他の診断パラメータと併用して診断に使用される (日本肝臓学会、2021)。そのため、MASL を定義するためにはいくつかの指標が必要であると考えられる。したがって、未病としての MASLD の診断基準を設定するためには、MASL において特徴的な代謝を明らかにし、MASLD 発症初期の代謝動態を理解することが重要であると考えられる。



**Figure 0-1.** History of terminology related to MASLD

## Bile acid (BA)

MASLD 患者の約 9 割は肥満患者であり、脂質代謝異常や肝脂質蓄積はその発症に重要な因子であると推察される (Younossi ZM et al., 2016; Loomba R et al., 2021)。したがって、MASLD 発症機構の理解には脂質代謝機構の解明が不可欠であると考えられる。食事脂質は小腸に到達すると胆汁液と混合され、これに含まれる BA が複合ミセルを形成しリパーゼによる分解を経て体内へと吸収される (Iqbal J et al., 2009)。BA は食事脂質の消化や吸収に関与する一方、肝臓や小腸における脂質代謝やコレステロール (Chol) 代謝にも関与することが明らかにされた (Fiorucci S et al., 2021)。BA は肝臓で Chol を基に合成され、グリシンまたはタウリンで抱合された形で小腸管腔内に分泌される。小腸に分泌された後には腸内細菌により脱抱合化及び脱水酸化等の代謝を受けるため、BA には多数の分子種が存在する (Ridlon JM et al., 2006)。これらの BA 分子種はそれぞれ、核内受容体や G タンパク質共役受容体 (GPCR) に対するリガンドとしても機能する (Fiorucci S et al., 2021)。これらの受容体へのアゴニスト/アンタゴニストとしての役割が BA 分子種により異なることから、詳細な BA 代謝動態の把握は肝脂質代謝の理解に繋がると考えられる。そこで当研究室では、BA 組成変動が食事誘導性肝脂質蓄積の誘導に関わる可能性を考慮した研究が行われてきた (Hori S et al., 2020; Lee JY et al., 2020)。

主な BA 生合成経路は「classical pathway」と「alternative pathway」である。Classical pathway では cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1 (CYP7A1) によって Chol が水酸化されることに始まり、classical pathway によって合成された BA は生合成 BA 量の大半を占める (Lefebvre P et al., 2009)。一方、alternative pathway と呼ばれる経路では cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1 (CYP27A1) によって開始され、これは健康なヒトにおける総 BA 合成の 3~18% に当たると報告されている (Sonne DP et al., 2016; Haeusler RA et al., 2013)。BA 生合成の第一段階を担う CYP7A1 は BA 生合成の律速酵素と考えられている。CYP7A1 によって産生された 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol (7 $\alpha$ -OH) は、更に cytochrome P450 family 8 subfamily B member 1 (CYP8B1) や CYP27A1 等によって水酸化を受け、最終的にタウロコール酸 (TCA) 及びタウロケノデオキシコール酸 (TCDC) 等へと合成される (Russell DW, 2003)。この二つはヒトの肝臓で作られる主要な BA である (Lefebvre P et al., 2009)。これに対しマウスやラットでは、CDCA やウルソデオキシコール (UDCA) からミュリコール酸 (MCA) を合成する酵素 cytochrome P450 family 2 subfamily C member 70 (CYP2C70) を有するため、コール酸 (CA) および MCA が肝臓で合成される (de

Aguiar Vallim TQ, et al., 2013)。ヒトは CYP2C70 持たないため、内因性の MCA は合成されないことになる。これらのように肝臓で合成された BA を一次 BA と呼ぶ。一次 BA は通常タウリンやグリシンの抱合体として存在し、非抱合型 BA と比較して親水性であるため (Hanafi NI et al., 2018)、胆汁を介した排泄が可能となる。一次 BA は肝細胞から、BA エクスポンターである、bile acid export pump (BSEP) や multidrug resistance protein 2 (MRP2) を介して毛細胆管へと分泌される (Sepe V et al., 2016)。BA は胆のうでプールされた後、摂食に応じて胆のうから排出され、総胆管内で膵液と混ざり胆膵液として十二指腸に分泌される (Lefebvre P et al., 2009)。BA は両親媒性物質であるため、胃排出物と胆膵液が混ざると BA は脂質とミセルを形成し、小腸での脂質消化・吸収に対して補助的に働く (Iqbal J et al., 2009)。分泌された BA は概ね小腸上皮細胞に吸収される (Chávez-Talavera O et al., 2017)。抱合型 BA は親水性分子であるため、回腸上皮細胞の管腔側の細胞膜に発現している apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) により能動輸送で取り込まれる (Zhang Y et al., 2006)。BA の一部は腸内細菌によって二次 BA に変換される (Guzior DV et al., 2021)。ヒトにおいて豊富に存在する TCA は、脱抱合化及び脱水酸化を受けてデオキシコール酸 (DCA) に、TCDCA はリトコール酸 (LCA) へとそれぞれ変換される (Guzior DV et al., 2021)。親水性の BA 分子は細胞膜に浸潤することが出来なくなるため、細胞毒性が比較的弱いと考えられる。脱抱合型 BA は ASBT への親和性が低くなるため、再吸収されにくい (Schiff ER et al., 1972)。その一方で脱水酸化された二次 BA は疎水性が増すため、トランスポーターを介さず細胞内に侵入する可能性がある。消化管上皮細胞に再吸収された BA は、上皮細胞の基底膜側細胞膜に局在する heterodimeric transporter (OST $\alpha$ /OST $\beta$ ) によって毛細血管に流れ込み (Dawson PA et al., 2010)、門脈血を介して肝臓へと到達した BA は sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) および organic anion transporter (OATP) によって肝細胞へと取り込まれ、再利用される (Slijepcevic D et al., 2017)。このように消化管内と肝臓内を循環するシステムを BA の腸肝循環と呼び、肝臓に再吸収されなかった一部の BA が肝静脈を経て体内を巡る経路を体循環と呼ぶ。消化管上皮細胞に吸収されなかった BA は糞中へと排泄される。

この BA の生合成・利用・輸送・排泄機構は、腸肝内の BA 濃度によるフィードバック制御を受けることでその恒常性が維持されている。主要な BA 恒常性制御因子は farnesoid X receptor (FXR) である (Wang H et al., 1999)。FXR は肝臓、腸、腎臓、副腎、白色脂肪組織、免疫細胞などのいくつかの臓器で



発現するタンパク質である (Lefebvre P et al., 2009)。FXR は BA と結合し活性化されるが、そのリガンド活性は BA 分子種により異なる。疎水 BA は単純拡散によって核内受容体まで到達できる一方で、親水性の強い BA はトランスポーターを介する能動輸送により細胞内へ入らなければ核内受容体に作用することが出来ないため、一般的に核内受容体に対する活性化能力は疎水性 BA の方が強いと考えられる。したがって、FXR に対するアゴニスト活性は CDCA > DCA > CA > LCA の順である (Makishima M et al., 1999)。一方で、 $\alpha$ MCA および  $\beta$ MCA は FXR にアンタゴニストとして作用する (Sayin SI et al., 2013)。FXR はリガンドと結合すると retinoid X receptor (RXR) と結合し、プロモーター領域に結合して標的遺伝子の転写活性化を行う (Krężel W et al., 2019)。FXR の標的遺伝子の一つは small heterodimer partner (SHP) である (Goodwin B et al., 2000)。同報告において、SHP は liver receptor homolog1 (LRH-1) や hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) と結合することで、これらの転写因子のプロモーター領域への結合を阻害することが明らかになっている。この LRH-1 および HNF4 $\alpha$  は CYP7A1 や CYP8B1 の発現を正に制御するため、FXR の活性化は BA 生合成を抑制する (Goodwin B et al., 2000; Zhang M et al., 2001)。FXR は腸上皮細胞にも発現しており、腸管腔から BA が多量に吸収され FXR が活性化されると、fibroblast growth factor 15, Fibroblast growth factor 19 (FGF15/19) の発現が増加する (Inagaki T et al., 2005)。FGF15/19 は腸上皮から門脈血中に分泌されると、肝細胞の類洞側細胞膜上に発現する FGF receptor (FGFR4) / $\beta$ -Klotho 複合体によって肝細胞に取り込まれる (Ito S et al., 2005)。FGF15/19 は Proto-Oncogene C-Jun (c-Jun) のリン酸化や mitogen activated protein kinase (MAPK) の活性化を抑制することで、CYP7A1 および CYP8B1 の発現を抑制する (Kliwer SA et al., 2015)。肝細胞内において FXR の活性化は BA エクスポートの BSEP や ATP binding cassette subfamily B member 1 (ABCB1) (Ananthanarayanan M et al., 2001; Schuetz EG et al., 2001)、ピリルビンやグルタチオン、硫酸抱合された BA のエクスポートの MDR-related protein 2 (MDR2) (Kast HR et al., 2002) および、ATP binding cassette subfamily C member 2 (ABCC2) の発現を正に制御することで、FXR は BA 輸送を制御する (Donkers JM et al., 2019)。また、FXR の活性化は BA のインポーターである NTCP や OATP の発現を減少させる (Denson LA et al., 2001; Jung D et al., 2003)。これらのことは、肝臓内における FXR の活性化が肝臓内 BA の排泄促進に繋がることを意味する。また、消化管上皮細胞における FXR の活性化は、BA インポーターである ASBT の発現を阻害することで BA 吸収を減弱させ、BA の排泄を促して腸肝循環を抑える (Chen F et al., 2002)。このように、体内 BA 濃度を FXR がモニター

しつつ BA の量的恒常性維持に寄与する機構がある。

肝臓における FXR の機能は BA 代謝にとどまらず、脂質代謝やグルコース代謝にも関与する (Chávez-Talavera O et al., 2017)。FXR は高脂肪 (high fat; HF) 食摂取条件において、SHP を介して sterol regulatory element binding transcription factor 1c (SREBP1c) の発現を負に制御する (Watanabe M et al., 2004)。SREBP1c は脂肪酸合成 (*de novo* lipogenesis; DNL) 関連の酵素発現を正に制御するため、FXR の活性化は fatty acid synthase (FASN)、acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC)、stearoyl-CoA desaturase (SCD) 等の遺伝子発現を抑制する (Watanabe M et al., 2004)。更に、FXR の活性化は  $\beta$  酸化を促進する peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) の発現を正に制御する (Pineda Torra I et al., 2003)。肝細胞における FXR の活性化は、新規脂肪酸合成の抑制と、遊離脂肪酸の消費を促進するため、肝脂質の減少に繋がると考えられる。FXR は肝臓ステロール代謝にも関与する可能性も報告されている。FXR 欠損マウスの肝臓において、Chol エクスポートの ATP binding cassette subfamily G member 5 及び 8 (ABCG5/8) 発現が減少することが報告されている (Repa JJ et al., 2002)。また、マウスにおける FXR のアゴニスト処理は、Chol 生合成酵素である 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) の発現量を減少させる (Niesor EJ et al., 2001; Ong TP et al., 2005)。更に、FXR の活性化は proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) の発現を減少させることが報告されており、low density lipoprotein receptor (LDLR) による低密度リポタンパク質 (LDL) の取り込み促進に繋がる (McNutt MC et al., 2007; Zhang DW et al., 2007)。FXR 欠損マウスにおいて高カロリー摂取条件で高血糖及びインスリン抵抗性を発症することから、FXR はグルコース代謝にも関与する可能性がある (Cariou B et al., 2006; Zhang Y et al., 2006)。この現象は肝臓特異的 FXR 欠損マウスでは認められず、全身 FXR 欠損マウスでのみ認められたため、グルコース代謝調節には肝臓以外の部位での FXR が寄与すると予想されている (Zhang Y et al., 2006)。特に消化管上皮細胞における FXR は、FGF15/19- peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ) 経路の阻害により糖新生遺伝子の発現を抑制する (Potthoff MJ et al., 2011)。また、消化管上皮の L 細胞における FXR の活性化が G protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1) を介して GLP-1 分泌を促進させ、これが膵臓に作用することでインスリン分泌を促進する (Pathak P et al., 2017)。しかし、FXR と GPBAR1 の活性化がインスリン分泌に対して及ぼす効果については、相反する報告も存在する (Pathak P et al., 2017; Trabelsi MS et al., 2015)。

BA をリガンドとする FXR 以外の受容体として、GPBAR1 (Kawamata Y et al., 2003)、ビタミン D 受容体 (Makishima M et al., 2002)、pregnant X receptor (PXR) (Staudinger JL et al., 2001)、スフィンゴシン-1-リン酸受容体 2 (Nagahashi M et al., 2016)、ムスカリン受容体 (Sheikh Abdul Kadir SH et al., 2010) 等が報告されている。GPBAR1 は小腸の L 細胞、褐色および白色脂肪組織、胆のう等で発現するタンパク質である (Reimann F et al., 2008; Thomas C et al., 2009)。肝臓における活性型肝星細胞、類洞内皮細胞、及びクッパー細胞等の非実質細胞で発現し、肝実質細胞では発現しないとする報告が多い (Keitel V et al., 2008a; Keitel V et al., 2007; Keitel V et al., 2008b)。GPBAR1 は二次 BA との結合能力が高いことが知られており、アゴニストとしての能力は LCA>DCA>CDCA>CA の順である (Fiorucci S et al., 2021)。GPBAR1 は活性化されると、アデニル酸シクラーゼを活性化することにより cyclic adenosine monophosphate (cAMP) を産生し、細胞内シグナル伝達を行う (Kawamata Y et al., 2003)。GPBAR1 はエネルギー消費、グルコース恒常性、免疫系に関与することが報告されている (Ridlon JM et al., 2006)。ビタミン D 受容体および PXR は、LCA をアゴニストとする核内受容体であり、活性化すると FXR と同様に RXR とヘテロダイマーを形成し、FGF15/19 を含む標的遺伝子の転写活性を示す (Wistuba W et al., 2007)。また、スフィンゴシン-1-リン酸受容体 2 は肝細胞膜上に発現し、GCA や TCA などの抱合型 BA により活性化される受容体であり、この活性化は、スフィンゴシンキナーゼ 2 を細胞膜へ移行させてスフィンゴシンをスフィンゴシン-1-リン酸に変換する (Studer E et al., 2012)。スフィンゴシン-1-リン酸はヒストン脱アセチル化酵素の活性を抑制することで FXR や SHP、CYP7A1、ApoB-100 等の遺伝子の発現を抑制する (Kwong EK et al., 2019)。以上のように BA は、グルコース代謝や脂質代謝、Chol 代謝にも関与することが示されている。しかし、各受容体が制御する機構は先述した代謝機構だけにとどまらず、免疫細胞や神経細胞、骨格筋組織においても免疫や熱産生等に関与することも報告されている (Fiorucci S et al. 2021)。

BA は脂質・糖・エネルギー代謝の制御因子となるため (Chávez-Talavera O et al., 2017)、BA 代謝異常は様々な疾患の発症に関与する可能性がある。実際に、BA 関連疾患として、胆汁うっ滞関連肝疾患、アルコール性肝疾患、2 型糖尿病、肥満、MASLD、がんなどが報告されている (Chiang JYL et al., 2018)。メタボリックシンドロームは BA 代謝異常との関連が報告されている (McGlone ER et al., 2019)。摂取脂質や Chol の増加は、脂質吸収や過剰 Chol 排泄のために BA 合成および分泌が促進されることで、BA 組成が変動する (Hori S et al., 2020; Nakade Y et al., 2021)。多くの研究は、インスリン抵抗性が高

いII型糖尿病患者において肝臓 CA 濃度が高いことや空腹時総循環 BA 値が高くなる傾向があることを報告している (Haeusler RA et al., 2013; Cariou B et al., 2011)。また、2型糖尿病ではないにも関わらずインスリン抵抗性が高い患者において血漿中 12 水酸化 (12OH) BA/非 12OH (n12OH) BA 比が増加することも報告されている (Haeusler RA et al., 2008)。更に、血漿中総 BA 濃度は肥満患者で増加し body mass index (BMI) と相関する (Lefebvre P et al., 2009)。NASH 患者においては肝臓 BA だけでなく、血漿 BA も増加することが報告されている (Ferslew BC et al., 2015)。NASH 患者における過剰 BA への暴露は細胞損傷の原因となり、NASH 進行の原因にもなる可能性が示唆されている (Lefebvre P et al., 2009)。これらの報告は、体内での BA 量や組成の変動が疾患発症に寄与する可能性を示すものの、解析時間や摂食条件やコホートサイズなどの検証方法は必ずしも統一されていない。このように、BA が MASLD の診断マーカーになり得る可能性が示されつつあるものの、疾患発症における BA 代謝変動の役割についての全容は解明されていない。

## Chol

Chol は主に細胞膜構成要素として細胞膜に局在し、そこで隣接する脂質と相互作用して、細胞膜の剛性や流動性、透過性を調節する (Luo J et al., 2020)。細胞の総 Chol の大部分は、スフィンゴ脂質やグリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型タンパク質として細胞膜上に存在することが多い (Liscum L et al., 1999)。Chol は細胞内にも遊離 Chol として存在するが、その一部は酵素によって BA やステロイドホルモン等へと異化され生理活性物質として利用される (Luo J et al., 2020)。体内 Chol レベルは生合成、取り込み、輸送、貯蔵における相互作用によって決定されると考えられる。Chol 生合成にはアセチル CoA を基質として ATP や酸素、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) および nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) を多量に必要とし、エネルギー的に高価な同化反応であると考えられている (Luo J et al., 2020)。食事 Chol は、小腸上皮の頂端表面にある Niemann-pick C1-like intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1L1) によって吸収される (Altmann SW et al., 2004)。吸収された Chol の大部分は長鎖脂肪酸と結合して Chol エステルとなり、キロミクロンに取り込まれて血流を介して全身の組織へと運ばれる (Iqbal J et al., 2009)。そして、脂質を各組織へと受け渡すとキロミクロンはキロミクロンレムナントとなりやがて肝臓へと取り込まれる (Iqbal J et al., 2009)。また、肝臓に取り込まれた Chol は、リポタンパクや脂質と共に超低密度リポタンパク質 (VLDL) として分泌され、末梢組織へと分配される (Goldstein JL et al., 2009)。末梢組織における余剰 Chol はアポリポタンパク質 AI (ApoA-I) に導入され、高密度リポタンパク質 (HDL) となり血流を介して肝臓へと輸送される (Phillips MC, 2014)。肝臓における過剰な Chol は、acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT) によってエステル化され、Chol エステルとしてサイドゾル脂肪滴に貯蔵されるか胆汁中へ分泌される (Chang TY et al., 2009)。または、先述したリポタンパク質として体循環へと放出されるか、BA に合成されて体外へと排泄される。これらの恒常性維持は主に遺伝子の転写および翻訳後修飾によって行われる (Luo J et al., 2020)。

Chol 生合成に関わる酵素の殆どは、Sterol regulate element binding protein-2 (SREBP2)/ sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein (SCAP) / insulin-induced gene 1 protein (INSIG) により転写が制御される (Luo J et al., 2020)。SREBP2 は小胞体 (ER) 膜状で SCAP および INSIG と結合して三量体として局在する (Gong X et al., 2016; Yang T et al., 2002)。SREBP2、SCAP、INSIG はそれぞれ細胞内 Chol 結合領域を有し、細胞内 Chol 濃度が高い時には、これらのタンパク質に Chol や酸化 Chol が結合すること

で、SREBP2の転写活性は抑制される (Luo J et al., 2020)。低 Chol 時には、三量体から SREBP2/SCAP が ER から放出されてゴルジ体へ輸送される (Horton JD et al., 2003)。ここで SREBP2 はプロセッシングされ、成熟型 SREBP2 となることで転写活性化能を持ち、核内へ移行しプロモーター領域にある SRE 領域へ結合し標的遺伝子の転写を活性化する (Brown MS et al., 2018; Gong Y et al., 2006)。SREBP2 は HMGCR や squalene synthase を含む Chol 生合成酵素の多くを転写活性化することで、Chol 生合成を促進する (Wong LH et al., 2019; Liscum L et al., 1999)。したがって、SREBP2、SCAP、INSIG の発現量やタンパク質分解系からの保護、ER 膜での保持されやすさ、ゴルジ体への輸送、プロセッシング、核内への輸送、SRE への SREBP2 のリクルートなどを制御する因子は Chol 生合成を制御することが出来る (Luo J et al., 2020)。

細胞内外への Chol の輸送はリポタンパク質を介して行われる (Kwiterovich PO Jr., 2000)。LDL は細胞膜上に存在する LDLR に受容されると、エンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれる (Goldstein JL et al., 2009)。LDLR も SREBP2 の標的遺伝子であるため、細胞内 Chol 濃度が低下する際に発現が促進される (Lopez D et al., 2007)。逆に、細胞内 Chol が高い時、LDLR の発現は抑制されると同時に、LDLR 分解を担う myosin regulatory light chain interacting protein (IDOL) の発現が増加することで更に Chol の取り込みを抑制する (Zelcer N et al., 2009)。IDOL の発現量は liver X receptor (LXR) による活性化、または ubiquitin specific peptidase 2 (USP2) との相互作用による LDLR 分解抑制によって制御される (Zelcer N et al., 2009; Nelson JK et al., 2016)。一方、細胞からの Chol 排泄は ABC トランスポーターファミリーである、ABCA1、ABCG1、ABCG5、ABCG8 によって行われる (Luo J et al., 2020)。マクロファージでは ABCA1 および ABCG1 が、消化管上皮細胞では ABCA1、ABCG5 および ABCG8 が、肝細胞では ABCG5 および ABCG8 が主に発現している (Gelissen IC et al., 2006; Kennedy MA et al., 2005; Graf GA et al., 2003)。ABCA1 や ABCG1 は血中の ApoA-I への Chol 輸送を仲介することで、HDL 産生を仲介する (Gelissen IC et al., 2006)。ABCG5 および ABCG8 はヘテロ二量体を形成して肝細胞または腸上皮細胞膜状に存在し、胆管または腸管腔へ Chol を排泄する (Graf GA et al., 2003)。特に胆管に流出する Chol は BA ミセルに取り込まれ、最終的に消化管内へと排泄される (Vrins C et al., 2007)。しかし、ABCG5 および ABCG8 を介した Chol 流出の正確なメカニズムの解明はなされていない。ABCG5 および ABCG8 は共通プロモーターを有し (Lu K et al., 2001; Berge KE et al., 2000)、この領域には LXR (Berge KE et al., 2000)、LRH1 (Freeman LA et al., 2004)、HNF4 $\alpha$  (Sumi K et al., 2007)、GATA binding protein (Remaley AT et al., 2002;

Sumi K et al., 2007)、forkhead box O1 (FOXO1) (Biddinger SB et al., 2008)、nuclear factor-kappa-B (NF- $\kappa$ B) (Kikuchi T et al., 2016) の結合領域が存在する。特に LXR はこのプロモーター領域に結合し、ABCG5 および ABCG8 の発現を正に制御する因子である (Berge KE et al., 2000; Repa JJ et al., 2002; Yu L et al., 2003)。

Chol のエステル化は acetyl-CoA acetyltransferase 1 (ACAT1) または ACAT2 によって触媒される (Rogers MA et al., 2015)。肝臓において ACAT1 または ACAT2 によって産生された Chol エステルは、脂肪滴へ Chol を貯蔵する形態であるとともに、ABCG5 および ABCG8 によって認識されやすくなることから、細胞内から容易に排泄することが出来ると考えられている (Nguyen TM et al., 2012)。ヒト ACAT1 は LXR や SREBP-2 が結合するプロモーター領域を有さない一方で、ACAT2 は LXR によって負の制御を受けることが報告されている (Li BL et al., 1999)。したがって LXR は Chol のエステル化を介して細胞外への Chol 排泄や脂肪滴への取り込みを促進させることが出来る。

## 酸化 Chol

Chol の異化経路において産生される酸化 Chol は Chol と同様に Chol 恒常性維持に関与することが知られている (Samadi A et al., 2021)。酸化 Chol は、先述した LXR や SREBP-2/SCAP/INSIG と結合することに加え、核内受容体 (Lehmann JM et al., 1997; Umetani M et al., 2007; Soroosh P et al., 2014; Voisin M et al., 2017) や G タンパク質共役受容体 (Hannedouche S et al., 2011; Liu C et al., 2011; Nachtergaele S et al., 2012) に結合し、その機能制御に関わる。特に酸化 Chol は Chol と構造上の違いからタンパク質への結合能力が異なるため、効果的な Chol 恒常性維持物質として注目されている (Schroepfer GJ Jr, 2000; Javitt NB, 2004)。酸化 Chol は様々な CYP やヒドロキシステロイド脱水素酵素等を介した酸化、または、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) 等による自然酸化によって産生される (Russell DW, 2003; Zerbinati C et al., 2017a; Xu L et al., 2013; Zerbinati C et al., 2017b)。酵素酸化によって産生される主要な酸化 Chol には、24(S)-OH、27-OH、7 $\alpha$ -OH、4 $\beta$ -OH、25-OH、24(S)-OH、25-epoxycholesterol がある。7 $\alpha$ -OH は CYP7A1 により合成される BA 前駆体であり (Björkhem I et al., 2001)、4 $\beta$ -OH はヒトにおいて CYP3A4 と呼ばれる解毒の中心酵素によって合成されるため、他臓器と比較して肝臓での産生量が多いと考えられる (Bodin K et al., 2002; Diczfalusy U et al., 2011)。ROS は Chol 骨格の 7 位の炭素に結合する水素に作用しやすいため、自動酸化型の酸化 Chol では 7 $\beta$ -OH や 7-keto、7 $\alpha$ / $\beta$ -hydroperoxycholesterol が産生されやすい (Brown AJ et al., 1997)。また、6-oxo-cholestan-3 $\beta$ -5 $\alpha$ -diol や triol、 $\beta$ -epoxy、 $\alpha$ -epoxy なども自動酸化により生成される酸化 Chol である (Brown AJ et al., 1999; Lordan S et al., 2009; Zhang HF et al., 1990)。酸化 Chol は発生、糖代謝、炎症、分化におけるシグナル伝達物質として機能することが報告されてきた。Chol 輸送や DNL 関連遺伝子発現を制御する LXR は 24(S)-OH、27-OH、25-OH によって活性化される (Lu R et al., 2009; Holy P et al., 2018; Liu Y et al., 2018)。また、これらの酸化 Chol が INSIG と結合すると、SREBP2/SCAP/INSIG 複合体を安定化させ、は SREBP2 の ER 膜からの放出を阻害し、Chol 生合成を抑制する (Saito H et al., 2023)。LXR や SREBP-2 の活性を制御する酸化 Chol は、脂質代謝及び Chol 代謝を制御することが予想される。実際に 27-OH、7-keto、7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH、 $\beta$ -epoxy は 2 型糖尿病発症との関連が報告されている (Zarrouk A et al., 2014; Kloudova A et al., 2017; Menéndez-Carreño M et al., 2011)。また、糖尿病患者では肝臓内に酸化ストレスが生じており、これは 7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH、7-keto 濃度上昇によって引き



起こされる可能性が示されている (Zarrouk A et al., 2014; Menéndez-Carreño M et al., 2011)。マウスの場合、高脂肪高 Chol (HFHC) 食を与えると、血漿中の  $\alpha$ -epoxy、 $4\beta$ -OH、 $7\alpha$ -OH、 $7\beta$ -OH、 $27$ -OH 濃度が有意に上昇する (Wooten JS et al., 2014)。

## 研究目的と概要

先述したようにマウスやラット、ヒトにおいて種々のステロール代謝異常は MASLD 初期症状に繋がる可能性が明らかになってきた。その一方でステロール代謝は生物種間で異なることも明らかになっており、マウスやラットで得られた知見を単純にヒトに当てはめることはできない。しかし、ステロール代謝が異なるラットとマウスの間で共通する代謝経路が存在するならば、それは生存戦略上重要な代謝経路である可能性が高く、ヒトにおいても共通する経路が存在する可能性があるとも考えられる。そこで本研究では、第 1 章において、C57BL/6J (B6)マウスにおいて HF 食摂取が BA 組成を変動させるかを検証し、12OH BA と肝脂質蓄積量の関係について解析を行った。続いて第 2 章では、B6 マウスにおいて Chol や CA を添加した食事によりステロール代謝負荷させた肝臓で生じる脂質及びステロール代謝変動について検証を行った。これらの検証を基に、マウスにおける肝臓でのステロール代謝と肝脂質蓄積の関係について、特に肝脂質蓄積や関連イベントに及ぼす 12OH BA の影響を評価した。これらの知見を基に、ラットとマウスにおけるステロール代謝の共通性や相違点について考察した。

