



Title	ラットにおける $12\alpha$ 水酸化胆汁酸による肝脂質蓄積と血圧上昇との関連に関する研究
Author(s)	下田, 智子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15290号
Issue Date	2023-03-23
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15290">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15290</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/89414">https://hdl.handle.net/2115/89414</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Shimoda_Tomoko.pdf



ラットにおける  $12\alpha$  水酸化胆汁酸による  
肝脂質蓄積と血圧上昇との関連に関する研究

北海道大学 大学院農学院  
応用生物科学専攻 博士後期課程  
下田 智子

# 目次

目次	2
略語一覧	4
図リスト	6
表リスト	7
序論	8
第1章 Wistar ラットと WKAH ラットにおける肝脂質蓄積の変動係数評価	15
1-1. 背景と目的	16
1-2. 実験材料および実験方法	18
1-2-1. 実験動物および食餌	18
1-2-2. 血漿トランスアミナーゼおよび肝脂質の測定	18
1-2-3. 変動係数の解析	19
1-2-4. 統計解析	19
1-3. 結果	20
1-3-1. 近交系と非近交系ラットにおける血漿トランスアミナーゼおよび肝脂質の 変動係数の比較	20
1-3-2. 肝脂質パラメーターと変動係数との相関	20
1-4. 考察	25
第2章 コール酸添加食摂取ラットにおける肝脂質蓄積は血圧上昇を伴う	27
2-1. 背景と目的	28
2-2. 実験材料および実験方法	29

2-2-1.	実験動物および食餌	29
2-2-2.	血圧測定	30
2-2-3.	血漿, 組織および糞尿の回収	30
2-2-4.	胆汁酸解析	31
2-2-5.	血漿, 肝臓, 尿中の生化学的指標の測定	31
2-2-6.	肝臓中の酸化コレステロールの解析	32
2-2-7.	肝臓, 腎皮質中のアンジオテンシノーゲン発現遺伝子の測定	33
2-2-8.	統計解析	33
2-3.	結果	36
2-3-1.	食餌摂取量および体重・臓器重量・血圧の評価	36
2-3-2.	血圧の経時的変化と血圧に関連するパラメーター	36
2-3-3.	胆汁酸組成の解析	37
2-3-4.	12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸と血圧との相関	37
2-3-5.	酸化コレステロールと血圧との相関	37
2-4.	考察	44
	総括	48
	引用文献	55
	参考論文	67
	国内学会	68
	謝辞	69

## 略語一覽

ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ALT	Alanine aminotransferase
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter
BA	Bile acid
BP	Blood pressure
CA	Cholic acid
CDCA	Chenodeoxycholic acid
Chol	Cholesterol
CV	Coefficient of variation
CYP3A2	Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 2
CYP7A1	Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase
CYP8B1	Sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase
DBP	Diastolic blood pressure
DCA	Deoxycholic acid
DNL	<i>de novo</i> Lipogenesis
FASN	Fatty acid synthase
FFA	Free fatty acid
FXR	Farnesoid X receptor
GLUT	Glucose transporter
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
MAFLD	Metabolic dysfunction associated fatty liver disease
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NCD	Non-communicational disease
LXR	Liver X receptor alpha
OGTT	Oral glucose tolerance test
PXR	Pregnane X receptor
RAAS	Renin angiotensin aldosterone system
SBP	Systolic blood pressure
SREBF1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1
TCA	Taurocholic acid

TG	Triglyceride
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
VLDL	Very-low-density lipoprotein

# 図リスト

## 序章

Figure S-1. Schematic diagram of hepatic lipid accumulation and increased blood pressure in previous studies

## 第1章

Figure 1-1. Experimental design for CV analysis

Figure 1-2. Comparison of CVs of several parameters in inbred rats and outbred stocks

Figure 1-3. Correlation between the CVs of parameters determined

## 第2章

Figure 2-1. Parameters in relation to blood pressure (BP) and the polyol pathway

Figure 2-2. BA composition in rats fed a control or CA diet for 13 weeks

Figure 2-3. Correlation between 12 $\alpha$ OH BA and BP.

Figure 2-4. Pearson's correlations between oxysterols and blood pressure (BP)

## 総括

Figure S-2. Schematic diagram of hepatic lipid accumulation and increased blood pressure.

# 表リスト

## 第1章

Table 1-1. Multivariate correlations of CVs in the parameters among inbred and outbred stocks

## 第2章

Table 2-1. Diet compositions in control and CA diet

Table 2-2. BAs measured in this study

Table 2-3. Biochemical parameters

Table 2-4. Hepatic oxysterol concentrations

## 序論

日本は世界において長寿国であるが (Brown, 2015), 平均寿命が長いことは必ずしも生活の質が高いとは限らない. 平均寿命が長くなると, 死亡までに病気や障害のリスクが高まる可能性がある (Brown, 2015). 健康寿命は, 健康上の問題による日常生活活動の制限を特徴としない人の寿命の長さとして定義される (WHO, 2000). 平均余命と健康寿命の差は, 健康状態が悪い状態で生きた平均年数を示すため, 単に平均寿命を延ばすだけでなく, 健康寿命を延ばすことこそが重要である. 世界保健機関 (WHO) によると, 非感染性疾患 (non-communicational disease, NCD) は「不健康な食事や運動不足, 喫煙, 過度の飲酒, 大気汚染などにより引き起こされる, 癌・糖尿病・循環器疾患・呼吸器疾患・メンタルヘルスをはじめとする慢性疾患をまとめて総称したもの」と定義されている (Alwan, 2011). 2022年に策定されたアクションプランでは, 肥満の予防と管理のための新たな勧告がなされ, 2025年までに5歳以下の子どもや青年, 成人の肥満の増加を止め, 2030年までにあらゆる形態の栄養不良をなくすために肥満の予防と管理に関するライフコースの一連に関連する目標が示された (Ghebreyesus, 2022). このように, 近年あらゆる形態の栄養不良への取り組みが強調されている. 食事や代謝異常に関連した疾病が発症する前段階での予防や疾病の発症を未然に防ぐための代謝機構の解明は重要である.

非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) (Eslam, et al., 2020) の罹患率は世界的に急激に増加している (Younossi, 2016; Li, 2019). NAFLDによる肝脂質蓄積は, 生検による組織学的解析により鑑別される. 特に, 肝線維化の進展は NAFLD 患者において心疾患や肝関連死を含む, 長期転帰の主な予測因子として認識されている (Dulai, 2017). また, アディポネクチン (Arita, et al., 1999) や TNF- $\alpha$  (Yamauchi, et al., 2002) がインスリン抵抗性を惹起することによる脂肪組織での脂質蓄積が報告されている. このように肝線維化の進展過程や肥満にともなう脂肪細胞での脂質蓄積の要因は解明され始めているが, その全ての機序が解明されているわけではない. 2020年, 脂肪肝が代謝異常により引き起こされることを明確にした代謝異常関連脂肪肝疾患

(metabolic dysfunction associated fatty liver disease, MAFLD) という概念が提唱された (Eslam, et al., 2020). 多くの交絡因子が関与する肝臓での脂質代謝はいまだ不明な点が多い. 最近のシステムレビュー (Ye, et al., 2020) では脂肪肝の 4 割は非肥満であるとされることから, 肥満によらない代謝異常も無視できず, それに関連する代謝物の解析は脂肪肝発症の予防に重要な役割を果たすと考えられる.

脂質代謝において重要な役割を担う物質のひとつに胆汁酸がある (Figure S-1). 胆汁酸はコレステロールから肝臓で合成される両親媒性化合物であり (Bloch, et al., 1943), コレステロールの異化産物として広く認識されている (Schwarz, et al., 1996). 胆汁酸の合成において主要な段階は, コレステロールの  $7\alpha$  水酸化反応である (Myant & Mitropoulos, 1977). ラットでは, 門脈から離れた部位でコレステロール  $7\alpha$  水酸化酵素 (cholesterol  $7\alpha$ -hydroxylase, CYP7A1) が高発現し (Ugele, et al., 1991), それにより生成された  $7\alpha$  水酸化コレステロールが  $12\alpha$  水酸化酵素 (sterol  $12\alpha$ -hydroxylase, CYP8B1) によりステロイド骨格の 12 位での水酸化反応 (Pandak, et al., 2001) を受けるか否かによって  $12\alpha$  水酸化胆汁酸もしくは非  $12$  水酸化胆汁酸に分類される. 脂質の吸収においては食事由来脂質の可溶化が律速となるため (Hofmann & Mysels, 1988), 肝臓から胆管を通過して小腸に分泌された胆汁酸は脂質の消化・吸収の促進に寄与する. 胆汁酸は, ステロイド骨格を基本とした頑健な構造を持つことに加え, 回腸に高発現する頂端側ナトリウム依存性胆汁酸輸送体 (apical sodium-dependent bile acid transporter, ASBT) による能動輸送を介して門脈血中を通過して再び肝臓へと戻り再利用される (Chiang, 2009). このような胆汁酸の腸肝循環は, コレステロールの消費を最小限に抑えながら効率的に脂質の吸収を促進するという, エネルギー確保のための巧妙なシステムと考えることができる. これまで, 高脂肪食がラットの  $12\alpha$  水酸化胆汁酸の分泌を増加させ, その糞便排泄はエネルギー摂取量に依存すること (Yoshitsugu, et al., 2019), 肝臓や門脈および糞中の  $12\alpha$  水酸化胆汁酸濃度と肝臓脂質蓄積との間では有意な正の相関を示すことが見出された (Hori, et al., 2020). こ

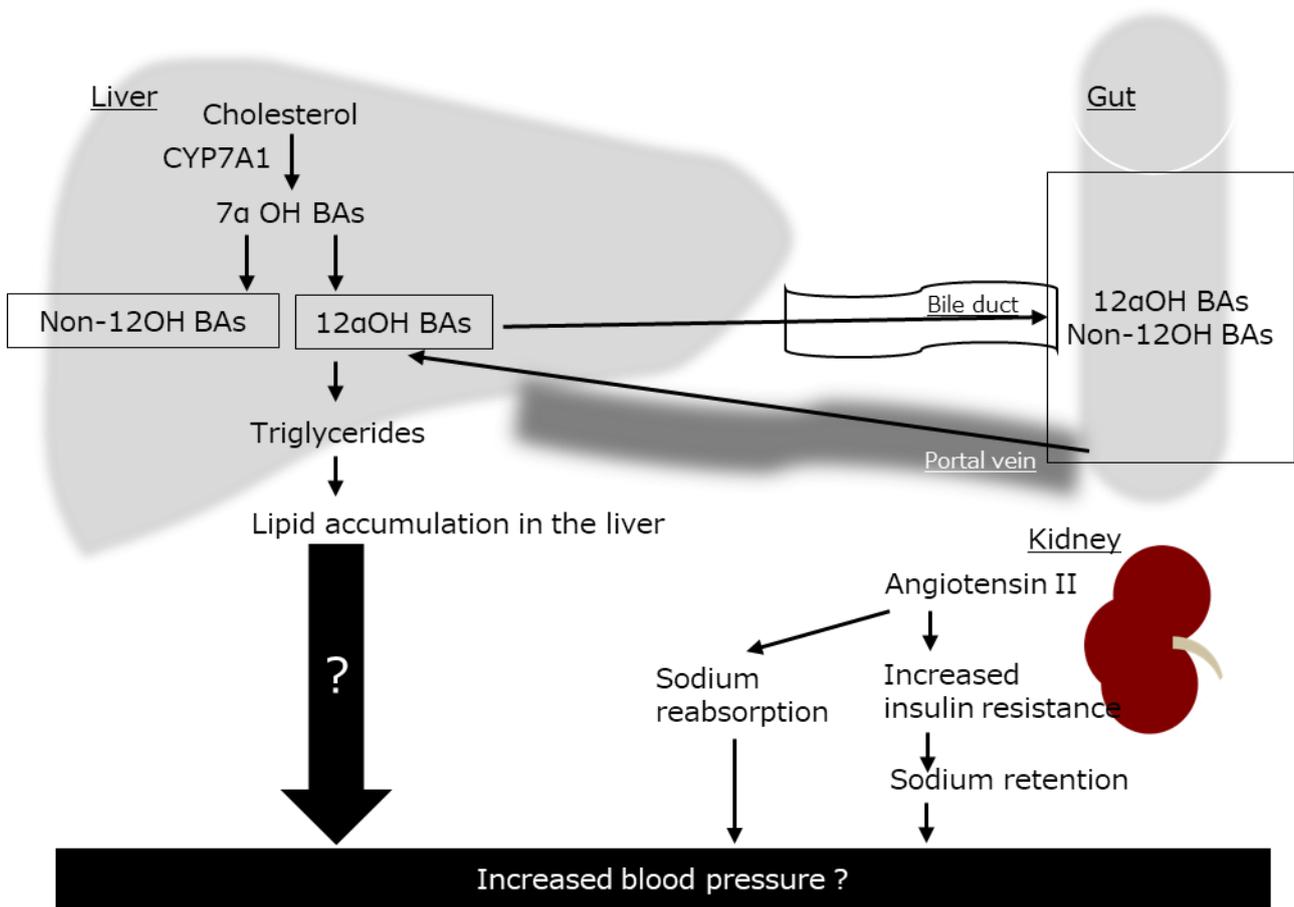
の時の体内胆汁酸環境を模倣するため、 $12\alpha$ 水酸化一次胆汁酸であるコール酸 (CA) を、腸内細菌による胆汁酸の  $7\alpha$ 脱水酸化が滞りなく進む程度に含む飼料 (0.5 g CA /kg 飼料) をラットに与えることで、コントロール食とほぼ同等の食餌中エネルギー組成を保ちつつ高脂肪食摂取時に観察される  $12\alpha$ 水酸化胆汁酸の特異的な増加を模倣する取り組みが行われた (Islam, et al., 2011; Lee, et al., 2020). 高脂肪食を摂取すると観察される胆汁酸代謝、すなわち  $12\alpha$ 水酸化一次胆汁酸やその腸内細菌代謝物であるデオキシコール酸 (DCA)の増加が (Ridlon, et al., 2006), CA 添加食 (0.5 g CA /kg 飼料) 摂取ラットにおいても誘導されることが確認された (Islam, et al., 2011). この条件下で十数週間以上飼育したラットは、肥満をとまなわない肝臓への脂質蓄積 (Figure S-1), 血漿トランスアミナーゼ活性の増加, 血漿アディポネクチン濃度の低下, 消化管における物質透過性の亢進など, 非感染性疾患で観察されるさまざまな症状を示した (Lee, et al., 2020). この状態は、体重増加を伴わずに肝臓に脂質が蓄積するという特徴があり、MAFLD の発症における  $12\alpha$ 水酸化胆汁酸の増加を反映する状態にあるものと考えられる (Caussy, 2019; Nimer, 2021).

