



|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | 高脂肪食摂取で増加する $12\alpha$ 水酸化胆汁酸による脂肪肝の誘導とその発現機構                                                   |
| 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                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14386">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14386</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/96759">https://hdl.handle.net/2115/96759</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Hori_Shota.pdf                                                                                  |



高脂肪食摂取で増加する  $12\alpha$  水酸化胆汁酸による  
脂肪肝の誘導とその発現機構

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  
堀 将太

# 目次

|                                                |    |
|------------------------------------------------|----|
| 目次                                             | 2  |
| 略語一覧                                           | 7  |
| 図リスト                                           | 10 |
| 表リスト                                           | 11 |
| 序論                                             | 12 |
| 第 1 章 HFD による $12\alpha$ 水酸化胆汁酸の増加機構と脂肪肝発症への関与 | 20 |
| 1-1. 背景と目的                                     | 21 |
| 1-2. 実験材料および実験方法                               | 23 |
| 1-2-1. 実験動物および食餌                               | 23 |
| 1-2-2. 血漿、組織および糞の回収                            | 23 |
| 1-2-3. 胆汁酸解析                                   | 23 |
| 1-2-4. 酸化コレステロール解析                             | 24 |
| 1-2-5. qRT-PCR                                 | 24 |
| 1-2-6. 肝臓、糞中および食餌中脂質の測定                        | 25 |
| 1-2-7. 血中脂質およびアミノトランスアミナーゼの測定                  | 25 |
| 1-2-8. 統計解析                                    | 25 |
| 1-3. 結果                                        | 29 |
| 1-3-1. 食餌摂取量および体重・臓器重量                         | 29 |
|                                                | 2  |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 1-3-2. 血中・肝臓中脂質パラメータ                | 29 |
| 1-3-3. 腸肝循環および循環血・糞中胆汁酸組成           | 29 |
| 1-3-4. 肝臓酸化コレステロールおよび胆汁酸代謝に関わる遺伝子発現 | 30 |
| 1-3-5. 各部位胆汁酸濃度と肝臓脂質濃度の相関解析         | 30 |
| 1-3-6. 肝臓脂質代謝に関わる遺伝子発現の解析           | 30 |
| 1-3-7. 食餌脂質摂取量と糞中脂質排泄の解析            | 31 |
| 1-4. 考察                             | 40 |
| 第2章 12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸による脂肪肝発現機構の解析 | 44 |
| 2-1. 背景と目的                          | 45 |
| 2-2. 実験材料および実験方法                    | 46 |
| 2-2-1. 実験動物および食餌                    | 46 |
| 2-2-2. 血漿、組織および糞の回収                 | 46 |
| 2-2-3. 胆汁酸解析                        | 46 |
| 2-2-4. qRT-PCR                      | 46 |
| 2-2-6. 血中脂質およびアミノトランスアミナーゼの測定       | 47 |
| 2-2-7. 肝臓、糞中および食餌中脂質の測定             | 47 |
| 2-2-8. 肝臓、糞中および血漿中铁濃度の測定            | 47 |
| 2-2-9. 統計解析                         | 48 |
| 2-3. 結果                             | 50 |
| 2-3-1. 食餌摂取量および体重・臓器重量の評価 (CA 負荷試験) | 50 |

|                                                      |    |
|------------------------------------------------------|----|
| 2-3-2. 門脈血漿中の胆汁酸組成の解析 (CA 負荷試験)                      | 50 |
| 2-3-3. 肝臓・血中脂質および血中トランスアミナーゼ解析 (CA 負荷試験)             | 50 |
| 2-3-4. 糞中脂質排泄および肝臓脂質代謝に関わる遺伝子発現の解析 (CA 負荷試験)         | 50 |
| 2-3-5. 肝臓ミネラル濃度および関連遺伝子発現の解析 (CA 負荷試験)               | 51 |
| 2-3-6. 大動脈血漿中の胆汁酸組成、脂質および鉄代謝 (CA 負荷と VCM 投与の組み合わせ試験) | 59 |
| 2-4. 考察                                              | 63 |
| 第 3 章 軽度鉄欠乏による肝臓脂質蓄積への影響評価                           | 68 |
| 3-1. 背景と目的                                           | 69 |
| 3-2. 実験材料および実験方法                                     | 70 |
| 3-2-1. 実験動物および食餌                                     | 70 |
| 3-2-2. 血漿、組織および糞の回収                                  | 70 |
| 3-2-3. qRT-PCR                                       | 70 |
| 3-2-4. 血中脂質およびアミノトランスアミナーゼの測定                        | 71 |
| 3-2-5. 肝臓脂質の測定                                       | 71 |
| 3-2-6. 肝臓、糞中および血漿中铁濃度の測定                             | 71 |
| 3-2-7. 統計解析                                          | 71 |
| 3-3. 結果                                              | 75 |
| 3-3-1. MID 食による貧血を伴わない鉄欠乏の誘導                         | 75 |
| 3-3-2. HS と MID の組み合わせによる肝臓脂質蓄積への影響                  | 78 |