第 1 章 HF 食摂取マウスでの肝脂質蓄積における  
12OH BA の関与

## 第1節 背景および目的

脂肪肝を予防することは、糖尿病、肝炎、肝細胞癌などの疾患発症リスクを軽減する効果的な対策法として期待されている (Chrysavgis L et al., 2022; Perry RJ et al., 2014; Geisler CE et al., 2017)。しかし、発症初期段階の肝臓で起こる代謝の変化、特に末梢血中の triacylglycerol (TG)と Cholが増加する以前の代謝の変化についての知見はない。当研究室の以前の研究では、HF食がラットの胆汁中のBA、特に12OH BAの分泌を増加させること (Yoshitsugu R et al., 2019)、門脈血中や肝臓での12OH BA濃度が肝TG濃度と相関することが見出されている (Hori S et al., 2020)。一方ヒトにおいても、末梢血清中での12OH BA/n12OH BA比は肝脂質蓄積と相関することが報告された (Haeusler RA et al., 2013)。これらのことは、体内での12OH BA代謝と肝脂質蓄積との間に関係があることを示唆している。様々な疾患の発症機序に関わる特定の遺伝子の関与を明らかにするためにマウスが用いられており、B6マウスを用いたノックアウト技術やトランスジェニック技術が広く普及している (Zhong F et al., 2020)。動物種間でBA代謝の相違が観察されているため (de Aguiar Vallim TQ et al., 2013)、ラットを用いて得られた知見がそのままマウスに当てはまる保証はない。そこで本章では、HF食を与えたB6マウスにおけるBA代謝変動と肝脂質代謝との関連について検証を行った。

## 第2節 実験材料および方法

### 2.1 動物実験

4週齢のB6雄性マウス(日本SLC、日本)16匹を1週間通常食で馴化した。飼育環境は12時間の明暗周期(明期:8:00~20:00)、室温を $22 \pm 2$  °C、湿度を $55 \pm 5\%$ に維持し、自由摂食及び自由給水として飼育した。馴化後、平均体重(BW)が均一になるよう8匹ずつに群分けし、Table1-1に示す通常食またはHF食を与え13週間飼育した。食事中Cholはカゼイン(0.26 mg Chol/g casein)、大豆油(0.01 mg Chol/g soybean oil)、ラード(1 mg Chol/g lard)に由来する(文部科学省、2023)。BWおよび摂食量を2日に一度測定し、これらを基に総摂食量およびChol摂取量を算出した。13週の飼育終了の前日から当日にかけて糞便を回収した。50 mg/kg body weight (BW)のペントバルビタールナトリウム腹腔内投与で麻酔したマウスを開復し、門脈血及び心臓血を採取した後放血屠殺し、肝臓、副睾丸脂肪組織および小腸内容物(SIC)を採取した。血液サンプルにはヘパリンナトリウム(陽進堂、日本)を添加し、 $2000 \times g$ 、4 °Cで15分間遠心分離することで血漿サンプルを得た。BA解析用サンプルは-30 °Cで保存し、それ以外のサンプルは-80 °Cで保存した。すべての動物実験は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定(北海道大学安全衛生本部)及び北海道大学動物実験マニュアル(国立大学法人北海道代諾動物実験委員会)に定められた規定に則り行った。(承認番号:17-0119および19-0161)

### 2.2 血漿トランスアミナーゼ活性解析

血漿トランスアミナーゼとして、アラニンアミノトランスフェラーゼ(alanine aminotransferase ;ALT)およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(aspartate aminotransferase;AST)を測定した。測定にはトランスアミナーゼCIIテストワコー(富士フィルム和光純薬株式会社、日本)を使用し、手順書に従い解析を行った。

### 2.3 脂質解析

肝臓組織100 mgまたは凍結乾燥糞に5 mLのクロロホルム/メタノール(2:1, v/v)を添加し、2日間静置することで脂質を溶出した(Folch J et al., 1957)。回収した上清を乾固させたものをイソプロパノール

に再溶解し、TG、total Chol (TC)、free Chol (FC) および free fatty acid (FFA) の測定を行った。測定にはそれぞれトリグリセライド E-テストワコー (富士フィルム和光純薬、日本)、コレステロール E-テストワコー (富士フィルム和光純薬、日本)、遊離コレステロール E-テストワコー (富士フィルム和光純薬、日本)、NEFA C-テストワコー (富士フィルム和光純薬、日本) を用いた。

## 2.4 酸化 Chol 組成解析

酸化 Chol は九州大学大学院農学研究院栄養化学研究室 (佐藤匡央教授、田中愛健助教) で分析された (Hori S et al., 2020; Shirouchi B et al, 2017)。概要としては以下の通りである。ブチルヒドロキシルエノン含有クロロホルム/メタノール (2 : 1, v/v) を用いて凍結乾燥肝臓粉末 100 mg から脂質を抽出した。この脂質抽出物をけん化後、ヘキサンを用いて非けん化画分を回収した。Sep-Pak Silica Vac cartridge (日本ウォーターズ、日本) を用いて、この非けん化画分から Chol と酸化 Chol を分離した。窒素ガスを用いてこの酸化 Chol 画分を乾固させた後、トリメチルシリル化を行った。測定にはガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS) を用いた。GC 装置として Shimadzu GC-2010 Plus (島津製作所、日本)、MS 装置として QP2020 series mass-selective detector (島津製作所、日本)、カラムとして Inert Cap 5MS/NP capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm thick、ジーエルサイエンス、日本) を使用した。内部標準として 19-OH を使用し抽出効率を補正し、Table 1-2 に示す酸化 Chol 濃度を定量した。

## 2.5 遺伝子発現解析

肝臓からの RNA 抽出には RNeasy mini kit (Qiagen, オランダ) を用いた。抽出した RNA の濃度を測定後、RiverTra Ace RT master mix with gDNA remover (TOYOBO, 日本) を用いて cDNA を合成した。各遺伝子発現は、TB Green Premix Ex Taq II (Takara, 日本) 及び Mx3000P real time PCR system (Agilent Technologies, アメリカ) を用い quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) 法で測定した。qRT-PCR に使用したプライマーは Tabel 1-3 に示した。

## 2.6 BA 組成解析

BA の分析は既報に則り実施した (Hori S et al., 2022)。肝臓、SIC、門脈血漿、動脈血漿および糞を凍結

乾燥し、肝臓と糞は乳棒ですりつぶし粉末化した。SIC 及び血漿サンプルはポリトロンを用いてホモジナイズした後に、すべてのサンプルを超音波破碎機によって更に解砕した。これらのエタノール抽出画分をメタノールで再溶解し、HLB 1 cc (10 mg) Extraction cartridges (日本ウォーターズ、日本)を用いて固相抽出した。BA 分子種の測定は超高速液体クロマトグラフィー質量分析装置 (UHPLC-MS) を用いた。UHPLC 装置として Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific、アメリカ)、MS 装置として Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific、アメリカ)、カラムには ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 µm column (日本ウォーターズ、日本)を使用した。溶離液には 10 mM 酢酸アンモニウム含有 20%アセトニトリル及び 10 mM 酢酸アンモニウム含有 80%アセトニトリルを使用した。内部標準として添加した Nordeoxycholic Acid (NDCA) により抽出効率を補正し、Table 1-4 に示す 31 種類の BA スタンダードを用いて標準曲線を作成することで、各サンプル内の BA 濃度を定量した。各胆汁酸分子種の略称は、Table 1-4 に示した。

## 2.7 メタボロミクス

肝臓組織 50 mg にメタノール (4 mL/g sample) 及び Milli-Q 水 (0.85 mL/g sample) を加え、超音波破碎機を用いてホモジナイズした。これにクロロホルム (4 mL/g sample) および Milli-Q 水 (4.4 mL/g) を添加し、ボルテックスで充分混合した後に氷上で静置した。遠心分離により有機層及び水層を回収し、Millex 0.2 µL フィルター (Millipore, アメリカ) でろ過した。得られた抽出液のうち有機層は窒素ガスで乾固させ、水層は濃縮遠心機により乾固させた。

水層画分のメタボローム測定に用いた装置は以下の通りである。UHPLC 装置として Ultimate3000 (Thermo Fisher Scientific, アメリカ)、MS 装置として Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, アメリカ)、カラムには ZIC-pHILIC column (150×4.6 mm, 5µm polymer, Merck, ドイツ) を使用した。溶離液には 10 mM 酢酸アンモニウム含有 5%アセトニトリル及び 10 mM 酢酸アンモニウム含有 95%アセトニトリルを用いた。有機層画分の代謝物解析においても、上記同様の装置を使用した。カラムには Hypersil GOLD column (1.9µm, 150 × 2.1 mm, Thermo Fisher Scientific)、溶離液として 10 mM ギ酸アンモニウム含有 60%アセトニトリル及び 10 mM ギ酸アンモニウム含有アセトニトリル/イソプロパノール (10 : 90, v/v) 溶液を使用した。水層及び有機層いずれの解析に

においても、Compound Discoverer 3.0 を用いて分子種の同定を行った。

## 2.8 統計解析

全ての結果は平均値  $\pm$  SEM で示した。JMP14.0 (SAS Institute, アメリカ) を用いて、Student's *t*-test による二群間の有意差検定を行い、*P* 値が 0.05 未満であるものを有意差があるとみなした。また、一部の結果では Smirnov-Grubbs rejection test により外れ値を除外した。



## 第3節 結果

### 3.1 摂食量・重量・血漿トランスアミナーゼ活性

HF 食摂取マウスにおいて、摂食量の減少が認められたが、エネルギー摂取量は有意に増加した (Table 1-5)。BW 及び副睪丸脂肪組織重量は HF 食摂取群で増加したが、BW 当たりの肝重量には有意な差は認められなかった。血漿 ALT 活性は HF 食摂取マウスにおいて増加したが、AST 活性に有意差は見られなかった。

### 3.2 Chol代謝変動

肝 TG 濃度と Chol 摂食量が HF 食摂取マウスで増加した (Figure 1-1A, 1-1B)。それに伴い肝臓総 Chol 濃度、遊離 Chol 濃度、血漿 Chol 濃度、および糞中 Chol 排泄量がそれぞれ HF 摂取マウスで増加した (Figure 1-1C)。また、肝臓内酸化 Chol はほとんどの分子種で増加していた (Figure 1-1D)。Chol 代謝関連遺伝子の発現解析を行ったところ、HF 食摂取群において、ステロール 12 水酸化酵素である *Cyp8b1* (Björkhem I et al., 1983) が有意に増加し、ステロール 27 位水酸化酵素である *Cyp27a1* (Twisk J et al., 1995) の発現は有意に減少した。一方、7 位水酸化酵素である *Cyp7a1* (Li YC et al., 1990)、Chol を代謝するためにミトコンドリアへ輸送する steroidogenic acute regulatory protein (*Star*) (Stocco DM et al., 2001) や Chol 生合成の律速酵素である *Hmgcr* (Goldstein JL et al., 1990) の発現には有意な差は認められなかったが、*Cyp7a1* 及び *Star* は増加する傾向を、*Hmgcr* は減少する傾向が認められた (Figure 1-1E)。また、HF 摂取マウスにおいて糞中コプロスタノール排泄が減少し、糞中中性 Chol 排泄は増加した (Figure 1-1F)。

### 3.3 BA 組成変動

肝臓において BA 合成関連遺伝子の発現では 12OH BA を合成する方向に変動する可能性が推察されたため、肝臓、SIC 及び糞中の BA 組成を評価した。HF 食摂取マウスにおいて、肝臓の 12OH BA 濃度に有意な増加は認められなかった (Figure 1-2A)。一方、対照群においてマウス肝臓で最も豊富に存在する T $\beta$ MCA だけでなく、TUDCA、 $\beta$ MCA、T $\omega$ MCA、 $\omega$ MCA を含む n12OH 濃度は有意に減少した。これに伴い肝臓内の総 BA 濃度及び n12OH 濃度は HF 食摂取群において有意に減少し、12OH BA/n12OH BA 比

は有意に増加した。SICにおいてはT $\alpha$ MCAの有意な減少等多少の違いは認められたものの、肝臓と同様に12OH BA/n12OH BA比は有意に増加した(Figure 1-2B)。糞中ではDCAや3 $\alpha$ 12 $\alpha$ 、CA、12 $\alpha$ LCA、7 $\alpha$ DCAを含む12OH BAの濃度はHF食摂取群において有意に増加し、逆に $\beta$ MCAや $\omega$ MCAは有意に減少した(Figure 1-2C)。これらに伴い糞中においてもHF食摂取群において12OH BA/n12OH BA比は増加した。この傾向は門脈血漿中BA組成でも認められた一方、動脈血漿中では認められなかった(Figure 1-2D, 1-2E)。

### 3.4 BA組成と肝TG及びTC蓄積量の相関解析

腸肝循環に関わる組織において、HF食摂取群で12OH BA/n12OH BA比が増加した。ラットではHF食摂取で門脈や肝臓・糞での12OH BA濃度と肝TG濃度との間に有意な正の相関が観察された(Hori S et al., 2020)。マウスにおいても同様な関係が見られるかを検証するため、各部位での12OH BA濃度や12OH BA/n12OH BA比と、肝TG量との間の相関を解析した。各部位の12OH BA濃度と肝臓TG濃度の間には有意な正の相関は観察されなかった。むしろ、糞の12OH BA/n12OH BA比と肝TG濃度とが正の相関を示し、肝臓・SIC・門脈血漿中・動脈血漿中での12OH BA/n12OH BA比と肝TG濃度との間に有意性は認められなかったものの、概ね正の相関を示す傾向が認められた(Figure 1-3)。

また、肝臓総Chol濃度と肝臓12OH BA/n12OH BA比との間に相関関係は認められなかったが、SIC、糞中の12OH BA/n12OH BA比は肝臓総Chol濃度と負の相関を示した(Figure 1-4)。

### 3.5 肝臓のメタボロミクス解析

HF食摂取により変動した代謝物を調査するためメタボロミクス解析を実施した。長鎖セラミド及びd18:1/20:0セラミド及びd18:1/22:0(n-9)セラミドの量がHF食摂取群において減少した(Figure 1-5A)。また、様々な種類のアセチルカルニチン量が増加していた(Figure 1-5B)。ほとんどのアミノ酸量に変動は認められなかった一方、スレオニンは僅かに増加しており、リジンの著しい減少が認められた(Figure 1-5C)。脂肪酸組成についても変動が認められ、ジアシルグリセロール(DG)及びTGは多くの分子種で増加する傾向を示した一方、ホスファチジルコリン(PC)とホスファチジルエタノールアミン(PE)では種々の分子種が減少する傾向を示した(Figure 1-6)。

### 3.6 食餌効率

摂食量が BW 増加に及ぼす影響を検証するために、BW 増加量から摂食量を除することで食餌効率を算出した。ラットに HF 食を摂取させた場合の数值は当研究室で以前実施されたデータを用いた (Hori S et al., 2020)。その結果、HF 食摂取マウスの食餌効率は、ラットの場合と比較して有意に低い値を示した (Figure 1-7)。

**Table 1-1.** Diet compositions

	C	HF
	g/kg diet	
Corn starch <sup>1</sup>	397.5	167.5
Casein <sup>2</sup>	200.0	200.0
Dextrin <sup>3</sup>	132.0	132.0
Sucrose <sup>4</sup>	100.0	100.0
Soybean oil <sup>5</sup>	70.0	70.0
Cellulose <sup>6</sup>	50.0	50.0
Mineral mixture <sup>7</sup>	35.0	35.0
Vitamin mixture <sup>8</sup>	10.0	10.0
L-Cystine <sup>9</sup>	3.0	3.0
Choline hydrogen tartrate <sup>10</sup>	2.5	2.5
Lard <sup>11</sup>	-	230.0

<sup>1</sup> Amylalpha (Chuo Shokuryo Co., Ltd.)

<sup>2</sup> NZMP Acid Casein (Fonterra Co-Operative Group Limited.)

<sup>3</sup> TK-16 (Matsutani Chemical Industry Co., Ltd.)

<sup>4</sup> Nippon Beet Sugar Manufacturing Co., Ltd.

<sup>5</sup> J-Oil Mills, Inc.

<sup>6</sup> Microcrystalline cellulose (Ceolus PH-102, Asahi Kasei Corporation)

<sup>7</sup> AIN-93G mineral mixture (MP Biomedicals)

<sup>8</sup> AIN-93 vitamin mixture (CLEA Japan, Inc.)

<sup>9</sup> L-Cystine (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)

<sup>10</sup> Choline Hydrogen Tartrate (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)

<sup>11</sup> Bell Shokuhin Co., Ltd.

**Table 1-2.** Measured oxysterols in this study

Systemic name	Trivial name	Abbreviation
Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol	$\beta$ -Triol	$\beta$ -Triol
Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -diol-6-one	5 $\alpha$ -hydroxy-6-ketocholesterol	5 $\alpha$ -OH-6-keto
Cholestan-5 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxy-3 $\beta$ -ol	5 $\alpha$ -Epoxycholesterol	$\alpha$ -Epoxy
Cholestan-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxy-3 $\beta$ -ol	5 $\beta$ -Epoxycholesterol	$\beta$ -Epoxy
5 $\alpha$ -Cholestan-3 $\beta$ -ol-6-one	6-Ketocholestanol	6-Keto
5-Cholesten-3 $\beta$ ,4 $\beta$ -diol	4 $\beta$ -Hydroxycholesterol	4 $\beta$ -OH
5-Cholesten-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol	7 $\alpha$ -Hydroxycholesterol	7 $\alpha$ -OH
5-Cholesten-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol	7 $\beta$ -Hydroxycholesterol	7 $\beta$ -OH
5-Cholesten-3 $\beta$ ,22( <i>R</i> )-diol	22( <i>R</i> )-Hydroxycholesterol	22( <i>R</i> )-Diol
5-Cholesten-3 $\beta$ ,24( <i>S</i> )-diol	24( <i>S</i> )-Hydroxycholesterol	24( <i>S</i> )-Diol
5-Cholesten-3 $\beta$ ,25-diol	25-Hydroxycholesterol	25-OH
5-Cholesten-3 $\beta$ -ol-7-one	7-Ketocholesterol	7-Keto
5-Cholesten-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,25( <i>R</i> )-triol	7 $\alpha$ ,25( <i>R</i> )-Dihydroxycholesterol	7 $\alpha$ ,25-Triol
25 <i>R</i> -Cholest-5-en-3 $\beta$ ,26-diol	27-Hydroxycholesterol	27-OH

5-Cholesten-3 $\beta$ ,19-diol (19-OH) was used as an internal standard.

**Table 1-3.** Primer sequences for qRT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Cyp7a1</i>	CCTGCAACCTTCTGGAGCTTA	AGCCTCCTTGATGATGCTATCTAGT
<i>Cyp8b1</i>	ATGAGCTGTTCAGGAAGTTC	TGTCCTGCATGGATGAAGC
<i>Cyp27a1</i>	CCAATGTGGACAACCTCCT	CTTGTGGTCTCGGTGGTC
<i>Star</i>	GGAGCTCTCTGCTTGGTTCTC	CTTGTGGTCTCGGTGGTC
<i>Gapdh</i>	TGACCTCAACTACATGGTCTACA	CTTCCCATTCTCGGCCTTG
<i>Bbox1</i>	TTCTCAACAGGCCAGAGCAA	TTCAGAGTTGGCAGCTGGAG

**Table 1-4.** BAs analyzed in this study

Systemic name	Trivial name	Abbreviation
Primary 12OH BAs		
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol	Cholic acid	CA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol- <i>N</i> -(2-sulfoethyl)-amide	Taurocholic acid	TCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide	Glycocholic acid	GCA
Secondary 12OH BAs		
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diol	Deoxycholic acid	DCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(2-sulfoethyl)-amide	Taurodeoxycholic acid	TDCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide	Glycodeoxycholic acid	GDCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,12 $\alpha$ -triol	Ursocholic acid	UCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diol-7-one	7-Oxo-deoxycholic acid	7 $\alpha$ DCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ -ol-12-one	12-Oxo-lithocholic acid	12 $\alpha$ LCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-12 $\alpha$ -ol-3-one	3-Oxo-12 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholanic acid	3 $\alpha$ 12 $\alpha$
Primary n12OH BAs		
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diol	Chenodeoxycholic acid	CDCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -triol	Hyochoolic acid	HCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -triol	$\alpha$ -Muricholic acid	$\alpha$ MCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\beta$ -triol	$\beta$ -Muricholic acid	$\beta$ MCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(2-sulfoethyl)-amide	Taurochenodeoxycholic acid	TCDCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide	Glycochenodeoxycholic acid	GCDCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -triol- <i>N</i> -(2-sulfoethyl)-amide	Tauro- $\alpha$ -muricholic acid	T $\alpha$ MCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\beta$ -triol- <i>N</i> -(2-sulfoethyl)-amide	Tauro- $\beta$ -muricholic acid	T $\beta$ MCA
Secondary n12OH BAs		
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -triol	$\omega$ -Muricholic acid	$\omega$ MCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -triol- <i>N</i> -(2-sulfoethyl)-amide	Tauro- $\omega$ -muricholic acid	T $\omega$ MCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diol	Ursodeoxycholic acid	UDCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diol- <i>N</i> -(2-sulfoethyl)-amide	Tauroursodeoxycholic acid	TUDCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide	Glycoursodeoxycholic acid	GUDCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ -ol	Lithocholic acid	LCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ -ol- <i>N</i> -(2-sulfoethyl)-amide	Tauroolithocholic acid	TLCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ -ol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide	Glycolithocholic acid	GLCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ -ol-7-one	7-Oxo-lithocholic acid	7 $\alpha$ LCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diol	Hyodeoxycholic acid	HDCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(2-sulfoethyl)-amide	Taurohyodeoxycholic acid	THDCA
5 $\beta$ -Cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide	Glycohyodeoxycholic acid	GHDCa

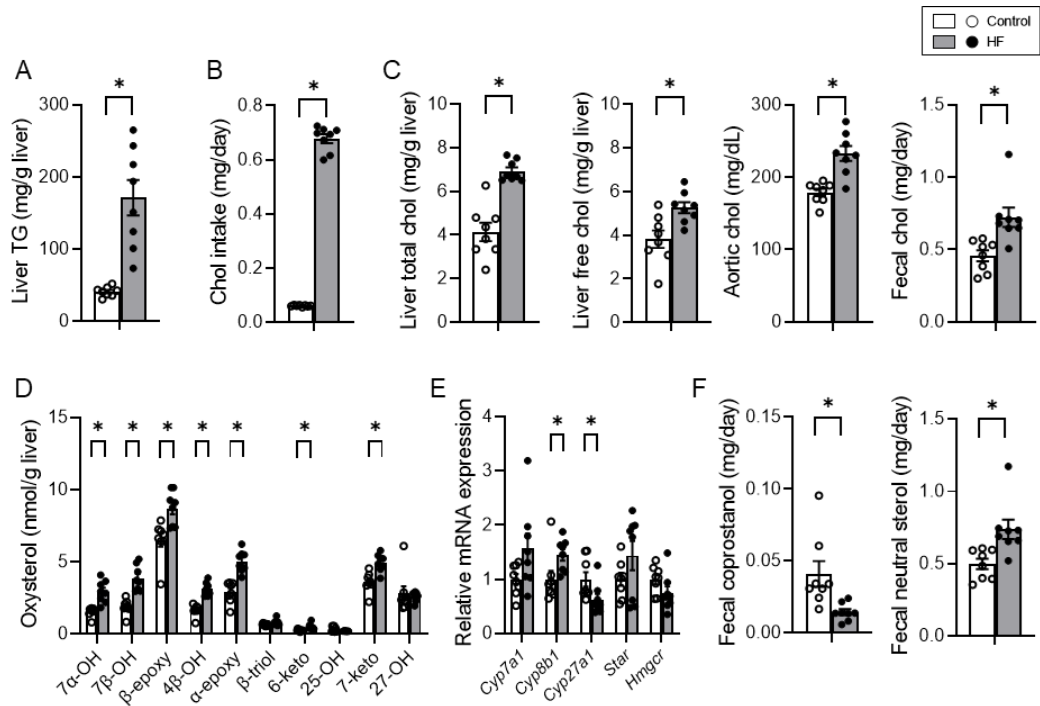
23-Nor-5 $\beta$ -cholanic acid-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diol was used as an internal standard. All BA standards analyzed in this study were obtained from Steraloids, Inc., except for UCA, which was obtained from Toronto Research Chemicals.

**Table 1-5.** Food intake, weights, and plasma transaminase activities

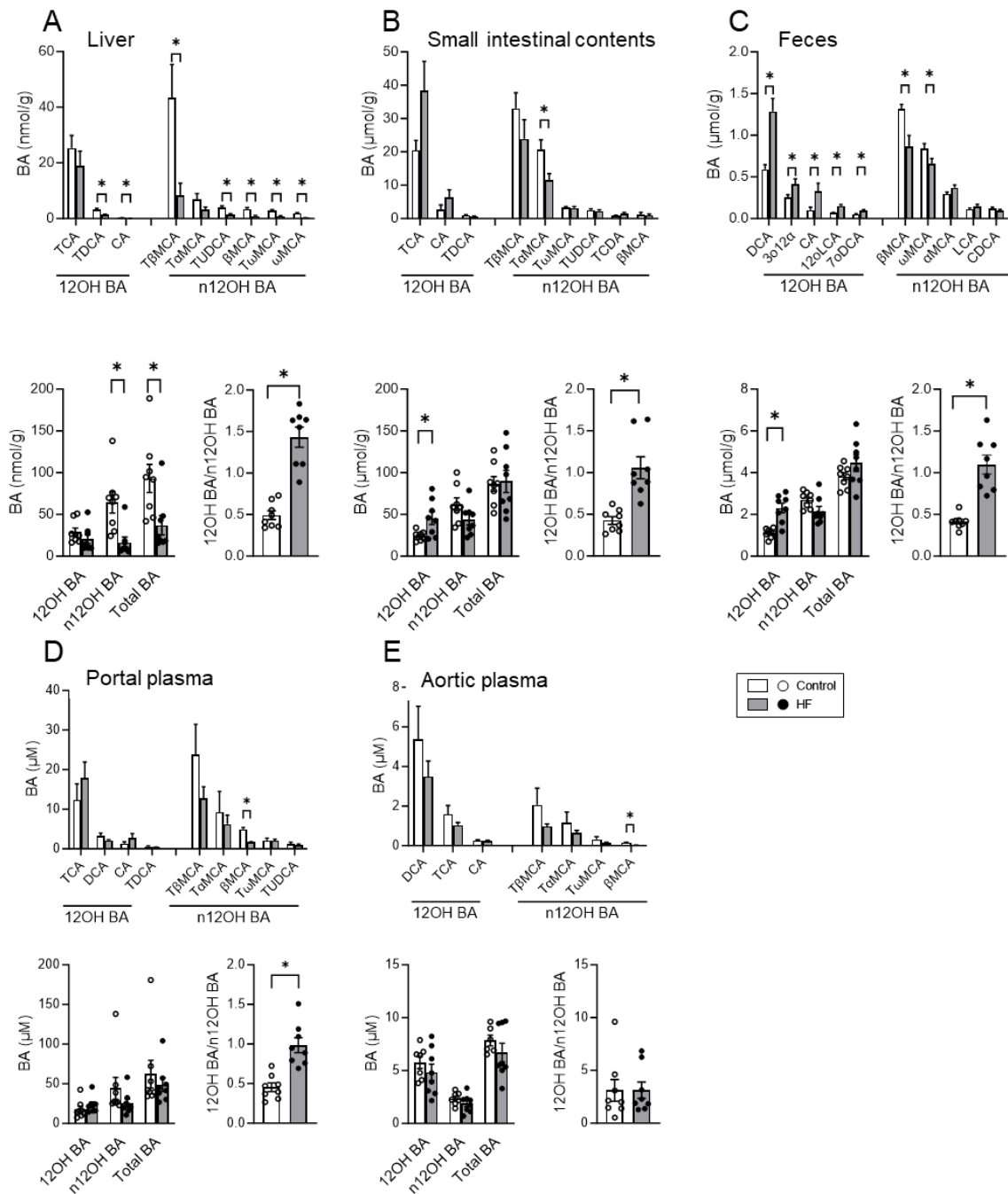
	C	HF
Total food intake (g)	329.5 ± 29.9	282.9 ± 12.1*
Total energy intake (kcal)	1266.0 ± 115.0	1524.9 ± 65.3*
Final BW (g)	29.4 ± 0.8	46.5 ± 1.0*
Organ weight (g/100 g BW)		
Liver	4.2 ± 0.1	4.5 ± 0.2
Epididymal adipose tissue	2.9 ± 0.2	5.3 ± 0.2*
Plasma ALT (IU/L)	3.0 ± 0.2	10.7 ± 2.4*
Plasma AST (IU/L)	65.5 ± 9.6	77.0 ± 14.8

\* Significant different from the values in control (Student's *t*-test, *P* < 0.05, n=7-8)

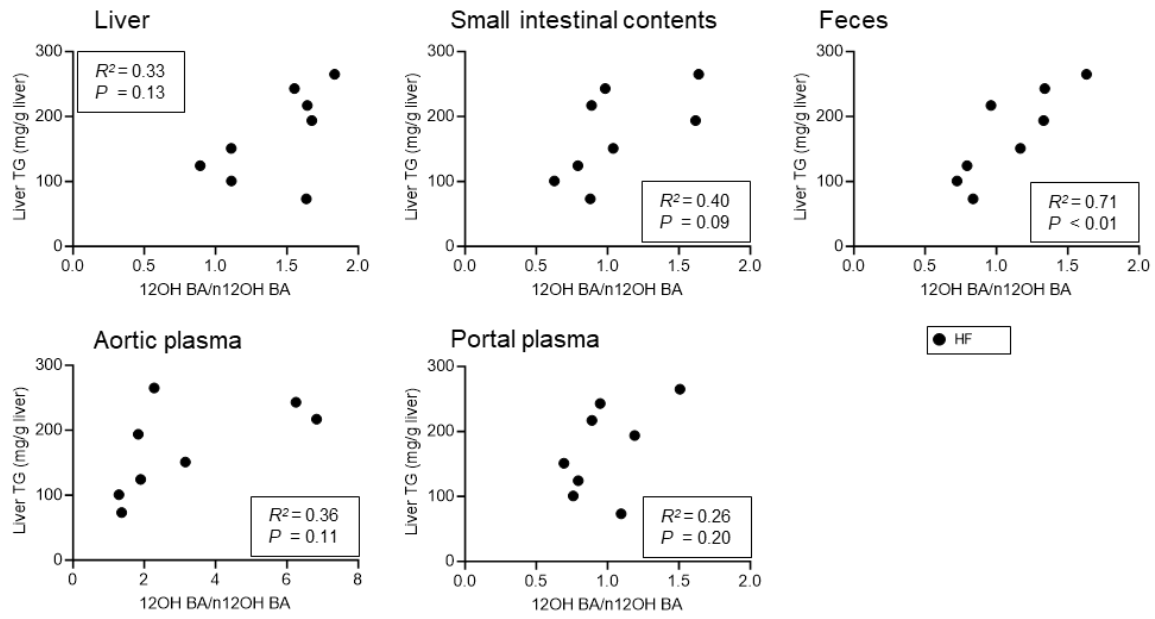




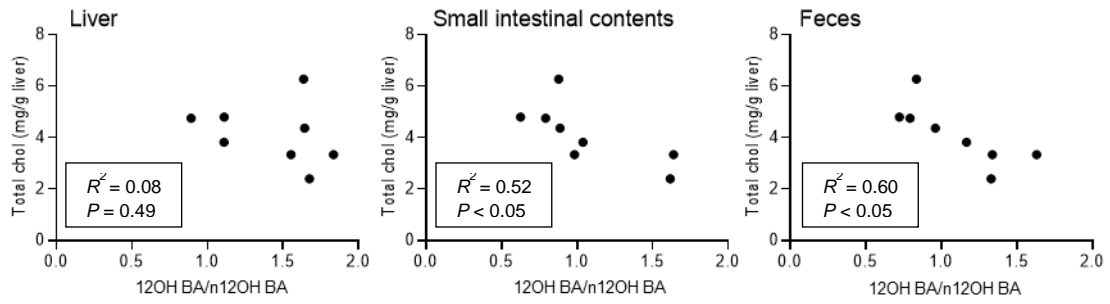
**Figure 1-1.** Distribution of Chol-related molecules in mice fed control or HF diet. (A) Hepatic TG concentration. (B) Daily Chol intake. (C) Chol concentration in the liver, blood, and feces. (D) Concentration of liver oxysterols. (E) mRNA expression of genes involved in Chol metabolism. (F) Coprostanol and neutral steroid excretion per day. Open bars,  $n = 8$  for control; filled bars,  $n = 8$  for HF. Data presented in E was normalized to *Gapdh* mRNA expression. Values are shown as the mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). Asterisks indicate a significant difference compared with the control ( $P < 0.05$ ).