MAFLD は、脂肪肝に①過体重・肥満, ②2型糖尿病, もしくは③痩せ・正常体重で2項目以上の代謝異常 (高血圧, 内臓脂肪蓄積, 耐糖能異常, 耐脂質異常症) のいずれかを合併する場合に診断される (Eslam et al., 2020). 糖尿病治療の臨床試験 (Ueki, et al., 2012) では、高血糖の是正のみでは脳や心血管疾患の予防は難しく、厳格な血圧や脂質レベルのコントロールを必要とすることが示唆されている. 血圧は、心拍出量と末梢血管抵抗の積で規定され、その調節機構には主に中枢・交感神経系やホルモン, 末梢血管, 体液量の4つが関与する. 1つめの中枢・交感神経系は、心拍出量と末梢血管抵抗を調節することにより血圧を調整する (Kumagai, 2012). 2つめの血圧調整に関与する主要なホルモンは、カテコラミン (副腎髄質ホルモン)とレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系 (renin angiotensin aldosterone system, RAAS) があげられる. 副腎髄質ホルモンとしては、アドレナリン ( $\alpha$ および  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  受容体に作用) とノルアドレナリン (主に  $\alpha$  受容体に作用) がある. 交

感神経の刺激によって、アドレナリンは副腎髄質においてノルアドレナリンにより合成され、ノルアドレナリンとともに血中に分泌される。これらのホルモンは受容体を介して循環器系や代謝の制御に深く関与する。 $\alpha$ 受容体は主に平滑筋収縮に関与しており、 $\beta_1$ 受容体は心拍数増加および心筋収縮力増大に、 $\beta_2$ 受容体は血管および血管平滑筋弛緩に関与する。RAASとしては、腎臓の傍糸球体装置から血中へ分泌されるレニンが、肝臓で産生されるアンジオテンシノーゲンを切断してアンジオテンシン I を産生する。そして、肺や血管内皮から産生されるアンジオテンシン変換酵素によって、アンジオテンシン I がアンジオテンシン II へと変換され、アンジオテンシン II 受容体を介して、血管平滑筋の収縮を促進する (Nishiyama, 2019)。3つめの末梢血管としては、上述の交感神経や RAAS の亢進が血管収縮を促し、末梢血管抵抗を増加させ、血圧を上昇させる。他の血管収縮因子としては、エンドセリンやトロンボキサン  $A_2$  などがあげられ、これらの因子の増加も血管収縮を促し血圧を上昇させる。一方、NO やプロスタサイクリンなどの主要な血管弛緩因子は、血管を弛緩させ血圧を下降させる。また、生活習慣や加齢に伴う末梢血管抵抗の増加 (動脈硬化) も深く関与し、動脈硬化が進展すると、血管内径が細くなり末梢血管抵抗が増加して血圧上昇を惹起する (Moghadasian, 1999)。4つめの体液量は、その恒常性を維持することが血圧を正常に保つことにつながる。体液量は主に浸透圧物質によって保持される。細胞外の主要な浸透圧物質はナトリウムである。ナトリウムは腎臓で尿中に排泄され、その量を適切に調節することでナトリウム量の恒常性を維持する (Sheng, 2000)。腎臓は、Figure S-1 に示すように RAAS におけるレニン-アンジオテンシン分泌に加えて、ナトリウムや体液量調節の観点からも血圧を制御している臓器であるといえる。さらに、生体内のナトリウムや体液量は、腎臓に加え、肝臓や筋肉、皮膚、免疫細胞・リンパ管系など、さまざまな多臓器が連携し合うことで恒常性が維持されていることも報告されている (Minegishi, 2020)。これまでに MAFLD で見られる脂肪肝の遷延により血圧の変動に関する機序は、

明らかにされていない。そこで、本研究では胆汁酸が脂質代謝だけでなく血圧に及ぼす影響に着目した。

血圧や脂質代謝のコントロールを栄養学の視点から動物実験を用いて検討しようとする際には、秤量や化学分析誤差といった物理的・化学的誤差や飼育方法や環境条件などの要素によって生ずる誤差があり、それらを克服できたとしてもなお個体差が生じ得る可能性がある。この個体差の大きさを示す方法として、標準偏差ならびに変動係数を用いて検討することができる (Konarzewski, et al., 1995)。特に抽出や分析などのさまざまなステップにおいて生じ得る誤差をできるだけ抑えた上で個体間変動を最小限に抑えることは、解釈し得る結果を導き出すために重要である。そこで、本研究では、近交系と非近交系のラットにおける肝脂質関連データのバラツキの程度を評価する研究を実施し、それをもとに選択した系統のラットを用いて CA 添加食により肥満を伴わない肝臓脂肪蓄積が生じた際に血圧へ及ぼす影響を明らかにする事を目指した。



**Figure S-1. Schematic diagram of hepatic lipid accumulation and increased blood pressure in previous studies.**

A conceptual diagram is shown based on previous studies.

第 1 章 Wistar ラットと WKAH ラットにおける  
肝脂質蓄積の変動係数評価

## 1-1. 背景と目的

実験動物における食事誘導性の非アルコール性脂肪肝モデルとして、メチオニンやコリンの欠乏、高脂肪食や高フルクトース食を用いたモデルがある (Ibrahim, et al., 2016). メチオニンやコリンの欠乏は、肥満にはならず肝臓で炎症や繊維化が引き起こされ、極めて重篤な肝疾患を呈するモデルである。高脂肪食による脂肪肝症状はそれほど重篤ではないものの、脂肪組織重量の増加による肥満に加え肝臓脂質蓄積と炎症が観察される (Ibrahim, et al., 2016). 高フルクトース食でも肝脂質蓄積に伴う炎症に脂肪組織重量の増加が伴う (Maithilikarpagaselvi, et al, 2016; Do, et al, 2018).

我々の用いた CA 添加飼料は 0.5 g CA /kg 飼料で 10 数週間飼育しても摂食量や体重増加に違いがないため (Lee, et al., 2020), 肥満や炎症・繊維化を伴わずに肝臓で脂質が蓄積されるモデルである。

代謝物解析を進める中で、動物種の実験動物種は重要な問題である。抽出や分析などのさまざまなステップにおいて誤差が生じ得ることに加え、個体間での数値のバラツキも無視できない。この誤差をできるだけ考慮して意味のある結果を導き出すための取り組みが重要であると考えられる。

げっ歯類は、その遺伝的背景により近交系と非近交系に分類される (Festing, 1997). 近交系は非近交系と比べて遺伝的な均一性があり、毒性または薬理的刺激に対する応答の表現型の個体間変動が少なくなる (Festing, 2010). これは、近交系の使用が統計的検出力を高め、より少ない動物で実験の再現性を向上させることを示唆している。対照的に、非近交系は実験にかかるコストが低く、人間の集団で見られるような個体間での遺伝的浮動が想定される (Gill, 1980). 生命科学において、広い分野で近交系動物が用いられているものの、近交系と非近交系の動物間の生物学的指標の変動に関して検討している報告はほとんどない (Festing, 2014). 近交系と非近交系の両方のげっ歯動物を使用するそれぞれの利点を考慮すると、近交系および非近交系げっ歯類動物間で、着目すべき生化学的指標の変動を比較することは、当該研究の進捗を左右する大きな要因となりうると思われる。

そこで、第1章では、変動係数(CV)を使用して、近交系と非近交系ラットの生物学的指標として、体重、血漿トランスアミナーゼ、および肝脂質濃度の変動を明らかにすることを目的とした。

## 1-2. 実験材料および実験方法

### 1-2-1. 実験動物および食餌

Wistar 雄ラット (Slc: Wistar, 日本エスエルシー株式会社, 静岡, 日本) および Wistar ラットに由来する Wistar King A Hokkaido 雄性ラット (WKAH /HkmSlc, 日本エスエルシー株式会社, 日本) (NBRP Rat No: 0154) をそれぞれ非近交系および近交系としてこの実験で使用した。飼育は、室温  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$ 、明期 8:00~20:00 の空調室で行い、ラットはワイヤー底のケージに個別に収容され、食物と水を自由に摂取できるようにした。AIN-93G (Lee, et al., 2016) に準拠した食餌に馴化し、実験期間の終わりにラットをペントバルビタールナトリウム (50 mg /kg 体重; 共立製薬, 東京, 日本) で麻酔し、採血により失血させた。血漿および肝臓を採取し、分析まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

この実験は、国立大学法人北海道大学の施設動物管理・使用委員会で承認されており (承認番号: 14-0026, 17-0119), 全ての動物実験は北海道大学動物実験に関するガイドラインに従って実施した。

### 1-2-2. 血漿トランスアミナーゼおよび肝脂質の測定

血漿 ALT は、トランスアミナーゼ CII-test Wako キット (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を用いて測定した。肝脂質は、クロロホルムとメタノール (2:1, v/v) を使用して抽出した。抽出物を濃縮乾固した後にイソプロパノールに溶解し、トリグリセリド E-テストワコーおよびコレステロール E-テストワコー (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を用いて、TG および Chol をそれぞれ測定した。

### 1-2-3. 変動係数の解析

単位や飼育期間の異なるデータのばらつきや平均値に対するばらつきを相対的に比較するために変動係数 (CV) を用いた。平均値に対する標準偏差の比率として算出される CV は、当該データにおけるサンプルごとのバラツキの程度を示す無次元の数値である。AIN-93G に準拠した食餌を与えたラットの 3 つの群を使用した、3 つの群の飼育期間は、Wistar ラットでは 6 週間飼育、WKAH ラットでは 2 週間飼育、また WKAH ラットでは 13 週間飼育したデータを用いた (Figure 1-1)。各実験データは、コントロール群と対照群 (1 群あたり 5~12 匹のラット) で構成された。CV は、体重 (g)、相対肝臓重量 (g /kg 体重)、肝 TG (mg /g liver)、肝 Chol (mg /g liver) および血漿 ALT (IU /L) について各群で算出した。

### 1-2-4. 統計解析

データの数値は平均値および SEM で示した。JMP15.0 (ver. 15.0; SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて、3 群の各パラメーターの比較には Tukey-Kramer 検定を用い、相関分析には Spearman の相関係数を求めた。また、体重、相対肝臓重量、肝 TG、肝 Chol および血漿 ALT は多変量解析を行った。有意差水準を  $P < 0.05$  に設定した。

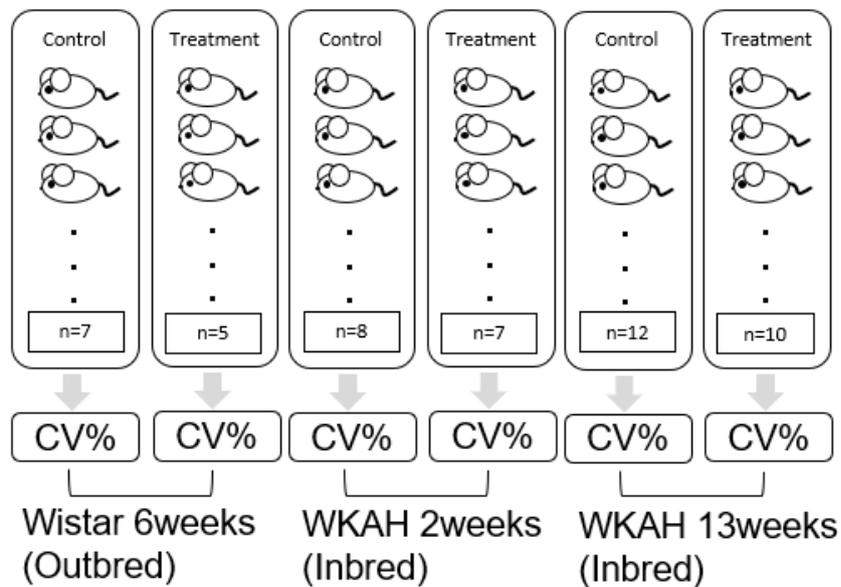
### 1-3. 結果

#### 1-3-1. 近交系と非近交系ラットにおける血漿トランスアミナーゼおよび肝脂質の変動係数の比較

各測定指標の CV を Figure 1-2 に示す。体重と相対肝臓重量の CV は約 5~10% だったが、肝脂質濃度 (TG および Chol) と血漿 ALT の CV は 10~40% の範囲だった。ラットの同系統間で体重、肝臓重量、Chol および ALT の CV の間に有意差は認められなかった。一方、TG の CV は、2 週齢および 13 週齢 WKAH ラットで 6 週齢の Wistar ラットよりも有意に低値を示した。Chol と ALT では、非近交系 Wistar ラットの CV は、実験期間の長さに関係なく WKAH ラットの CV よりも高くなる傾向が認められた。また、体重と肝臓重量については、ラットの遺伝的背景に関係なく CV が 10% に収まる結果となった。

#### 1-3-2. 肝脂質パラメーターと変動係数との相関

Table 1-1 に CV の多変量解析の結果を示す。体重の CV と相対肝重量には正の相関 ( $R = 0.64, P < 0.05$ ) が認められた。肝 TG の CV と肝 Chol の CV との間に正の相関が認められた ( $R = 0.70, P < 0.05$ ) (Figure 1-3)。CV の分布を確認すると WKAH ラットは、TG の CV プロットは比較的低い位置にあり (Figure 1-3A)、Wistar ラットの CV プロットは広く散らばっていた。このような傾向は、体重の CV と相対肝臓重量との関連では認められなかった (Figure 1-3B)。



**Figure 1-1. Experimental design for CV analysis.**

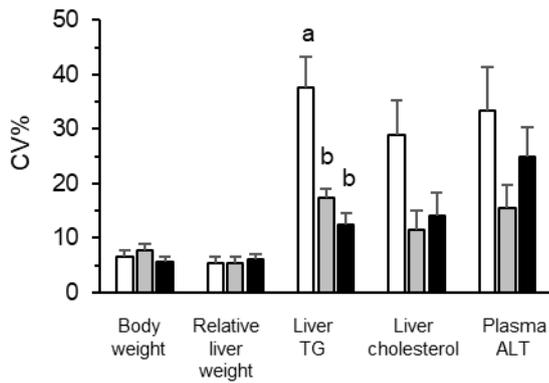
CVs is the percentage where the proportions of standard deviation in the mean value.

**Table 1-1. Multivariate correlations of CVs in the parameters among inbred and outbred stocks.**

	1	2	3	4	5
	CV of body weight	CV of relative liver weight	CV of liver TG	CV of liver cholesterol	CV of ALT
1. CV of body weight	—				
2. CV of relative liver weight	0.6404*	—			
3. CV of liver TG	-0.0939	-0.2420	—		
4. CV of liver cholesterol	-0.1743	-0.1539	0.7008*	—	
5. CV of ALT	-0.3263	-0.1400	0.3441	0.5522	—

Asterisks show a significant correlation between the parameters ( $P < 0.05$ ).