|                                                    |     |
|----------------------------------------------------|-----|
| 3-4. 考察                                            | 82  |
| 総括                                                 | 85  |
| ヒトデータから見る NAFLD の発症機構と其中での $12\alpha\text{OH}$ の役割 | 87  |
| NAFLD 発症における DNL の役割                               | 87  |
| DNL を促進する選択的インスリン抵抗性                               | 88  |
| インスリン抵抗性の背後に隠れた $12\alpha\text{OH}$                | 89  |
| 本研究で生まれた疑問                                         | 89  |
| ① NAFLD で $12\alpha\text{OH}$ が増加する機構              | 90  |
| ② $12\alpha\text{OH}$ が SREBP1 遺伝子発現を上昇させる機構       | 92  |
| ③ SREBP1 の下流の FASN および ACC 遺伝子発現が変動しない理由           | 93  |
| ⑤ $12\alpha\text{OH}$ 誘導性脂肪肝における腸内細菌の寄与            | 97  |
| ⑥ $12\alpha\text{OH}$ 誘導性の肝臓鉄濃度低下の脂肪肝への関与          | 97  |
| ⑦ $12\alpha\text{OH}$ による食事脂肪吸収増加の脂肪肝への寄与          | 98  |
| ⑧ $12\alpha\text{OH}$ は NASH 進行に関与するか              | 99  |
| 引用文献                                               | 101 |
| 参考論文                                               | 125 |
| その他の論文                                             | 126 |
| 国内学会                                               | 128 |
| 国際学会                                               | 130 |
| その他、受賞歴                                            | 131 |



## 略語一覽

|                 |                                                                |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|
| ACC             | Acetyl-CoA carboxylase                                         |
| ACSS2           | Acetyl-CoA synthetase 2                                        |
| ACTA            | Actin alpha 2                                                  |
| ALT             | Alanine aminotransferase                                       |
| AST             | Aspartate aminotransferase                                     |
| ASBT            | Apical sodium-dependent bile acid transporter                  |
| BCAA            | Branched chain amino acid                                      |
| BMP6            | Bone morphogenetic protein 6                                   |
| CA              | Cholic acid                                                    |
| CPT1            | Carnitine O-palmitoyltransferase 1                             |
| CDCA            | Chenodeoxycholic acid                                          |
| CIDEA           | Cell death-inducing DNA fragmentation factor A-like effector A |
| Col1 $\alpha$ 1 | Collagen type I alpha 1                                        |
| CYP3A2          | Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 2                  |
| CYP7A1          | Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase                            |
| CYP27A1         | Sterol 27-hydroxylase                                          |
| CYP8B1          | 12 $\alpha$ -hydroxylase                                       |
| DNL             | De novo lipogenesis                                            |
| DMT1            | Divalent metal transporter 1                                   |
| FASN            | Fatty acid synthase                                            |
| FPN             | Ferroportin 1                                                  |
| FFA             | Free fatty acid                                                |
| FN1             | Fibronectin 1                                                  |
| FoxO1           | Forkhead box protein O1                                        |