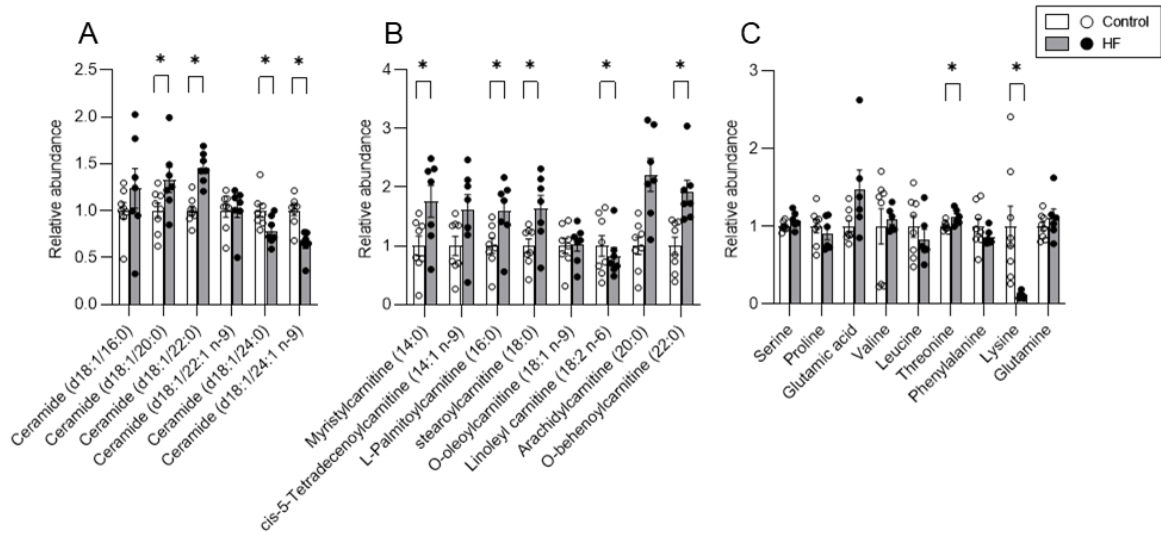
**Figure 1-2.** BA compositions in the liver, small intestine contents, and feces of mice fed control and HF diet. BA composition; 12OH BA, n12OH BA, and total BA concentrations; and the ratio of 12OH BA/n12OH BA in the (A) liver, (B) small intestinal contents, (C) feces, (D) portal plasma, and (E) aortic plasma. Open bars represent control ( $n = 8$ ) and filled bars represent HF ( $n = 8$ ). Values are shown as mean  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ). Asterisks indicate a significant difference compared with the control ( $P < 0.05$ ).



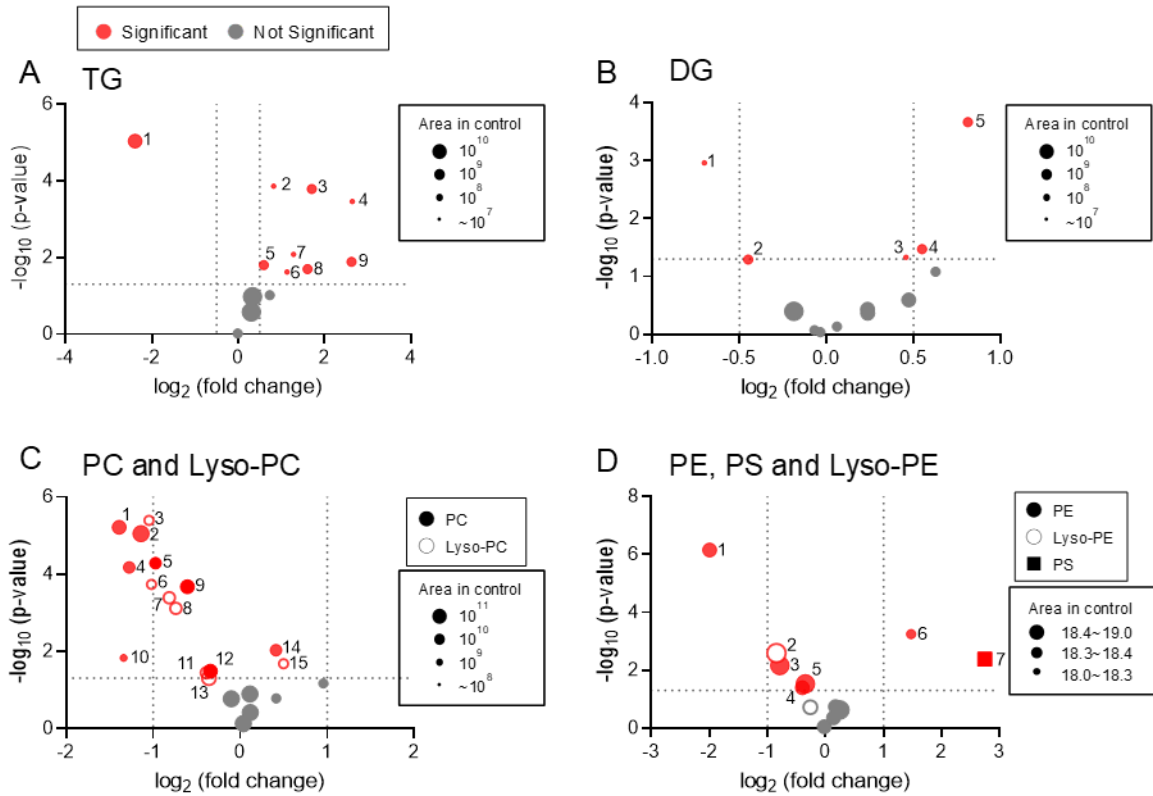
**Figure 1-3.** Correlation between the ratio of 12OH BA/n12OH BA and hepatic TG concentration. Correlation in the liver, small intestine contents, feces, aortic plasma, and portal plasma. Filled bars represent HF (n = 8).  $P$ -values are shown in the inset.



**Figure 1-4.** Correlation between the ratio of 12OH BA/n12OH BA and hepatic total Chol (Total Chol) concentration. Correlation in the liver, small intestine contents, feces, aortic plasma, and portal plasma. Filled bars represent HF (n = 8). P-values are shown in the inset.

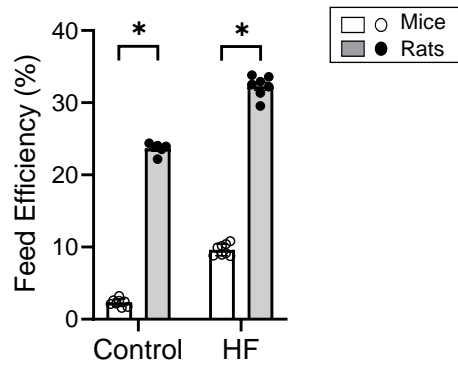


**Figure 1-5.** Composition of various metabolites in the liver of the mice fed control and HF diet. Relative abundances of (A) ceramides, (B) acylcarnitine, and (C) amino acids. Open bars represent control (n = 8) and filled bars represent HF (n = 8). Values are shown as mean ± SEM (n = 8). Asterisks indicate a significant difference compared with the control ( $P < 0.05$ ).



**Figure 1-6.** Composition of various metabolites in liver of the mice fed control and HF diet.

(A) Triacylglycerol (TG); (1) 20:0/20:1 (n-9)/20:4 (n-6), (2) 18:2 (n-6)/18:2 (n-6)/18:2 (n-6), (3) 16:1 (n-7)/18:1 (n-9)/18:1 (n-9), (4) 16:0/18:2 (n-6)/18:2 (n-6), (5) 17:1 (n-8)/20:2 (n-6)/20:2 (n-6), (6) 18:4 (n-3)/19:4 (n-6)/18:4 (n-3), (7) 18:3 (n-3)/14:0/18:3 (n-3), (8) 18:1 (n-9)/18:2 (n-6)/18:1 (n-9), (9) 18:2 (n-6)/18:2 (n-6)/20:2 (n-6). (B) Diacylglycerol (DG); (1) 18:2 (n-6)/18:2 (n-6), (2) 18:3 (n-3)/20:3 (n-6), (3) 14:0/14:1 (n-5), (4) 15:0/16:1 (n-7), (5) 16:1 (n-7)/18:1 (n-9). (C) Phosphatidyl choline (PC) and lyso-PC; (1) 18:3 (n-3)/18:2 (n-6) PC, (2) 16:0/18:3 (n-3) PC, (3) 16:1 (n-7) lyso-PC, (4) 18:3 (n-6)/p-18:1 (n-7) PC, (5) p-16:0/16:0 PC, (6) 22:5 (n-3) lyso-PC, (7) 20:4 (n-6) lyso-PC, (8) 18:2 (n-6) lyso-PC, (9) 14:0/18:1 (n-9) PC, (10) 20:5 (n-3)/24:1 (n-9) PC, (11) 18:1 (n-9) lyso-PC, (12) 16:0/18:0 PC, (13) 16:0 lyso-PC, (14) 18:3 (n-3)/18:3 (n-3) PC, (15) 17:0 lyso-PC. (D) Phosphatidyl ethanolamine (PE), phosphatidyl serine (PS), and lyso-PE (1) 20:4 (n-6)/22:6 (n-3) PE, (2) 22:6 (n-3) lyso-PE, (3) 18:1 (n-7)/20:4 (n-6) PE, (4) 18:1 (n-9)/18:2 (n-6) PE, (5) 18:4 (n-3)/24:1 (n-9) PE, (6) 18:2 (n-6)/24:0 PE, (7) 24:0/24:0 PS. Each marker size indicates range of area values shown in inset. Markers in red indicate a significant difference between the dietary groups ( $n = 8$ ,  $P < 0.05$ ).



**Figure 1-7.** Difference in feed efficiency between mice and rats

The ratio of weight gain to food intake over 8 weeks was calculated. The values in rats were calculated with the data in our previous study.

$$\text{Feed Efficiency (\%)} = \frac{\text{Weight gain (g)}}{\text{Total food intake (g)}} \times 100$$

Open bars for mice (n = 8) and filled bars for rats (n = 6-7). Values were shown as the mean with the SEM.

Asterisks indicate a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ).

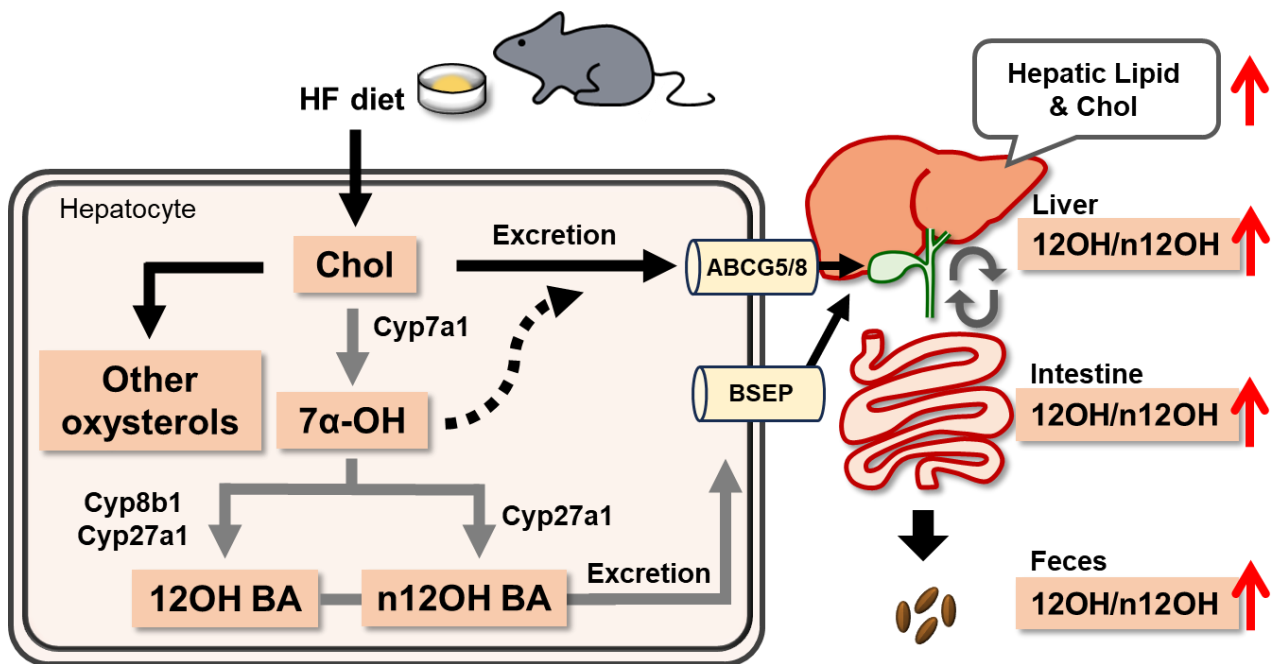


Figure 1-8. Graphical abstract in Chapter 1



## 第4節 考察

ヒトでは糞中 12OH BA の濃度は n12OH BA よりも高いことが報告されているが (Hashimoto N et al., 2020)、体循環血中では n12OH BA の方が豊富に存在する (Jiao N et al., 2018)。これらのことは、BA の濃度だけでなく、それらの組成が組織間で大きく異なることを示している。ラットでは 12OH BA の濃度は腸肝循環関連部位において高い (Lee JY et al., 2020)。B6 マウスにおいて n12OH BA は糞便中に豊富に含まれていた (Figure 1-2)。HF 食摂取ラットでは肝脂質蓄積と門脈血漿中および糞中 12OH BA 濃度との間に正の相関があることが見出されている (Hori S et al., 2020)。このような 12OH BA と肝脂質蓄積との関係はマウスを用いたいくつかの研究でも同様に示唆されている。*Cyp8b1* 欠損マウスは 12OH BA が極端に少なく、このマウスに西洋食を与えると肝 TG 濃度の増加が抑えられ、この飼料に TCA を加えると肝 TG 濃度が増加に転じる (Bertaggia E et al., 2017)。別の研究においても、肝臓における *Cyp8b1* の欠損が high Chol (HC) 食を与えたマウスの肝脂質蓄積を改善することが示された (Patankar JV et al., 2018)。本研究では、HF 食摂取 B6 マウスにおいて糞中の 12OH BA /n12OH BA 比と肝 TG 濃度との間に正の相関が観察されたことから、糞中の 12OH BA /n12OH BA 比が肝脂質蓄積を反映する指標となり得る可能性が示された。また、Hori らによる HF 食摂取ラットのデータを基に再解析を行った結果、HF 摂取ラットの糞中 12OH BA/n12OH BA と肝 TG 蓄積量は正の相関を示した ( $R = 0.77, P = 0.0019$ ) (Hori et al., 2020)。BMI が 27 以上のヒト肥満患者において、糞中 CA/CDCA 比は肝臓脂肪量と正の相関傾向を示すが、統計的な有意差は確認されていない (Chen L et al., 2020)。この報告での肝臓脂肪量は局在プロトン磁気共鳴分光法を用いて解析されており、肝臓の右葉の定点での肝脂肪量測定であった。肝臓への脂肪沈着は肝臓組織全体に一樣に溜まるとは限らない。本研究では肝臓組織の内側葉 (median lobe) を切り出して解析しており (Martins P et al., 2007)、動物種だけでなく採取部位の違いが結果の違いの原因となっている可能性がある。

マウスの糞中 12OH BA/n12OH BA 比と肝 TG 濃度との間に正の相関が見られた一方、肝臓・SIC・大動脈血漿・門脈血漿ではこのような明確な相関関係は認められなかった (Figure 1-3)。これは糞と他組織とのサンプリング条件の違いによるものと考えられる。糞は 24 時間の総糞を採取したが、他は解剖時点での採取である。つまり糞便中の BA は 1 日の累積値であり、他の部位の BA は解剖時点の BA 組成

を反映していると考えられる。肝臓の *Cyp8b1* 発現の増加に関わらず、肝臓中の 12OH BA 濃度には変化が認められなかった (Figure 1-1E, 1-2A)。さらに、小腸および糞便中の 12OH BA 濃度は増加し (Figure 1-2B, 1-2C)、小腸および糞中の総 Chol 濃度と 12OH BA /n12OH BA 比との間には負の相関が観察された (Figure 1-3)。これらの結果は、HF 食摂取状態ではステロール排泄形態が 12OH BA に傾く方向に代謝が変動した可能性を示している。

Chol は構造的に安定した強固なステロイド骨格を持ち、体内では分解されないため、エネルギーを取り出すことができない (Wang HH et al., 2017)。エネルギー制限が肝臓 Chol を減少させることを踏まえると (Rocha-Gomes A et al., 2021)、十分なエネルギー摂取があれば Chol 合成は促進されると考えられる。しかし、エネルギーも Chol も十分量存在する場合、Chol は排泄される可能性がある。水酸基を比較的多く有する 12OH BA は水系に排泄しやすいステロイド排泄形態の一つと考えることができる。また、食を介して潤沢にエネルギーが供給される場合には肝脂質蓄積が誘導されるため (Hori S et al., 2020)、肝臓の脂質蓄積と糞便中の 12OH BA 濃度に正の相関関係があることに不思議はない。実際、ヒトでは脂肪肝指標と大動脈血漿中の 12OH BA /n12OH BA 比との正の相関が報告されている (Haeusler RA et al., 2013)。マウスにおいては糞中 12OH BA /n12OH BA 比のみが肝 TG 濃度を反映することから、動物種の壁を超えた肝脂質蓄積の指標として、糞中の 12OH BA /n12OH BA 比が利用できる可能性が示された。

HF 食摂取ラットでは Chol の 12OH BA への変換が亢進し、肝臓における *Hmgcr* 発現が低下する (Hori S et al., 2020)。一方で、マウスで同様な実験を行った場合には糞中への Chol 排泄が亢進しており、肝臓でいくつかの酸化 Chol の濃度が増加した (Figure 1-1C, 1-1F)。これらの結果から、HF 食摂取マウスでは Chol を BA の合成に使うのではなく、むしろ Chol そのものを直接排泄することにより体内での Chol の恒常性を維持している可能性がある。このようなマウスとラットでの Chol 排泄形態の違いには、エネルギー消費の相違が関わる可能性が考えられる。マウスの食餌効率ラットよりも有意に低く (Figure 1-7)、体温維持のためにより多くのエネルギーが消費されると推察される。HF 食を摂取した場合には、肝臓における TG は燃焼に用いることができる一方で、相当量の Chol が残存することになる。この際、マウスのエネルギー要求量に関わらず、肝臓で Chol を BA に変換するには一定の NADPH が要求されるため (Dashty M, 2013)、その排泄も合わせるとかなりの NADPH 消費となることが推察される。そこで、

Chol そのものを直接排泄する方が、エネルギー消費の観点ではマウスにとって無駄が少ない選択となるのかもしれない。NADPH の減少は酸化ストレス防御の減弱につながることから (Ju HQ et al., 2020)、HF 摂取マウスにおける血中 ALT 活性の増加は、酸化ストレスの増大に起因することが考えられる。

HF 食摂取 B6 マウスでは、多くの種類のアシルカルニチンレベルが増加していた (Figure 1-4B)。カルニチン生合成に関わるリジン (Tanphaichitr V et al., 1973; Kunau WH et al., 1995) は HF 食摂取 B6 マウスの肝臓で特異的に減少していた (Figure 1-4C)。カルニチンはミトコンドリア内への長鎖脂肪酸の輸送を介して脂肪酸の  $\beta$  酸化を促進する (Ling B et al., 2012)。カルニチンレベルの増加が、過剰な脂肪にตอบสนองして肝細胞が脂肪酸を異化できるように仕向ける可能性がある。しかし、カルニチン生合成の律速酵素である  $\gamma$ -ブチロベタイン水酸化酵素 1 (*Bbox1*) の発現には差は認められなかった。高脂血症ラットにおいて、BBOX1 のタンパク質発現量はポリアデニル化による mRNA の安定化、翻訳効率の増加を通じて増加するため (Rigault C et al., 2013)、本研究においても BBOX1 タンパク質の量の増加を介したカルニチン生合成の促進が生じている可能性は否定できない。

メタボローム解析では、TG、DG、PC、PE および PS の脂肪酸組成に一定の変化が観察されたが、パスウェイ解析を行ってもこれらの変動に対応する経路は同定されなかった。組織から解析用サンプルを抽出する際、親水性と疎水性の分子の抽出効率は分子ごとに異なることが問題になり得る。本来、抽出溶媒は対象脂質によって設定する必要があるが、リン脂質のような両親媒性の物質であれば、その親水性度合いは分子種によって多様であるため、脂質の網羅的解析には自ずと限界があると予想される。本試験では、メタボローム解析用に抽出したサンプルを用いて遊離 Chol 濃度を予備的に分析したところ、群間に有意な差は認められなかった。これに対し、Folch 法で抽出した脂質画分は HF 食摂取マウスの肝臓において遊離 Chol の増加が認められた (Figure 1-1C)。一般に、リピドミクスは脂質組成の変化を推定するのに有用であるが、脂質中のあらゆる分子種に適応できる抽出条件は存在しないことに留意すべきである。有機溶媒の適切な選択と慎重な評価が、特にリピドミクスの応用には必須であると考えられる。

本章では、B6 マウスにおいてもラットのステロール代謝の共通点として、糞中の 12OH BA 組成が肝脂質蓄積に関与する可能性を見出した。一方相違点として、HF 食摂取によって体内で増加した Chol

に対し、マウスでは胆汁酸合成だけでなく Chol の直接排泄および種々の酸化 Chol 代謝に関わる経路が活性化される可能性を明らかにした。

## 第2章 Chol 及び CA 添加食摂取マウスにおける 肝脂質蓄積とステロール代謝変動の関係

## 第1節 背景および目的

第一章において、B6 マウスでは糞中 12OH BA /n12OH BA 比は肝脂質代謝と関連することが示された。しかし、体内の Chol の量的恒常性維持のためのメカニズムについては依然不明な点が多い。特に、ラットとマウスを比較した場合、HF 食摂取状態では Chol 排泄形態および酸化 Chol 産生形態に差異が認められた。そこで、本章ではステロール負荷時に生じる Chol 代謝変動と肝脂質代謝変動について検証を行うことを目的とした。

ラットの胆汁液中で最も豊富な BA は TCA であり (Yoshitsugu R et al., 2019)、TβMCA および TωMCA を含む n12OH BA の濃度は、TCA の約 3 分の 1 にとどまる (Yoshitsugu R et al., 2019)。ラットに HF 食を 8 週間以上摂取させたところ、胆汁液において TCA の選択的増加が観察され、門脈血漿や糞便において n12OH の有意な増加は観察されなかった (Hori S et al., 2020)。第 1 章で示したように、B6 マウスでは肝臓・門脈血漿・糞便では n12OH 濃度が高く、門脈血漿では体循環血漿よりも高濃度の BA が検出された。HF 食摂取マウスの糞便中では 12OH 濃度の増加と n12OH BA 濃度の減少が観察された (Figure 1-2)。また、ラットにおいて CA 添加飼料 (0.5 g/kg 飼料) を与えた場合、腸内細菌による BA の 7 位の脱水酸化を阻害せずに、肝脂質蓄積、消化管バリアの脆弱化、血圧上昇、腸内細菌の変化、および肝臓での酸化 Chol 濃度の増加が誘導された (Lee JY et al., 2020; Liu H et al., 2022; Shimoda T et al., 2023)。したがって、Chol 及び CA 添加食摂取によるステロール負荷は、マウスにおいても肝臓におけるステロール代謝を変動させ、その後の代謝産物やサイトカイン環境等に影響を及ぼすことが予想される。

Chol 添加食は、動脈硬化、胆石形成、NASH の動物モデルを誘導するために使用されている (Hartvigsen K et al., 2007; Wang TY et al., 2018; Fujihira E et al., 1978; Radhakrishnan S et al., 2021)。飼料に Chol を添加する場合、その吸収を促進するために、しばしば CA が同時に添加される (Woollett LA et al., 2004)。NASH モデルにおいては、Chol と CA を添加した HF 食が用いられることがある (Radhakrishnan S et al., 2020)。しかし、これらの Chol 負荷モデルでは、Chol の添加量は 10~25 g/kg 食餌であることが多く、Chol の添加量や BA 添加量の妥当性について合理的な基準が定められているとは考えにくい (Santhekadur PK et al., 2018)。また、Chol と CA を同時に摂取させた場合のステロール及び脂質代謝変化に関する情報を文献で見出すことができない。食餌への Chol および CA の単独または同時添加による代