A



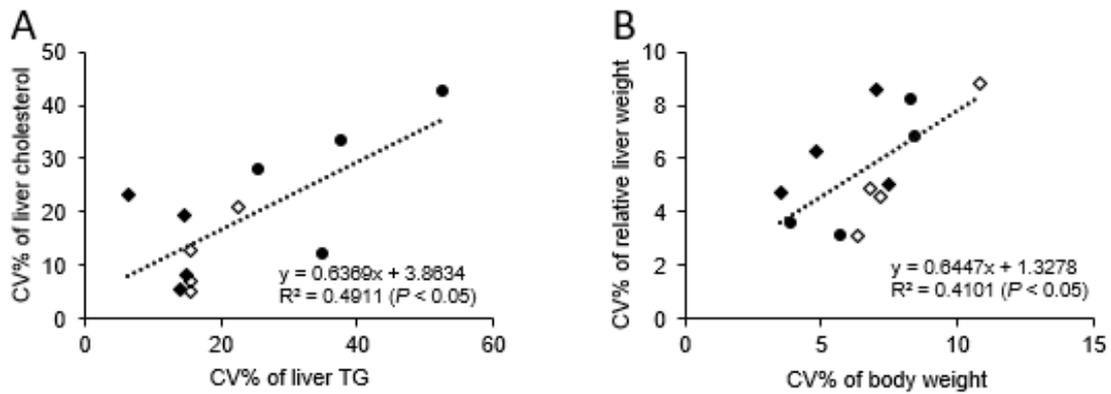
B

strain	group	n	Body weight	Relative liver weight	Liver TG	Liver cholesterol	Plasma ALT
Wistar 6 weeks	Control	7	6.30	10.21	31.89	7.96	50.90
Wistar 6 weeks	Treatment	5	9.26	9.47	57.41	17.89	17.40
Wistar 6 weeks	Treatment	5	4.37	11.74	47.85	12.46	42.80
Wistar 6 weeks	Treatment	5	7.66	17.62	24.33	19.09	22.70
Wistar 6 weeks	Control	7	4.85	4.29	52.57	42.49	
Wistar 6 weeks	Treatment	5	5.69	6.49	37.61	33.38	
Wistar 6 weeks	Treatment	5	5.59	5.45	77.53	35.63	
Wistar 6 weeks	Treatment	5	5.31	8.84	53.59	25.08	
WKAH 2 weeks	Control	8	6.28	6.16	15.58	5.14	11.70
WKAH 2 weeks	Treatment	7	6.75	10.67	15.56	7.13	5.00
WKAH 2 weeks	Treatment	7	3.59	6.61	13.23	10.69	23.70
WKAH 2 weeks	Control	8	5.16	6.10			
WKAH 2 weeks	Treatment	7	6.27	10.24			21.10
WKAH 13 weeks	Control	12	3.47	9.55	13.94	5.39	34.30
WKAH 13 weeks	Treatment	10	7.48	10.78	6.28	23.12	30.40
WKAH 13 weeks	Control	12	7.01	10.89	20.97	8.31	10.20
WKAH 13 weeks	Treatment	10	4.77	7.95	18.81	19.64	25.20

**Figure 1-2. Comparison of CVs of several parameters in outbred rats and inbred stocks.**

A. Bars represent CVs in outbred Wistar (open bar) for 6 weeks and inbred WKAH (gray bars for 2 weeks and black bars for 13 weeks). Values not sharing the same letter are significantly different ( $P < 0.05$ ,  $n=4$ ).

B. The mean value of CVs of several parameters in each group.



**Figure 1-3. Correlation between the CVs of parameters determined.**

(A) CVs of liver TG and liver Chol in inbred rats and outbred stocks. Each spot shows the value for individual rat in outbred Wistar rats (closed circle, 6 weeks) or inbred WKAH rats (open diamond, 2 weeks; filled diamond, 13 weeks).

(B) CVs of body weight and relative liver weight in inbred rats and outbred stocks. Each spot shows the value for individual rats in outbred Wistar rats (closed circle, 6 weeks) or inbred WKAH rats (open diamond, 2 weeks; filled diamond, 13 weeks).

#### 1-4. 考察

CV は測定システムの精度を評価するために使用されている (Hundal, et al., 2002). CV 自体は数値変動の指標であるため、さまざまな生物学的指標の評価にも応用できる. この研究では、近交系と非近交系ラットの実験的栄養学研究で頻繁に使用される体重と肝臓での脂質蓄積の変動を評価した. 体重および相対肝臓重量の CV は、近交系および非近交系ラットの双方で 10% 未満だったが、肝 TG, 肝 Chol および血漿 ALT などの代謝指標の CV は 10% を超えた. 特に、近交系である WKAH ラットの肝 TG の CV 値が非近交系の Wistar ラットよりも低いことは、近交系ラットの遺伝的背景の安定性が代謝指標の CV の低下に寄与していることを示唆している.

さまざまな近交系マウスの体重の CV は 4.2% から 10.1% の範囲である (Konarzewski, et al., 1995). 本研究における体重の CV は、遺伝的背景に関係なく約 5~10% と先行研究と同程度であった. 代謝指標の場合、本研究の結果でも文献でも次のように高い CV が報告されている. ヒトの血漿アミノ酸濃度の CV は 3% から 28% であり、大部分の臨床サンプルでは約 15% との報告がある (Felig, et al., 1969). Fluoro-2-deoxy-D-glucose 取込みの CV は、ヒト肺癌細胞で約 31.9% であり (Nolop, et al., 1987), 一晚絶食したサルにおける血漿グルコースの CV は 34 ~ 51% である (Young, et al., 1999). さらに、 $\gamma$ -アミノ酪酸濃度の CV 値が高い場合には、 $^1\text{H-NMR}$  のメタボロミクス分析で対照群と治療群の違いを検出することが困難になり (Tkáč, et al., 2001), 代謝物濃度の違いを検出するためには低い CV が有利である.

実験動物での研究は、肥満、2 型糖尿病、非アルコール性脂肪肝疾患などの代謝性疾患の発症における生物学的プロセスに関する貴重な情報を提供し続けており (Febbraio, et al. 2019; Kleinert, et al. 2018), さまざまな代謝マーカーの確立を可能にした. 近交系のすべての数値における CV が、必ずしも非近交系のそれよりも小さいわけではないが (Festing, 2010), 本研究は、肝臓における TG の濃度変動の差異を正確に評価するためには、CV 値が低い近交系動物の使用が有利と

なることを示唆している。また、体重の CV が WKAH ラットと Wistar ラットの双方でほぼ同等であることを示した。合理的な結果を得るために、対象となるパラメーターの CV 分析に基づき目的の指標に対して信頼できる動物系統を使用する必要がある。ラットでは、マウスに比べて分析するために十分な量の臓器や体液・腸内容物を確保できるため、栄養科学では高頻度に用いられる。

PubMed の検索では、実験研究に用いられた動物の 80% が近交系マウスであり、10% が非近交系ラットであった (Festing, 2014)。このことは、特にラットを用いた研究において研究者が近交系を使用する利点を認識していない可能性を示している。生物学的指標で有意差を得るには、一般に各値で約 7% の CV が必要である (Kobayashi, et al. 2011)。体重と相対肝臓重量の CV がこの範囲内にあるため (Figure 1-2)、これらの指標の変化は、非近交系の系統でも容易に検出できる。一方で、肝 TG や Chol, 血漿 ALT などの代謝指標の有意差を検出することは、特に非近交系では困難である可能性が否めない。実際、Wistar ラットでは肝 TG と肝 Chol の高い CV 値が観察され、これらの値の間に有意な相関関係が生じ (Figure 1-3)、非近交系の Wistar ラットにおけるこれらのパラメーターの大きな偏差が示された。

本研究は、実験期間の長さにかかわらず近交系の WKAH ラットにおける肝 TG の CV が、非近交系の Wistar ラットよりも有意に低い値をとることを示した。このことは、近交系ラットの使用が肝臓脂質変動を正確に評価するために役立つことを示唆している。

## 第2章 コール酸添加食摂取ラットにおける

肝脂質蓄積は血圧上昇を伴う

## 2-1. 背景と目的

第1章において、肝臓における脂質濃度の CV を比較したところ、近交系の方が非近交系に比べて肝脂質の CV が低い値に抑えられることが確認できた。高脂肪食摂取ラットでは 12 $\alpha$  水酸化胆汁酸の分泌が増加し、その糞便排泄はエネルギー摂取量に依存する (Yoshitsugu, et al., 2019)。また、高脂肪食を与えられたラットの腸肝循環における 12 $\alpha$  水酸化胆汁酸濃度と肝臓脂質蓄積の間には、有意な正の相関が認められた (Hori, et al., 2020)。胆汁酸が肝臓から胆管へ排泄され、小腸内で脂肪酸の吸収に関与した後、小腸下部で再吸収されるという体内の胆汁酸環境を模倣するために、主要な 12 $\alpha$  水酸化胆汁酸であるコール酸 (CA) を食事に追加する実験の報告が複数ある (Ridlon, et al., 2006; Islam, et al., 2011)。一般に、食事に追加された CA が微生物の変換能力を超えていると直接糞中に排泄されるが (Ridlon, et al., 2006; Islam, et al., 2011)、Hori らは飼料への CA 添加量が 0.5 g /kg であれば糞中での CA は増えずに DCA は増加することを見出した (Hori, et al., 2020)。すなわちこの添加量であれば腸内細菌による胆汁酸の 7 $\alpha$  脱水酸化を妨げない状態にあると考えられる。この時の腸内微生物叢と胆汁組成の変化は高脂肪食における状態と概ね似た状態に変化した (Islam, et al., 2011)。また、これらの条件下では、*Firmicutes* が腸内微生物叢で優勢を示した (Islam, et al., 2011; Lee, et al., 2020)。これらのことは、12 $\alpha$  水酸化胆汁酸そのものが腸内菌叢の調節因子として作用することを示している。

これらの研究経過をふまえて、本章では、コントロール食とほぼ同等の食餌組成を保ったまま高脂肪食摂取時の 12 $\alpha$  水酸化胆汁酸の特異的な増加を模倣した CA 添加食モデル (0.5 g /kg diet) (Islam, et al., 2011; Lee, et al., 2020) を用いた。高脂肪食を摂取すると、腸管循環での 12 $\alpha$  水酸化胆汁酸や糞中での DCA の濃度増加が観察される。本研究で用いた CA 添加食も類似の胆汁酸代謝を形成することは確認されている (Islam, et al., 2011; Lee, et al., 2020)。これらの条件下で 13 週間以上飼育した後、ラットは、肥満をともしない肝臓脂質の蓄積、血漿トランスアミナーゼ活性の増加、

血漿アディポネクチン濃度の低下，消化管における物質透過性の亢進など，非感染性疾患のさまざまな特徴を示した (Lee, et al., 2020). この肝脂質蓄積では，肝臓における炎症応答や繊維化などは観察されていないため初期の肝脂質蓄積と考えることができる．この時，リポポリサッカライドで急性炎症を誘発すると，血漿トランスアミナーゼ活性はコントロール群のラットと比較して，CA 添加食摂取ラットで著しく増加することが見出された (Lee, et al., 2020). これらのことは， $12\alpha$  水酸化胆汁酸が肝脂質蓄積に関連するさまざまな症状における重要な誘導因子であることを示唆している．

肝臓の脂質蓄積を伴う代謝異常は，最近，異常な糖代謝と高血圧を伴う心血管疾患の危険因子である代謝障害関連脂肪肝疾患 (MAFLD)として分類されている (Eslam, et al., 2020). MAFLD は，脂肪肝に①過体重・肥満，②2型糖尿病，もしくは③痩せ・正常体重で2項目以上の代謝異常 (高血圧，内臓脂肪蓄積，耐糖能異常，耐脂質異常症)のいずれかを合併する場合に診断される (Eslam et al., 2020). CA 添加食摂取ラットでは，肝臓での脂質蓄積を認めたが，体重の増加を伴わず，絶食時の血糖値に有意差は観察されなかった (Yoshitsugu, et al., 2019). つまり CA 添加食摂取ラットは，非肥満状態での脂肪肝のモデルと考えることができる一方，血圧への影響は検討されていない．そこで，本研究では CA 添加食摂取にともなう血圧 (BP) の変動に着目し，肝脂質蓄積との関連を検証することを目的とした．

## 2-2. 実験材料および実験方法

### 2-2-1. 実験動物および食餌

WKAH/Hkm Slc 雄ラット (生後3週間，日本エスエルシー，浜松，日本) を，温度  $22 \pm 2$  °C，湿度  $55 \pm 5\%$ ，および12時間明期 (明期，8:00～20:00) の条件下で個別のケージに収容した．動物は食物と水を自由に摂取できるようにした．ラットに AIN93G に準拠した餌 (Reeves, et al., 1993) を

2週間の順化期間にわたって与えた後、AIN-93ベースの対照飼料を与えた群(n=12)と0.5 g/kgのCA添加飼料を与えた群(n=12)(Table 2-1)の2群に分けて13週間飼育した。

動物実験は、国立大学法人北海道大学の施設内動物管理使用委員会によって承認された(許可番号14-0026および17-0119)。また、北海道大学動物実験実施マニュアルに従って実施した。

### 2-2-2. 血圧測定

血圧は、非侵襲的血圧測定装置(BP-98A-L, Softron, 東京, 日本)を用いて測定した。ラットを管状の保定器に入れ、テールカフセンサーを使用して収縮期血圧と拡張期血圧を測定した。測定は飼育開始時から解剖時まで実施し、頻度は1回/3日の間隔で、10:00~12:00の間に実施した。血圧値は、1度の測定において3回測定し、その平均値を用いた。血圧の数値としては群分けを行ってから4週間の間隔で結果を表記した。

### 2-2-3. 血漿、組織および糞尿の回収

飼育終了時に糞を採取した。飼育終了時、ラットはペントバルビタールナトリウム(50 mg/kg体重; 共立製薬, 東京, 日本)の腹腔内注射で麻酔した。腹部大動脈と門脈から血液サンプルを採取し、ヘパリンナトリウム(200 IU/mL血液; ナカライテスク, 京都, 日本)とアプロチニン(500 KIU/mLウシ肺由来; 富士フイルム和光ケミカル, 大阪, 日本)を含むシリンジに採取した。失血により安楽死させた後に、血漿、肝臓、盲腸内容物、および腎皮質を採取し、胆汁酸以外は、分析に使用するまで-80°Cで保存した。胆汁酸分析用のサンプルは、-30°Cで保存した。膀胱からは尿を採取した。

#### 2-2-4. 胆汁酸解析

胆汁酸解析は、肝臓、門脈血漿、大動脈血漿、盲腸内容物、腎皮質、および糞便において実施した。胆汁酸の抽出と分析は、先行研究 (Hagio, et al., 2009; Hori, et al., 2022) に従って、Dionex UltiMate 3000 UPLC システム (Thermo Fisher Scientific Corporation, CA, USA) を使用して実施した。質量分析は、陰イオンモードでエレクトロスプレーイオン化プローブを備えた Orbitrap 質量分析計 Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) を使用して実施した。内部標準としてノルデオキシコール酸 (23-nor-5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ , 12 $\alpha$ -diol) を用いて胆汁酸濃度を測定した。この研究で分析された胆汁酸分子種を Table 2-2 に示す。