|             |                                          |
|-------------|------------------------------------------|
| FTH1        | Ferritin heavy chain 1                   |
| FXR         | Farnesoid X receptor                     |
| G6Pase      | Glucose 6-phosphatase                    |
| HFD         | High-fat diet                            |
| HFE2        | Homeostatic Fe regulator 2               |
| HAMP        | Hepcidin antimicrobial peptide           |
| HMGCR       | Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase      |
| HMOX1       | Heme oxygenase 1                         |
| HP          | Haptoglobin                              |
| HPX         | Hemopexin                                |
| HS          | High-sucrose                             |
| IA          | Iron-adequatet                           |
| ID          | Iron deficiency                          |
| INSIG2A     | Insulin induced gene 2A                  |
| IL6         | Interleukin 6                            |
| IL1 $\beta$ | Interleukin-1 beta                       |
| IRS         | Insulin receptor substrate               |
| LCN2        | Lipocalin-2                              |
| LCN2R       | Lipocalin-2 receptor                     |
| LXR         | Liver X receptor alpha                   |
| KHKC        | Ketohexokinase C                         |
| MAFLD       | Metabolic associated fatty liver disease |
| MID         | Marginal iron deficiency                 |
| mtDNA       | Mitochondrial DNA                        |
| mTORC1      | Mammalian target of rapamycin complex 1  |
| NAFLD       | Non-alcoholic fatty liver disease        |
| NASH        | Nonalcoholic steatohepatitis             |

|              |                                                                       |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------|
| NCD          | Non-communicational disease                                           |
| nDNA         | Nuclear DNA                                                           |
| PEPCK        | Phosphoenolpyruvate carboxykinase                                     |
| PI3K         | Phosphatidylinositol-3 kinase                                         |
| RPLP0        | Ribosomal protein lateral stalk subunit P0                            |
| SHP          | Small Heterodimer Partner                                             |
| SREBP1       | Sterol regulatory element binding protein 1                           |
| SCAP         | Sterol regulatory element binding protein cleavage activating protein |
| STAR         | Steroidogenic acute regulatory protein                                |
| TCA          | Taurocholic acid                                                      |
| TG           | Triglyceride                                                          |
| TFR1         | Transferrin receptor 1                                                |
| TFR2         | Transferrin receptor 2                                                |
| TGR5         | Takeda G protein-coupled receptor 5                                   |
| TNF $\alpha$ | Tumor necrosis factor alpha                                           |
| VCM          | Vancomycine                                                           |
| ZIP14        | Zrt- and irt-like protein 14                                          |

## 図リスト

### 第1章

Figure. 1-1. HFD induces hepatic steatosis

Figure. 1-2. HFD increases specifically  $12\alpha$  OH in enterohepatic circulation

Figure. 1-3. HFD increases specific  $12\alpha$  OH

Figure. 1-4. HFD modulates cholesterol metabolism in a direction favorable to  $12\alpha$  OH synthesis

Figure. 1-5.  $12\alpha$  OH correlates with hepatic steatosis

Figure. 1-6. HFD suppresses hepatic gene expression regulates lipid metabolism

Figure. 1-7. HFD enhances apparent dietary fat absorption

### 第2章

Figure. 2-1. CA diet increases specifically  $12\alpha$  OH

Figure. 2-2. CA diet induces hepatic steatosis and liver injury

Figure. 2-3. CA diet reduces fecal lipid excretion and modulates liver lipid gene expression in a direction favorable to lipid accumulation

Figure. 2-4. Liver iron concentration negatively correlates with liver lipid accumulation

Figure. 2-5. CA diet induces liver iron deficiency.

Figure. 2-6. Primary  $12\alpha$  OH is responsible for CA diet-induced disorders.

### 第3章

Figure. 3-1. MID diet does not affect growth parameters

Figure. 3-2. MID diet induces iron deficiency without anemia

Figure. 3-3. MID diet induces iron deficiency without anemia in HS-fed rats

Figure. 3-4. MID combined with HS induces liver TG accumulation

# 表リスト

## 第 1 章

Table. 1-1. Diet compositions in control and HFD

Table. 1-2. Molecular species of bile acid

Table. 1-3. Molecular species of oxysterol

Table. 1-4. Food intake, growth, and organ weights in male WKAH/HkmSlc rats fed either control or HFD for 8 weeks.