謝変動の評価は、肝脂質蓄積とその後の炎症などのイベントにおけるそれぞれの寄与を明らかにする上で重要である。

したがって本章では、飼料への Chol と CA を添加する場合の組み合わせの差異が、肝脂質蓄積やステロール代謝に関連する因子に及ぼす影響を検討した。

## 第2節 実験材料および方法

### 2.1 動物実験

実験動物として B6 雄性マウス (日本 SLC、日本) を選択し、4 週齢のマウスを 1 週間通常食で馴化した。飼育環境は 12 時間の明暗周期 (明期：8:00~20:00)、室温を  $22 \pm 2$  °C、湿度を  $55 \pm 5\%$  に維持し、自由摂食及び自由給水として飼育した。馴化後平均 BW が均一になるよう群分けし、Table 2-1 に示す通常食 (C) または Chol 添加食 (Ch)、CA 添加食 (CA)、Chol 及び CA 添加食 (ChCA) を与え 6 週間飼育した。Chol 添加量については既報を参考に肝脂質蓄積が誘導される Chol 添加量を最大 6 g/kg diet とし (Hashimoto N et al., 2020)、CA 添加量を 0.5 g/kg diet とした (Lee JY et al., 2020)。本試験では胆石による炎症を避けるため (Hashimoto N et al., 2020)、Chol 添加量を 3 g/kg diet に減らした群についても検証を行った。BW および摂食量を 2 日に一度測定し、第 1 章と同様に総摂食量および Chol 摂取量を算出した。6 週の飼育終了 2 日前から当日にかけて 2 日分の糞便を回収した。ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg BW) の腹腔内投与で麻酔したマウスを開腹し、門脈血及び心臓血を採取した後放血屠殺し、肝臓、副睾丸脂肪組織および SIC を採取した。胆のうは胆管を結紮後に肝臓から分離し採取した。血液サンプルにヘパリンナトリウム (陽進堂、日本) 添加後し、 $2000 \times g$ 、4 °C で 15 分間遠心分離することで血漿サンプルを得た。BA 解析用サンプルは -30 °C で保存し、それ以外のサンプルは解析に使用するまで全て -80 °C で保存した。すべての動物実験は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定 (北海道大学安全衛生本部) 及び北海道大学動物実験マニュアル (国立大学法人北海道代諾動物実験委員会) に定められた規定に則り行った (承認番号：19-0161)。

### 2.2 脂質解析

「第 1 章実験材料および方法」の「2.3 脂質解析」に記す方法と同様に実施した。

### 2.3 BA 組成解析

「第 1 章実験材料および方法」の「2.7 BA 組成解析」に記す方法と同様に実施した。



## 2.4 酸化 Chol 組成解析

「第1章実験材料および方法」の「2.4 酸化 Chol 組成解析」に記す方法と同様に実施した。ただし、分析装置としては Shimadzu GC-2030 (島津製作所、日本) 及び QP2020 NX series mass-selective detector (島津製作所、日本) を用いた。

## 2.5 遺伝子発現解析

「第1章 実験材料および方法」の「2.5 遺伝子発現解析」に記す方法と同様に実施した。使用したプライマーの配列を Table 2-2 に示した。

## 2.6 血漿トランスアミナーゼ解析

「第1章 実験材料および方法」の「2.2 血漿トランスアミナーゼ活性測定」に記す方法と同様に実施した。

## 2.7 血漿 Lipocalin2 (LCN2) 測定

血漿における LCN2 量は ELISA 法によって測定した。測定には門脈血漿を 50  $\mu$ L の使用し、LCN2 測定 ELISA キットとして MLCN20 (Biotech R&D、アメリカ) を使用した。

## 2.8 脂肪酸組成解析

既報 (横山史佳、2023) にしたがって脂肪酸の抽出及び解析を行った。「2.2 脂肪酸解析」で得た脂質抽出物を乾固させたものに 0.3 M 水酸化カリウム含有 90%メタノールを添加し、80  $^{\circ}$ C で 1 時間加熱することで脂肪のけん化を行った。ギ酸により中和後、けん化した脂質画分はヘキサンを用いて回収した。濃縮乾固後メタノールに再溶解し、Millex 0.2  $\mu$ m フィルター (Millipore、アメリカ) を用いてろ過した。メタノールにより 10 倍希釈して分析サンプルとした。UHPLC-MS (UHPLC : Ultimate3000、Thermo Fisher Scientific、アメリカ、MS : Q Exactive<sup>TM</sup> Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap<sup>TM</sup> Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, アメリカ) を使用して解析した。カラムには Hypersil GOLD column (1.9  $\mu$ m, 150  $\times$  2.1 mm) (Thermo Fisher Scientific, アメリカ) を使用した。溶離液

として 10 mM ギ酸アンモニウム含有の 60%アセトニトリルと、100 mM ギ酸アンモニウム含有アセトニトリル/イソプロパノール (10 : 90, v/v) を用いて、アセトニトリル濃度が減少するようにグラジエントをかけて分離を行った。カラム温度は 60 °C、流速は 0.3 mL/min とし、サンプル温度は 4 °C に保った。MS はスキャン範囲を m/z を 67~1000 とし、ニードル電圧を positive mode: 4.5 kV、negative mode: -4.0 kV、キャピラリー温度は 320 °C として分析を行った。Trace Finder (Thermo Fisher Scientific, アメリカ) を用いて脂肪酸分子種の同定およびエリア値の算出を行った。内部標準として添加したマルガリン酸 (17 : 0) のエリア値を用いて抽出効率を補正し、Table 2-3 に示す脂肪酸分子種の標準曲線を利用して定量した。

## 2.9 メタボロミクス

肝臓からの代謝物抽出は Maddocks らの論文 (Maddocks et al., 2013) を基に一部改変して行った。肝臓組織 50 mg に内部標準として 1 mg/mL ノルロイシン溶液を 10 µL 及び氷冷したメタノール : アセトニトリル : 水 = 5 : 3 : 2 を 1.5 mL 加え、ポリトロンを用いてホモジナイズした後に超音波破碎機によって更に組織を解砕した。4 °C で 1 時間おくことでタンパク質を沈殿させ、16000 × g、4 °C で 10 分間遠心分離した。上清を回収し、Millex 0.2 µm フィルター (Millipore, アメリカ) を通してろ過した。得られた抽出液にアセトニトリルを等量加え、2 倍希釈した後、UHPLC-MS (UHPLC; Ultimate3000, Thermo Fisher Scientific, アメリカ)、MS : Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, アメリカ) を使用して解析を行った。ガードカラムとして SeQuant® ZIC®-pHILIC Guard 20 × 2.1 mm PEEK coated guard column (5 µM polymer) (Merck, ドイツ) を使用し、分離カラムとして SeQuant® ZIC®-pHILIC HPLC Column 150 × 4.6 mm (5 µM polymer) (Merck, ドイツ) を接続して使用した。移動相 A は 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O、移動相 B はアセトニトリル溶液を使用し、アセトニトリル濃度を 80%~40% の間でグラジエントをかけることで代謝物の分離を行った。カラム温度は 30 °C、流速は 0.3 mL/min とし、サンプル温度は 4 °C に保った。MS を用いた検出については Thermo Fischer のメタボロミクス解析メソッドを参考に、スキャン範囲を m/z が 67~1000 とし、ニードル電圧を positive mode: 4.5 kV、negative mode: -4.0 kV、キャピラリー温度は 320 °C として分析を行った。各サンプルの測定毎にカラム内を洗浄し、quality control を随時行うことで測定

の精度をモニターした。得られたデータは Compound Discoverer 3.3 (Thermo fisher scientific, アメリカ) のメタボロミクス解析フローに従い解析を行った (Workflow Templates/Metabolomics/Untargeted Metabolomics with Statistics Detect Unknowns with ID using Online Databases and mzLogic)。この解析により各ピークに対応する分子種を予測した後、当該分子のエリア値を算出して相対量とした。

## 2.1 0 統計解析

特に言及しない限り、平均値 $\pm$ SEM で示した。JMP14.0 (SAS Institute、アメリカ) を用いて二元配置分散分析 (Two-way ANOVA、Ch  $\times$  CA) を行い、交互作用が認められた場合には、Tukey-Kramer test による群間の有意差検定を行った。一部の結果では Smirnov-Grubbs rejection test により外れ値を除外している。P 値が 0.05 未満を有意差があるとみなした。

## 第3節 結果

### 3.1 摂食量・重量・脂質代謝

CA 添加では摂食量が低下し、これに伴い BW が減少した (Table 2-4)。Chol 添加では摂食量に有意な差が認められないにもかかわらず、BW が減少した。また、Chol と CA 摂取は肝臓の相対重量を増加させた。CA の摂取は副睪丸周囲白色脂肪組織 (eWAT) 重量を減少させた。このことが CA 添加における肝臓の相対重量の増加に寄与した可能性がある。いずれの食餌も、胆のうの相対重量には有意な影響を及ぼさなかった。

Chol 添加では肝 TG、Chol、および FFA 濃度の増加が認められた。Chol 添加により肝臓 Chol 濃度が増加し、この増加は CA との組み合わせでさらに増加した (Figure 2-1)。一方で、CA 添加だけでは肝臓への Chol 濃度の増加は認められなかった。糞中 TG 排泄は Chol 添加で増加した。糞中 Chol 排泄量のパターンは TG 排泄量のそれと似た傾向を示したが、糞中 Chol 排泄量では TG に比べて明確な統計的有意差が認められた。更に、Chol 添加により増加した糞中 Chol 排泄は、CA との組み合わせにより減少することが示された。Chol 添加により糞中 FFA 排泄量は増加し、その程度は CA との組み合わせで顕著に増加した。門脈血漿中の TG 濃度には有意な差は認められなかった。門脈血漿中の Chol および FFA の濃度は CA 添加により有意に減少した (Figure 2-1)。

このような体内脂質代謝への Chol および CA 添加の影響について、より高い Chol 負荷 (6 g/kg diet) で検証を行った (Figure 2-S1A)。その結果、高 Chol を添加としても肝脂質濃度の明確な増加が見られず、CA との組み合わせにおいてはむしろ低下する傾向を示した (Figure 2-S1A)。より高い Chol 添加では糞中の Chol 排泄量が増加した。更に、肝臓での脂質代謝 (*Srebf1*; SREBP1 のマウスオーソログ, *Fasn*) 及び Chol 代謝 (*Srebf2*; SREBP2 のマウスオーソログ, *Hmgcr*, *Abcg5*, *Abcg8*) 関連遺伝子のうち、Chol の添加量を上げることで顕著な発現増加を示したものは Chol の排泄に関わる遺伝子 (*Abcg5*, *Abcg8*) であることを見出した (Figure 2-S1B)。したがって、Chol 添加量を 6 g/kg diet に増やしたとしても、負荷した Chol は糞中に排泄され、肝脂質濃度増加の更なる促進には必ずしもつながらないことが示された。そこで、これ以降の実験では Chol 添加量を 3 g/kg diet としたグループで検証を行った。

### 3.2 BA 組成変動

肝臓において、Cと比較してT $\beta$ MCA量はChol添加で有意に増加したが、CAとの組み合わせで有意に減少した (Figure 2-2)。CA添加は胆汁やSICにおけるTCA濃度を増加させた。特にSICにおいて、CholとCAの組み合わせはT $\beta$ MCA濃度を相乗的に増加させた。糞便中の12OH BA濃度は、CholおよびCAの添加にかかわらず、顕著な増加は認められなかった。その一方で、Chol添加により糞中 $\beta$ MCAの顕著な増加が認められた。以上の結果は12OH BAとn12OH BAの分類からも確認することが出来た (Figure 2-4)。Chol添加において肝臓および糞中n12OH BAは増加するが、CA添加では腸肝循環 (SICおよび胆汁) での12OH BAを増加させた。CholやCAの添加は、門脈血漿における主要なBAであるT $\beta$ MCAおよびTCA濃度をそれぞれ増加させた (Figure 2-3)。一方、動脈血漿ではT $\beta$ MCAの存在比が著しく低下し、摂取飼料による影響としてはCA添加によりTCA濃度の増加が見られたものの、門脈血漿で見られたようなChol添加によるT $\beta$ MCA濃度の増加は観察されなかった。12OH BAとn12OH BAの比率の結果より、CA添加では腸肝循環内12OH BAが増加していることが確認できた (Figure 2-4)。

### 3.3 酸化Chol変動

Chol添加では、肝臓内の $\alpha$ -Epoxy、7 $\alpha$ -OH、7 $\beta$ -OH、4 $\beta$ -OH、6-Ketoの濃度が増加した (Figure 2-5)。一方、CA添加により、肝臓中の $\beta$ -Epoxy、7-Keto、 $\alpha$ -Epoxy、 $\beta$ -Triol、7 $\beta$ -OH、4 $\beta$ -OH、5 $\alpha$ -OH-6-keto、6-Keto濃度が増加した。CholとCAの組み合わせでは、7 $\beta$ -OHと4 $\beta$ -OHの濃度において交互作用が認められた。

### 3.4 脂質代謝に関わる遺伝子発現変動

Chol添加により *Srebfl* の発現が増加する一方、*Fasn*、acetyl-CoA carboxylase 1 (*Acc1*)、carnitine palmitoyl transferase 1 $\alpha$  (*Cpt1a*)、*Srebp2* および *Hmgcr* の発現が有意に減少した (Figure 2-6A)。その一方で、CA添加では *Cpt1a* および *Cpt2* の発現が減少した。Chol添加では *Cyp7a1*、*Cyp2c70*、*Abcg5*、*Abcg8* および cytochrome P450 family 3 subfamily A member 11 (*Cyp3a11*) (ヒト CYP3A4 のオーソログ) の発現が増加し、*Cyp8b1* の発現は減少した (Figure 2-6B)。一方、CA添加では *Cyp27a1* の発現が減少し、*Abcg5* および *Abcg8* の発現が増加した。更に *Abcg5* および *Abcg8* の発現については、CholとCAの組み合わせ

による交互作用が認められた。

### 3.5 血中トランスアミナーゼ活性・炎症性サイトカイン発現

Chol 添加および CA 添加のいずれにおいても AST 活性を増加させたが、ALT 活性には有意な変化を及ぼさなかった (Figure 2-7A)。一方、肝臓での炎症性サイトカイン等の発現では、*Lcn2*、tumor necrosis factor  $\alpha$  (*Tnfa*)、interleukin 6 (*Il6*)、interleukin 1 $\beta$  (*Il1b*)、CC motif chemokine ligand 2 (*Ccl2*) の発現に交互作用が認められた (Figure 2-7B, C)。

### 3.6 グルタチオン代謝及びステロール代謝の関連解析

メタボロミクスの結果、Chol 添加により還元型グルタチオン (GSH) および酸化型グルタチオン (GSSG) レベルが有意に減少した (Figure 2-8A)。興味深いことに、Chol 添加では GSH/GSSG 比が増加しており、Chol と CA の組み合わせではその増加が鈍化した。肝臓におけるグルタチオン代謝に関わる遺伝子のうち glutathione S-transferase  $\mu$  1 (*Gstm1*) および glutathione S-transferase  $\alpha$  1 (*Gsta1*)のみ Chol と CA の組み合わせで有意な増加が認められた (Figure 2-8B)。*Gstm1* や *Gsta1* の遺伝子発現パターンは、肝臓における酸化 Chol 量増加の場合と似た傾向を示したため、これらの間の相関解析を行うと、*Gstm1* 及び *Gsta1* が 7 $\beta$ -OH および 4 $\beta$ -OH 濃度とそれぞれ強い正の相関を示した (Figure 2-8C)。更に、同様の遺伝子発現パターンを示す *Abcg5* および *Abcg8* は 4 $\beta$ -OH 濃度と強い正の相関関係があることを見出した。一方、肝臓内メタボローム解析でのアミノ酸組成では、Chol 添加によってセリンの量が減少し、GSSG と似た変動傾向を示した (Figure 2-9)。また Chol 添加により、ロイシンの量が増加した。

### 3.7 脂肪酸解析

Chol 添加によりパルミチン酸、オレイン酸、ステアリン酸、リノール酸、リグノセリン酸、パルミトレイン酸、ドコサヘキサエン酸、 $\alpha$ -リノレン酸のレベルが増加した。CA 添加によりここで示す全ての脂肪酸のレベルが減少した。Chol と CA の組み合わせによる交互作用は認められなかった (Figure 2-10)。

### 3.8 LCN2 関連のパラメータ評価

CA 添加では、transferrin receptor 1 (*Tfr1*)、ZRT/IRT-like protein 14 (*Zip14*)、divalent metal transporter 1 (*Dmt1*)、haptoglobin (*Hp*)、Hemopexin (*Hpx*)、Hepcidin antimicrobial peptide (*Hamp*) の発現が増加した (Figure 2-11A)。Chol と CA の組み合わせでの交互作用が認められた遺伝子は *Fth* のみであったが、発現変動は極めて僅かであった。血漿中 LCN2 の濃度には有意な変化は認められなかった (Figure 2-11B)。Lipocalin-2 receptor (*Lcn2r*) の発現や、NF- $\kappa$ B 以外の LCN2 制御性転写因子 glucocorticoid receptor (GR) やその標的遺伝子の発現を解析したものの、有意な発現変動は認められなかった (Figure 2-11C)。

**Table 2-1.**

Diet composition

	C	Ch	CA	ChCA
	g/kg diet			
Corn starch <sup>1</sup>	397.5	394.5	397.5	394.5
Casein <sup>2</sup>	200	200	200	200
Dextrin <sup>3</sup>	132	129	131.5	128.5
Sucrose <sup>4</sup>	99.5	100	99.5	99.5
Soybean oil <sup>5</sup>	70	70	70	70
Cellulose <sup>6</sup>	50	50	50	50
Mineral mixture <sup>7</sup>	35	35	35	35
Vitamin mixture <sup>8</sup>	10	10	10	10
L-Cystine <sup>9</sup>	3	3	3	3
Choline hydrogen tartrate <sup>10</sup>	2.5	2.5	2.5	2.5
Cholesterol <sup>11</sup>	0	3	0	3
Cholic acid <sup>12</sup>	0	0	0.5	0.5

<sup>1</sup> Amylalpha (Chuo Shokuryo Co., Ltd.)<sup>2</sup> NZMP Acid Casein (Fonterra Co-Operative Group Limited.)<sup>3</sup> TK-16 (Matsutani Chemical Industry Co., Ltd.)<sup>4</sup> Nippon Beet Sugar Manufacturing Co., Ltd.<sup>5</sup> J-Oil Mills, Inc.<sup>6</sup> Microcrystalline cellulose (Ceolus PH-102, Asahi Kasei Corporation)<sup>7</sup> AIN-93G mineral mixture (MP Biomedicals)<sup>8</sup> AIN-93 vitamin mixture (CLEA Japan, Inc.)<sup>9</sup> L (-)-Cystine (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation,)<sup>10</sup> Choline Hydrogen Tartrate (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)<sup>11</sup> Cholesterol (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)<sup>12</sup> Cholic acid (Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation)



**Table 2-2.**

The primer sequences for qRT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Abcg5</i>	GTCATCGCCACGGTCATTTT	GGCCAAAAGAGCAGCAGAGA
<i>Abcg8</i>	ATCCATTGGCCACCCTTGTC	CTTTGCTGCGTCTGTCGATG
<i>Acc1</i>	AGCCTCCGTCAGCTCAGATACA	GTTTTACTAGGTGCAAGCCAGACA
<i>Atgl</i>	GCCAACGCCACTCACATCTA	GCCTCCTTGGACACCTCAAT
<i>Bmp6</i>	TCTTGCAGGAGCATCAGCAC	TTCCAGCCAACCTTCTTCTGA
<i>Ccl2</i>	ATGCAGGTCCCTGTCATGCT	GAGTGGGGCGTAACTGCAT
<i>Cpt1a</i>	GACTCCGCTCGCTCATTCC	ACCAGTGATGATGCCATTCTTG
<i>Cpt2</i>	CACAGCATCGTACCCACCAT	TCATTCAAGAGAGGCTTCTGTGC
<i>Cyp27a1</i>	CCAATGTGGACAACCTCCT	CTTGTGGTCTCGGTGGTC
<i>Cyp2c70</i>	AAGCTCTGATTGACCAGGGAGA	TCCATTGCTGAAGACGATGC
<i>Cyp3a11</i>	CAAACGCCTCTCCTTGCTGT	TATCCCCACTGGGCCAAAAT
<i>Cyp7a1</i>	CCTGCAACCTTCTGGAGCTTA	AGCCTCCTTGATGATGCTATCTAGT
<i>Cyp8b1</i>	ATGAGCTGTTCAGGAAGTTC	TGTCCTGCATGGATGAAGC
<i>Dmt1</i>	TTCCAGGATGTGGAGCACCT	CAGGCTTGTGAACGTGAGGA
<i>Dpep1</i>	CATGAGAACCACACCGGTCA	TGGTCTCAGCAGCTGGTTGT
<i>Fasn</i>	CTTCGGCTGCTGTTGGAAGT	TCGGATGCCTCTGAACCACT
<i>Fpn1</i>	ACCTGACCTCAGCAAAATTCC	CACTGCAAAGTGCCACATCC
<i>Fth1</i>	CATCAACC GCCAGATCAACC	GAGCCACATCATCTCGGTCA
<i>Gapdh</i>	TGACCTCAACTACATGGTCTACA	CTTCCCATTCTCGGCCTTG
<i>Gck</i>	CCTTCCCTGTAAGGCACGAA	TCGGAGAAGTCCCACGATGT
<i>Gclc</i>	AGAAGATGCGGAGGCATCAA	ATGCTGCAGGCTTGAATGT
<i>Gclm</i>	CAAATCAGCCCCGATTTAGTCA	CGGGATTTATCTTCTCCACTGC
<i>Ggt1</i>	AAGCGCTGCTCAGAGATTGG	CATGAGCCCCATACACAGCA
<i>Gpx1</i>	GGTTTCCCGTGCAATCAGTT	ACCAGGTCGGACGTAATTGA
<i>Gpx2</i>	GAGCTGCAATGTCGCTTTCC	GCTGTT CAGGATCTCCTCGTTC
<i>Gr1</i>	CACCACGACCATGATTCCAG	GTGGCCCTTTTCATCCGTCT
<i>Gss</i>	TGGATGCTGTCAGCCAGAAC	TGCCCTCTTTCAGGACTTGC
<i>Gsta1</i>	TGGGAAGGACATGAAGGAGAGA	TCTCTTTGGTCTGGGGGACA
<i>Gstm1</i>	TTCCCAAACCTGAGGGACTTC	CTCCAGTGGGCCATCTTTGA
<i>Gstp1</i>	TCGCGGCAAATATGTCACC	GGGACAGCAGGGTCTCAAAA

**Table 2-2.** continued

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Gstt1</i>	TACCTGGCATGGCAGCATAC	AACGTGGCTGCCAGTGTTTC
<i>Hamp</i>	AGCAGCACACCTATCTCCATC	GCAATGTCTGCCCTGCTTTC
<i>Hfe2</i>	TGGCTCGAGAACCCAGTATCA	CCGGTTCTTCCCAGATGATG
<i>Hmgcr</i>	ATGGCAGGACGCAACCTCTA	AGCTTCAGCAGTGCTTTCTCC
<i>Hmox1</i>	CAGATGGCGTCACTTCGTC	AGTGCTGATCTGGGGTTTCC
<i>Hp</i>	GCAATGGGTGAACACAGTCG	CATCCATAGAGCCACCGATGA
<i>Hpx</i>	CTGGAATCCCATACCCACCA	TGGCAAAGTCCCAGAACCAC
<i>Il1b</i>	CAATGTCACCTCCATCCTGGT	CAATGTCACCTCCATCCTGGT
<i>Il6</i>	TGATGGATGCTACCAAAGTGG	TTCATGTAAGTCCAGGTAGCTATGG
<i>Lcn2</i>	CAATGTCACCTCCATCCTGGT	CCCTGGAGCTTGGAAACAAAT
<i>Lcn2r</i>	CCTCTTCATCTTGGGCTTTGC	CCCAAGGTCAGCAGCACAAT
<i>Mrp1</i>	ACACTGCTGGGCATCACCAT	GCATAATTCCCAGGATTGGA
<i>Pde3b</i>	CCTGGATTTTATCCCTGCTCTG	TCAGCTGTGGAGTTGGGAAA
<i>Sreb1</i>	GCACAGCAACCAGAAGCTCA	ACTGCCACAAGCTGACACCA
<i>Sreb2</i>	TCTCAACGTCAGCGGCACTA	CCTGCTTTTGCCAGAGTGCT
<i>Star</i>	GGAGCTCTCTGCTTGGTTCTC	ACCTCCAAGCGAAACACCTT
<i>Tfr1</i>	TTCCGCCATCTCAGTCATCA	GCAGGACAGCTTCCTTCCATT
<i>Tfr2</i>	ACGCCTTGTTGGTCAACAACC	GGGCCCCAATGACAACATAG
<i>Tnfa</i>	ACTGAACTTCGGGGTGATCG	TGAGGGTCTGGGCCATAGAA
<i>Zip14</i>	GAGTGGGCCGGGATAATGTT	TCTGAGATCGCTCGCTCAAG

**Table 2-3.**

Measured fatty acids in this study

Numerical symbol	common name
12:0	Lauric acid
14:0	Myristic acid
16:0	Palmitic acid
16:1	Palmitoleic acid
18:0	Stearic acid
18:1	Oleic acid
18:2	Linoleic acid
18:3	Linolenic acid
20:1	Eicosenoic acid
20:4	Arachidonic acid
22:1	Erucic acid
22:4	Docosatetraenoic acid
20:0	Arachidic acid
22:0	Docosanoic acid
24:0	Lignoceric acid

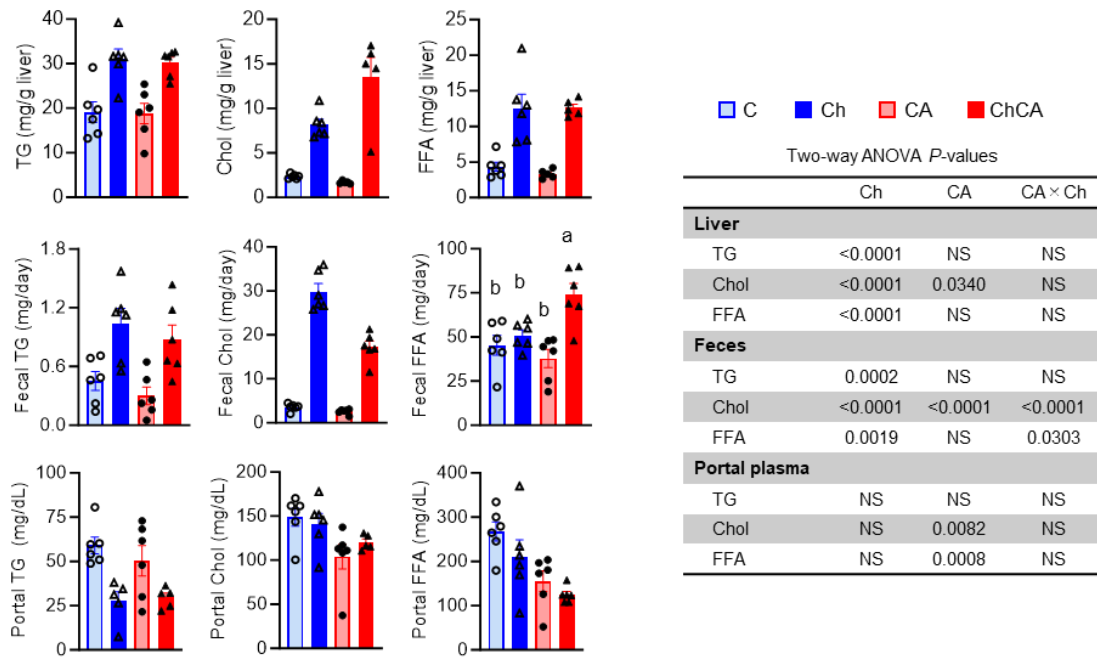
17:0 margaric acid was used as an internal standard.