#### 2-2-5. 血漿、肝臓、尿中の生化学的指標の測定

トランスアミナーゼ CII テストキット (和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を使用して、大動脈血漿中の AST および ALT を測定した。TG, Chol および遊離脂肪酸 (FFA) の濃度は、それぞれトリグリセリド E 検定, コレステロール E 検定, および NEFA C 検定 (和光純薬工業) を使用した。脂質抽出のために、100 mg の肝臓または凍結乾燥した糞を抽出溶液 (クロロホルム/メタノール = 2:1) に浸し (Folch, et al. 1957), 2 日間かけて脂質を抽出した。抽出物中の溶媒をさらに 2 日間風乾し、脂質抽出物を 2-プロパノールに溶解して測定した。TG および Chol レベルは、先行研究の方法 (Lee, et al., 2020) で実施した。血漿ナトリウム濃度は、原子吸光分光光度計 (Z-5310; Hitachi High-Technologies Corporation, 東京, 日本) を用いて測定した。ソルビトール, フルクトース, およびグルコースの肝臓濃度は、D-Sorbitol Colorimetric Assay Kit (BioVision, Inc., Waltham, MA, USA), EnzyChrom™ Fructose Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA), およびグルコース C-II テストワコー (Wako) を使用して測定した。尿中クレアチニンおよびアルブミンレベルは、それぞれク

レアチニンアッセイキット (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) および LBIS ラットアルブミン ELISA キット (Wako) を用いた。

#### 2-2-6. 肝臓中の酸化コレステロールの解析

肝臓中の酸化コレステロールは、先行研究 (Shirouchi, et al., 2017) の方法を一部改変して抽出した。肝脂質は、クロロホルムとメタノール (2:1, v/v) を使用して抽出した。抽出した肝臓脂質をエバポレーターで濃縮乾固し、酸化防止剤として 0.01% ブチル化ヒドロキシトルエンを含むヘキサンに溶解し、分析まで -30 °C に保存した。内部標準として、19-ヒドロキシコレステロール (5-cholesten-3 $\beta$ , 19-diol) (Steraloids, Newport, RI, USA) を各サンプルに加えた。一晩けん化した後、未けん化脂質をヘキサンで抽出した。抽出した脂質から Sep-Pak Silica Vac カートリッジ (日本ウォーターズ, 東京, 日本) を用いてオキシステロールを分取した。すなわち、カートリッジをヘキサンで平衡化した後、ヘキサンと 2-プロパノール (3:7, v/v) の混合物でオキシステロールを溶出した。オキシステロール画分の溶媒を除去した後、トリメチルシリルエーテルに変換した。オキシステロールは、SPB-1 融合シリカキャピラリーカラム (内径 60 m $\times$ 0.25 mm, 0.25 $\mu$ m ID, Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) を用いてガスクロマトグラフ質量分析装置 (QP5050A, Shimadzu) で解析した。各オキシステロールの濃度は、19-ヒドロキシコレステロールを内部標準として定量した。分析したオキシステロールは、4 $\beta$ -hydroxycholesterol (5-cholesten-3 $\beta$ , 4 $\beta$ -diol),  $\alpha$ -epoxycholesterol (cholestan-5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ -epoxy-3 $\beta$ -ol),  $\beta$ -epoxycholesterol (cholestan-5 $\beta$ , 6 $\beta$ -epoxy-3 $\beta$ -ol), 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol (5-cholesten-3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -diol), 7 $\beta$ -hydroxycholesterol (5-cholesten-3 $\beta$ , 7 $\beta$ -diol), 7-ketcholesterol (5-cholesten-3 $\beta$ -ol-7-one), 25-hydroxycholesterol (5-cholesten-3 $\beta$ , 25-diol), および 27-hydroxycholesterol (25R-cholest-5-en-3 $\beta$ , 26-diol) である。なお、本解析は、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栄養化学分野の佐藤匡央教授と共同して実施した。

### 2-2-7. 肝臓、腎皮質中のアンジオテンシノーゲン発現遺伝子の測定

先行研究 (Hori, et al., 2018) に従い、肝臓と腎皮質からの total RNA 抽出には RNeasy Mini キット (Qiagen, ヒルデン, ドイツ) を使用した。RNA の逆転写には ReverTra Ace qPCR RT master mix with gDNA Remover (Toyobo Co., Ltd. Osaka, Japan) を使用した。作成した cDNA と TaqMan Gene Expression Assays および TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で発現解析を行なった。用いた TaqMan Gene Expression Assay は、Angiotensin 変換酵素 (Rn00561094\_m1), Angiotensinogen (Rn00593114\_m1), レニン (Rn00561847\_m1) である。また、内在性コントロールとして ribosomal protein lateral stalk subunit p0 (Rn03302271\_gH) を使用した。

### 2-2-8. 統計解析

データは平均  $\pm$  SEM で示した。JMP Pro 16.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を統計解析に使用した。2 群間の有意差は、Student's *t*-test を用い、血圧と胆汁酸の相関については、Pearson の積率相関係数を評価した。有意差水準は  $P < 0.05$  とした。

**Table 2-1. Diet compositions in control and CA diet**

	Control	CA
	g /kg diet	
Casein <sup>1</sup>	200	200
Dextrin <sup>2</sup>	529.5	529.5
Sucrose <sup>3</sup>	100	99.5
Soybean oil <sup>4</sup>	70	70
Cellulose <sup>5</sup>	50	50
Mineral mixture <sup>6</sup>	35	35
Vitamin mixture <sup>7</sup>	10	10
L-Cystine <sup>8</sup>	3	3
Choline hydrogen tartrate <sup>8</sup>	2.5	2.5
Cholic acid <sup>8</sup>	-	0.5

<sup>1</sup> NZMP Acid Casein (Fonterra Co-Operative Group Limited, Auckland, New Zealand),

<sup>2</sup> TK-16 (Matsutani Chemical Industry Co., Ltd., Hyogo, Japan)

<sup>3</sup> Nippon Beet Sugar Manufacturing Co., Ltd., Tokyo, Japan

<sup>4</sup> J-Oil Mills, Inc., Tokyo, Japan

<sup>5</sup> Crystalline cellulose (Ceolus PH-102, Asahi Kasei Chemicals Corp., Tokyo, Japan)

<sup>6</sup> AIN-93G Mineral mixture (Reeves et al., 1993)

<sup>7</sup> AIN-93G Mineral mixture (Reeves et al., 1993)

<sup>8</sup> FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan

**Table 2-2. BAs measured in this study**

Systemic name	Trivial name	Abbreviations
<b>Primary 12<math>\alpha</math>OH BAs</b>		
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-sulphoethyl)-amide	Taurocholic acid	TCA
5 $\beta$ -cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide	Glycocholic acid	GCA
<b>Secondary 12<math>\alpha</math>OH BAs</b>		
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-sulphoethyl)-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 $\alpha$ ,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 $\alpha$ 12
5 $\beta$ -cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,12 $\alpha$ -triol	Ursocholic acid	UCA
<b>Primary non-12OH BAs</b>		
5 $\beta$ -cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diol	Chenodeoxycholic acid	CDCA
5 $\beta$ -cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(2-sulphoethyl)-amide	Taurochenodeoxycholic acid	TCDC
5 $\beta$ -cholanic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -di-ol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide	Glycochenodeoxycholic acid	GCDCA
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 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -triol- <i>N</i> -(2-sulphoethyl)-amide	Tauro- $\alpha$ -muricholic acid	T $\alpha$ MCA
5 $\beta$ -cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\beta$ -triol- <i>N</i> -(2-sulphoethyl)-amide	Tauro- $\beta$ -muricholic acid	T $\beta$ MCA
<b>Secondary non-12OH BAs</b>		
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-sulphoethyl)-amide	Tauro- $\omega$ -muricholic acid	T $\omega$ MCA
5 $\beta$ -cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -triol	Hyochoolic acid	HCA
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-sulphoethyl)-amide	Taurohyodeoxycholic acid	THDCA
5 $\beta$ -cholanic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide	Glycohyodeoxycholic acid	GHDC
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-sulphoethyl)-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-sulphoethyl)-amide	Taurolithocholic 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

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 食餌摂取量および体重・臓器重量・血圧の評価

食物摂取量と最終体重に有意な群間差は観察されなかった (Table 2-3). コントロール群と比較して CA 群では, AST および ALT が有意に増加した. 血漿 TG, Chol および FFA 濃度に有意差は見られなかった. 一方, 肝臓の TG と Chol 値は, コントロール群と比較して CA 群で有意に高い値を示した.

### 2-3-2. 血圧の経時的変化と血圧に関連するパラメーター

血圧の経時的変化は, 8 週目まで収縮期血圧と拡張期血圧の両方に群間差は認めなかったが, 12 週目にはコントロール群と比較して CA 群で収縮期血圧と拡張期血圧の両方に有意な増加が観察された (Figure 2-1a). 血圧の変動に関与する RAAS や血中のナトリウム濃度を確認するためにこれらのパラメーターを測定した. 肝臓におけるアンジオテンシノーゲンの発現レベル, および腎皮質におけるアンジオテンシノーゲン, アンジオテンシン変換酵素, およびレニンの mRNA 発現レベルに群間差は見られなかった (データは示していない). 大動脈ナトリウムおよび尿中クレアチニン濃度にも有意な群間差は認められなかった (Figure 2-1b). 一方, 尿中アルブミン濃度は, コントロール群と比較して CA 群において有意に上昇した (Figure 2-1b). グルコースとソルビトールの肝臓濃度に群間差はなかったが, フルクトース濃度において, コントロール群と比較して CA 群に有意な増加が観察された (Figure 2-1c). また, 肝フルクトース濃度と収縮期および拡張期血圧との間に有意な正の相関が認められた (Figure 2-1d).

### 2-3-3. 胆汁酸組成の解析

胆汁酸濃度や組成の変動が顕著な部位では、 $12\alpha$  水酸化胆汁酸が当該部位に作用する可能性が推察される。そのような部位を洗い出すために、組織間の胆汁酸組成の比較をした (Figure 2-2)。肝臓では、コントロール群と比較して CA 群では TCA や GCA を含む  $12\alpha$  水酸化胆汁酸の濃度が上昇したが、 $T\beta$ MCA,  $T\alpha$ MCA,  $T\omega$ MCA などの非  $12$  水酸化胆汁酸の明らかな濃度上昇は認められなかった。 $12\alpha$  水酸化胆汁酸および非  $12$  水酸化胆汁酸組成における同様の変化が血液 (門脈および大動脈血漿) および腎皮質で観察された。また、胆汁酸濃度は大動脈血漿および腎皮質よりも門脈血漿で高値を示した。盲腸内容物および糞便中の  $12\alpha$  水酸化胆汁酸および非  $12$  水酸化胆汁酸の両方で増加を認め、 $12\alpha$  水酸化胆汁酸濃度は CA 群で有意に高値を示した。

### 2-3-4. $12\alpha$ 水酸化胆汁酸と血圧との相関

Figure 2-3 に示すように、盲腸内容物および糞中の  $12\alpha$  水酸化胆汁酸と血圧 (収縮期血圧および拡張期血圧) は正の相関を示した。一方、肝臓、動脈、腎臓の  $12\alpha$  水酸化胆汁酸と血圧には、明らかな相関は認められなかった。

### 2-3-5. 酸化コレステロールと血圧との相関

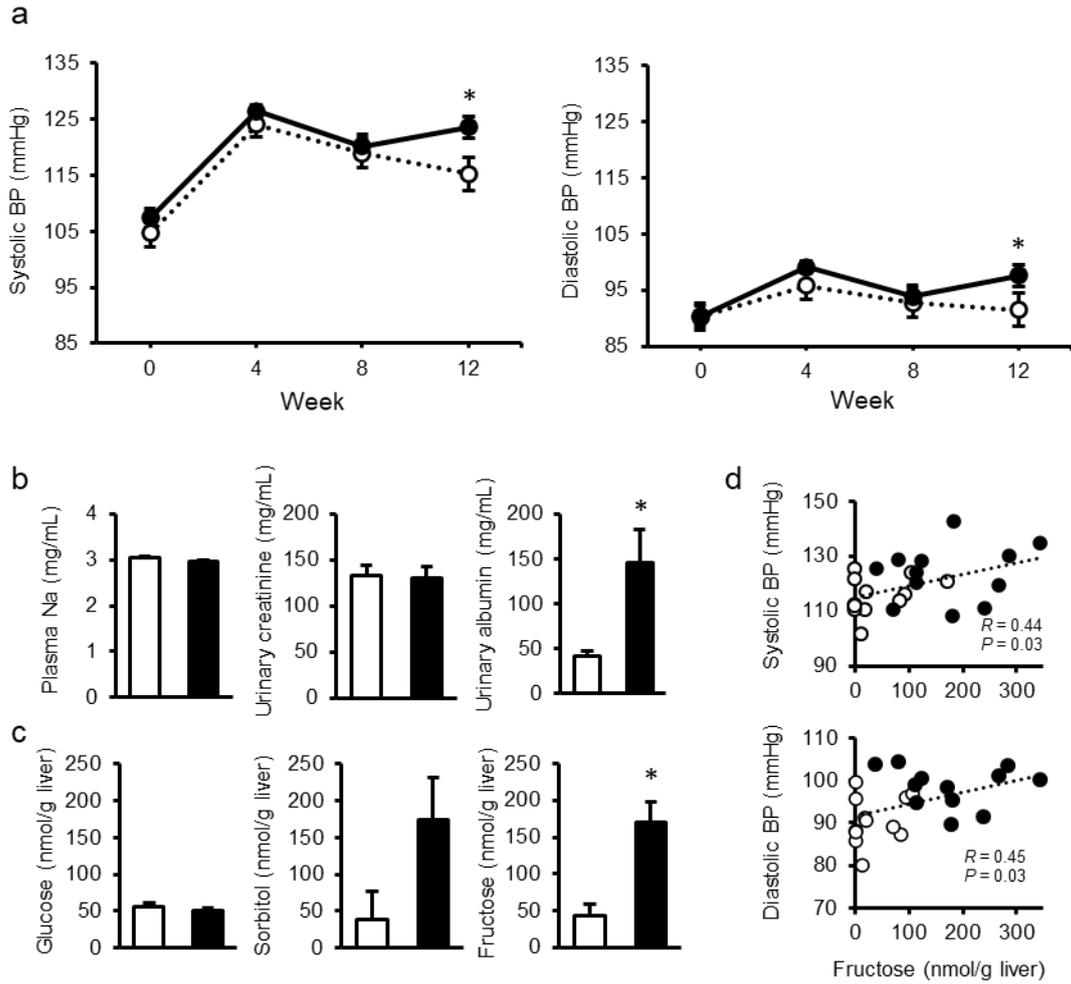
肝臓の酸化コレステロール濃度を Table 2-4 に示す。 $4\beta$ -ヒドロキシコレステロール、 $\beta$ -エポキシコレステロール、 $7\alpha$ -ヒドロキシコレステロール、および  $7\beta$ -ヒドロキシコレステロールは、CA 群において有意に高い濃度が観察された。Figure 2-4 に示すように、酸化コレステロール ( $4\beta$ -ヒドロキシコレステロール,  $R = 0.61, P < 0.01$ ;  $\beta$ -エポキシコレステロール,  $R = 0.59, P < 0.01$ ) と収縮期血圧に正の相関が認められた。拡張期血圧とも同様の相関が観察された ( $4\beta$ -ヒドロキシコレステロール,  $R = 0.49, P < 0.01$ ;  $\beta$ -エポキシコレステロール,  $R = 0.42, P < 0.01$ )。

**Table 2-3. Biochemical parameters**

	Control	CA
Total food intake (g)	1614 ± 25.8	1617 ± 24.0
Final body weight (g)	384 ± 7.6	387 ± 5.6
Final liver weight (g)	12.0 ± 0.4	14.4 ± 0.3*
<b>Plasma parameters</b>		
AST (IU /L)	21.5 ± 1.43	39.9 ± 4.39*
ALT (IU /L)	10.1 ± 0.88	19.8 ± 2.05*
TG (mg /dL)	184.2 ± 19.8	197.9 ± 17.2
Chol (mg /dL)	77.8 ± 2.28	85.9 ± 3.87
FFA (mEq /L)	0.41 ± 0.03	0.53 ± 0.10
<b>Liver lipids</b>		
TG (mg /g liver)	34.7 ± 1.5	86.7 ± 3.7*
Chol (mg /g liver)	2.6 ± 0.1	11.9 ± 0.7*

Values are expressed as means ± SEM.