## 第 2 章

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

Table. 2-2. Food intake, growth, and organ weights in WKAH/HkmSlc male rats fed either control or CA diet for 13 weeks

Table. 2-3. Food intake, growth, and organ weights in WKAH/HkmSlc male rats fed either control or CA diet treated with or without VCM in drinking water for 6 weeks (Study 3)

Table. 2-4. Aortic plasma bile acid profile in WKAH/HkmSlc male rats fed either control or CA diet treated with or without VCM in drinking water for 6 weeks (Study 3)

## 第 3 章

Table. 3-1. Diet compositions in control and HS either with IA or MID

Table. 3-2. Growth parameters and tissue weight in rats fed control and HS either with IA or MID

## 序論

1900 年代、人類の死因の上位を占めていたのは現代のような心臓病や脳卒中、癌ではなく、ヒトからヒトへと感染する感染症だった (Jones et al., 2012)。ヒトが持つ特有の探究心や好奇心が人々の移動を促し、現代のような衛生観念や治療法がないが故にさらなる感染症の増大を後押しする事になった。死因トップ 3 を肺炎、結核、腸チフスが占め、10 万人あたり 500 件の死者を記録した (Jones et al., 2012)。これは現在世界を席卷している新型コロナウイルスと同程度の被害であり (Hoseinpour et al., 2020)、かつての感染症の脅威の大きさが伺い知れる。幸いなことに、手洗い等の公衆衛生学に基づいた予防法の普及や治療法の発達、特に 1900 年の中期を境にペニシリンを始めとした抗生物質の発見 (Bennett & Chung, 2001) により感染症による死亡ケースは劇的に減少し始めた (Achilladelis, 1993; Cutler et al., 2006)。その結果、2010 年にかけて全体の死亡率は半分以上にまで低下すると同時に人類の寿命は大幅に伸び始めた一方で、人類の死因上位を占める要因が大きく変動する事となった (Jones et al., 2012)。

感染症の脅威が相対的に減少した結果、現代人類の死因の大半を占めるようになったのは非感染性疾患 (non-communicational disease、NCD) である。世界保健機関 (WHO: World Health Organization) によると、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)。1900 年代の後半には NCD による死亡率がついに感染症を上回り (Achilladelis, 1993; Cutler et al., 2006)、現代で最大の脅威となった。2008 年には死因のおよそ 3 分の 2 を NCD が占め、地域の低～中所得者ではその割合は 80% にもものぼった (Alwan, 2011)。感染症が未だ死因上位を占めるアフリカでさえ、2030 年までに NCD による死因が感染症を上回ると予測されている (Alwan, 2011)。すなわち、NCD の予防法および治療法の確立は人類が成し遂げるべき最重要課題の 1 つといっても過言ではない。

非アルコール性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease、NAFLD) は過剰な飲酒を伴わずに肝臓に脂肪が蓄積する疾患である。複雑で多様な表現型から、より包括的な疾患を表す病名として代謝性脂肪肝疾患 (metabolic associated fatty liver disease、MAFLD) とも呼称されるようになり (Eslam et al., 2020)、糖尿病や心血管系疾患等の NCD の発症リスクを上昇させる事もわかってきた (Younossi et al., 2018)。西洋における NAFLD の罹患率は 20–30% (Vernon et al., 2011)、

世界中では 10 億人もの NAFLD 患者が存在し (Younossi et al., 2018)、特に幼児や青年期の若者の間でその患者数が増加している (Wiegand et al., 2010)。従来、NAFLD は単なるメタボリックシンドロームの発現型の 1 つと考えられていたが、炎症を伴った非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis、NASH) および肝硬変、肝臓癌の主要な発症要因であるだけでなく (Younossi et al., 2018)、糖尿病や心血管系疾患に先だって発症し (Lonardo et al., 2015)、肝臓局所に留まらない NCD の発症リスクを上昇させる事が明らかになってきた (Younossi et al., 2018)。すなわち、NAFLD の予防および治療法の確立は 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。

肝臓脂肪蓄積は肝臓によるトリグリセライド (triglyceride、TG) 生成が VLDL による TG の放出および  $\beta$  酸化による脂肪酸分解を上回った場合に起こる。この観点からヒト NAFLD のデータを眺めると、VLDL 放出量は増加 (Fabbrini et al., 2008, 2009; Targher et al., 2016)、肝臓脂肪酸酸化は一定かむしろ増加する (Bugianesi et al., 2005; Chalasani et al., 2003; Sanyal et al., 2001)。すなわち、NAFLD における肝臓脂肪蓄積の原因は肝臓脂肪の排出および分解ではなく、肝臓 TG 生成の増大、具体的には (1) 皮下・内臓脂肪組織の脂肪分解で循環血および門脈血に放出された脂肪酸 (2) 食後キロミクロンの TG 分解により循環血に放出された脂肪酸 (3) 肝臓に輸送された血中リポタンパクの TG 分解、そして (4) 非脂質前駆体から新たに合成された脂肪酸 (De novo lipogenesis、DNL) の 4 つの供給源に由来すると考えられる。