**Table 2-4.**

Food intake and growth parameters

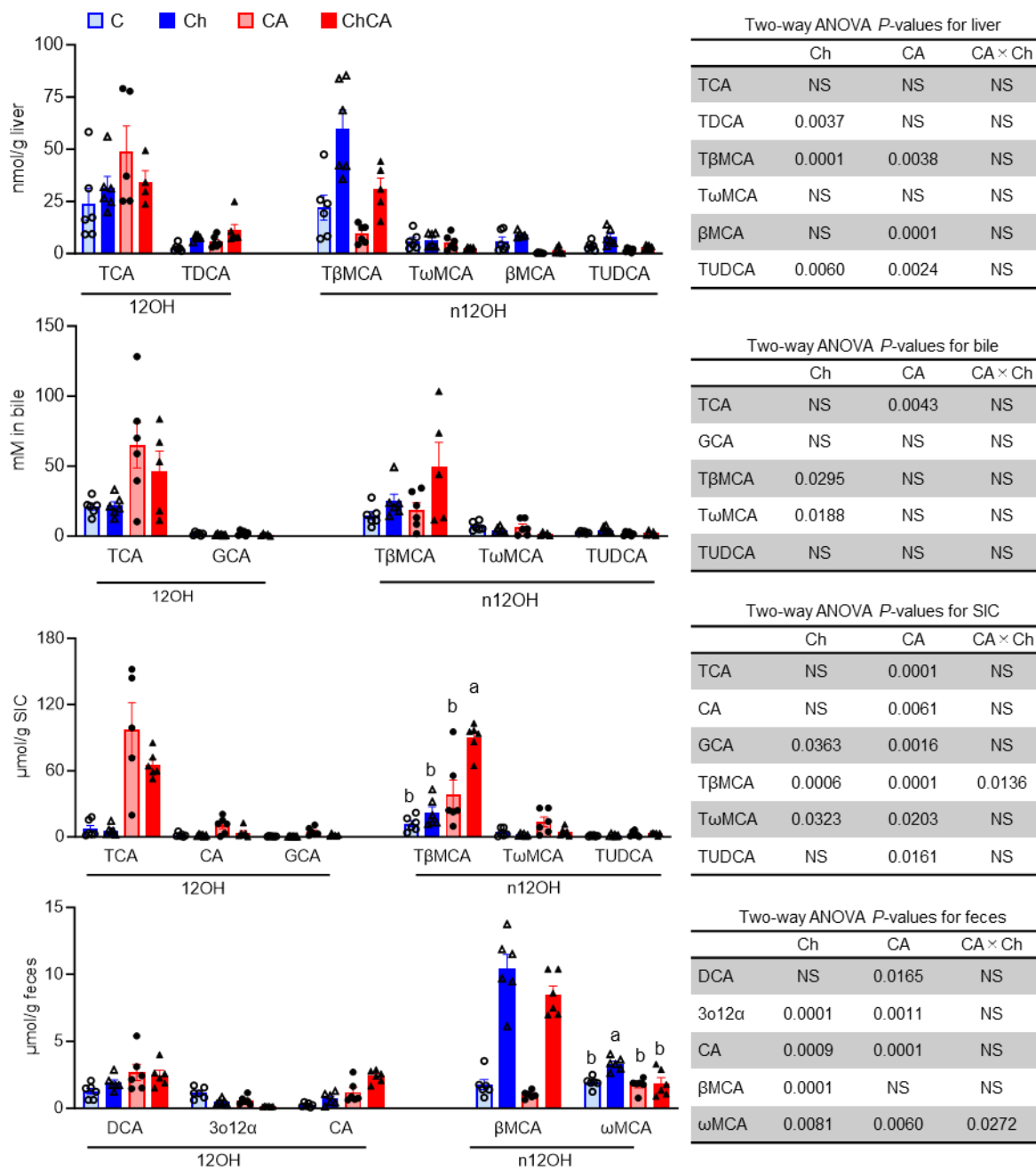
	C	Ch	CA	ChCA	Two-way ANOVA <i>P</i> -values		
					Ch	CA	Ch×CA
Food intake (g)	133.8 ± 6.3	125.2 ± 4.6	119.0 ± 4.7	113.9 ± 5.1	NS	0.0221	NS
Chol intake (mg)	7.1 ± 0.3	382.1 ± 14.1	6.3 ± 0.3	347.8 ± 15.6	<0.0001	NS	NS
Final BW (g)	25.1 ± 0.6	23.1 ± 0.4	22.0 ± 0.6	20.7 ± 1.2	0.0412	0.0017	NS
Organ weight (g/100 g BW)							
Liver	3.9 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2	5.0 ± 0.4	0.0306	0.0385	NS
eWAT	2.4 ± 0.3	2.1 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	NS	<0.0001	NS
Gallbladder	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.10 ± 0.10	NS	NS	NS

Values are presented as mean ± SEM (n = 6).



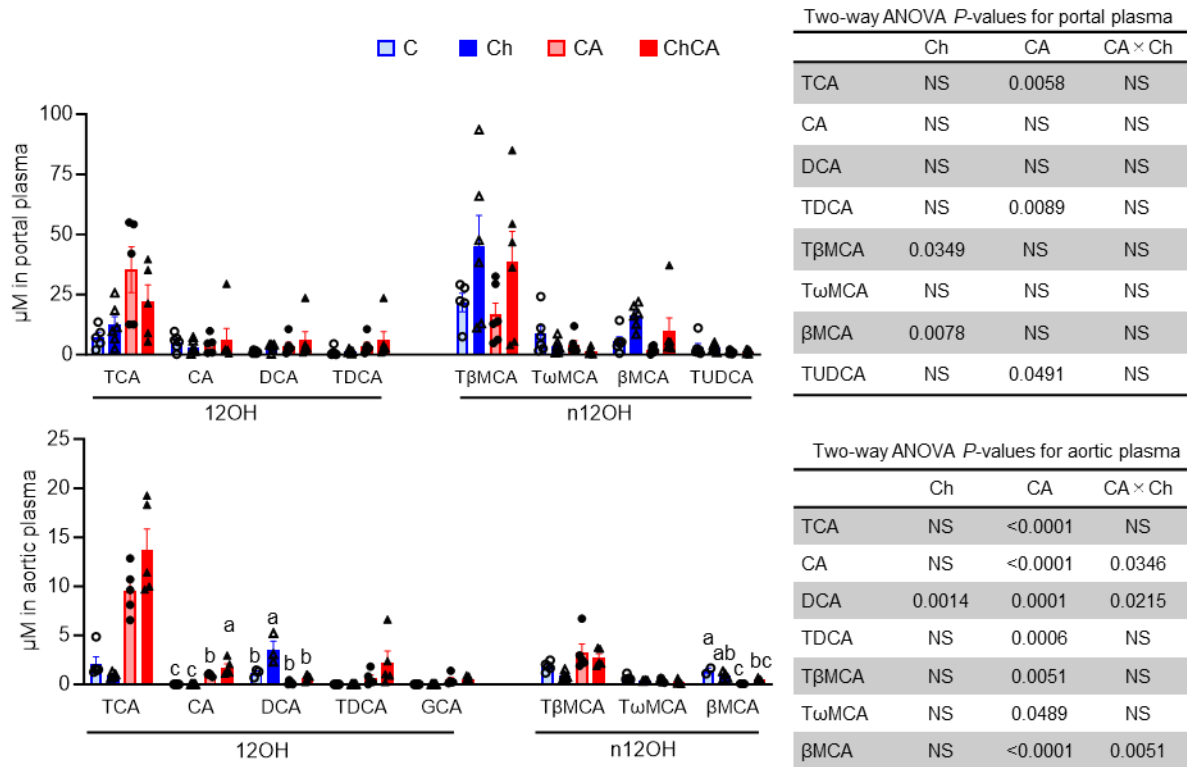
**Figure 2-1.** Lipid parameters in liver, feces, and portal plasma

Each data plot in control mice (C), Chol-fed mice (Ch), CA-fed mice, and ChCA-fed mice is shown as open circles, open triangles, closed circles, and closed triangles, respectively. Values are presented as the means  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 6$ ). Two-way ANOVA *P*-values are shown in the inset table. Post hoc test with the Turkey-Kramer was performed when the interaction was significant in two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). Values not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer test).



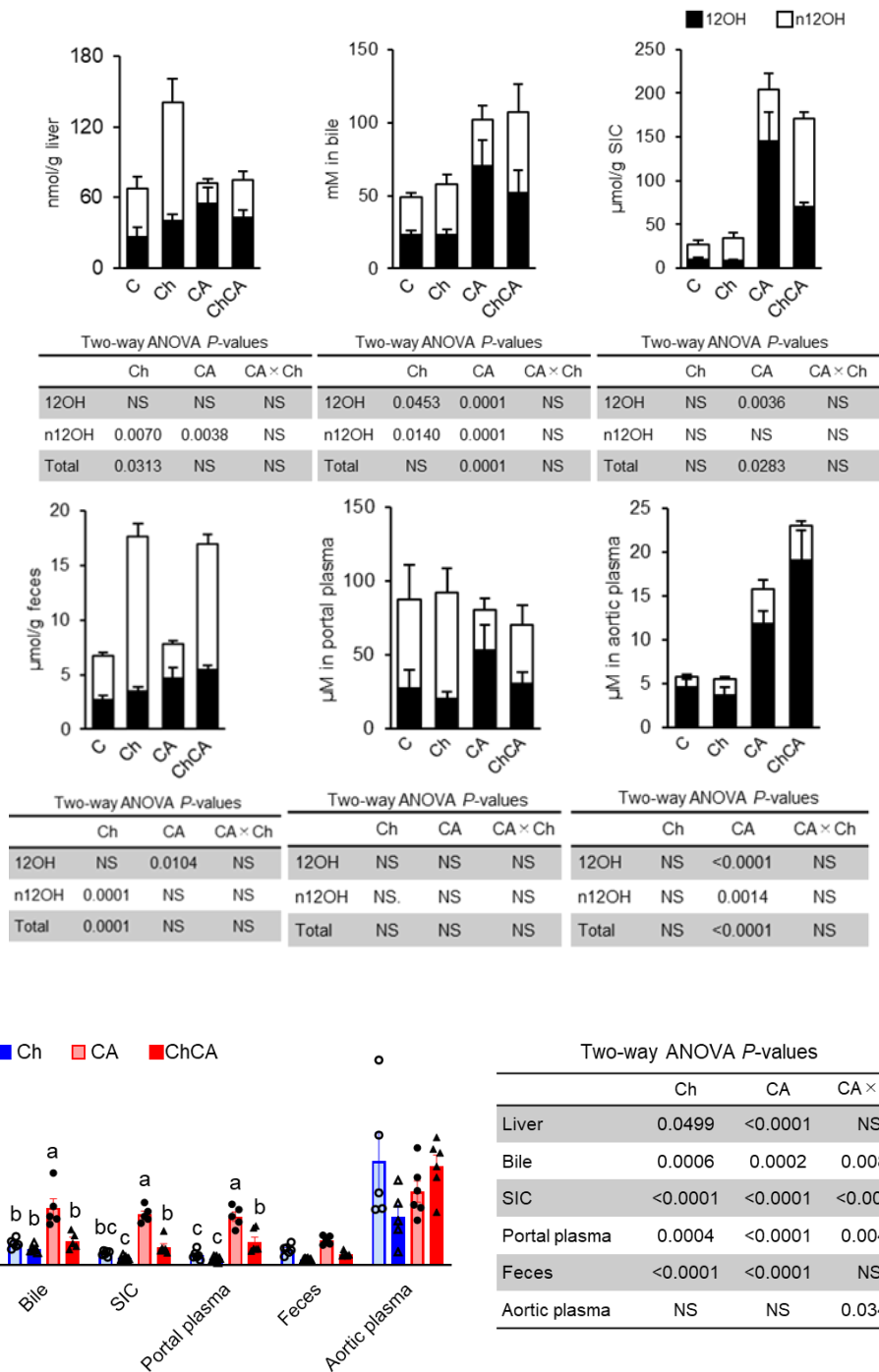
**Figure 2-2.** BA compositions in liver, bile, SIC, and feces

Each data plot in control mice (C), Chol-fed mice (Ch), CA-fed mice, and ChCA-fed mice is shown as open circles, open triangles, closed circles, and closed triangles, respectively. Values are presented as the means  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 6$ ). Two-way ANOVA *P*-values are shown in the inset table. Post hoc test with the Turkey-Kramer was performed when the interaction was significant in two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). Values not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer test). BAs account for less than 1% of the total BA concentration are not presented in this graph.



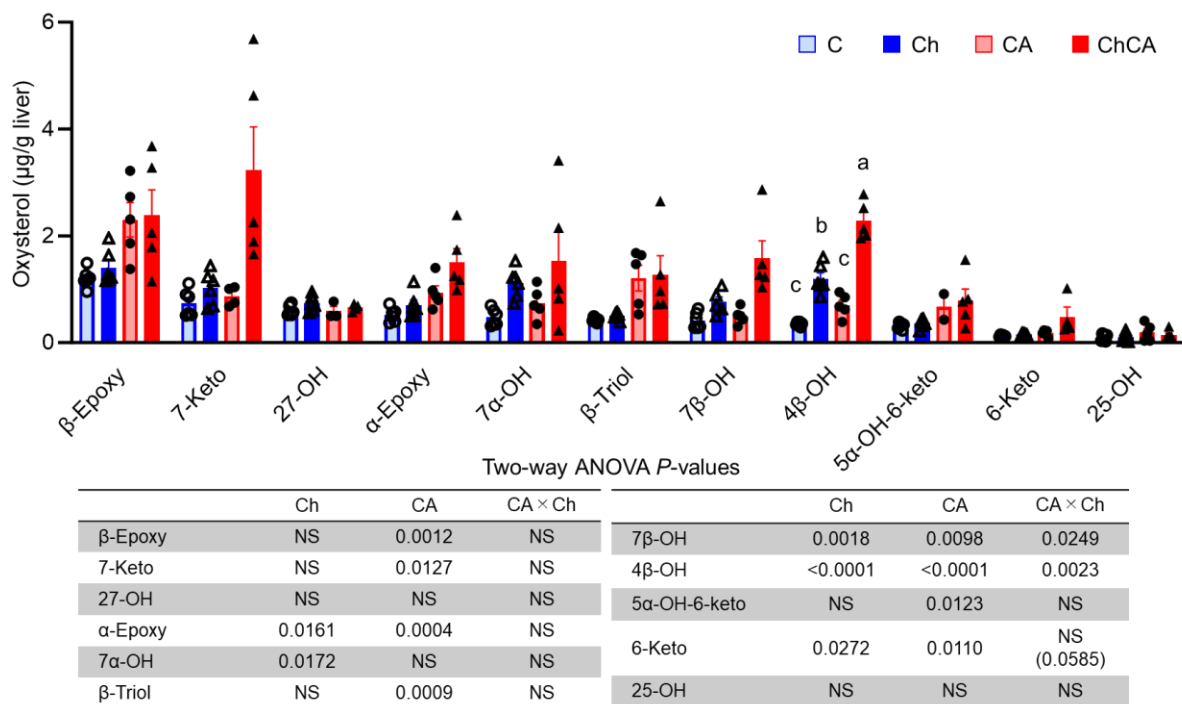
**Figure 2-3.** BA compositions in aortic plasma and portal plasma

BA compositions in aortic plasma and portal plasma. Each data plot in control mice (C), Chol-fed mice (Ch), CA-fed mice, and ChCA-fed mice is shown as open circles, open triangles, closed circles, and closed triangles, respectively. Values are presented as the means  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 6$ ). Two-way ANOVA *P*-values (Ch  $\times$  CA) are shown in the inset table. Post hoc test with the Turkey-Kramer was performed when the interaction was significant in the two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). Values not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer test). BAs account for less than 1% of the total BA concentration are not presented in the graphs.



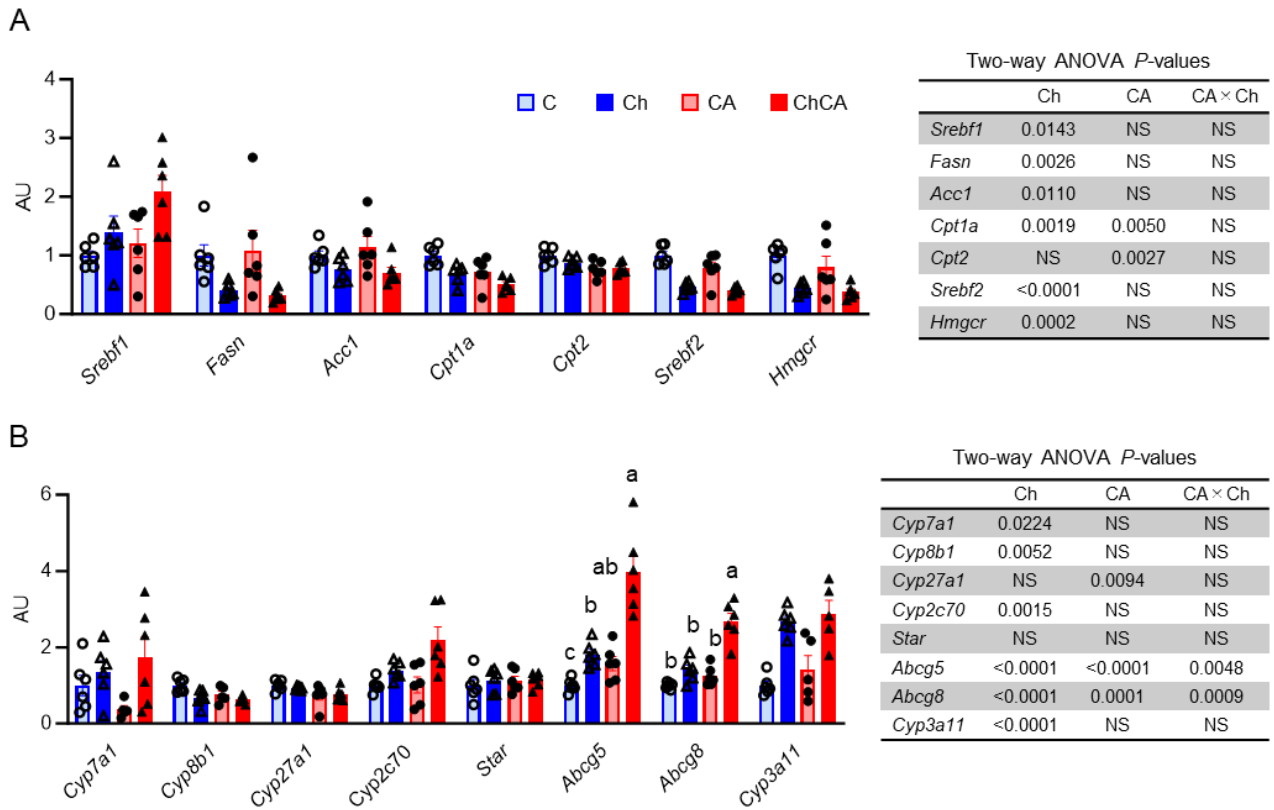
**Figure 2-4.** Concentration of total BA and the proportions of 12OH and n12OH BAs in liver, bile, SIC, feces, portal plasma and aortic plasma. Each data plot in control mice (C), Chol-fed mice (Ch), CA-fed mice, and ChCA-fed mice is shown as open circles, open triangles, closed circles, and closed triangles, respectively. Total BA concentration and the proportions of 12OH and n12OH BAs. Values are presented as the means + SEM (n = 4 - 6). 12OH and n12OH BAs are shown in black and white bar, respectively. Two-way ANOVA *P*-values are shown in the inset tables. Values not sharing the same letter are significantly different (*P* < 0.05, Tukey-Kramer test).





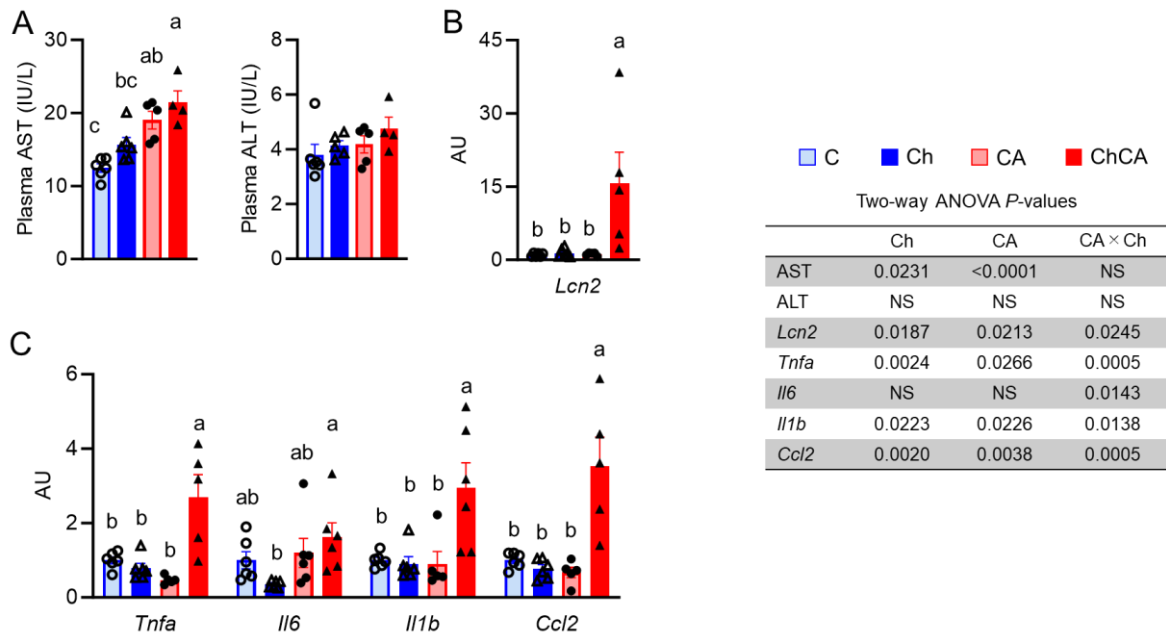
**Figure 2-5.** Hepatic oxysterol compositions

Each data plot in control mice (C), Chol-fed mice (Ch), CA-fed mice, and ChCA-fed mice is shown as open circles, open triangles, closed circles, and closed triangles, respectively. Values are presented as the means  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 6$ ). Two-way ANOVA *P*-values are shown in the inset table. Post hoc test with the Turkey-Kramer was performed when the interaction was significant in two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). Values not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer test).

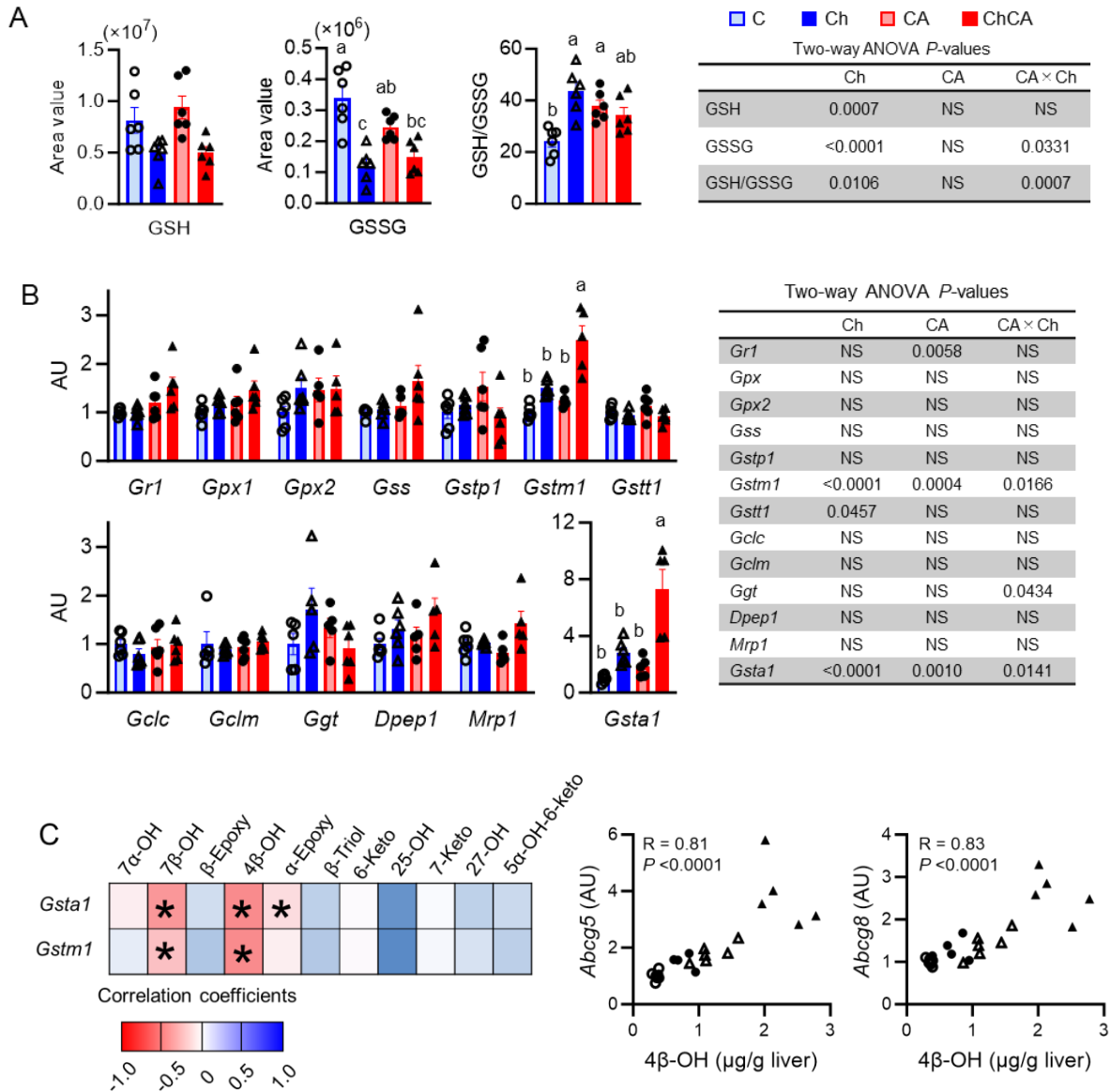


**Figure 2-6.** Hepatic gene expressions

(A) Lipid metabolism-related genes. (B) Chol metabolism-related genes. Each data plot in control mice (C), Chol-fed mice (Ch), CA-fed mice, and ChCA-fed mice is shown as open circles, open triangles, closed circles, and closed triangles, respectively. Values are presented as the means  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 6$ ). Two-way ANOVA *P*-values are shown in the inset table. Post hoc test with the Turkey-Kramer was performed when the interaction was significant in two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). Values not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer test).

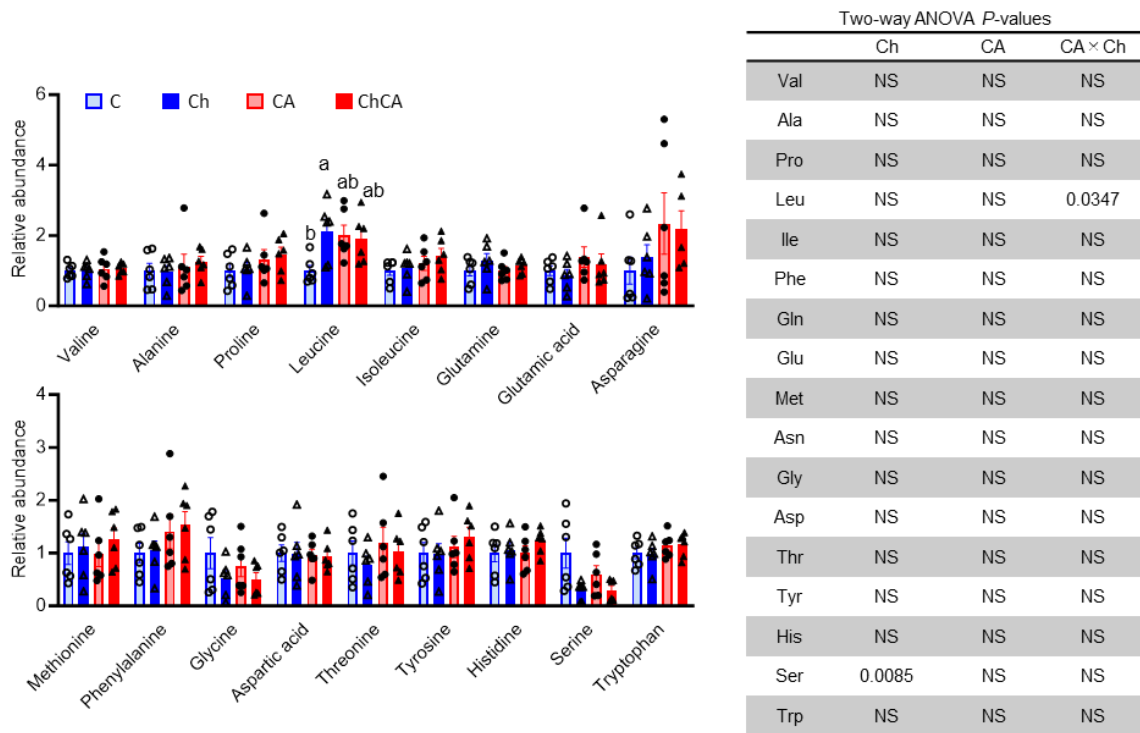


**Figure 2-7.** Plasma transaminase activities and hepatic inflammation-related gene expressions (A) Plasma AST and ALT activities. (B) hepatic *Lcn2* expression, and (C) hepatic inflammation-related gene expressions. Each data plot in control mice (C), Chol-fed mice (Ch), CA-fed mice, and ChCA-fed mice is shown as open circles, open triangles, closed circles, and closed triangles, respectively. Values are presented as the means  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 6$ ). Two-way ANOVA  $P$ -values are shown in the inset table. Post hoc test with the Turkey-Kramer was performed when the interaction was significant in two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). Values not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer test).