\* Significant difference from the values of control groups (Student's *t*-test, *P*<0.05, n=12)



**Figure 2-1. Parameters in relation to blood pressure (BP) and the polyol pathway.**

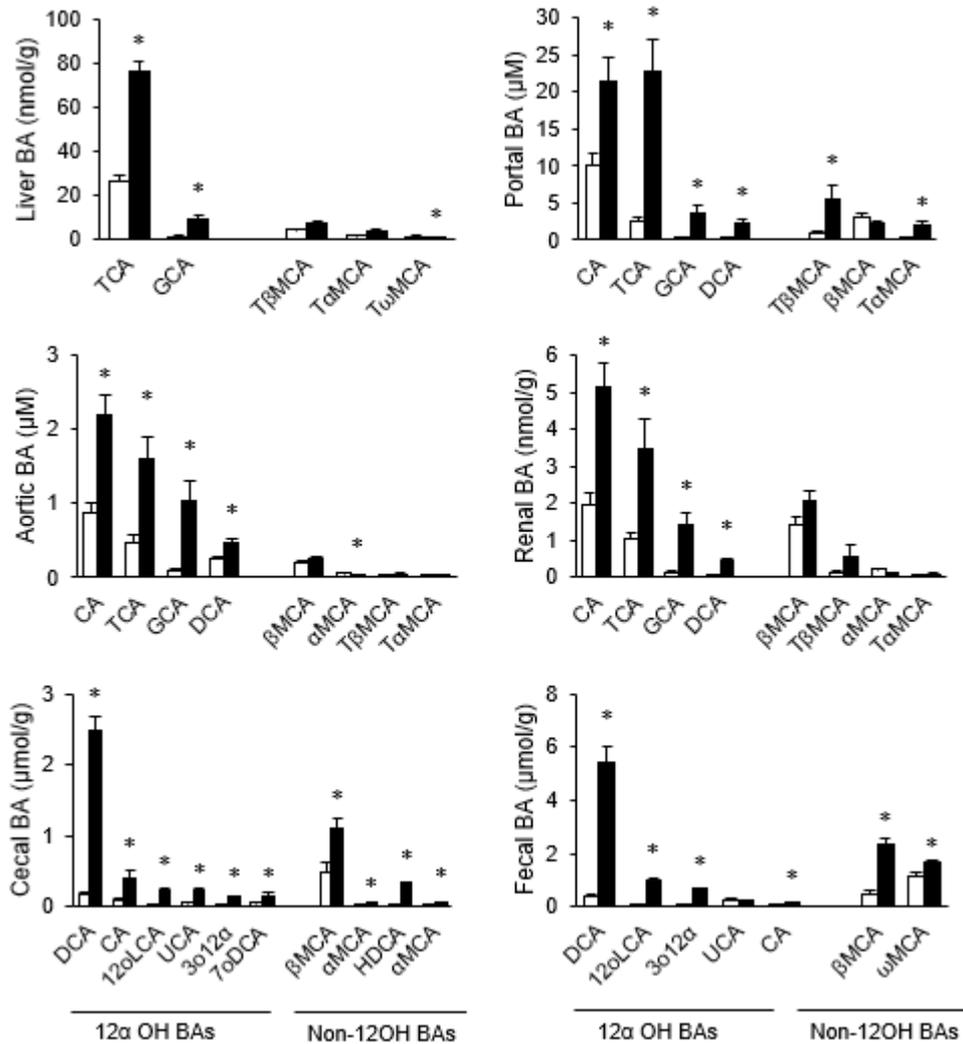
(a) Changes in systolic and diastolic BPs for 12 weeks.

(b) Concentration of sodium in the aortic plasma, urinary creatinine, and urinary albumin.

(c) Hepatic concentration of metabolites in the polyol pathway (glucose, sorbitol, and fructose).

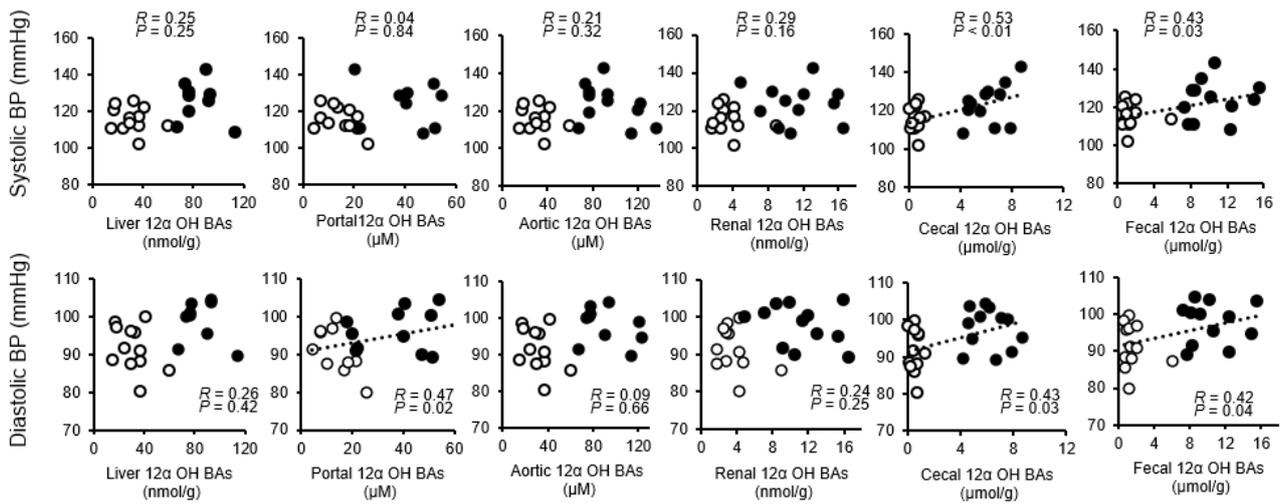
(d) Pearson's correlation between hepatic fructose concentration and BP. Open bars and symbols, control diet; filled bars and symbols, CA diet.

Data are presented as means  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ). Asterisks indicate a significant difference compared to the control ( $P < 0.05$ ).



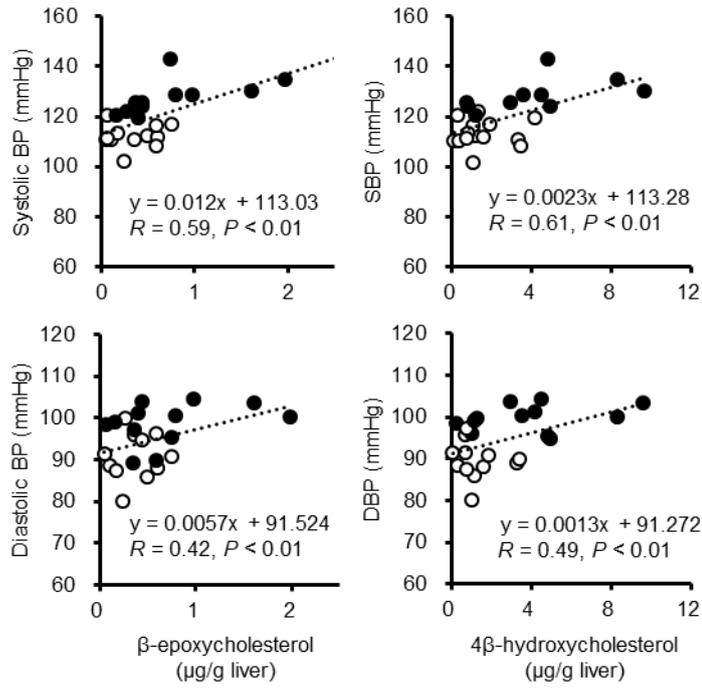
**Figure 2-2. BA composition in rats fed a control or CA diet for 13 weeks.**

Liver, portal plasma, aortic plasma, renal cortex, cecal contents, feces. Open bars, control diet; filled bars, CA diet. Data are presented as means  $\pm$  SEM (n = 12). Asterisks indicate a significant difference compared to the control ( $P < 0.05$ ). 3 $\alpha$ 12 $\alpha$ : 5 $\beta$ -cholanic acid-12 $\alpha$ -ol-3-one, 7 $\alpha$ DCA: 7-oxo-deoxycholic acid, 12 $\alpha$ LCA: 12-oxo-lithocholic acid: CA: cholic acid, DCA: deoxycholic acid, GCA: glycocholic acid, HDCA: hyodeoxycholic acid, TCA: taurocholic acid, TaMCA: tauro- $\alpha$ -muricholic acid, T $\beta$ MCA: tauro- $\beta$ -muricholic acid, T $\omega$ MCA: tauro- $\omega$ -muricholic acid, UCA: ursocholic acid,  $\alpha$ MCA: $\alpha$ -muricholic acid,  $\beta$ MCA:  $\beta$ -muricholic acid,  $\omega$ MCA:  $\omega$ -muricholic acid



**Figure 2-3. Correlation between 12 $\alpha$ OH BA and BP.**

The graphs show Pearson's correlations between 12 $\alpha$ OH BA and blood pressures (BPs) (systolic or diastolic). Control and CA-fed rats were shown in open and closed circle (n=12) each.



**Figure 2-4. Pearson's correlations between oxysterols and blood pressure (BP).**

Open symbols, control diet; filled symbols, CA diet. (n=12).

**Table 2-4. Hepatic oxysterol concentrations**

	Control	CA
	$\mu\text{g /g liver}$	
4 $\beta$ -hydroxycholesterol	0.94 $\pm$ 0.15	4.31 $\pm$ 0.74*
$\alpha$ -epoxycholesterol	0.06 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.04
$\beta$ -epoxycholesterol	0.34 $\pm$ 0.07	0.72 $\pm$ 0.17*
7 $\alpha$ -hydroxycholesterol	1.19 $\pm$ 0.17	3.02 $\pm$ 0.80*
7 $\beta$ -hydroxycholesterol	1.22 $\pm$ 0.25	3.13 $\pm$ 0.40*
7-keto-cholesterol	0.23 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.09
25-hydroxycholesterol	1.20 $\pm$ 0.26	1.68 $\pm$ 0.26
27-hydroxycholesterol	0.13 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.03

Values are expressed as means  $\pm$  SEM.

\* Significant difference from the values of control groups (Student's *t*-test,  $P < 0.05$ ,  $n = 12$ ).

## 2-4. 考察

12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸による肝脂質蓄積と血圧上昇について検討したところ、血圧上昇と腎機能および脂質代謝の関連を見出した。12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸合成をつかさどる CYP8B1 の遺伝子発現と肝脂質蓄積亢進が観察され (Pathak, et al., 2019), CYP8B1 遺伝子の欠損では高脂肪食で誘導される肝脂質蓄積が抑制される (Bertaglia, et al, 2017). このことは、12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸の増加が肝臓での脂質蓄積に関与することを示している。本研究では、体重増加を伴わない肝脂質蓄積と血圧の上昇が認められた。CA 群では、早期の腎機能低下の指標であるアルブミン尿が観察され、胆汁酸が血圧の上昇と腎機能に関連している可能性が考えられる。血圧が上昇した動物の腎皮質の胆汁酸組成を他の臓器の胆汁酸組成と比較した報告は他に見当たらない。腎皮質の胆汁酸濃度は、肝臓および門脈血漿の胆汁酸濃度よりも低値を示した。しかし、主要な 12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸である TCA と CA の濃度は、大動脈血漿と比較して腎皮質で約 2 倍程度高い濃度として検出された。本研究で分析されているように血圧と腸肝、糞、門脈血漿、腹部大動脈血漿および腎臓における網羅的胆汁酸解析との関係を示した研究はほとんどない。しかし、Yang, et al. (2022) は、血圧を調整する臓器である腎臓に着目し、腎皮質における胆汁酸 (CA, DCA および CDCA) の濃度が Wistar ラットよりも高血圧 SHR ラットで高く、血圧と胆汁酸濃度に正の相関があることを示した。この研究は、胆汁酸代謝が高血圧発症の危険因子であると述べているが、その機序は明らかにされていない。本研究では、CA の負荷が直接的に RAAS を増強したり血漿ナトリウム濃度を上昇させたりすることがなかったために、腎皮質の 12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸と血圧の直接的な関与は見られない結果となったと考えられる。

一方、肝臓ではフルクトースの前駆体であるソルビトールの濃度が増加し、CA 群の肝臓ではフルクトースが増加し、ポリオール経路の関与が示唆された。低酸素症、および高血糖症はポリオール経路を活性化することが示されているが (Andres-Hernando, et al. 2019), 本研究では 12 $\alpha$ 水

酸化胆汁酸もその活性化につながる可能性を示した。さらに、肝臓のフルクトース濃度と血圧に正の相関が観察された。フルクトースの摂取は、高血圧の病歴のない米国の成人の血圧上昇と関連していることが報告されている (Jalal, 2010)。また、肝臓での内因性フルクトースの産生は、脂肪肝の発症にも寄与する (Lanaspa., et al. 2013)。同様に、本研究でも CA 群の肝臓フルクトース濃度は増加した。SREBF1 の発現を制御する LXR のアゴニストである肝臓の 4 $\beta$ -ヒドロキシコレステロールの産生が CA 群で増加したため、肝脂質の蓄積は肝臓における SREBF1 を介した脂肪酸合成の誘導に関わる可能性がある (Shimano, et al., 1997)。

