HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高脂肪食摂取で増加する12α水酸化胆汁酸による脂肪肝の誘導とその発現機構［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	堀, 将太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14386号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81200
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Hori_Shota_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博　士（農学）　　氏名　　堀　将 太

審査担当者　主　査　教　授　石　塚　　敏
副　査　教　授　園　山　　慶
副　査　講　師　吹　谷　　智

学 位 論 文 題 名

高脂肪食摂取で増加する 12α水酸化胆汁酸による脂肪肝の誘導とその発現機構

本論文は、和文 132 頁、図 17、表 10、3 章からなり、参考論文 3 編が添えられている。

世界中で 10 億人もの患者が存在する非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は肝臓脂肪蓄積を特徴とする原因不明の肝疾患である。肝臓脂肪蓄積は非アルコール性脂肪肝炎および線維化に先立って起こるイベントで、肝臓局所に留まらない糖尿病や心血管系疾患等の非感染性疾患（NCD）の発症リスクを増加させる。すなわち、肝臓脂肪蓄積の原因物質の特定とその機構解明は NCD 発症リスク低下、ひいては人類の健康寿命延伸に直結する。

12α水酸化胆汁酸（12αOH）は肝臓で合成されるコレステロールの最終異化産物の 1 つである。ステロイド骨格の 12 位に水酸基を持ち、12 位に水酸基を持たない非 12α水酸化胆汁酸と比較すると、糖尿病や NAFLD で 12αOH の特異的な増加が観察され、肝臓脂肪蓄積に対して促進的に働くことが代謝経路に関わる遺伝子改変により示唆されている。しかしながら、12αOH が選択的に増加する機構や 12αOH が直接的に肝臓脂質蓄積を誘導できるかどうかは未解明である。また、12αOH は腸内細菌による代謝を受けることで複雑に形態を変えるため、肝臓脂肪蓄積に寄与する分子種は特定されていない。本研究では、高脂肪食（HFD）による食餌誘導性脂肪肝や 12αOH 特異的な増加環境を模倣した飼料へのコール酸（CA）添加、抗生物質により二次胆汁酸生成を抑制させる実験系を用い、HFD による選択的な 12αOH の増加機構と 12αOH による脂肪肝の発現機構を検証した。

HFD 摂取による 12αOH の特異的増加機構と脂肪肝への関与

12αOH が選択的に増加する HFD 摂取モデルを用いて 12αOH の増加機構と肝臓脂肪蓄積との関連を調べた。HFD ラットでは、腸肝循環に関連する体液、組織において 12αOH 濃度が選択的に上昇した。12αOH 選択的な増加機構を調べるために、胆汁酸合成に関わる酵素の遺伝子発現レベルおよび胆汁酸合成の前駆体である酸化コレステロールを評価したところ、HFD 摂取で肝臓において 12αOH 合成を司るステロール 12α水酸化酵素（CYP8B1）の遺伝子発現レベルが上昇することを見出した。また、肝臓のコレステロール蓄積に伴って胆汁酸合成の律速酵素であるコレステロール 7α水酸化酵素（CYP7A1）の遺伝子発現レベルと CYP7A1 が胆汁酸生合成の中間体と

して合成する 7α水酸化コレステロール濃度が肝臓で上昇した。これらの結果は、HFD 摂取が胆汁酸前駆体合成の増加および CYP8B1 遺伝子発現レベルの増大を介して 12αOH を選択的に増加させる経路を示唆する。さらに、12αOH が混合ミセルの形成作用により食事脂質の吸収を促進する知見と一致して、腸肝循環における 12αOH 濃度は見掛けの脂肪吸収量の増加を伴って肝臓脂肪濃度と正の相関を示した。すなわち、HFD 誘導性の 12αOH 特異的な増大は食事脂肪吸収を促進することで脂肪肝に寄与する可能性がある。

12α水酸化胆汁酸による脂肪肝発症機構の解析

肝臓で合成される 12αOH である CA をラットの食餌に添加することで、HFD に類似した 12αOH 選択的な増加環境を形成し、脂肪肝発症における 12αOH の関与を検証した。その結果、CA 摂取状態では、糞中脂質排泄量の低下だけでなく、非脂質前駆体からの脂肪酸合成 (DNL) を制御するステロール調節配列結合タンパク質 (SREBP1) 遺伝子発現レベルの上昇や肝臓鉄濃度の低下を伴って脂肪肝を発症することを見出した。バンコマイシン投与により腸内細菌による胆汁酸代謝を抑制した場合にも、CA 摂取による肝臓鉄濃度の低下や SREBP1 遺伝子発現の上昇、肝臓脂肪蓄積は解消されなかった。これらの結果は、腸内細菌を介した二次胆汁酸生成に関わらず、肝臓由来の 12αOH が肝臓鉄濃度の低下や DNL 亢進を介して脂肪肝を起こす可能性を示している。

軽度鉄欠乏による肝臓脂肪蓄積への影響評価

CA 摂取において肝臓脂肪蓄積と負に相関して肝臓鉄濃度の減少が観察された結果をふまえ、充足量の半量の鉄を含む軽度鉄欠乏食 (MID) 食をラットに与えることで、食事からの鉄供給制限が肝臓脂肪蓄積に及ぼす影響を調べた。その結果、MID において CA 摂取と同程度の肝臓鉄濃度低下が観察された。この時、肝臓における DNL を亢進させやすいショ糖を多く含む食餌を与えた状態において、MID の摂取が DNL に関わる脂肪酸合成酵素の遺伝子発現レベルの上昇を伴って肝臓脂肪蓄積を誘導することを見出した。以上の結果は、肝臓局所的な鉄濃度の低下が DNL を介して肝臓脂肪蓄積を促進する機序を示唆している。

本研究により、NAFLD で観察される 12αOH 特異的な増加機構の一端として、HFD 摂取による肝臓でのコレステロールおよび酸化コレステロールの蓄積や、胆汁酸合成酵素の遺伝子発現レベルの変動を介した経路が示唆された。また、腸内細菌により生成される二次胆汁酸ではなく、肝臓で合成される 12αOH が、食事脂肪吸収の促進や肝臓鉄濃度の低下、および肝臓 DNL 亢進等の複数の経路を介して肝臓脂質蓄積を促進する経路が示された。

よって、審査員一同は、堀 将太が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。