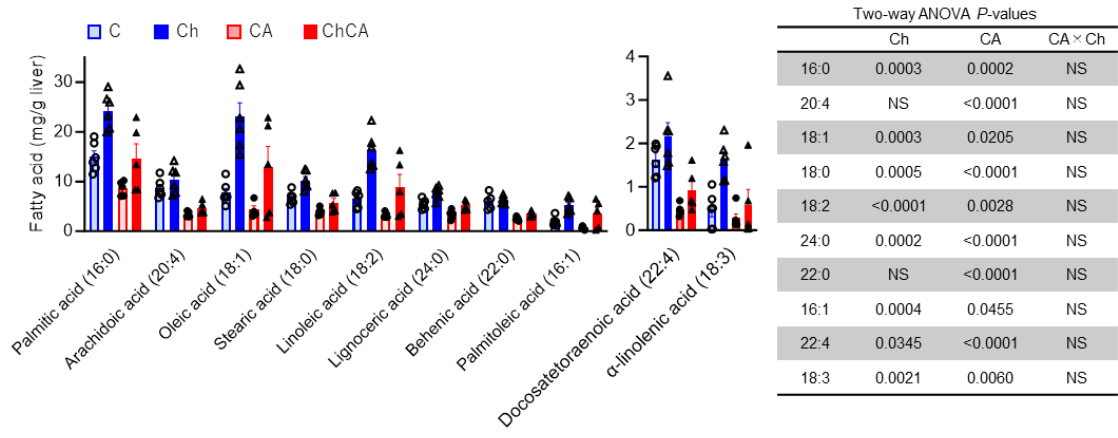
**Figure 2-8.** Relationships between glutathione metabolism and oxysterol metabolism in the liver

(A) The levels of GSH and GSSG with the ratio of GSH/GSSG in the liver. (B) hepatic gene expressions in relations to glutathione metabolism. (C) Correlation among oxysterol concentrations, glutathione-related gene expressions, and the expressions of Chol transporters Each data plot in control mice (C), Chol-fed mice (Ch), CA-fed mice, and ChCA-fed mice is shown as open circles, open triangles, closed circles, and closed triangles, respectively. Values are presented as the means  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 6$ ). Two-way ANOVA *P*-values are shown in the inset table. Post hoc test with the Turkey-Kramer was performed when the interaction was significant in two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). Values not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer test).



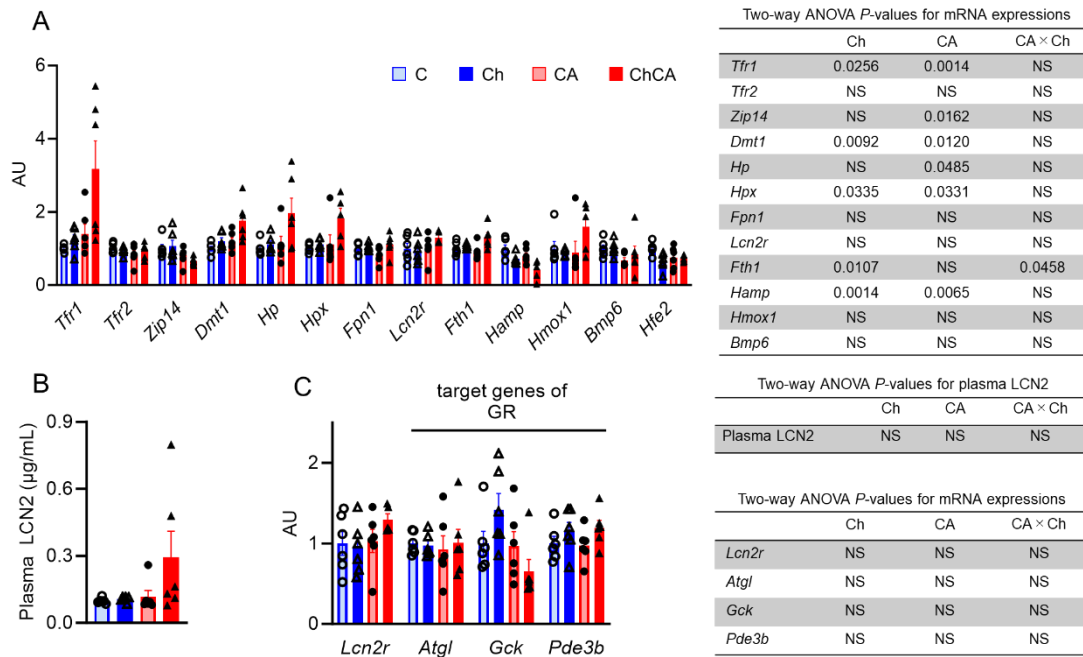
**Figure 2-9.** Alterations of amino acid abundance in the liver

Each data plot in control mice (C), Chol-fed mice (Ch), CA-fed mice, and ChCA-fed mice is shown as open circles, open triangles, closed circles, and closed triangles, respectively. Values are presented as the means  $\pm$  SEM ( $n = 5 - 6$ ). Two-way ANOVA *P*-values are shown in the inset table. Post hoc test with the Turkey-Kramer was performed when the interaction was significant in two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). Values not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer test).



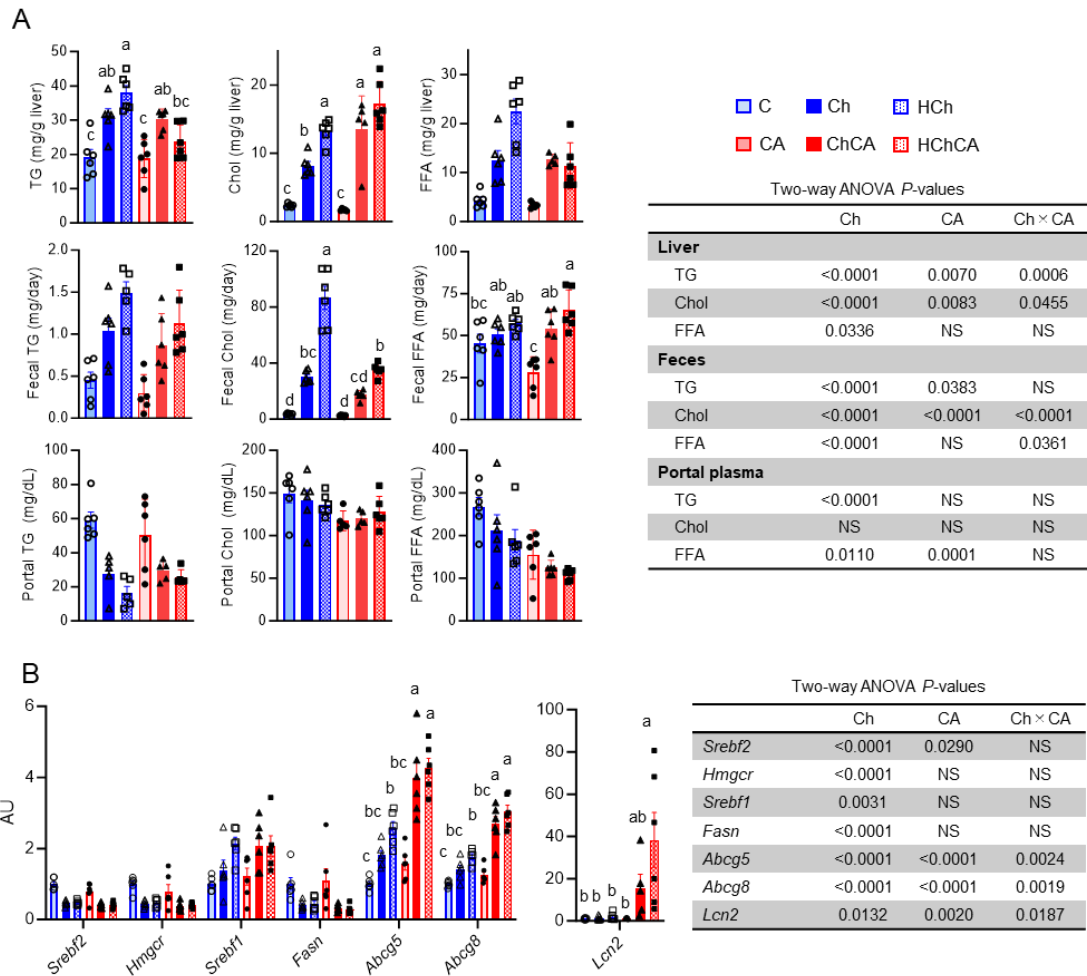
**Figure 2-10.** Alterations of fatty acid compositions in the liver

Each data plot in control mice (C), Chol-fed mice (Ch), CA-fed mice, and ChCA-fed mice is shown as open circles, open triangles, closed circles, and closed triangles, respectively. Values are presented as the means  $\pm$  SEM (n = 5 - 6). Two-way ANOVA *P*-values are shown in the inset table. Post hoc test with the Turkey-Kramer was performed when the interaction was significant in two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). Values not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer test).



**Figure 2-11.** Hepatic gene expressions related with iron metabolism and LCN2 transcription

(A) The expressions of iron metabolism-related genes. (B) LCN2 protein concentration in portal plasma. (C) The expressions of LCN2 metabolism-related genes. Each data plot in control mice (C), Chol-fed mice (Ch), CA-fed mice, and ChCA-fed mice is shown as open circles, open triangles, closed circles, and closed triangles, respectively. Values are presented as the means  $\pm$  SEM (n=5-6). Two-way ANOVA P-values are shown in the inset table. Post hoc test with the Turkey-Kramer was performed when the interaction was significant in two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). Values not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer test).



**Figure 2-S1.** Lipid parameters and hepatic mRNA expressions in mice fed a higher level of cholesterol supplementation to the diet

(A) The concentrations of TG, Chol and FFA in liver, feces, and portal plasma. (B) Relative mRNA expressions in the liver. Additional groups of mice were fed with diets with a higher level of Chol at 6 g Chol/kg diet (HCh) without or with CA at 0.5 g CA/kg diet (HChCA). The additional Chol was supplemented at the expense of dextrin. Each data plot in control mice (C), Chol-fed mice (Ch), CA-fed mice, ChCA-fed mice, HCh-fed mice, and HChCA-fed mice is shown as open circles, open triangles, closed circles, closed triangles, open square, and closed square, respectively. Values are presented as the means  $\pm$  SEM (n=5 - 6). Two-way ANOVA *P*-values (Ch  $\times$  CA) are shown in the inset tables. Post hoc test with the Turkey-Kramer was performed when the interaction was significant in the two-way ANOVA ( $P < 0.05$ ). Values not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer test).



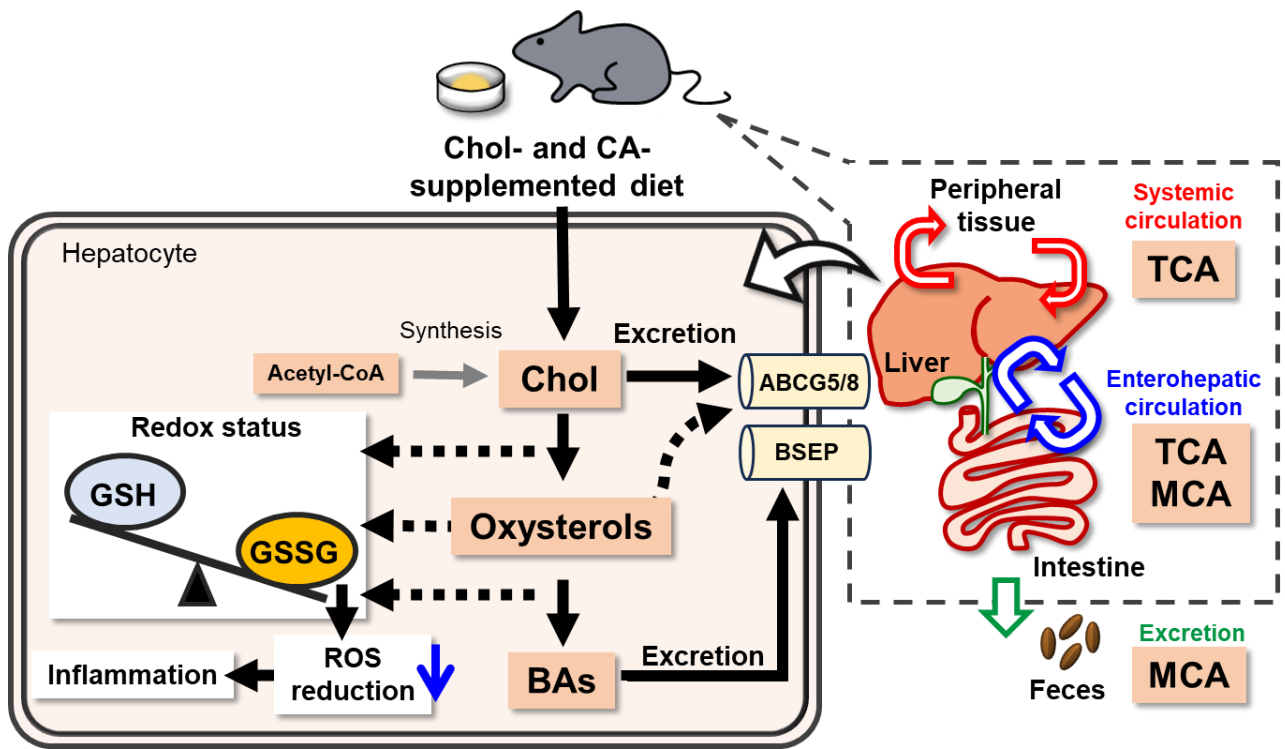


Figure 2-S2. Graphical abstract

## 考察

Chol または CA の食餌への添加は、マウスにおける食餌誘導性肝脂質蓄積のモデルとして用いられている (Santhekadur PK et al., 2018)。しかし、これらを利用した実験において、酸化 Chol や BA を含むステロール代謝に関する情報はほとんどない。BA の多様な生理作用に加えて、CA の添加食がラットの肝脂質蓄積を促進することが示されている (Lee JY et al., 2020)。マウスでの食餌誘導性肝脂質蓄積におけるステロールの作用を明らかにするためには、Chol や BA の代謝変動と関連症状との関係性を評価する必要がある。本研究においては、Chol と CA の組み合わせにより、肝臓における酸化 Chol 濃度の顕著な増加、*Abcg5/8* の発現上昇、炎症関連遺伝子発現の亢進が引き起こされることを見出した。

当初、より高い Chol 添加レベルとして 6 g/kg 食餌を用いた群も設定した。しかしこの群では、3 g/kg の Chol 添加食群と比較して、糞便中の Chol 排泄量は有意に増加した一方で肝脂質蓄積量は増加せず、負荷された Chol の多くが排出されてしまう結果となった。また、過剰な Chol 補給は胆石の形成につながる可能性がある (Hashimoto N et al., 2021)。ChCA 食を与えたマウスの胆のうからは 1 個体のみ小さな胆石が検出されたが、それ以外のマウスで胆石は検出されなかった。過剰な Chol 負荷は、胆石のような肝脂質蓄積以外の症状を引き起こす可能性があり注意を要する。日常の食習慣における多様な経路を介した微妙な代謝変動の積み重ねが肝脂質蓄積の誘導に関与することを考慮すると、より現実的なステロール負荷条件において Chol 代謝の変動に伴って増減する代謝物を評価する必要がある。本研究では、マウスの場合には 3 g/kg の Chol 負荷が妥当であることを見出した。

BA 合成は、Cytochrome P450 (CYP) 酵素による Chol の水酸化反応により進行するが、この反応には NADPH、すなわち NADP による還元力が必要である (Pandey AV et al., 2013)。したがって、肝細胞での酸化還元バランスがステロール代謝の亢進で変動することが示唆される。本試験では Chol 添加食を与えたマウスでは GSH/GSSG 比が上昇したが、CA との併用では GSH/GSSG 比が低下した (Figure 2-8A)。NADPH は GSH の産生と DNL にも使用される (Ju HQ et al., 2020)。GSH/GSSG 比は Chol 単独では増加するものの、CA の組み合わせによりその増加が減弱する方向になることから (Figure 2-8A)、酸化ストレスを受けやすい状態に遷移していることが示唆された。また Chol 添加では、基質の減少によってグルタチオン生合成が抑制される可能性が示され、酸化還元バランスが破綻しつつあることが考

えられる (Figure 2-8A, Figure 2-9)。血中 ALT 活性に差がみられないことから重篤な炎症は惹起されていないことが推察される一方で、Chol と CA の組み合わせでは ROS によって産生される 7 $\beta$ -OH (Dyer RG et al., 1997) や 7-Keto (Vejux A et al., 2009) の濃度が相乗的に上昇し、NF- $\kappa$ B 活性化に応答する遺伝子の発現が増加した (Figure 2-5, Figure 2-8B, C)。特に、NF- $\kappa$ B の標的遺伝子である LCN2 (Zhao P et al., 2014; Borkham-Kamphorst E et al., 2021) の発現は他遺伝子と比較して非常に強く増強されており、*Lcn2* 発現が NF- $\kappa$ B の転写活性化によって優先的に誘導された可能性を示す。また、Chol および CA の組み合わせによる 4 $\beta$ -OH 濃度と *Abcg5/8* 発現の相乗的発現増加は、Chol と酸化 Chol の排出を促進する LXR の活性化によるものと考えられる (Figure 2-8C)。Chol と CA の共摂取による Chol 吸収量の増加時には、Chol 排泄の亢進が起こり、Chol と CA の同時摂取によって必ずしも肝脂質蓄積が促進されなかった理由の一つと考えられる。また、Chol 摂取による肝 TG 蓄積は LXR $\alpha$ /SREBF1 の発現増加を介した DNL の促進によるものであると推察できる (Figure 2-1, Figure 2-6A) (Luo J et al., 2020)。しかし、SREBF1 の標的遺伝子である *Fasn* や *Accl* の発現は、Chol 摂取により有意に減少しており、遺伝子発現のみで解釈できる状況ではなかった (Figure 2-6A)。核内の成熟型 SREBF1 タンパク質は絶食後 3 時間程度で著しく減少する (Horten JD et al., 1998)。更に、*Fasn* や *Accl* は miR-27a によって翻訳抑制されるため、これらの発現制御機構が働いたことで、*Srebfl* の発現量との整合性が認められなかった可能性がある (Zhang M et al., 2017)。Chol 添加により肝臓に蓄積された脂質分子種では、アラキドン酸やベヘン酸では有意な増加は認められず、合成される脂肪酸の特異性が示唆された (Figure 2-10)。本試験における脂肪酸組成の解析サンプルは溶解/濃縮を繰り返しており、この回数が C・Ch 群と CA・ChCA 群で異なることが各分子種の量的変動に影響した可能性があり解釈には注意を要する。

Chol を摂取したマウスの肝臓および糞便中の BA プロファイルにおいて、肝臓および糞便中の T $\beta$ MCA および  $\beta$ MCA 濃度はそれぞれ増加した (Figure 2-3)。このことは、Chol を負荷した場合にマウスの肝臓では Chol を T $\beta$ MCA などの n12OH BA に優先的に変換し、これを糞中に  $\beta$ MCA として排泄している可能性が示された。本研究では、*Cyp2c70* 発現増加は顕著ではなかったにもかかわらず、Chol を摂取したマウスでは  $\beta$ MCA の糞中排泄量が非常に増加した (Figure 2-6B)。その一方、*Cyp8b1* の発現量には Chol 摂取で有意な減少が観察されたが、群間でそのレベルに大きな変化は認められなかった (Figure 2-6B)。これらの結果は、このレベルの Chol 負荷では Chol を n12OH BA に変換するのに十分な

CYP2C70 活性があり、マウスでは 12OH BA 合成よりもむしろ n12OH BA 合成経路が優勢であることを示唆している。

*Cyp3a11* の発現は、Chol 添加により増加した (Figure 2-6B)。CYP3A11 は、4 $\beta$ -OH を産生し、LXR の活性化を介して、肝臓や小腸で *Abcg5* や *Abcg8* などの Chol 排出因子の発現を誘導すると考えられる (Janowski BA et al., 1996; Repa JJ et al., 2002)。4 $\beta$ -OH 濃度の顕著な増加は Chol と CA の組み合わせ群で相乗的に増加したため、摂取 CA の増加が BA 合成を部分的に抑制することが酸化 Chol 産生を増やしているのかもしれない (Figure 2-5)。したがって、Chol と CA の組み合わせでは過剰な食餌性 Chol およびそれを基に作られる酸化 Chol が ABCG5 および ABCG8 を介して肝臓および小腸から BA としての形態を介さずに排泄されることが示唆された。

マウスでは肝臓に T $\beta$ MCA を蓄積する能力がある可能性を考えることもできる。これは胆汁や SIC では、肝臓で認められた T $\beta$ MCA の増加が認められなかったことと表裏一体の関係にあると考えられる。本研究では、2 日間にわたり採取された糞便を糞中 BA 分析に用いているため、ここで糞中 BA 組成は、腸管内に分泌された BA の日内変動を累積した値と考えられる。一方、胆汁と SIC は解剖時に採取されたものであり、これらの組織内 BA 組成は解剖時点の一時的な BA 組成を反映する。CA 摂取では胆汁、SIC、門脈血漿において高濃度の TCA が観察された (Figure 2-2, Figure 2-4)。BA 取り込みを担う ASBT は、MCA などの n12OH BA と比較して TCA を効率よく取り込むことが報告されている (Kramer W et al., 1999)。これらのことから、TCA は選択的に腸肝循環に関わる部位で循環する一方、 $\beta$ MCA は排泄されやすいことが示唆される。

本章の結論として、食餌性 Chol 負荷における CA の添加は、単に Chol 吸収を促進するだけではなく、ステロール代謝変動を介して酸化還元状態や炎症関連遺伝子の発現亢進に関わることが示された。本研究における食餌への Chol と CA の添加量は、従来使用されている添加量より低かったものの、肝臓での酸化 Chol 濃度、酸化還元状態、Chol トランスポーター発現増加において、Chol 及び CA 添加による相乗効果が認められた。これらの現象に NF- $\kappa$ B/LCN2 経路に関わる可能性が示された。

## 総括

本研究では、MASLDの未病状態における12OH BAの役割を明らかにすることを目的とし、マウスにおける肝脂質蓄積とステロール代謝変動をHF食とChol・CA添加食を用いて検証した。そして、ラットの先行研究(Lee JY et al., 2020, Hori et al., 2020)との比較で、動物種間でのステロール代謝の相違を検証した(Table 3)。第1章では、ラットにおいてHF食摂取が腸肝循環内12OH BA濃度の増加を引き起こすことを踏まえて、HF食を摂取させたB6マウスにおけるBA組成の変動を評価した。その結果、B6マウスのBA組成はHF食摂取によって明確な12OH BA濃度の増加は観察されず、むしろn12OH BA濃度が減少することが明らかとなった。肝臓、SICおよび門脈血漿での12OH BA濃度と肝TG蓄積量との間に相関は認められなかったが、糞中の12OH BA/n12OH BA比のみ肝TG濃度との間に正の相関が認められた。このことは、マウスにおいても糞中の12OH BAの相対濃度を用いることで肝脂質蓄積の程度を予測しうる得ることを示している。第1章ではエネルギー摂取過多でのステロール代謝変動についての解析であったため、第2章ではステロール負荷のみを誘導した際のB6マウスにおける肝脂質及びステロール代謝の変動を解析した。摂取Chol量の増加は、門脈血漿でのn12OH BA濃度の増加や糞へのn12OH BA排泄の増加を引き起こしたが、12OH BAの代謝には影響を及ぼさなかった。CA摂取は12OH BA/n12OH BA比は増加させたものの、肝脂質蓄積を誘導しなかった。これらのことは、糞中12OH BA/n12OH BA比の増加が肝TGと相関関係を示すのは、エネルギーが潤沢に存在することが必要条件であることが示唆された。また、CholとCAを組み合わせた食餌は肝脂質及び酸化Chol濃度、炎症関連の遺伝子発現をより強く増加することが明らかとなった。

これらの結果を踏まえると、ラットとマウスでは過剰脂質や過剰ステロール摂取に対しステロール代謝変動が異なることが示唆された。本研究で使用したB6マウスにおいて肝臓、小腸、門脈血漿中において最も豊富なBAはT $\beta$ MCAであった(Figure 1-2, Figure 2-2)。その一方で、WKAH/HkmSlcラットを用いた先行研究では、TCAまたはCAが豊富であった(Hori S et al., 2020)。これらのBA組成の違いは消化管上皮細胞または肝細胞におけるFXRの転写活性の違いを生じさせている可能性がある。FXRはBAと結合し転写活性化されると、肝臓においてはBA合成酵素や門脈血からBAを取り込むインポーターの発現抑制、消化管上皮細胞においては管腔からのBA取り込みを担うトランスポーターの発現抑制等を誘導し、腸肝循環内のBA量を減少させる代謝変動を誘導する(Lefebvre P et al., 2009)。そのため、FXR

のアンタゴニストである MCA が恒常的に多い B6 マウスのような生物種は FXR が常に抑制される環境にあることが推察される (Sayin SI et al., 2013)。この環境を有する生物はそうでない生物と比較して、肝臓において BA が合成されにくく、腸管に分泌された BA は再吸収されにくい代謝動態をとる可能性がある。本研究では HF 摂取および Chol または Chol と CA の組み合わせ食摂取の全てで、B6 マウスの Chol 排泄量が有意に増加することを見出している (Figure 1-1C, 1-1F, 2-1)。一方、HF 食摂取 WKAH/HkmSlc ラットにおいてこの傾向は認められていない (Hori S et al., 2020)。Chol を BA に代謝しにくい状況では、容易に肝臓内に Chol が蓄積される可能性がある。このことは、マウスにおいて様々な酸化 Chol が増加する要因の一つとなることを示唆している (Figure 1-1D, 2-5)。肝臓での Chol や酸化 Chol の濃度増加は、LXR の活性化を介して、Chol 生合成の抑制および肝外への Chol 排泄を促進する (Lu R et al., 2009; Holy P et al., 2018; Liu Y et al., 2018)。したがって、B6 マウスのような FXR を抑制しやすい体内環境を有する生物では、BA を介した Chol 排泄よりも Chol の直接排泄や生合成の抑制を行うことで Chol 恒常性を維持している可能性がある。Schwarz らの報告によると、マウスにおける一日の肝臓 Chol 収支の内訳は、生合成から約 3.3 mg、食餌からは約 0.4 mg 増加し、BA として約 0.9 mg、胆汁中への直接排泄として約 1.6 mg 減少することが報告されている (Schwarz M et al., 1998)。マウスが Chol 生合成を中心に肝臓内の Chol 量を増加させる代謝動態をとるのは、酸化 Chol を介して LXR または SREBP2 による Chol 生合成を制御しやすいことに起因するのかもしれない。LXR の活性化は DNL を促進させる (Repa JJ et al., 2000)。しかし、LXR のリガンドである 4 $\beta$ -OH 濃度が増加する CA 添加食摂取マウスにおいて、肝脂質蓄積が更に増加する傾向は認められなかった (Figure 2-1, Figure 2-5)。一方ラットでは、CA 添加食摂取によって 4 $\beta$ -OH 濃度が増加し、肝脂質蓄積が増加していた (Lee JY et al., 2020)。ラットと比較して、マウスは体重当たりの体表面積が大きいため熱放散が起りやすく、また運動量が異なる可能性がある。このことから、BW に対して同程度のエネルギーを摂取した場合でも、肝臓へ蓄積できるエネルギー量はマウスの方が少ないことが推察される。つまり、両生物種とも 4 $\beta$ -OH の増加によって DNL は促進されるものの、マウスではエネルギー消費量の差異から肝脂質蓄積が観察されなかった可能性がある。

マウス (Figure 1-3)・ラット (Hori S et al., 2020) では共に、HF 食摂取において肝 TG 濃度と糞中 12OH

BA/n12OH BA 比が正の相関を示した。しかし、CA 摂取マウスにおいてはこの関係は認められなかった。この結果を受けて、マウスにおいては摂取脂質量が過多となる場合に 12OH BA/n12OH BA 比と肝 TG 濃度とが相関すると予想した。アデノウィルスを用いて CYP8B1 を過剰発現させた B6 マウスにおいて、胆のう中の TCA 濃度は約 1.5 倍程度増加し、MCA 濃度は約 2 割減少する (Pathak P et al., 2019)。このマウスを通常食で飼育すると、肝臓での SREBF1 及び *Fasn* の発現が増加するが、肝脂質蓄積量に有意な差は生じない。しかし、HF 食摂取 CYP8B1 高発現マウスでは、BW の変化なしに肝 TG 濃度が増加した (Pathak P et al., 2019)。CYP8B1 欠損 B6 マウスでは、腸、肝臓、胆のうの平均 12OH BA 濃度が、野生型の 1 割以下に減少し、n12OH BA 濃度が約 2 倍に増加した。12OH BA/n12OH BA 比は野生型では 1.87 であったが CYP8B1 欠損マウスでは 0.06 にまで減少した (Bertaggia E et al., 2017)。この状態のマウスに通常食を与えると、脂肪組織の減少により BW が僅かに減少し、血中インスリン量が減少し耐糖能異常が認められた。一方で、このマウスに西洋食 (4.5 kcal/g, エネルギー比として 42%が脂質由来) を摂取させると、肝臓中アシルグリセロールと Chol の濃度は通常食摂取マウスと同程度で、血漿中の Chol および TG の濃度にも差は認められなかった。更に、このマウスに無脂肪食を給餌しても BW、脂質量、肝脂質蓄積濃度には見られない。この時、摂取エネルギー量にも差異は認められない。これらの知見をまとめると、12OH BA の代謝変動に伴い肝脂質蓄積量変動するのは、HF 食を摂取している条件下であり、12OH BA/n12OH BA 比と肝 TG 濃度との関係は摂取エネルギー量よりも摂取脂質量に依存する可能性が考えられる。BA には消化管での脂質吸収の促進作用がある一方で、CYP8B1 過剰発現マウスでは mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1)/pS6K の活性化が SREBF1 誘導性の DNL を促進することが報告されていることから (Pathak P et al., 2019)、12OH BA が肝脂質蓄積の亢進に関わる機構が吸収促進以外にもあるものと推察される。