肝臓の 4 $\beta$ -ヒドロキシコレステロール濃度と血圧には正の相関が確認された。2週間 CA 食を与えた WKAH ラットの肝臓では TG と 4 $\beta$ -ヒドロキシコレステロールが蓄積されたものの (Lee, et al., 2020)、短期間での血圧上昇は観察されなかった。つまり、CA によって誘導される肝臓の 4 $\beta$ -ヒドロキシコレステロールおよびフルクトース産生による脂質蓄積の亢進は、長期間 CA 負荷した場合に血圧の上昇に関わる可能性を示している。また、プレグナン X 受容体 (PXR) の活性化は、ヒトと Sprague-Dawley ラットの両方で血圧を上昇させる (Rahunen, et al., 2022)。我々は以前に、ヒト *Cyp3a4* とマウス *Cyp3a11* のオルソログであるラット *Cyp3a2* の肝臓での発現増加を発見している (Lee, et al., 2020)。この発現は PXR によって制御され (Li, et al., 2009)、4 $\beta$ -ヒドロキシコレステロールの産生に関与している可能性が考えられる。CA だけでなく、CA 由来の DCA, 7 $\alpha$ DCA, 12 $\alpha$ LCA も 1  $\mu$ M 未満の EC<sub>50</sub> で PXR を活性化することが報告されている (Krasowski, et al., 2005)。これらのことから、本研究における肝臓の 4 $\beta$ -ヒドロキシコレステロール含有量と血圧との正の相関には、胆汁酸を認識する核内受容体である PXR の活性化が関わりと推察される。門脈血漿ではコントロール群の CA の平均値は 10.2  $\mu$ M であるのに対し CA 群は 21.4  $\mu$ M、DCA の平均値は 0.3  $\mu$ M であるのに対し CA 群は 2.4  $\mu$ M の濃度であった (Figure2-2)。これらは概ね PXR の EC<sub>50</sub> を超える濃度であることから、CA などの 12 $\alpha$  水酸化胆汁酸が直接的に PXR を活性化して、4 $\beta$ -ヒドロキ

シコレステロールの産生を促すことが強く示唆される。そして、CA 群の動脈血漿中の CA 濃度は門脈血漿における数値の約 1/10 であることを考慮すると、PXR に対する CA の影響は、回腸から肝臓までの腸肝組織に限定されると考えるべきであろう。

本研究では、 $\beta$ -エポキシコレステロールの肝臓濃度は 4 $\beta$ -ヒドロキシコレステロールよりも低かったが、同様に血圧と正の関係を示した。酸化ストレスと細胞死における  $\beta$ -エポキシコレステロールの関与が示されており (Medina, et al., 2022), 肝機能に与える  $\beta$ -エポキシコレステロールの影響が示唆される。酸化コレステロールである  $\beta$ -エポキシコレステロールは肉製品に含まれており (Osada, et al., 2000), 疫学研究 (Oude Griep, et al., 2016) では肉の消費と血圧上昇との関係が示唆されていることから  $\beta$ -エポキシコレステロールが高血圧に寄与する可能性が考えられる。

アルブミン尿はインスリン抵抗性の指標であり、メタボリック シンドロームに関連する腎臓および心血管リスクの増加を示すものである (Ruggenenti, et al., 2006)。ヒトでの研究では、インスリン抵抗性と血漿中の 12 $\alpha$  水酸化胆汁酸/非 12 水酸化胆汁酸比との関連が示された (Haeusler, 2013)。動物実験でも同様の結果が得られており、12 $\alpha$  水酸化胆汁酸の合成が肝臓のインスリンシグナル伝達が障害されたマウス (Haeusler, et al., 2012; Semova, et al., 2022), および糖尿病モデルであるストレプトゾトシン投与 Wistar ラットで増強された (Zhang, et al., 2019)。さらに、尿アルブミン対クレアチニン比は、ストレプトゾトシン投与 Wistar ラットで観察された。これらの結果は、インスリン抵抗性によって誘発される全身循環中の 12 $\alpha$  水酸化胆汁酸濃度の増加が、腎機能に悪影響を与えることを示唆している。したがって、12 $\alpha$  水酸化胆汁酸は脂肪肝や腎機能障害だけでなく、糖尿病性腎症の発症にも関与しているかも知れない。

結論として、CA 添加飼料を与えたラットにおいて血圧が上昇すること、一般的に想定される血中ナトリウム濃度の増加やレニン-アンジオテンシン系の関与は観察されないことに加え、フルクトース、4 $\beta$ -ヒドロキシコレステロール、 $\beta$ -エポキシコレステロールなどの肝臓代謝物が血圧に

関わることを見出した。CA 添加食モデルでは尿中アルブミン濃度の増加が観察された。これらのことから、肝脂質蓄積を伴う血圧上昇や腎機能障害における  $12\alpha$  水酸化胆汁酸の関与が提案される。

## 総括

疾病の発症予防のために発症の前段階における代謝機構を解明することは極めて重要である。本研究で着目した MAFLD では、肥満を伴わずに肝臓に脂質が蓄積される場合も含まれる。このような自覚症状が伴わない代謝異常に  $12\alpha$  水酸化胆汁酸が関わる可能性が考えられる。本研究では、肝臓における TG 蓄積を評価するため近交系ラットが有用であることに加え、脂質吸収を担うとともに肝脂質蓄積に関与する  $12\alpha$  水酸化胆汁酸と血圧上昇の関連を明らかにし、それらの双方に関わるパラメーターを見出すことができた。以下にその内容を示す。

第1章において、非近交系 Wistar ラットと Wistar ラットに由来する近交系である WKAH ラットを用いて体重、肝臓重量、肝脂質濃度 (TG および Chol) と血漿 ALT の変動係数 (CV) を比較し、実験的再現性を検討した。その結果、体重と肝臓重量の CV には差を認めなかったが、肝脂質濃度 (TG および Chol) と血漿 ALT の CV は、Wistar ラットでは 30~40% であり、WKAH ラットは 10~25% であった。さらに、これら CV の変動は、WKAH ラットでは実験期間の長さに関係なく観察された。したがって、肝臓の脂質代謝評価を検討する場合には近交系ラットの有用性が示された。

第2章では、肝臓の脂質蓄積は、糖尿病や高血圧などの発症リスクを高くする。 $12\alpha$  水酸化胆汁酸による肝脂質蓄積における血圧について検討したところ、脂肪肝の遷延により血圧が上昇する結果が得られた。WKAH ラットを2つのグループに分け、AIN-93 に準拠した食餌または CA を添加した食餌 (0.5 g CA /kg) を 13 週間与えた。コントロール群に比べて CA 群では、収縮期血圧および拡張期血圧ならびに肝臓の脂質濃度を増加させた。レニン-アンジオテンシン系の mRNA 発現や血中ナトリウム濃度に群間差は見られず、尿中アルブミン濃度はコントロール群と比較して CA 群で高値を示した。一方、肝臓中の  $4\beta$ -ヒドロキシコレステロールや  $\beta$ -エポキシコレステロールおよびフルクトースの濃度と血圧との間に有意な正の相関を認めた。これらの結果は、 $12\alpha$  水酸化胆汁酸によって誘導される脂肪肝の遷延により血圧が上昇し、その機序は、ナトリウムおよびレニ

ン-アンジオテンシン系の関与は見出せなかったが、肝臓における酸化コレステロールおよびフルクトースの増加の関与が明らかになった。これらのことから、脂肪肝と血圧上昇および腎機能障害における 12 $\alpha$  水酸化胆汁酸の関与が示唆された。

本研究では、12 $\alpha$  水酸化胆汁酸による肝臓での脂質蓄積とその代謝物である肝臓のコレステロールやフルクトースの増加と血圧に正の相関があった。さらにアルブミン尿が観察された。肝臓での脂質蓄積について、TG は体内の蓄積型エネルギーであるが、その過剰な蓄積が肝臓で生じれば脂肪肝となり、それが脂肪組織で生じれば肥満を引き起こす。CA を与えられたラットは肥満ではないため、肝臓での脂質蓄積を重点的に評価できる実験系とみなすことができる。肝臓への脂質蓄積は、キロミクロンなどのリポタンパクから遊離脂肪酸の肝臓への取り込みとその後の TG 合成、肝臓内での脂肪酸合成 (*de novo* lipogenesis, DNL) とその後の TG 合成、肝臓での TG 分解、そして肝臓からの VLDL としての TG 放出の 4 つが関わると考えられる。本研究と同一の実験系で、CA 添加食摂取ラットでは脂肪酸合成を制御する SREBF1 の発現が肝臓において亢進することが見出されている (Lee, et al., 2020)。肝臓で DNL にかかわる酵素の多くが転写因子である SREBP1c によって誘導される (Shimano, 2001)。また、SREBP1c は、酸化コレステロールをリガンドとする転写因子である LXR によって活性化される。本研究では (FigureS-2, A,B), SREBF1 の上流にある LXR のアゴニストである肝臓の 4 $\beta$ -ヒドロキシコレステロールの産生が CA 添加食摂取ラットで増加することを確認した。非アルコール性脂肪肝炎における肝臓への TG 蓄積は SREBP1c 活性の亢進によることが報告されている (Bitter, et.al., 2015)。DNL には、グルコースやフルクトース、アミノ酸、酢酸などから産生されるアセチル CoA に加えて NADPH の還元力が必要である (Wallace & Metallo, 2020)。ミトコンドリアでアセチル CoA が潤沢にあったとしてもミトコンドリア膜を超えて輸送する事ができないため DNL に直接導入できない。そのため、解糖系産物のアセチル CoA を DNL に組み込むためには一度トリカルボン酸サイクルに入り、クエン酸としてトリカルボン酸輸送体を通

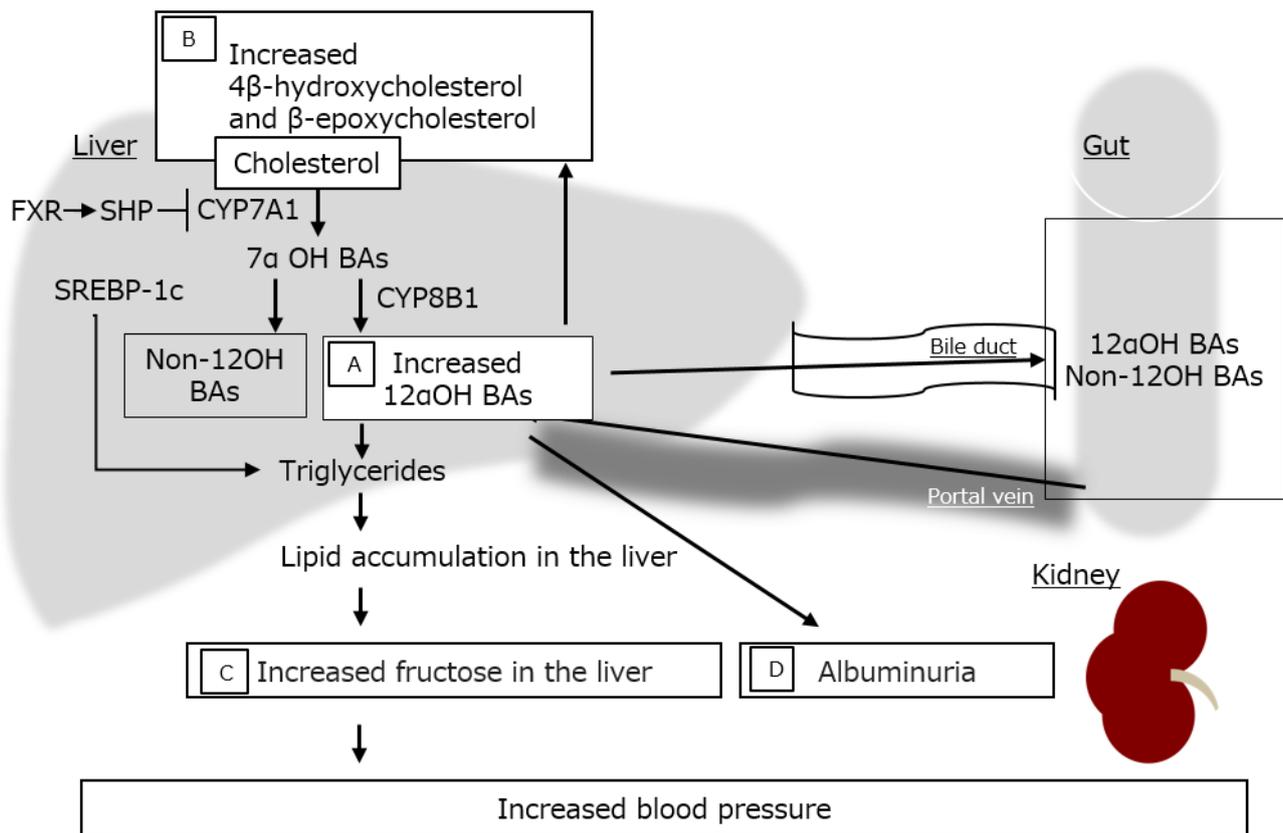
して細胞質に輸送された後に ATP クエン酸リアーゼ (ATP citrate lyase, ACLY) によってアセチル CoA へと変換される必要がある。こうして細胞質で生成したアセチル CoA は、アセチル CoA カルボキシラーゼ (acetyl-CoA carboxylase, ACC) によってマロニル CoA へと変換される。マロニル CoA は脂肪酸合成酵素 (fatty acid synthase, FASN) によって縮合、還元、脱水、還元の順を繰り返してアセチル CoA へと 2 つの炭素が組み込まれていく。このサイクルはパルミチン酸を合成するまで続き、生成したパルミチン酸は不飽和化を受けて不飽和脂肪酸がつくられていく。アセチル CoA からマロニル CoA を合成する反応は ATP を必要とするため (Wallace & Metallo, 2020), 基質濃度だけでなく細胞質内の ATP 濃度も DNL の重要な因子になる。このような肝細胞における酸化還元因子と ATP の CA 摂取による変動に興味をもたれる。一方, VLDL は肝臓から脂質を運び出し末梢組織へ移送する役割がある (Karpe, 1999)。ビタミン B6 欠乏時に生じる肝臓脂質蓄積においても, メチオニンの代謝障害が VLDL の減少を引き起こす (Kitagawa, et al., 2015)。これらのことは肝臓脂質蓄積の減少における VLDL 分泌の抑制が示唆される。実際, 肝臓ではヒト初代肝細胞にタウロコール酸を添加すると用量依存的に VLDL 分泌が抑制されることが示されており (Lin, 1996), DNL 以外に VLDL 分泌もこの CA 摂取による肝脂質蓄積に関わると考えられる。CA 添加食摂取ラットでは, 肝臓での SREBP1 の遺伝子発現上昇が確認された (Hori, et al., 2020)。本研究では, 肝臓の 4 $\beta$ -ヒドロキシコレステロール濃度と血圧には正の相関が確認されたが, 2 週間 CA 添加食を与えた WKAH ラットでは肝臓 TG と 4 $\beta$ -ヒドロキシコレステロールの蓄積が見られたにも関わらず (Lee, et al., 2020), 本研究ではこの時点での血圧上昇は観察されなかった。つまり, CA により誘導される肝臓の 4 $\beta$ -ヒドロキシコレステロールおよびフルクトース産生による脂質蓄積の亢進が進んだ後に, 血圧上昇が惹起されることが推察される。