DNL は複数のステップを踏んで起こる複雑なイベントである。DNL は反応に必要な NADPH/NADP<sup>+</sup>の比が高い細胞質で行われる。前駆体となるのはグルコースやフルクトース、アミノ酸、酢酸などから供給されるアセチル CoA である (Wallace & Metallo, 2020)。ただし、解糖系からミトコンドリアで合成されたアセチル CoA は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エロンガーゼにより更なる長鎖脂肪酸、デサチュラーゼによる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。

ステロール調節要素結合転写因子 1 (sterol regulatory element binding protein 1、SREBP1) は膜結合型の転写因子で、ACC や FASN を上方制御することで DNL を亢進する (Horton et al., 2002; Shimano, 2001)。SREBP1 を活性化させる因子の代表例はインスリンである (Matsuzaka et al., 2004; Osborne, 2000)。インスリンは肝臓に発現するインスリン受容体に結合し、下流のシグナルを活性化させることで SREBP1 の発現を増加させる (Haas et al., 2012)。その機構には不明な点が多いものの、少なくとも 2 つの機構で SREBP1 を活性化させる。1 つ目は SREBP1 の転写促進 (Foretz et al., 1999)、2 つ目は翻訳後修飾により不活性型から活性型 SREBP1 へと変化させる機構である (Yabe et al., 2003)。また、グルコースも同様に重要な SREBP1 の活性化因子であり、ストレプトゾトシン投与によってインスリンを欠乏させたマウスでも、高血糖状態が SREBP1 の発現を誘導する (Matsuzaka et al., 2004)。

DNL は NAFLD の肝臓脂肪蓄積に大きく寄与する。興味深いことに、NAFLD 患者は肝臓脂肪蓄積が進んでいるにも関わらず DNL が亢進する特徴的な表現型を示す (Lambert et al., 2014)。従来、トレーサー試験で推定された肝臓で合成されるパルミチン酸の合成量は健常なヒトで 1-10% (Diraison et al., 2003; Faix et al., 1993; Hellerstein et al., 1991; Lambert et al., 2014; Marques-Lopes et al., 2001)、NAFLD 患者でも 15-26% 程度 (Donnelly et al., 2005; Hodson et al., 2017; Lambert et al., 2014; Tamura & Shimomura, 2005) とされており、DNL は重要視されていなかった。しかしながら、NAFLD 患者の肝臓では SREBP1 mRNA 発現が健常者に比べて 5 倍に増加する事に加え (Kohjima et al., 2008)、過去の研究で推定された DNL の寄与が過小評価されていると見立て、重水を用いて長期間 (3~5 週間) 試験が行われた研究では、NAFLD 患者の血中 TG に含まれる約 40% ものパルミチン酸が肝臓 DNL に由来する事が明らかになった (Smith et al., 2020)。

NAFLD で DNL が亢進するメカニズムは明らかではないが、インスリン抵抗性に伴った循環血中のインスリンおよびグルコース濃度の増加が SREBP1 発現を増大させる事で DNL を亢進さ



せているのではないかと考えられている (Smith et al., 2020)。その一方で、SREBP1 の発現増加を確かめた細胞実験では、インスリン濃度が 10-100 nM (Kim et al., 1998; Li et al., 2010; Shimomura et al., 1999)、グルコースは > 25mM (Iroz et al., 2017; Yamashita et al., 2001) と、生体で観察される事が稀な高濃度が用いられていた事を考えると、未知の DNL 促進因子がある可能性は否定できない。