CA 添加食によって 4 $\beta$ -OH が増加する代謝変動はマウスとラットで共通するため、4 $\beta$ -OH が関与する経路に関しても興味を持たれる。4 $\beta$ -OH は CYP3A11 によって合成される酸化 Chol である (Diczfalusy U et al., 2011)。CYP3A サブファミリーは消化管上皮細胞および肝臓において特に発現量が多い CYP 酵素であり、NASH 誘導食摂取マウスの肝臓において発現が増加する (Suzuki S et al., 2016)。PXR または constitutive androstane receptor (CAR) の活性化により CYP3A11 の転写が活性化される (Zanger UM et al.,



2013)。CAR および PXR はどちらも BA をリガンドとして活性化される転写因子である (Moore JT et al., 2003)。しかし、本研究において、測定したいずれの BA の濃度も 4 $\beta$ -OH 濃度との間に相関関係は認められなかった。CAR および PXR はリガンド特異性が低く、生物種によってリガンド特性に差があるため、*in vivo* でリガンドを明確に特定することは困難である (Moore JT et al., 2003)。更に、*in vitro* においてはリガンド非結合状態であっても CAR は自発的に核内へ移行し、コアクチベーターをリクルートして遺伝子の転写制御を起こすことも問題となる (Kanno Y et al., 2010)。また、ヒト肝細胞癌由来の細胞である HuH7 に 4 $\beta$ -OH を作用させると SREBP1c 発現が増加し、DNL の促進を介して TG 蓄積量が増加した (Moldavski O et al., 2021)。しかし、この機構はラットの初代培養化肝細胞においては確認されていない (Salonurmi T et al., 2020)。この違いは、発現しているコアクチベーターまたはコリプレッサーが異なることが原因であると予想されている。LXR はリガンドと結合すると、LXR-RXR ヘテロ二量体はプロモーター領域へ結合する。このときコアクチベーター (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$ 、transformation/transcription domain-associated protein、acyl-CoA synthetase short chain family member 2、E1A binding protein p300、tyrosine-protein kinase SRC-1) またはコリプレッサーである nuclear receptor corepressor 2 と結合することで、対象となるプロモーター領域が選択される (Hu X et al., 2003; Huuskonen J et al., 2004; Oberkofler H et al., 2003; Wagner BL et al., 2003; Zhang Y et al., 2004)。LXR に結合したリガンドはコアクチベーターやコリプレッサーとも相互作用する可能性があり、親和性次第では転写複合体の形成に影響を及ぼすことが予想される。しかし、マウスまたはラットの肝細胞内で発現する LXR に対するコアクチベーターやコリプレッサーの同定やそれらに対する酸化 Chol の作用の全容は解明されていないため、今後の検証が期待される。結合するリガンドの種類によって LXR が転写活性化する遺伝子の種類に特異性が生じることが明らかになれば、MASLD 治療に応用できる可能性がある。

Chol や酸化 Chol の肝臓への蓄積は、細胞毒性の原因となり得る (Minowa K et al., 2023)。HF 摂取ラットでは、7 $\alpha$ -OH を除く酸化 Chol 濃度に変化は認められない一方 (Hori S et al., 2020)、HF 摂取マウスでは酸化 Chol の増加と血漿 ALT 活性が増加した (Table 1-5)。したがって、マウスはラットと比較してステロイドホルモンによる炎症誘導性が高い可能性が考えられる。また、Chol と CA 組み合わせにより、マウス肝臓では酸化 Chol の増加に加え、炎症性サイトカインの遺伝子発現が亢進した (Figure 2-7)。発現増加を

示した遺伝子のうち、顕著に発現増加を示した LCN2 は CA 添加食ラット肝臓においても発現が増加することが示されている (Hori S et al., 2021)。ステロール負荷による LCN2 の発現増加もマウスおよびラットにおいて共通して認められた機構であるため、生体内において重要な応答である可能性がある。

LCN2 は疎水性ポケットを有する約 25 kDa のタンパク質である (Flower DR., 1996)。このポケットに小さな疎水性分子やステロイドを結合し様々な物質を輸送する機能を持つ (Flower DR., 1996)。また、シデロフォアと結合することで鉄を捕捉するため、肝臓内鉄代謝に関与する可能性がある (Lim D et al., 2021)。このような LCN2 の特性は、MASLD を含む様々な疾患の発症に関わる可能性がある (Asimakopoulou A et al., 2016)。マウス肝実質細胞において脂質蓄積条件において、LCN2 を過剰に発現させると DNL・炎症・線維化関連遺伝子の発現抑制と脂肪分解関連遺伝子の発現増加を誘導し、LCN2 欠損マウスにおいては DNL・炎症・線維化関連遺伝子の発現が誘導され、脂肪分解関連酵素の発現が抑制される (Xu Y et al., 2019)。したがって、LCN2 の発現増加は肝臓を脂質蓄積やそれに伴う炎症や線維化に対して保護的に働くと予想されている。その一方で、HF 食摂取 *ob/ob* マウスで  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)/ matrix metalloproteinase-9 (MMP9)/ signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) シグナルを介して肝星細胞を活性化させ線維化を進行させる (Kim KE et al., 2023)。したがって、肝星細胞での LCN2 は MASH を進行させる可能性が考えられる。LCN2 自体は分泌性のタンパク質であり、肝臓における LCN2 の役割を解明するためには、その標的を明らかにする必要がある。本研究における肝臓の遺伝子発現解析は、肝臓を切り出しその組織片の全てをホモジナイズし RNA 抽出を行っている。肝臓組織に占める肝実質細胞の割合は 8 割程度であるため、総肝臓の遺伝子発現を肝実質細胞の発現とみなして解析を行った。しかし厳密には、本研究では肝星細胞やクッパー細胞、浸潤した好中球が含まれていた可能性は否定できない。LCN2 は特に好中球に豊富に発現しているため (Cowland JB et al., 1997)、好中球マーカーの測定を行ったが検出されなかった。また、肝星細胞やクッパー細胞由来である可能性は否定できない。この解決のためには、CA 添加食で誘導される LCN2 はどの細胞由来かを特定する必要がある。

ヒトでは CYP2C70 は発現しないため、主要な n12OH BA は CDCA であり、これは FXR の強力なアゴニストである (Makishima M et al., 1999)。また、ヒトの血漿や糞中では n12OH BA と比較して 12OH BA の方が多いためマウスほど FXR が抑制されている環境ではないことが予想される (Hamilton JP et al.,

2007; Angelin B et al., 1982)。Schwarzらの報告によると、ヒトの肝臓内 Chol量は約 100 g であり、一日当たりの新規生合成として 600~900 mg、食事からは 300~500 mg の Cholが増加する。一方、一日当たり BAとして 500~600 mg、胆汁への Cholの直接排泄として約 600 mgが減少する (Schwarz M et al., 1998)。前述したように、肝臓での Cholの濃度増加において、マウスでは生合成による寄与が殆どである一方、ヒトでは食事からの寄与がマウスに比べて大きい。ヒトでは肝臓からの Chol排泄形態は、BAと Cholとしての直接排泄が同程度である (Schwarz M et al., 1998)。これらをふまえると、ヒトと比較してマウスは肝細胞内に Cholを溜め込み易い可能性がある。MASHモデルとして、Chol (1.25%) と CA (0.5%) を添加した飼料をマウスに与える試験系がある (Matsuzawa N et al., 2007)。この食餌を摂取したマウスは、6~24 週間にかけて時間依存的に脂肪変性や炎症、肝細胞のバルーニングを伴う肝線維症等の MASH 様症状を呈する。さらにこの食餌に 60%の脂質を添加すると、12 週で脂質異常症、脂質過酸化、酸化ストレスが誘導される (Matsuzawa N et al., 2007)。しかし、この食餌組成で使用する Chol添加量は生理学的な条件に対して高いことが懸念される。これらのことを踏まえると、マウスではヒトと比較してステロール負荷による肝臓での炎症等の応答が早期あるいは低い負荷量で現れる可能性が考えられる。

胆のうを有するという点はマウスとヒトの共通点であり、ラットとの差異である (Kruepunga N et al., 2019)。胆のうは肝臓から分泌された BA やビリルビン、Cholを胆汁として濃縮・貯蔵し、摂食に応じて十二指腸に分泌する組織である (Housset C et al., 2016)。マウスにおいて、胆のうを回収することで胆汁の採取は容易であるが、ラットは胆管へのカニューレーションに技術を要するため、胆汁のみを採取することは困難であり、正確な胆汁流量を測定することは難しい。加えて、マウスではヒトの BA組成を模倣したトランスジェニックマウスの研究が行われており、これらのモデルは 12OH BAによる肝脂質代謝変動機構の解明に寄与するものと期待される (Honda A et al., 2020)。一方ラットとヒトでは、門脈血において 12OHが多く存在するという点が共通するため、BA代謝に関する研究で利用されている (Hori S et al., 2020; Angelin B et al., 1982)。ラット肝臓では CYP2C70 が発現するが、肝臓や小腸においては TCAの方が豊富に存在する (Takahashi S et al., 2016; Hori S et al., 2020)。これらのことから、ラットの腸および肝臓における定常的な FXR の応答性や Chol代謝はヒトと似た動きを示すことが予想される。ヒ

ト・マウス・ラットでは先述したような共通点・相違点があるため、BA代謝機構およびそれに付随する機構に関する研究で利用する実験動物は解析したい事象に合わせて選択する必要がある。

本研究において、マウスにおいても糞中の 12OH BA /n12OH BA 比を算出することで HF 食摂取条件では肝脂質濃度との間に正の相関が観察された。飼料への Chol と CA の組み合わせ添加は、ステロール代謝変動を介して肝臓の酸化還元状態や炎症関連遺伝子の発現亢進に関わることが示された。ステロール代謝と肝脂質蓄積に関するこれらの知見は、MASLD 未病状態において特徴的な代謝の一つであると考えられる。今後、未病時に変動する他の代謝物を明らかにし、MASLD 未病の全容を捉えることで、診断および予防法の確立に繋がることを期待される。さらに、BA は構造的に安定で扱いやすいことや、糞中 BA を利用した検査は非侵襲的に行えることを踏まえると、MASLD 未病状態の判断基準に BA 組成を利用できる可能性が考えられる。代謝物の組成は生命活動の結果を反映していると考えられるため、未病症状の程度をより明確に反映するパラメータの探索は今後も引き続き行われると考えられる。未病状態には自覚症状はあるが検査で異常が認められない状態が存在する。このような状況の患者においても、代謝物を利用した診断によって未病状態を検出することが可能になるかもしれない。近年、質量分析装置は高感度化や解析の高速化、小型化や安価なモデルの登場により、医療機器としてより応用しやすい状況になりつつある。一方で、実用化を進めるためには抽出方法や分析条件の明確化、わかりやすい情報として提供するためのデータ解析システムの構築も不可欠である。特に、検査結果を解釈するためには代謝物の組成変動と疾患の関与に関する知見の集約が必要になる。様々な代謝物と疾患の関連性が明らかになれば、メタボロミクスを利用して未病状態の網羅的診断が可能となる。医療機関で様々な未病状態を検出することが可能になれば、非感染性疾患等の発症を未然に防ぐことに繋がり、これが SDGs における目標達成の礎にも寄与するものと期待される。

**Table 3-1.** Metabolic differences and similarities between mice and rats

	Rat	Mouse
Main BA species in enterohepatic circulation	12OH BA	n12OH BA
<b>HF diet</b>		
Excretion form in sterols	BA	Chol
Sterol oxidation in the liver	Enzymic oxidation	Auto-oxidation & enzymic oxidation
Enterohepatic 12OH/n12OH BA circulation	Increased	Increased
Relationship between of the hepatic TG concentration and fecal 12OH/n12OH BA ratio	Correlated	Correlated
<b>CA diet</b>		
Hepatic TG concentration	Increased	No change
Relationship between of the hepatic TG concentration and fecal 12OH/n12OH BA ratio	No	No
Sterol oxidation in the liver	Enzymic oxidation	Auto-oxidation & enzymic oxidation
GSH/GSSG ratio in the liver	Increased	Increased
Susceptibility to inflammation	Enhanced	Enhanced

## 引用文献

- 日本肝臓学会編、「NASH・NAFLDの診療ガイド2021」、(2021)p.26、4. NAFLDの検査所見
- 福生吉祐、一般社団法人日本未病システム学会編著、「未病医学標準テキスト」、(2018)p.11-p.18、1-3 現代未病の概念と解釈ー東洋医学的未病と西洋医学的未病ーその応用
- 文部科学省、「日本食品標準成分表（八訂）増補2023年」、(2023)
- 横山史佳、修士論文「ラットにおける12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸による肝脂質蓄積機構」(2023)
- Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*. (2004) 303(5661):1201-1204.
- Ananthanarayanan M, Balasubramanian N, Makishima M, Mangelsdorf DJ, Suchy FJ. Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. *J Biol Chem*. (2001) 276(31):28857-28865.
- Asimakopoulou A, Weiskirchen S, Weiskirchen R. Lipocalin 2 (LCN2) expression in hepatic malfunction and therapy. *Front Physiol*. (2016) 7:430:1-18.
- Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al., Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*. (2000) 290(5497):1771-1775.
- Bertaglia E, Jensen KK, Castro-Perez J, Xu Y, Di Paolo G, Chan RB, et al., Cyp8b1 ablation prevents Western diet-induced weight gain and hepatic steatosis because of impaired fat absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. (2017) 313(2): E121-E133.
- Biddinger SB, Haas JT, Yu BB, Bezy O, Jing E, Zhang W, et al., Hepatic insulin resistance directly promotes formation of cholesterol gallstones. *Nat Med*. (2008) 14(7):778-782.
- Björkhem I, Eggertsen G. Genes involved in initial steps of bile acid synthesis. *Curr Opin Lipidol*. (2001) 12(2):97-103.
- Björkhem I, Eriksson M, Einarsson K. Evidence for a lack of regulatory importance of the 12 alpha-hydroxylase in formation of bile acids in man: an in vivo study. *J Lipid Res*. (1983) 24(11):1451-1456.
- Bodin K, Andersson U, Rystedt E, Ellis E, Norlin M, Pikuleva I, et al., Metabolism of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol in humans. *J Biol Chem*. (2002) 277(35):31534-40. Borkham-Kamphorst E, Haas U, Pinoé-Schmidt M, Abdallah AT, Weiskirchen R. Chronic mineral oil administration increases hepatic inflammation in wild type mice compared to lipocalin 2 null mice. *Lab Invest* (2021) 101(12):1528-1539.
- Borkham-Kamphorst E, Haas U, Pinoé-Schmidt M, Abdallah AT, Weiskirchen R. Chronic mineral oil administration increases hepatic inflammation in wild type mice compared to lipocalin 2 null mice. *Lab Invest*

(2021) 101(12):1528-1539.

Brown AJ, Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. (1999) 142(1):1-28.

Brown AJ, Leong SL, Dean RT, Jessup W. 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lipid Res*. (1997) 38(9):1730-1745.

Brown MS, Radhakrishnan A, Goldstein JL. Retrospective on cholesterol homeostasis: The central role of scap. *Annu Rev Biochem*. (2018) 87:783-807.

Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism*. (2016) 65(8):1038-1048.

Cariou B, Chetiveaux M, Zaïr Y, Pouteau E, Disse E, Guyomarc'h-Delasalle B, et al., Fasting plasma chenodeoxycholic acid and cholic acid concentrations are inversely correlated with insulin sensitivity in adults. *Nutr Metab (Lond)*. (2011) 8(1):48:1-6.

Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, et al., The farnesoid X receptor modulates adiposity and peripheral insulin sensitivity in mice. *J Biol Chem*. (2006) 281(16):11039-11049.

Chang TY, Li BL, Chang CC, Urano Y. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. (2009) 297(1):E1-E9.

Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B. Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. (2017) 152(7):1679-1694.

Chen F, Ma L, Dawson PA, Sinal CJ, Sehayek E, Gonzalez FJ, Breslow J. Liver receptor homologue-1 mediates species- and cell line-specific bile acid-dependent negative feedback regulation of the apical sodium-dependent bile acid transporter. *J Biol Chem*. (2003) 278(22):19909-19916.

Chen L, van den Munckhof ICL, Schraa K, Ter Horst R, Koehorst M, van Faassen M et al., Genetic and Microbial Associations to Plasma and Fecal Bile Acids in Obesity Relate to Plasma Lipids and Liver Fat Content. *Cell Rep*. (2020) 33(1):108212.

Chiang JYL, Ferrell JM. Bile acid metabolism in liver pathobiology. *Gene Expr*. (2018) 18(2):71-87.

Chrysavgis L, Giannakodimos I, Diamantopoulou P, Cholongitas E. Non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: Clinical challenges of an intriguing link. *World J Gastroenterol*. (2022) 28(3):310-331.

Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics*. (1997) 45(1):17-23.

- Dashty M. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. *Clin Biochem.* (2013) 46(15):1339-1352.
- Dawson PA, Hubbert ML, Rao A. Getting the mOST from OST: Role of organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta, in bile acid and steroid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* (2010) 1801(9):994-1004.
- Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* (1998) 114(4):842-845.
- de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA. Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab.* (2013) 17(5):657-669.
- Denson LA, Sturm E, Echevarria W, Zimmerman TL, Makishima M, Mangelsdorf DJ, et al., The orphan nuclear receptor, shp, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, ntcp. *Gastroenterology.* (2001) 121(1):140-147.
- Diczfalusy U, Nylén H, Elander P, Bertilsson L. 4 $\beta$ -Hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans. *Br J Clin Pharmacol.* (2011) 71(2):183-189.
- Donkers JM, Roscam Abbing RLP, van de Graaf SFJ. Developments in bile salt based therapies: A critical overview. *Biochem Pharmacol.* (2019) 161:1-13.
- Dyer RG, Stewart MW, Mitcheson J, George K, Alberti MM, Laker MF. 7-ketocholesterol, a specific indicator of lipoprotein oxidation, and malondialdehyde in non-insulin dependent diabetes and peripheral vascular disease. *Clin Chim Acta.* (1997) 4;260(1):1-13.
- Eslam M, Newsome PN, Sarin SK, Anstee QM, Targher G, Romero-Gomez M, et al., A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement. *J Hepatol.* (2020) 73(1):202-209.
- Ferslew BC, Xie G, Johnston CK, Su M, Stewart PW, Jia W, et al., Altered bile acid metabolome in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci.* (2015) 60(11):3318-28.
- Fiorucci S, Distrutti E, Carino A, Zampella A, Biagioli M. Bile acids and their receptors in metabolic disorders. *Prog Lipid Res.* (2021) 82:101094.
- Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J.* (1996) 318 (Pt 1)(Pt 1):1-14.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* (1957) 226(1):497-509.
- Freeman LA, Kennedy A, Wu J, Bark S, Remaley AT, Santamarina-Fojo S, et al., The orphan nuclear receptor LRH-1 activates the ABCG5/ABCG8 intergenic promoter. *J Lipid Res.* (2004) 45(7):1197-1206.
- Fujihira E, Kaneta S, Ohshima T. Strain difference in mouse cholelithiasis and the effect of taurine on the gallstone formation in C57BL/C mice. *Biochem Med.* (1978) 19(2):211-217.
- Geisler CE, Renquist BJ. Hepatic lipid accumulation: cause and consequence of dysregulated gluco-regulatory



- hormones. *J Endocrinol.* (2017) 234(1):R1-R21.
- Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, et al., ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2006) 26(3):534-540.
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* (1990) 343(6257):425-430.
- Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2009) 29(4):431-438.
- Gong X, Qian H, Shao W, Li J, Wu J, Liu JJ, et al., Complex structure of the fission yeast SREBP-SCAP binding domains reveals an oligomeric organization. *Cell Res.* (2016) 26(11):1197-1211.
- Gong Y, Lee JN, Lee PC, Goldstein JL, Brown MS, Ye J. Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metab.* (2006) 3(1):15-24.
- Goodwin B, Jones SA, Price RR, Watson MA, McKee DD, Moore LB, et al., A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. *Mol Cell.* (2000) 6(3):517-526.
- Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, et al., ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem.* (2003) 278(48):48275-48282.
- Guzior DV, Quinn RA. Review: microbial transformations of human bile acids. *Microbiome.* (2021) 9(1):140.
- Haeusler RA, Astiarraga B, Camastra S, Accili D, Ferrannini E. Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12 $\alpha$ -hydroxylated bile acids. *Diabetes.* (2013) 62(12):4184-4191.
- Hamilton JP, Xie G, Raufman JP, Hogan S, Griffin TL, Packard CA, et al., Human cecal bile acids: concentration and spectrum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* (2007) 293(1):G256-G263.
- Hanafi NI, Mohamed AS, Sheikh Abdul Kadir SH, Othman MHD. Overview of Bile Acids Signaling and Perspective on the Signal of Ursodeoxycholic Acid, the Most Hydrophilic Bile Acid, in the Heart. *Biomolecules.* (2018) 8(4):159.
- Hannedouche S, Zhang J, Yi T, Shen W, Nguyen D, Pereira JP, et al., Oxysterols direct immune cell migration via EBI2. *Nature.* (2011) 475(7357):524-527.
- Hartvigsen K, Binder CJ, Hansen LF, Rafia A, Juliano J, Hörkö S et al. A diet-induced hypercholesterolemic murine model to study atherogenesis without obesity and metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2007) 27(4):878-885.
- Hashimoto N, Han KH, Wakagi M, Ishikawa-Takano Y, Ippoushi K, Fukushima M. Bile acids induced hepatic lipid accumulation in mice by inhibiting mRNA expression of patatin-like phospholipase domain containing 3 and microsomal triglyceride transfer protein. *Nutr Res* (2021) 92:12-20.
- Hashimoto N, Matsui I, Ishizuka S, Inoue K, Matsumoto A, Shimada K, et al., Lithocholic acid increases intestinal

- phosphate and calcium absorption in a vitamin D receptor dependent but transcellular pathway independent manner. *Kidney Int.* (2020) 97(6):1164-1180.
- Holy P, Kloudova A, Soucek P. Importance of genetic background of oxysterol signaling in cancer. *Biochimie.* (2018) 153:109-138.
- Honda A, Miyazaki T, Iwamoto J, Hirayama T, Morishita Y, Monma T et al. Regulation of bile acid metabolism in mouse models with hydrophobic bile acid composition. *J Lipid Res* (2020) 61(1):54-69.
- Hori S, Abe T, Lee DG, Fukiya S, Yokota A, Aso N et al., Association between 12 $\alpha$ -hydroxylated bile acids and hepatic steatosis in rats fed a high-fat diet. *J Nutr Biochem.* (2020) 83:108412.
- Hori S, Liu H, Yamada R, Ichitsubo S, Sakaguchi A, Yokoyama F et al. Extraction of bile acids from biological samples and quantification using ultra-high-performance liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry In: Cazarin CBB, editor. *Basic Protocols in Foods and Nutrition, New York: Springer* (2022) 115–27.
- Hori S, Satake M, Kohmoto O, Takagi R, Okada K, Fukiya S, et al., Primary 12 $\alpha$ -Hydroxylated Bile Acids Lower Hepatic Iron Concentration in Rats. *J Nutr.* (2021) 151(3):523-530.
- Horton JD, Shah NA, Warrington JA, Anderson NN, Park SW, Brown MS, et al., Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2003) 100(21):12027-12032.
- Housset C, Chrétien Y, Debray D, Chignard N. Functions of the Gallbladder. *Compr Physiol.* (2016) 6(3):1549-1577.
- Hu X, Li S, Wu J, Xia C, Lala DS. Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol Endocrinol.* (2003) 17(6):1019-1026.
- Huuskonen J, Fielding PE, Fielding CJ. Role of p160 coactivator complex in the activation of liver X receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2004) 24(4):703-708.
- Iqbal J, Hussain MM. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2009) 296(6):E1183-E1194.
- Inagaki T, Choi M, Moschetta A, Peng L, Cummins CL, McDonald JG et al., Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* (2005) 2(4):217-225.
- Ito S, Fujimori T, Furuya A, Satoh J, Nabeshima Y, Nabeshima Y. Impaired negative feedback suppression of bile acid synthesis in mice lacking  $\beta$ Klotho. *J Clin Invest.* (2005) 115(8):2202-2208.
- Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR $\alpha$ . *Nature* (1996) 383(6602):728-731.
- Javitt NB. Oxysteroids: a new class of steroids with autocrine and paracrine functions. *Trends Endocrinol Metab.* (2004) 15(8):393-397.

- Jiao N, Baker SS, Chapa-Rodriguez A, Liu W, Nugent CA, Tsompana M, et al., Suppressed hepatic bile acid signalling despite elevated production of primary and secondary bile acids in NAFLD. *Gut*. (2018) 67(10):1881-1891.
- Ju HQ, Lin JF, Tian T, Xie D, Xu RH. NADPH homeostasis in cancer: functions, mechanisms and therapeutic implications. *Signal Transduct Target Ther* (2020) 7;5(1):231.
- Jung D, Kullak-Ublick GA. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha: a key mediator of the effect of bile acids on gene expression. *Hepatology*. (2003) 37(3):622-631.
- Kanno Y, Miyazaki Y, Inouye Y. The nuclear import of the constitutive androstane receptor by importin/Ran-GTP systems. *Biochim Biophys Acta*. (2010) 1803(8):968-974.
- Karp CL. Unstressing intertemperate models: how cold stress undermines mouse modeling. *J Exp Med*. (2012) 209(6):1069-1074.
- Kast HR, Goodwin B, Tarr PT, Jones SA, Anisfeld AM, Stoltz CM, et al., Regulation of multidrug resistance-associated protein 2 (ABCC2) by the nuclear receptors pregnane X receptor, farnesoid X-activated receptor, and constitutive androstane receptor. *J Biol Chem*. (2002) 277(4):2908-2915.
- Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, et al., A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem*. (2003) 278(11):9435-9440.
- Keitel V, Donner M, Winandy S, Kubitz R, Häussinger D. Expression and function of the bile acid receptor TGR5 in Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. (2008a) 372(1):78-84.
- Keitel V, Kubitz R, Häussinger D. Endocrine and paracrine role of bile acids. *World J Gastroenterol*. (2008b) 14(37):5620-5629.
- Keitel V, Reinehr R, Gatsios P, Rupprecht C, Görg B, Selbach O, et al., The G-protein coupled bile salt receptor TGR5 is expressed in liver sinusoidal endothelial cells. *Hepatology*. (2007) 45(3):695-704.
- Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán A, Tarr P, Fishbein MC, et al., ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab*. (2005) 1(2):121-131.
- Kikuchi T, Orihara K, Oikawa F, Han SI, Kuba M, Okuda K, et al., Intestinal CREBH overexpression prevents high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia by reducing *Npc1l1* expression. *Mol Metab*. (2016) 5(11):1092-1102.
- Kim KE, Lee J, Shin HJ, Jeong EA, Jang HM, Ahn YJ, et al., Lipocalin-2 activates hepatic stellate cells and promotes nonalcoholic steatohepatitis in high-fat diet-fed Ob/Ob mice. *Hepatology*. (2023) 77(3):888-901.
- Kliwer SA, Mangelsdorf DJ. Bile acids as hormones: The FXR-FGF15/19 pathway. *Dig Dis*. (2015) 33(3):327-331.