アルドース還元酵素とソルビトール脱水素酵素は尿細管上皮細胞に発現していることが明らかにされており, フルクトースはさらに代謝を受け, 尿酸を産生する (Terubayashi, et al., 1989)。

尿酸はレニンの分泌増加を来し、一酸化窒素の生物学的利用能の低下と酸化ストレスの上昇をもたらす。これが腎臓の血管傷害を惹起して、最終的には食塩感受性高血圧となる (Becker, et al., 2019)。CA 添加食の摂取は、フルクトースと血圧との正の相関が観察されただけで、RAAS には変化がなく、腎機能と直接的な関与は確認できなかった。しかし、肝臓でのフルクトースの増加は脂質蓄積を介して肝臓内での血液循環量に影響を及ぼし高血圧を引き起こす可能性は考えられる。また、糸球体で濾過されたフルクトースは、Glut5 を介して直接尿細管上皮細胞に取り込まれると考えられており、血液から濾過された尿中フルクトースがクレアチニンクリアランスの低下や尿中たんぱく排泄の増加を引き起こす (Nakayama, et al., 2010)。本研究では、アルブミン尿が観察されたのみであった。アルブミン尿は、インスリン抵抗性や、メタボリックシンドロームに関連する腎臓および心血管リスクの増加を示す指標である (Ruggenti, et al., 2006)。ヒトでの研究では、インスリン抵抗性は血漿中  $12\alpha$  水酸化胆汁酸 / 非  $12$  水酸化胆汁酸比と正の相関がある (Haeusler, et al., 2013)。動物実験でも同様の結果が得られ、 $12\alpha$  水酸化胆汁酸の合成は、肝臓のインスリンシグナル伝達が障害されたマウスや (Haeusler, et al., 2012; Semova, et al., 2022)、ストレプトゾトシン投与 Wistar rat で増強された (Zhang, et al., 2019)。インスリン抵抗性の亢進と  $12\alpha$  水酸化胆汁酸濃度の増加という二つのイベントが、互いに腎機能に悪影響を与えるものと考えられる (Figure S-2, C,D)。

MAFLD の段階的な進行を考慮すると、改善が見込める段階とそうでない段階がある。つまり、単純性脂肪肝であれば改善が可能であるが、肝硬変や肝がんへ進展してしまうと病態の次元が異なり、単純に脂質代謝異常を改善させるだけでは不十分となる可能性が高い。脂質代謝異常から病態の発症は長い時間をかけて悪化する経過からも、病態を模倣する適切な実験モデルの検討や発症までのプロセスを検討することは極めて重要である。本研究によって、CA 添加食摂取にともな

う肝脂質蓄積が血圧上昇を伴うことが示された。これらの成果が MAFLD 発症機構の解明や、予防治療へ繋がることを期待する。



**Figure S-2. Schematic diagram of hepatic lipid accumulation and increased blood pressure.**

- A. As shown in Figure 2-2, increases were observed in hepatic concentrations of 12 $\alpha$ OH BAs, but a clear increase was not found in non-12OH BAs.
- B. The hepatic concentrations of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol and  $\beta$ -epoxycholesterol correlated BP levels (Figure 2-4).
- C. No difference was found in the hepatic concentrations of glucose and sorbitol, but a significant increase in fructose concentration was observed in the CA-fed rats. Significant positive correlations were observed between hepatic fructose concentration and systolic or diastolic BP (Figure 2-1c, d).
- D. A significant increase in urinary albumin concentration was observed in the CA-fed rats.

## 引用文献

- Alwan, A. (2011) Global status report on noncommunicable diseases 2010. World Health Organization.
- Andres-Hernando, A., Johnson, R.J., Lanaspa, MA. (2019) Endogenous fructose production: what do we know and how relevant is it? *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*. 22; 289-294. doi: 10.1097/MCO.0000000000000573.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J., Hotta, K., Shimomura, I., Nakamura, T., Miyaoka, K., Kuriyama, H., Nishida, M., Yamashita, S., Okubo, K., Matsubara, K., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. (1999) Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 257; 79-83. doi: 10.1006/bbrc.1999.0255.
- Becker, BD., Borghi C., Burnier, M., Borne P. (2019) Uric acid and hypertension: a focused review and practical recommendations. *Journal of Hypertension*. 37; 878-883. doi:10.1097/HJH.0000000000001980.
- Bertaglia, E., Jensen., KK., Castro-Perez, J., Xu., Paolo. GD., Chan, RB., Wang L., Haeusler., RA. (2017) Cyp8b1 ablation prevents Western diet-induced weight gain and hepatic steatosis because of impaired fat absorption. *Journal of Physiology Endocrinol and Metabolism*. 313; E121-E133. doi: 10.1152/ajpendo.00409.
- Bitter, A., Nüssler, AK., Thasler, WE., Klein, K., Zanger, UM., Schwab, M., Burk, O. (2015) Human sterol regulatory element-binding protein 1a contributes significantly to hepatic lipogenic gene expression. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 35; 803-15. doi: 10.1159/000369739.
- Bloch, K., Berg, BN., Rittenberg, D. (1943) The biological conversion of cholesterol to cholic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 149; 511-517.
- Brown, G.C. (2015) Living too long: The current focus of medical research on increasing the quantity, rather than the quality, of life is damaging our health and harming the economy. *EMBO Report*. 16; 137–141.

- Caussy, C., Hsu, C., Singh, S., Bassirian, S., Kolar, J., Faulkner, C., Sinha, N., Bettencourt, R., Gara, N., Valasek, MA., Schnabl, B., Richards, L., Brenner, DA., Hofmann, AF., Loomba, R. (2019) Serum bile acid patterns are associated with the presence of NAFLD in twins, and dose-dependent changes with increase in fibrosis stage in patients with biopsy-proven NAFLD. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 49(2); 183-193.
- Chiang, J.Y.L. (2009) Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research*. 50(10); 1955–1966.
- Do, MH., Lee, E., Oh, MJ., Kim, Y., Park, HY. (2018) High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change. *Nutrients*. 10(6); 761. doi: 10.3390/nu10060761.
- Dulai, PS., Singh, S., Patel, J., Soni, M., Prokop, LJ., Younossi, Z, Sebastiani, G., Ekstedt, M., Hagstrom, H., Nasr, P., Stal, P., Wong, VW., Kechagias, S., Hultcrantz, R., Loombaet, R. (2017) Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Hepatology*. 65(5); 1557–65.
- Eslam, M., Newsome, PN., Sarin, SK., Anstee, QM., Targher, G., Romero-Gomez, M., Zelber-Sagi, S., Wong, VW., Dufour, JF., Schattenberg, JM., Kawaguchi, K., Arrese, M., Valenti, L., Shiha, G., Tiribelli, C., Yki-Järvinen, H., Fan, DJ., Grønbaek, H., Yilmaz, Y, Cortez-Pinto, H., Oliveira, CP., Bedossa, P., Adams, LA., Zheng, MH., Fouad, Y., Chan, WK., Mendez-Sanchez, N., Ahn, SH., Castera, L., Bugianesi, E., Ratziu, V., George, J. (2020) A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement. *Journal of Hepatology*. 73; 202-209. doi: 10.1016/j.jhep.2020.03.039.
- Febbraio, MA., Reibe, S., Shalpour, S., Ooi, GJ., Watt, MJ., and Karin, M. (2019) Preclinical models for studying NASH-driven HCC: How useful are they? *Cell Metabolism*. 29; 18-26.
- Felig, P., Owen, OE., Wahren, J., and Cahill, GF. Jr. (1969) Amino acid metabolism during prolonged starvation. *Journal of Clinical Investigation*. 48; 584-594.

- Festing, M.F.W. (1997) Variation and its implications for the design of experiments in toxicological research. *Comparative Hematology International*. 7; 202–207.
- Festing, M.F.W. (2010) Inbred strains should replace outbred stocks in toxicology, safety testing, and drug development. *Toxicologic Pathology*. 38; 681–690.
- Festing, M.F.W. (2014) Evidence should trump intuition by preferring inbred strains to outbred stocks in preclinical research. *Journal of the Institute for Laboratory Animal Research*. 55; 399-404.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, GH. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226; 497-509. doi: 10.1016/S0021-9258(18)64849-5.
- Ghebreyesus, TA. (2022) Global status report on physical activity 2022. World Health Organization.
- Gill, TJ. (1980) The use of randomly bred and genetically defined animals in biomedical research. *The American Journal of Pathology*. 101; S21–32.
- Haeusler, RA, Pratt-Hyatt, M, Welch, CL, Klaassen, CD, Accili D. (2012) Impaired generation of 12-hydroxylated bile acids links hepatic insulin signaling with dyslipidemia. *Cell Metabolism*. 15; 65-74.
- Haeusler, RA., Astiarraga, B., Camastra, S., Accili, D., Ferrannini, E. (2013) Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12 $\alpha$ -hydroxylated bile acids. *Diabetes*. 62; 4184-4191. doi: 10.2337/db13-0639.
- Hagio, M., Matsumoto, M., Fukushima, M., Hara, H., Ishizuka, S. (2009) Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents of rats using LC/ESI-MS. *Journal of Lipid Research*. 50; 173-180. doi: 10.1194/jlr.D800041-JLR200.
- Hofmann, A. F., & Mysels, K. J. (1988) Bile salts as biological surfactants. *Colloids and Surfaces*, 30(1); 145–173.
- Hori, S., Hara, H., Ishizuka, S. (2018) Marginal iron deficiency enhances liver triglyceride accumulation in rats fed a high-sucrose diet. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 82; 2140-2148. doi: 10.1080/09168451.2018.1515616.

- Hori, S., Abe, T., Lee, DG., Fukiya, S., Yokota, A., Aso, N., Shirouchi, B., Sato, M., Ishizuka, S. (2020) Association between 12 $\alpha$ -hydroxylated bile acids and hepatic steatosis in rats fed a high-fat diet. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 83; 108412. doi: 10.1016/j.jnutbio.2020.108412.
- Hori, S., Liu, H., Yamada, R., Ichitsubo, S., Sakaguchi, A., Yokoyama, F., Ishizuka, S. (2022) Extraction of bile acids from biological samples and quantification using ultra high-performance liquid chromatography-orbitrap mass spectrometry, In C.B.B. Cazarin (Ed.), *Basic Protocols in Foods and Nutrition*, Humana Press, p.115-127, doi: 10.1007/978-1-0716-2345-9\_8.
- Hundal, RS., Petersen, KF., Mayerson, AB., Randhawa, PS., Inzucchi, S., Shoelson, SE., and Shulman, GI. (2002) Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 109; 1321-1326.
- Ibrahim, SH., Hirsova, P., Malhi, H., Gores, GJ. (2016) Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Digestive Diseases and Sciences*. 61; 1325-1336.
- Islam, KMBS., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Yokota, A. (2011) Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology*. 141; 1773-1781. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.046.
- Jalal, DI., Smits, G., Johnson, RJ., Chonchol. M. (2010) Increased fructose associates with elevated blood pressure. *Journal of the American Society of Nephrology*. 21; 1543-1549. doi: 10.1681/ASN.2009111111. 20.
- Karpe, F. (1999) Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Journal of International Medicine*. 246; 341–355.
- Kitagawa, E, Yamamoto, T, Yamamoto, K, Nakagawa, T, Hayakawa, T. (2015) Accumulation of lipid in rat liver was induced by vitamin B6 deficiency and was ameliorated by supplemental phosphatidylcholine in the diet. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(8); 1320–1326.
- Kleinert, M., Clemmensen, C., Hofmann, SM., Moore, MC., Renner, S., Woods, SC., Huypens, P., Beckers, J., de Angelis, MH., Schürmann, A., Bakhti, M., Klingenspor, M., Heiman, M., Cherrington, AD.,

- Ristow, M., Lickert, H., Wolf, E., Havel, P.J., Müller, T.D., and Tschöp, M.H. (2018) Animal models of obesity and diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. 14; 140-162.
- Kobayashi, K., Sakuratani, Y., Abe, T., Yamazaki, K., Nishikawa, S., Yamada, J., Hirose, A., Kamata, E., and Hayashi, M. (2011) Influence of coefficient of variation in determining significant difference of quantitative values obtained from 28-day repeated-dose toxicity studies in rats. *Journal of Toxicological Sciences*. 36; 63-71.
- Konarzewski, M., and Diamond, J. (1995) Evolution of basal metabolic rate and organ masses in laboratory mice. *Evolution*. 49; 1239-1248.
- Krasowski, M.D., Yasuda, K., Hagey, L.R., Schuetz, E.G. (2005) Evolution of the pregnane x receptor: adaptation to cross-species differences in biliary bile salts. *Molecular Endocrinology*. 19; 1720-1739. doi: 10.1210/me.2004-0427.
- Kumagai, H., Oshima, N., Matsuura, T., Imai, M., Iigaya, K., Onimaru, H., Kawai, A., Sakata, K., Onami, T., Takimoto, C., Kamayachi, T., Osaka, M., Hayashi, K., Itoh, H., Saruta, T. (2007) Whole-cell patch-clamp and optical imaging of neurons in the RVLM, the CVLM, and the caudal end of VLM. In: Kubo T, Kuwaki T (eds). *Central Mechanisms of Cardiovascular Regulation*. Transworld Research Network, Kerala, India, p. 83-106.
- Kumagai, H., Oshima, N., Matsuura, T., Iigaya, K., Imai, M., Onimaru, H., Sakata, K., Osaka, M., Onami, T., Takimoto, C., Kamayachi, T., Itoh, H., Saruta, T. (2012) Importance of rostral ventrolateral medulla neurons in determining efferent sympathetic nerve activity and blood pressure. *Hypertension Research*. 35(2); 132-141. doi: 10.1038/hr.2011.208.
- Lanaspa, M.A., Ishimoto, T., Li, N., Cicerchi, C., Orlicky, D.J., Ruzycski, P., Rivard, C., Inaba, S., Roncal-Jimenez, C.A., Bales, E.S., Diggie, C.P., Asipu, A., Petrash, J.M., Kosugi, T., Maruyama, S., Sanchez-Lozada, L.G., McManaman, J.L., Bonthron, D.T., Sautin, Y.Y., Johnson, R.J. (2013) Endogenous fructose production and metabolism in the liver contributes to the development of metabolic syndrome. *Nature Communications*. 4; 2434. doi: 10.1038/ncomms3434.

- Lee, Y., Yoshitsugu, R., Kikuchi, K., Joe, GH., Tsuji, M., Nose, T., Shimizu, H., Hara, H., Minamida, K., Miwa, K., and Ishizuka, S. (2016) Combination of soya pulp and *Bacillus coagulans* lilac-01 improves intestinal bile acid metabolism without impairing the effects of prebiotics in rats fed a cholic acid-supplemented diet. *British Journal of Nutrition*. 116; 603-610.
- Lee, JY., Shimizu, H., Hagio, M., Fukiya, S., Watanabe, M., Tanaka, Y., Joe, GH., Iwaya, H., Yoshitsugu, R., Kikuchi, K., Tsuji, M., Baba, N., Nose, T., Tada, K., Hanai, T., Hori, S., Takeuchi, A., Furukawa, Y., Shirouchi, B., Sato, M., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Yokota, A., Ishizuka, S. (2020) 12 $\alpha$ -Hydroxylated bile acid induces hepatic steatosis with dysbiosis in rats. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1865; 158811. doi: 10.1016/j.bbalip.2020.158811.
- Lee, H., Lee, YH., Kim, SU., Kim, HC., (2021) Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and incident cardiovascular disease risk: a nationwide cohort study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 19; 2138-2147. doi: 10.1016/j.cgh.2020.12.022.
- Li, J., Zou, B., Yeo YH, Feng, Y., Xie, X., Lee, DH., Fujii, H., Wu, Y., Kam, LY., Ji, F., Li, X., Chien, N., Wei, M., Ogawa, E., Zhao, C., Wu, X., Stave, CD., Henry, L., Barnett, S., Takahashi, H., Furusyo, N., Eguchi, Y., Hsu, YC., Lee, TY., Ren, W., Qin, C., Jun, DW., Toyoda, H., Wong, VW., Cheung, R., Zhu, Q., Nguyenl, MH., (2019) Prevalence, incidence, and outcome of non-alcoholic fatty liver disease in Asia,1999–2019: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 4 (5); 389–98.
- Lin, Y., Havinga, R., Verkade, HJ., Moshage, H., Slooff, MJ., Vonk, RJ., Kuipers F. (1996) Bile acids suppress the secretion of very-low-density lipoprotein by human hepatocytes in primary culture. *Hepatology*, 23(2); 218-228.
- Maithilikarpagaselvi, N., Sridhar, MG., Swaminathan., RP., Sripradha, R., Badhe, B. (2016) Curcumin inhibits hyperlipidemia and hepatic fat accumulation in high-fructose-fed male Wistar rats. *Pharmaceutical Biology*. 54(12); 2857-2863. doi: 10.1080/13880209.2016.1187179.

- Medina, P., Silvente-Poirot, S., Poirot, M. (2022) Oxysterols are potential physiological regulators of ageing. *Ageing Research Reviews*. 77; 101615. doi: 10.1016/j.arr.2022.101615.
- Minegishi, S., Luft, FC., Titze, J., Kitada, K. (2020) Sodium Handling and Interaction in Numerous Organs. *American Journal of Hypertension*. 33(8); 687–694. doi: 10.1093/ajh/hpaa049.
- Moghadasian, MH., Frohlich, JJ. (1999) Effects of dietary phytosterols on cholesterol metabolism and atherosclerosis: clinical and experimental evidence. *American Journal of Medicine*. 107(6); 588-594. doi: 10.1016/s0002-9343(99)00285-5.
- Myant, N. B., & Mitropoulos, K. A. (1977) Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. *Journal of Lipid Research*. 18; 135–153.
- Nakayama, T., Kosugi, T., Gersch, M., Connor, T., Sanchez-Lozada, LG., Lanaspa, MA., Roncal, C, Perez-Pozo, SE., Johnson, RJ., Nakagawa, T. (2010) Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. *American Journal of Physiology Renal Physiology*. 298(3); F712-720. doi: 10.1152/ajprenal.00433.
- Nimer, N., Choucair, I., Wang, Z., Nemet, I., Lim L., Gukasyan, J., Weeks, TL., Alkhoury, N., Zein, N., Tang, W.H.W., Fischbach, MA., Brown, JM., Allayee, H., Dasarathy, S., Gogonea, V., Hazen, SL. (2021) Bile acids profile, histopathological indices and genetic variants for non-alcoholic fatty liver disease progression. *Metabolism*. 116; 154457. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154457.
- Nishiyama, A. (2019) Pathophysiological mechanisms of mineralocorticoid receptor-dependent cardiovascular and chronic kidney disease. *Hypertensions research*. 42(3); 293-300. doi: 10.1038/s41440-018-0158-6.
- Nolop, KB., Rhodes, CG., Brudin, LH., Beaney, RP., Krausz, T., Jones, T., Hughes, J.M.B. (1987) Glucose utilization in vivo by human pulmonary neoplasms. *Cancer*. 60; 2682-2689.
- Osada, K., Hoshina, S., Nakamura, S., Sugano, M. (2000) Cholesterol oxidation in meat products and its regulation by supplementation of sodium nitrite and apple polyphenol before processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48; 3823-3829. doi: 10.1021/jf991187k.

- Oude Griep, LM., Seferidi, P., Stamler, J., Van Horn, L., Chan, Q., Tzoulaki, I., Steffen, LM., Miura, K., Ueshima, H., Okuda, N., Zhao, L., Soedamah-Muthu, SS., Daviglius, ML., Elliott P. (2016) INTERMAP Research Group, Relation of unprocessed, processed red meat and poultry consumption to blood pressure in East Asian and Western adults. *Journal of Hypertension*. 34; 1721-1729. doi: 10.1097/HJH.0000000000001008.
- Pandak, WM., Bohdan, P., Franklund, C., Mallonee, DH., Eggertsen, G., Björkhem, I., Gil, G., Vlahcevic, ZR., Hylemon, PB. (2001) Expression of sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase alters bile acid pool composition in primary rat hepatocytes and in vivo. *Gastroenterology*, 120(7); 1801–1809.
- Pathak, P., Chiang, John Y L. (2019) Sterol 12 $\alpha$ -Hydroxylase Aggravates Dyslipidemia by Activating the Ceramide/mTORC1/SREBP-1C Pathway via FGF21 and FGF15. *Gene Expression the Journal of Liver Research*, 19; 161-173.
- Rahunen, R., Kummu, O., Koivukangas, V., Hautajärvi, H., Hakkola, J., Rysä, J., Hukkanen, J. (2022) Pregnane X receptor–4 $\beta$ -hydroxycholesterol axis in the regulation of overweight- and obesity-induced hypertension. *Journal of the American Heart Association*. 11; e023492. doi: 10.1161/JAHA.121.023492.
- Reeves, PG., Nielsen, FH., Fahey GC. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of Nutrition*. 123; 1939-1951. doi: 10.1093/jn/123.11.1939.
- Ridlon, JM., Kang, DJ., Hylemon, PB. (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, 47(2); 241–259.
- Ruggenenti, P, Remuzzi, G. (2006) Time to abandon microalbuminuria? *Kidney International*. 70; 1214-1222. doi: 10.1038/sj.ki.5001729.
- Schwarz, M., Lund, E. G., Setchell, K. D., Kayden, H. J., Zerwekh, J. E., Björkhem, I., Herz, J., Russell, D. W. (1996) Disruption of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene in mice. II. Bile acid deficiency is overcome by induction of oxysterol 7 $\alpha$ -hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30); 18024-18031.

- Semova, I., Levenson, AE., Krawczyk, J., Bullock, K., Gearing, ME., Ling, AV., Williams, KA., Miao, J., Adamson, SS., Shin, DJ., Chahar, S., Graham, MJ., Crooke, RM., Hagey, LR., Vicent, D., Ferranti, SD., Kidambi, S., Clish, CB., Biddinger, SB. (2022) Insulin prevents hypercholesterolemia by suppressing 12 $\alpha$ -hydroxylated bile acids. *Circulation*. 145; 969-982. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.045373.
- Sheng, HW. (2000) Sodium, chloride and potassium. In: Stipanuk M, ed. *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 686-710.
- Shimano, H, Horton, JD., Shimomura, I., Hammer, RE., Brown, MS., Goldstein, JL. (1997) Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *Journal of Clinical Investigation*. 99; 846-854. doi: 10.1172/JCI119248.
- Shimano, H. (2001) Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Progress in Lipid Research*. 40; 439-452.
- Shirouchi, B., Kashima, K., Horiuchi, Y., Nakamura, Y., Fujimoto, Y., Tong, LT., Sato, M. (2017) 27-Hydroxycholesterol suppresses lipid accumulation by down-regulating lipogenic and adipogenic gene expression in 3T3-L1 cells. *Cytotechnology*. 69; 485-492. doi: 10.1007/s10616-016-9962-5.
- Terubayashi, H., Sato, S., Nishimura, C., Kador, PF., Kinoshita, JK. (1989) Localization of aldose and aldehyde reductase in the kidney. *Kidney International*. 36; 843-51. doi: 10.1038/ki.1989.270.
- Tkáč, I., Keene, CD., Pfeuffer, J., Low, WC., and Gruetter, R. (2001) Metabolic changes in quinolinic acid-lesioned rat striatum detected non-invasively by in vivo <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Journal of Neuroscience Research*. 66; 891-898.
- Ueki, K., Sasako, T., Okazaki, Y., Kato, M., Okahata, S., Katsuyama, H., Haraguchi, M., Morita, A., Ohashi, K., Hara, K., Morise, A., Izumi, K, Ishizuka N., Ohashi Y., Noda M., Kadowaki, T., J-DOIT3 Study Group. (2017) Effect of an intensified multifactorial intervention on cardiovascular outcomes and mortality in type 2 diabetes (J-DOIT3): an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinology*. 5; 951-964.

- Ugele, B., Kempen, HJ., Kempen, JM., Gebhardt, R., Meijer, P., Burger, HJ., Princen, HM. (1991) Heterogeneity of rat liver parenchyma in cholesterol 7 alpha-hydroxylase and bile acid synthesis. *Biochemical Journal*. 276; 73–77.
- Wallace, M., & Metallo, CM. (2020) Tracing insights into de novo lipogenesis in liver and adipose tissues. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 108; 65-71.
- World Health Organization. (2000) The World health report: 2000: health systems: improving performance. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. (2022) Global action plan for the prevention and control of noncommunicable disease 2022-2030 WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.
- Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., Yamashita, S., Noda, M., Kita, S., Ueki, K., Eto, K., Akanuma, Y., Froguel, P., Foufelle, F., Ferre, P., Carling, D., Kimura, S., Nagai, R., Kahn, BB., Kadowaki T. (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature Medicine*. 8; 1288-1295. doi: 10.1038/nm788.
- Yang, K., Zhang, P., Lv, T., Wu, J., Liu, Q. (2022) Acupuncture at Taichong and Zusanli points exerts hypotensive effect in spontaneously hypertensive rats by metabolomic analysis. *Journal of Chromatography B*. 1207; 123352. doi: 10.1016/j.jchromb.2022.123352.
- Ye, Q., Zou, B., Yeo, YH., Li, J., Huang, DQ., Wu, Y., Yang, H., Liu, C., Kam, LY., Tan, W.W.E., Chien, N., Trinh, S., Henry, L., Stave, CD., Hosaka, T., Cheung, RC., Nguyen, MH. (2020) Global prevalence, incidence, and outcomes of non-obese or lean non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatology*. 5; 739-752. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30077-7.
- Younossi, ZM, Koenig, AB, Abdelatif, D, Fazel Y, Henry, L, Wymer, M. (2016) Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 64(1); 73–84.

- Yoshitsugu, R., Kikuchi, K., Iwaya, h., Fujii, N., Hori, S., Lee, DG., Ishizuka, S. (2019) Alteration of bile acid metabolism by a high-fat diet is associated with plasma transaminase activities and glucose intolerance in rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 65; 45-51. doi: 10.3177/jnsv.65.45.
- Yoshitsugu, R., Liu, H, Kamo, Y., Takeuchi, A., Joe, GH., Tada, K., Kikuchi, K., Fujii, N., Kitta, S., Hori, S., Takatsuki, M., Iwaya, H., Tanaka, Y., Shimizu, H., Ishizuka, S. (2021) 12 $\alpha$ -Hydroxylated bile acid enhances accumulation of adiponectin and immunoglobulin A in the rat ileum. *Scientific Reports*. 11; 12939. doi: 10.1038/s41598-021-92302-z.
- Young, AA., Gedulin, BR., Bhavsar, S., Bodkin, N., Jodka, C., Hansen, B., Denaro, M. (1999). Glucose-lowering and insulin-sensitizing actions of exendin-4: studies in obese diabetic (*ob/ob*, *db/db*) mice, diabetic fatty Zucker rats, and diabetic rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Diabetes* 48; 1026-1034.
- Zhang, F., Yuan, W., Wei, Y., Zhang, D., Duan, Y., Li, B., Wang, X., Xi, L., Zhou, Y., Wu, X. (2019) The alterations of bile acids in rats with high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetes and their negative effects on glucose metabolism. *Life Science*. 229; 80-92. doi: 10.1016/j.lfs.2019.05.031.

## 参考論文

**Shimoda, T.**, Hori, S., Maegawa, K., Takeuchi, A., Lee, Y., Joe, G., Tanaka, Y., Shimizu, H., Ishizuka, S. (2020) A low coefficient of variation in hepatic triglyceride concentration in an inbred rat strain. *Lipids in Health and Disease*, 19(1), 137.

**Shimoda, T.**, Shimizu, H., Iwasaki, W., Liu, H., Kamo, Y., Tada, K., Hanai, T., Hori, S., Joe, G., Tanaka, Y., Sato, M., Miyazaki, H., Ishizuka, S. (2022) A diet supplemented with cholic acid elevates blood pressure accompanied by albuminuria in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, in press.

## 国内学会

下田智子, 清水英寿, 加茂佳恵, 多田幸司, 花井健人, 堀将太, 田中愛建, 佐藤匡央, 石塚敏 ラ  
ットにおけるコール酸摂取による肝脂質蓄積の増加は血圧の上昇を伴う, 日本栄養・食糧学会北海道支部大会 (2022年, 札幌, 口頭発表)

## 謝辞

本論文は数多くの方々の御協力を賜り、作製されたものです。私は、博士後期課程から本研究室へ入学しました。入学時から学位取得までの7年間、細部にわたる御指導と御助言、さらに本論文の主査として御校閲を賜りました北海道大学大学院農学研究院基盤研究部門生物機能化学分野食品栄養学研究室の石塚敏教授に心より感謝申し上げます。また、御多忙にも関わらず副査の御快諾と御校閲を賜りました食品機能化学研究室の園山慶教授、食品栄養学研究室の比良徹准教授に謹んで感謝の意を表します。さらに研究全般に関し、御助言、御指導いただいた島根大学大学院自然科学研究科農生命科学専攻の清水英寿教授に深謝申し上げます。また、筑波大学大学院生命科学環境研究科宮崎均教授には、血圧測定に際し、機器の提供をしていただきました。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栄養化学分野の佐藤匡央教授には、肝臓の酸化コレステロール解析をしていただき、研究結果の解釈に際し、多くの御助言、御指導をいただきました。厚く感謝申し上げます。

在学期間は、胆振東部地震および新型コロナウイルス感染症の流行によりサンプル管理などにおいて食品栄養学研究室の皆様が筆舌に尽くしがたいほどの御支援をいただきました。また、本研究を執行するにあたり尊い命をささげてくれたラットの冥福を祈り、全ての皆様に心より御礼申し上げます。

2023年3月 下田 智子