- Kloudova A, Guengerich FP, Soucek P. The role of oxysterols in human cancer. *Trends Endocrinol Metab.* (2017) 28(7):485-496.
- Kong B, Wang L, Chiang JY, Zhang Y, Klaassen CD, Guo GL. Mechanism of tissue-specific farnesoid X receptor in suppressing the expression of genes in bile-acid synthesis in mice. *Hepatology.* (2012) 56(3):1034-1043.
- Kramer W, Stengelin S, Baringhaus KH, Enhsen A, Heuer H, Becker W et al., Substrate specificity of the ileal and the hepatic Na<sup>+</sup>/bile acid cotransporters of the rabbit. I. Transport studies with membrane vesicles and cell lines expressing the cloned transporters. *J Lipid Res* (1999) 40(9):1604-1617.
- Krężel W, Rühl R, de Lera AR. Alternative retinoid X receptor (RXR) ligands. *Mol Cell Endocrinol.* (2019) 491:110436.
- Kruepunga N, Hakvoort TBM, Hikspoors JPJM, Köhler SE, Lamers WH. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* (2019) 1865(5):869-878.
- Kunau WH, Dommes V, Schulz H.  $\beta$ -oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res.* (1995) 34(4):267-342.
- Kwiterovich PO Jr. The metabolic pathways of high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, and triglycerides: a current review. *Am J Cardiol.* (2000) 86(12A):5L-10L.
- Kwong EK, Zhou H. Sphingosine-1-phosphate signaling and the gut-liver axis in liver diseases. *Liver Res.* (2019) 3(1):19-24.
- Lee JY, Shimizu H, Hagio M, Fukiya S, Watanabe M, Tanaka Y, et al., 12 $\alpha$ -Hydroxylated bile acid induces hepatic steatosis with dysbiosis in rats. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* (2020) 1865(12):158811.
- Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev.* (2009) 89(1):147-191.
- Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, et al., Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* (1997) 272(6):3137-3140.
- Li BL, Li XL, Duan ZJ, Lee O, Lin S, Ma ZM, et al., Human acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) gene organization and evidence that the 4.3-kilobase ACAT-1 mRNA is produced from two different chromosomes. *J Biol Chem.* (1999) 274(16):11060-11071.
- Li YC, Wang DP, Chiang JY. Regulation of cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase in the liver. Cloning, sequencing, and regulation of cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase mRNA. *J Biol Chem.* (1990) 265(20):12012-1209.
- Lim D, Jeong JH, Song J. Lipocalin 2 regulates iron homeostasis, neuroinflammation, and insulin resistance in the brains of patients with dementia: Evidence from the current literature. *CNS Neurosci Ther.* (2021) 27(8):883-894.

- Ling B, Aziz C, Alcorn J. Systematic evaluation of key L-carnitine homeostasis mechanisms during postnatal development in rat. *Nutr. Metab.* (2012) 9, 66.
- Liscum L, Munn NJ. Intracellular cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta.* (1999) 1438(1):19-37.
- Liu C, Yang XV, Wu J, Kuei C, Mani NS, Zhang L, et al., Oxysterols direct B-cell migration through EBI2. *Nature.* (2011) 475(7357):519-523.
- Liu H, Kohmoto O, Sakaguchi A, Hori S, Tochigi M, Tada K et al. Taurocholic acid, a primary 12 $\alpha$ -hydroxylated bile acid, induces leakiness in the distal small intestine in rats. *Food Chem Toxicol* (2022) 165:113136.
- Liu Y, Wei Z, Ma X, Yang X, Chen Y, Sun L, et al., 25-Hydroxycholesterol activates the expression of cholesterol 25-hydroxylase in an LXR-dependent mechanism. *J Lipid Res.* (2018) 59(3):439-451.
- Loomba R, Friedman SL, Shulman GI. Mechanisms and disease consequences of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell.* (2021) 13;184(10):2537-2564.
- Lopez D, Abisambra Socarrás JF, Bedi M, Ness GC. Activation of the hepatic LDL receptor promoter by thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta.* (2007) 1771(9):1216-1225.
- Lordan S, Mackrill JJ, O'Brien NM. Oxysterols and mechanisms of apoptotic signaling: implications in the pathology of degenerative diseases. *J Nutr Biochem.* (2009) 20(5):321-336.
- Lu K, Lee MH, Hazard S, Brooks-Wilson A, Hidaka H, Kojima H., Two genes that map to the STSL locus cause sitosterolemia: genomic structure and spectrum of mutations involving sterolin-1 and sterolin-2, encoded by ABCG5 and ABCG8, respectively. *Am J Hum Genet.* (2001) 69(2):278-290.
- Lu R, Ito J, Iwamoto N, Nishimaki-Mogami T, Yokoyama S. FGF-1 induces expression of LXR $\alpha$  and production of 25-hydroxycholesterol to upregulate the apoE gene in rat astrocytes. *J Lipid Res.* (2009) 50(6):1156-1164.
- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* (1980) 55(7):434-438.
- Luo J, Yang H, Song BL. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2020) 21(4):225-245.
- Makishima M, Lu TT, Xie W, Whitfield GK, Domoto H, Evans RM, et al., Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science.* (2002) 296(5571):1313-1316.
- Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, et al., Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science.* (1999) 284(5418):1362-1365.
- Martins PN, Neuhaus P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver Int.* (2007) 27(3):384-392.
- Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, et al., Lipid-induced oxidative stress causes

- steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology*. (2007) 46(5):1392-1403.
- McGlone ER, Bloom SR. Bile acids and the metabolic syndrome. *Ann Clin Biochem*. (2019) 56(3):326-337.
- McNutt MC, Lagace TA, Horton JD. Catalytic activity is not required for secreted PCSK9 to reduce low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. *J Biol Chem*. (2007) 282(29):20799-20803.
- Menéndez-Carreño M, Varo N, Mugueta C, Restituto P, Ansorena D, Astiasarán I. Correlation between serum content of the main COPs (cholesterol oxidation products) from autoxidation and cardiovascular risk factors. *Nutr Hosp*. (2011) 26(1):144-151.
- Minowa K, Rodriguez-Agudo D, Suzuki M, Muto Y, Hirai S, Wang Y, et al., Insulin dysregulation drives mitochondrial cholesterol metabolite accumulation: initiating hepatic toxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res*. (2023) 64(5):100363.
- Moldavski O, Zushin PH, Berdan CA, Van Eijkeren RJ, Jiang X, Qian M, et al., 4 $\beta$ -Hydroxycholesterol is a prolipogenic factor that promotes SREBP1c expression and activity through the liver X receptor. *J Lipid Res*. (2021) 62:100051.
- Moore JT, Moore LB, Maglich JM, Kliewer SA. Functional and structural comparison of PXR and CAR. *Biochim Biophys Acta*. (2003)1619(3):235-238.
- Nachtergaele S, Mydock LK, Krishnan K, Rammohan J, Schlesinger PH, Covey DF, et al., Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothed. *Nat Chem Biol*. (2012) 8(2):211-220.
- Nagahashi M, Yuza K, Hirose Y, Nakajima M, Ramanathan R, Hait NC, et al., The roles of bile acids and sphingosine-1-phosphate signaling in the hepatobiliary diseases. *J Lipid Res*. (2016) 57(9):1636-1643.
- Nakade Y, Kitano R, Sakamoto K, Kimoto S, Yamauchi T, Inoue T, et al., Characteristics of bile acid composition in high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in obese diabetic rats. *PLoS One*. (2021) 16(2):e0247303.
- Nelson JK, Sorrentino V, Avagliano Trezza R, Heride C, Urbe S, Distel B, et al., The Deubiquitylase USP2 regulates the LDLR pathway by counteracting the E3-Ubiquitin ligase IDOL. *Circ Res*. (2016) 118(3):410-419.
- Nguyen TM, Sawyer JK, Kelley KL, Davis MA, Kent CR, Rudel LL. ACAT2 and ABCG5/G8 are both required for efficient cholesterol absorption in mice: evidence from thoracic lymph duct cannulation. *J Lipid Res*. (2012) 53(8):1598-1609.
- Niesor EJ, Flach J, Lopes-Antoni I, Perez A, Bentzen CL. The nuclear receptors FXR and LXR $\alpha$ : potential targets for the development of drugs affecting lipid metabolism and neoplastic diseases. *Curr Pharm Des*. (2001) 7(4):231-259.
- Oberkofler H, Schraml E, Krempler F, Patsch W. Potentiation of liver X receptor transcriptional activity by

- peroxisome-proliferator-activated receptor gamma co-activator 1 alpha. *Biochem J.* (2003) 371(Pt 1):89-96.
- Ong TP, Heidor R, de Conti A, Dagli ML, Moreno FS. Farnesol and geraniol chemopreventive activities during the initial phases of hepatocarcinogenesis involve similar actions on cell proliferation and DNA damage, but distinct actions on apoptosis, plasma cholesterol and HMGCoA reductase. *Carcinogenesis.* (2006) 27(6):1194-1203.
- Pandey AV, Flück CE. NADPH P450 oxidoreductase: structure, function, and pathology of diseases. *Pharmacol Ther.* (2013) 138(2):229-254.
- Patankar JV, Wong CK, Morampudi V, Gibson WT, Vallance B, Ioannou GN, et al., Genetic ablation of Cyp8b1 preserves host metabolic function by repressing steatohepatitis and altering gut microbiota composition. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2018) 314(5): E418-E432.
- Pathak P, Chiang JYL. Sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase aggravates dyslipidemia by activating the ceramide/mTORC1/SREBP-1c pathway via FGF21 and FGF15. *Gene Expr.* (2019) 19(3):161-173.
- Pathak P, Liu H, Boehme S, Xie C, Krausz KW, Gonzalez F, et al., Farnesoid X receptor induces Takeda G-protein receptor 5 cross-talk to regulate bile acid synthesis and hepatic metabolism. *J Biol Chem.* (2017) 292(26):11055-11069.
- Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* (2014) 510(7503):84-91.
- Phillips MC. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem.* (2014) 289(35):24020-24029.
- Pineda Torra I, Claudel T, Duval C, Kosykh V, Fruchart JC, Staels B. Bile acids induce the expression of the human peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene via activation of the farnesoid X receptor. *Mol Endocrinol.* (2003) 17(2):259-272.
- Potthoff MJ, Boney-Montoya J, Choi M, He T, Sunny NE, Satapati S, et al., FGF15/19 regulates hepatic glucose metabolism by inhibiting the CREB-PGC-1 $\alpha$  pathway. *Cell Metab.* (2011) 13(6):729-738.
- Radhakrishnan S, Ke JY, Pellizzon MA. Targeted nutrient modifications in purified diets differentially affect nonalcoholic fatty liver disease and metabolic disease development in rodent models. *Curr Dev Nutr.* (2020) 24;4(6): nzaa078.
- Radhakrishnan S, Yeung SF, Ke JY, Antunes MM, Pellizzon MA. Considerations when choosing high-fat, high-fructose, and high-cholesterol diets to induce experimental nonalcoholic fatty liver disease in laboratory animal models. *Curr Dev Nutr.* (2021) 13;5(12): nzab138.
- Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM. Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab.* (2008) 8(6):532-539.
- Remaley AT, Bark S, Walts AD, Freeman L, Shulenin S, Annilo T, et al., Comparative genome analysis of potential

- regulatory elements in the ABCG5-ABCG8 gene cluster. *Biochem Biophys Res Commun.* (2002) 295(2):276-282.
- Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *J Biol Chem.* (2002) 277(21):18793-18800.
- Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res.* (2006) 47(2):241-259.
- Rigault C, Le Borgne F, Tazir B, Benani A, Demarquoy J. A high-fat diet increases L-carnitine synthesis through a differential maturation of the Bbox1 mRNAs. *Biochim Biophys Acta.* (2013) 1831(2):370-377.
- Rinella ME, Neuschwander-Tetri BA, Siddiqui MS, Abdelmalek MF, Caldwell S, Barb D, Kleiner DE, Loomba R. AASLD Practice Guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* (2023) 77(5):1797-1835.
- Rocha-Gomes A, Teixeira AE, Lima DSS, Rocha LDS, da Silva AA, Lessa MR, et al., Caloric restriction or cafeteria diet from birth to adulthood increases the sensitivity to ephedrine in anxiety and locomotion in Wistar rats. *Physiol Behav.* (2021) 236:113430.
- Rogers MA, Liu J, Song BL, Li BL, Chang CC, Chang TY. Acyl-CoA:cholesterol acyltransferases (ACATs/SOATs): enzymes with multiple sterols as substrates and as activators. *J Steroid Biochem Mol Biol.* (2015) 151:102-107.
- Romero-Gómez M, Zelber-Sagi S, Trenell M. Treatment of NAFLD with diet, physical activity and exercise. *J Hepatol.* (2017) 67(4):829-846.
- Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem.* (2003) 72:137-174.
- Saito H, Tachiura W, Nishimura M, Shimizu M, Sato R, Yamauchi Y. Hydroxylation site-specific and production-dependent effects of endogenous oxysterols on cholesterol homeostasis: Implications for SREBP-2 and LXR. *J Biol Chem.* (2023) 299(1):102733.
- Salonurmi T, Nabil H, Ronkainen J, Hyötyläinen T, Hautajärvi H, Savolainen MJ, et al., 4 $\beta$ -Hydroxycholesterol signals from the liver to regulate peripheral cholesterol transporters. *Front Pharmacol.* (2020) 11:361.
- Samadi A, Sabuncuoglu S, Samadi M, Isikhan SY, Chirumbolo S, Peana M et al., A comprehensive review on oxysterols and related diseases. *Curr Med Chem.* (2021) 28(1):110-136.
- Santhekadur PK, Kumar DP, Sanyal AJ. Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* (2018) 68(2):230-237.
- Sayin SI, Wahlström A, Felin J, Jäntti S, Marschall HU, Bamberg K, et al., Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist. *Cell*



*Metab.* (2013) 17(2):225-235.

Schiff ER, Small NC, Dietschy JM. Characterization of the kinetics of the passive and active transport mechanisms for bile acid absorption in the small intestine and colon of the rat. *J Clin Invest.* (1972) 51(6):1351-1362.

Schroepfer GJ Jr. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol Rev.* (2000) 80(1):361-554.

Schuetz EG, Strom S, Yasuda K, Lecureur V, Assem M, Brimer C, et al., Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450. *J Biol Chem.* (2001) 276(42):39411-39418.

Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD. Marked reduction in bile acid synthesis in cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase-deficient mice does not lead to diminished tissue cholesterol turnover or to hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* (1998) 39(9):1833-1843.

Sepe V, Festa C, Renga B, Carino A, Cipriani S, Finamore C, et al., Insights on FXR selective modulation. Speculation on bile acid chemical space in the discovery of potent and selective agonists. *Sci Rep.* (2016) 6:19008.

Sheikh Abdul Kadir SH, Miragoli M, Abu-Hayyeh S, Moshkov AV, Xie Q, Keitel V, et al., Bile acid-induced arrhythmia is mediated by muscarinic M2 receptors in neonatal rat cardiomyocytes. *PLoS One.* (2010) 5(3):e9689.

Shimoda T, Shimizu H, Iwasaki W, Liu H, Kamo Y, Tada K et al. A diet supplemented with cholic acid elevates blood pressure accompanied by albuminuria in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* (2023) 21;87(4):434-441.

Shirouchi B, Kashima K, Horiuchi Y, Nakamura Y, Fujimoto Y, Tong LT, et al., 27-Hydroxycholesterol suppresses lipid accumulation by down-regulating lipogenic and adipogenic gene expression in 3T3-L1 cells. *Cytotechnology.* (2017) 69(3):485-492.

Slijepcevic D, Roscam Abbing RLP, Katafuchi T, Blank A, Donkers JM, van Hoppe S, et al., Hepatic uptake of conjugated bile acids is mediated by both sodium taurocholate cotransporting polypeptide and organic anion transporting polypeptides and modulated by intestinal sensing of plasma bile acid levels in mice. *Hepatology.* (2017) 66(5):1631-1643.

Sonne DP, van Nierop FS, Kulik W, Soeters MR, Vilsbøll T, Knop FK. Postprandial plasma concentrations of individual bile acids and FGF-19 in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* (2016) 101(8):3002-3009.

Soroosh P, Wu J, Xue X, Song J, Sutton SW, Sablad M, et al., Oxysterols are agonist ligands of ROR $\gamma$ t and drive Th17 cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2014) 111(33):12163-12168.

Staudinger JL, Goodwin B, Jones SA, Hawkins-Brown D, MacKenzie KI, LaTour A, et al., The nuclear receptor

- PXR is a lithocholic acid sensor that protects against liver toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2001) 13;98(6):3369-3374.
- Stocco DM. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol.* (2001) 63:193-213.
- Studer E, Zhou X, Zhao R, Wang Y, Takabe K, Nagahashi M, et al., Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary rodent hepatocytes. *Hepatology.* (2012) 55(1):267-276.
- Sumi K, Tanaka T, Uchida A, Magoori K, Urashima Y, Ohashi R, et al., Cooperative interaction between hepatocyte nuclear factor 4 alpha and GATA transcription factors regulates ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8. *Mol Cell Biol.* (2007) 27(12):4248-4260.
- Suzuki S, Sato Y, Umegaki K, Chiba T. [Influence of High-fat and High-cholesterol Diet on Major CYP Activities in the Liver]. *Yakugaku Zasshi.* (2016) 136(9):1297-1305.
- Takahashi S, Fukami T, Masuo Y, Brocker CN, Xie C, Krausz KW, et al., Cyp2c70 is responsible for the species difference in bile acid metabolism between mice and humans. *J Lipid Res.* (2016) 57(12):2130-2137.
- Tanphaichitr V, Broquist HP. Role of lysine and  $\epsilon$ -N-trimethyllysine in carnitine biosynthesis. II. Studies in the rat. *J Biol Chem.* (1973) 248(6):2176-2181.
- Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, et al., TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab.* (2009) 10(3):167-177.
- Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* (2010) 52(5):1836-1846.
- Trabelsi MS, Daoudi M, Prawitt J, Ducastel S, Touche V, Sayin SI, et al., Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nat Commun.* (2015) 6:7629.
- Twisk J, Hoekman MF, Lehmann EM, Meijer P, Mager WH, Princen HM. Insulin suppresses bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes by down-regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase gene transcription. *Hepatology.* (1995) 21(2):501-510.
- Umetani M, Domoto H, Gormley AK, Yuhanna IS, Cummins CL, Javitt NB, et al., 27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen. *Nat Med.* (2007) 13(10):1185-1192.
- UN General Assembly, Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development, (2015), A/RES/70/1, available at: <https://www.refworld.org/docid/57b6e3e44.htm>
- Vaz FM, Wanders RJ. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J.* (2002) 361(Pt 3):417-429.
- Vejux A, Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol Aspects Med.*

(2009) 30(3):153-170.

- Voisin M, de Medina P, Mallinger A, Dalenc F, Huc-Claustre E, Leignadier J, et al., Identification of a tumor-promoter cholesterol metabolite in human breast cancers acting through the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2017) 114(44):E9346-E9355.
- Vrins C, Vink E, Vandenberghe KE, Frijters R, Seppen J, Groen AK. The sterol transporting heterodimer ABCG5/ABCG8 requires bile salts to mediate cholesterol efflux. *FEBS Lett.* (2007) 2;581(24):4616-4620.
- Wagner BL, Valledor AF, Shao G, Daige CL, Bischoff ED, Petrowski M, et al., Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol Cell Biol.* (2003) 23(16):5780-5789.
- Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM. Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell.* (1999) 3(5):543-553.
- Wang HH, Garruti G, Liu M, Portincasa P, Wang DQ. Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances In reverse Cholesterol Transport. *Ann Hepatol.* (2017) 16(Suppl. 1: s3-105.):s27-s42.
- Wang TY, Portincasa P, Liu M, Tso P, Wang DQ. Mouse models of gallstone disease. *Curr Opin Gastroenterol.* (2018) 34(2):59-70.
- Watanabe M, Houten SM, Wang L, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, et al., Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest.* (2004) 113(10):1408-1418.
- Wistuba W, Gnewuch C, Liebisch G, Schmitz G, Langmann T. Lithocholic acid induction of the FGF19 promoter in intestinal cells is mediated by PXR. *World J Gastroenterol.* (2007) 13(31):4230-4235.
- Wong LH, Gatta AT, Levine TP. Lipid transfer proteins: the lipid commute via shuttles, bridges and tubes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2019) 20(2):85-101.
- Woollett LA, Buckley DD, Yao L, Jones PJ, Granholm NA, Tolley EA et al., Cholic acid supplementation enhances cholesterol absorption in humans. *Gastroenterology* (2004) 126(3):724-731.
- Wooten JS, Wu H, Raya J, Perrard XD, Gaubatz J, Hoogeveen RC. The influence of an obesogenic diet on oxysterol Metabolism in C57BL/6J Mice. *Cholesterol.* (2014) 2014:843468.
- Xu L, Korade Z, Rosado DA Jr, Mirnics K, Porter NA. Metabolism of oxysterols derived from nonenzymatic oxidation of 7-dehydrocholesterol in cells. *J Lipid Res.* (2013) 54(4):1135-1143.
- Xu Y, Zhu Y, Jadhav K, Li Y, Sun H, Yin L, et al., Lipocalin-2 protects against diet-induced nonalcoholic fatty liver disease by targeting hepatocytes. *Hepatol Commun.* (2019) 3(6):763-775.
- Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, Yabe D, Gong Y, Aebersold R, et al., Crucial step in cholesterol homeostasis:

- sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell*. (2002) 110(4):489-500.
- Yoshitsugu R, Kikuchi K, Iwaya H, Fujii N, Hori S, Lee DG et al. Alteration of bile acid metabolism by a high-fat diet is associated with plasma transaminase activities and glucose intolerance in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* (2019) 65(1):45-51.
- Younossi ZM, Golabi P, Paik JM, Henry A, Van Dongen C, Henry L. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): a systematic review. *Hepatology*. (2023) 77(4):1335-1347.
- Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. (2016) 64(1):73-84.
- Yu L, York J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. et al. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem*. (2003) 278, 15565–15570.
- Zarrouk A, Vejux A, Mackrill J, O'Callaghan Y, Hammami M, O'Brien N, et al., Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Res Rev*. (2014) 18:148-162.
- Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science*. (2009) 325(5936):100-104.
- Zerbinati C, Caponecchia L, Puca R, Ciacciarelli M, Salacone P, Sebastianelli A, et al., Mass spectrometry profiling of oxysterols in human sperm identifies 25-hydroxycholesterol as a marker of sperm function. *Redox Biol*. (2017a) 11:111-117.
- Zerbinati C, Iuliano L. Cholesterol and related sterols autoxidation. *Free Radic Biol Med*. (2017b) 111:151-155.
- Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, et al., Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem*. (2007) 282(25):18602-18612.
- Zhang HF, Basra HJ, Steinbrecher UP. Effects of oxidatively modified LDL on cholesterol esterification in cultured macrophages. *J Lipid Res*. (1990) 31(8):1361-1369.
- Zhang M, Chiang JY. Transcriptional regulation of the human sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  in mediating bile acid repression. *J Biol Chem*. (2001) 276(45):41690-41699.
- Zhang M, Sun W, Zhou M, Tang Y. MicroRNA-27a regulates hepatic lipid metabolism and alleviates NAFLD via repressing FAS and SCD1. *Sci Rep*. (2017) 7(1):14493.
- Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme

activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* (2013) 138(1):103-141.

Zhang Y, Castellani LW, Sinal CJ, Gonzalez FJ, Edwards PA. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) regulates triglyceride metabolism by activation of the nuclear receptor FXR. *Genes Dev.* (2004) 18(2):157-169.

Zhang Y, Lee FY, Barrera G, Lee H, Vales C, Gonzalez FJ, et al., Activation of the nuclear receptor FXR improves hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2006) 103(4):1006-1011.

Zhao P, Elks CM, Stephens JM. The induction of lipocalin-2 protein expression in vivo and in vitro. *J Biol Chem* (2014) 28;289(9):5960-5969.

Zhong F, Zhou X, Xu J, Gao L. Rodent models of nonalcoholic fatty liver disease. *Digestion.* (2020) 101(5):522-535.

## 参考論文

W. Iwasaki, R. Yoshida, H. Liu, S. Hori, Y. Otsubo, Y. Tanaka, M. Sato, S. Ishizuka., The ratio of 12 $\alpha$ - to non-12-hydroxylated bile acids reflect hepatic triacylglycerol accumulation in a high-fat diet-fed C57BL/6J mice.

*Sci Rep* (2022) 12(1):16707

## その他の論文

1. Lee Y, Tanaka Y, Iwasaki W, Yokoyama F, Joe GH, Tsuji M, Takuma N, Tada K, Hanai T, Hori S, Shimizu H, Minamida K, Kazunori M, Ishizuka S., Dietary supplementation with okara and *Bacillus coagulans* lilac-01 improves hepatic lipid accumulation induced by cholic acids in rats. *J Funct Foods* (2022) 90:104991, 2022.
2. 石塚敏, 岩崎若菜. 高脂肪食摂取による 12 $\alpha$  水酸化胆汁酸代謝・循環の比較. *アグリバイオ* (2022) 6(14): 60-63
3. Shimoda T, Shimizu H, Iwasaki W, Liu Y, Kamo Y, Toda K, Hanai T, Hori S, Joe GH, Tanaka Y, Sato M, Miyazaki H, Ishizuka S., A diet supplemented with cholic acid elevates blood pressure accompanied by albuminuria in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, (2023) 87(4):434-441.
4. Kasano-Camones CI, Takizawa M, Oshima N, Saito C, Iwasaki W, Nakagawa Y, Fujitani Y, Yoshida R, Saito Y, Izumi T, Terawaki SI, Sakaguchi M, Gonzalez FJ, Inoue Y., PPAR $\alpha$  activation partially drives NAFLD development in liver-specific Hnf4a-null mice. (2023) *J Biochem*, 173(5):393-411.
5. Lee DG, Iwasaki W, Hori S, Kubota N, Ishizuka S. Ingesting a fermented milk product reduces liver triacylglycerol accumulation and normalizes gut permeability in rats even under a cholic acid-fed condition. *J Funct Foods*, (2023) 104:105523.

## 国内学会

1. 岩崎若菜、吉田凌、田中愛健、佐藤匡央、石塚敏、「高脂肪食摂取マウスにおける肝脂質蓄積への12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸の関与」、日本栄養・食糧学会東北支部(第55回大会)・北海道支部(第51回大会)合同支部大会・2021年12月19日・オンライン開催
2. 岩崎若菜、吉田凌、大坪友樹、田中愛健、佐藤匡央、石塚敏、「マウスおよびラットにおいて12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸の存在比は肝脂質蓄積と相関する」、日本栄養・食糧学会大会(第76回大会)・2022年6月10～12日・兵庫
3. 岩崎若菜、石塚敏、「C57BL/6Jマウスへの軽微なコール酸及びコレステロール負荷が肝脂質蓄積を誘導する」、日本農芸化学会 北海道・東北支部 合同支部会 2022年9月20日・北海道
4. 岩崎若菜、田中愛健、佐藤匡央、石塚敏「ステロール誘導性肝脂質蓄積マウスにおける体循環血中のタウロコール酸濃度上昇に伴う肝臓での lipocalin2 発現の促進」分子生物学会(第46回大会)、2023年12月6日～8日・兵庫



## 国際学会

1. Iwasaki W, Yoshida R, Hori S, Tanaka Y, Sato M, Ishizuka S. Difference of sterol metabolism between mice and rats in response to a high-fat diet or diet supplemented with cholic acid., International congress of nutrition in Tokyo, Japan, Dec 6<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> 2022.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、博士後期課程からの配属にも関わらず快く研究室に受け入れてくださり、3年間に渡る研究生活において研究を進めるための環境整備や研究に関するご助言だけでなく、研究者としてあるべき姿を教えてくださいました本研究の主指導教員である、北海道大学大学院農学研究院食品栄養学研究室の石塚敏教授に深く御礼申し上げます。更に、本研究を進めるにあたり酸化コレステロールの解析およびデータの評価に関するご助言をいただきました、九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座の佐藤匡央教授、田中愛健助教、張博鯤さん、深見洋平さんに厚く感謝申し上げます。御多忙にもかかわらず、本稿の副査の御快諾と御高閲を賜りました食品機能化学研究室の園山慶教授および食品栄養学研究室の比良徹准教授に厚く御礼申し上げます。また、学生生活や研究において共に助け合い励まし合ってきた当研究室の先輩、同期、後輩と、本研究の足掛かりとなる研究を成し遂げた吉田凌さんをはじめとする卒業生の皆様に深く感謝いたします。加えて、本研究開発の一部は、JST 科学技術イノベーション創出に向けた大学フェローシップ創設事業 JPMJFS2101 の支援を受けたものです。博士課程における研究費や生活費はこのフェローシップ制度に支えられたところが大きく、この制度なしではこれほど研究に従事することは叶いませんでした。本制度の諸担当者の皆様および制度確立に至るまでに尽力してくださいました皆様に御礼申し上げます。最後に、今日まで私を支援し、温かく見守ってくださいました家族に深く感謝申し上げます。

2024年3月 岩崎若菜