胆汁酸はコレステロールから肝臓で合成され、特有の両親媒性構造を有する化合物である。構造的類似性からコレステロールが前駆体であることは 1920 年代から推測されていたものの、トレーサー試験を用いて実際に胆汁酸の前駆体がコレステロールであると実証されたのは 1943 年の事である (Bloch et al., 1943)。現在では、肝臓におけるコレステロール最終異化産物として広く認識されるようになった (Schwarz et al., 1996)。胆汁酸合成量を決定づけるコレステロール 7 $\alpha$  水酸化酵素 (cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase、CYP7A1) はラットでは門脈から離れた部位で高発現し (Ugele et al., 1991)、コレステロールの 7 $\alpha$  水酸化反応を担う (Myant & Mitropoulos, 1977)。CYP7A1 による反応を受けた胆汁酸中間体は、12 $\alpha$  水酸化酵素 (12 $\alpha$ -hydroxylase、CYP8B1) より 12 位の水酸化反応 (Pandak et al., 2001) を受けるか否かによって 12 $\alpha$  水酸化胆汁酸 (12 $\alpha$  OH) もしくは非 12 $\alpha$  水酸化胆汁酸 (non-12 $\alpha$  OH) に分類できる。肝臓で合成される 12 $\alpha$  OH および non-12 $\alpha$  OH はコール酸 (cholic acid、CA) とケノデオキシコール酸 (chenodeoxycholic acid、CDCA) である。こうして肝臓で合成される胆汁酸は一次胆汁酸と呼ばれ、管腔内に分泌される前に水溶性を上げるためにグリシンもしくはタウリンによる抱合化を受ける。腸肝循環を逃れ大腸に到達した一次胆汁酸は、タウリンおよびグリシンの脱抱合を受けた後に、腸内細菌による 7 $\alpha$  脱水酸化反応により二次胆汁酸へと変換される (Ridlon et al., 2006)。

胆汁酸の生理作用として、水に溶けにくい脂質を可溶化する作用がある事は 1 世紀近く前から知られていた (Verzar, 1938)。食事脂質の吸収は脂質の可溶化が律速になることから (Hofmann & Mysels, 1988)、肝臓から胆管を通して小腸に分泌された胆汁酸は食事脂質の消化・吸収の促進に寄与する事となる (Hofmann, 1999)。コレステロール骨格を基本として頑健な構造に加え、大部分の胆汁酸は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して再び

肝臓へと戻る腸肝循環で再利用される (Chiang, 2009)。コレステロール消費を最小限に抑えながら、効率的に高エネルギーな脂質の吸収を促進する巧妙なシステムである。

従来、胆汁酸は単なる食餌脂質吸収促進作用を持つ物質として認知されていたが、ここ数十年の研究成果により NCD を媒介するシグナル因子として注目されるようになった。1999 年には核内受容体であるファルネソイド X 受容体 (farnesoid X receptor、FXR) (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999; Wang et al., 1999)、続いて 2002 – 2003 年に膜貫通型受容体である Takeda G タンパク質共役受容体 5 (takeda G protein-coupled receptor 5、TGR5) (Kawamata et al., 2003; Maruyama et al., 2002) が胆汁酸の感知センサーとして発見された。それ以来、脂質の消化吸収に留まらない代謝制御因子としての胆汁酸の役割が注目されるようになった (Kliwer & Mangelsdorf, 2015; Thomas et al., 2009)。こうして胆汁酸受容体をターゲットにした NCD の改善策は数多く提案されてきたが、受容体特異的なアゴニストやアンタゴニストを用いた強力な作用をもつ薬剤を使用したものが多く、NCD 発症において生体内で内因的に増減する胆汁酸の役割には不明な点が多い。

通常、体内を循環する胆汁酸量は厳密に制御されている。腸肝循環を逃れた一部の胆汁酸は糞中へと排泄されるため、排泄された胆汁酸を補うために新たに肝臓で胆汁酸が合成される。CYP7A1 による胆汁酸合成量は肝臓および小腸に高発現する FXR によるネガティブフィードバックを受ける (de Aguiar Vallim et al., 2013)。胆汁酸による肝臓の FXR 活性化は小型ヘテロダイマーパートナー (small Heterodimer Partner、SHP) を介して CYP7A1 の発現を抑制する一方で、小腸の FXR 活性化は線維芽細胞成長因子 15/19 (fibroblast growth factor15/19、FGF15/19) の門脈血中への分泌を促し、肝臓に到達した FGF15/19 が CYP7A1 抑制により胆汁酸合成量を低下させる (de Aguiar Vallim et al., 2013)。また、胆汁酸トランスポーターも FXR による調節を受けることで体内の胆汁酸濃度を調節する (de Aguiar Vallim et al., 2013)。驚くべき事に、こうした FXR を活性化する能力は、より水溶性の高い  $12\alpha\text{OH}$  では non- $12\alpha\text{OH}$  と比べて 100 倍以上低く (Parks et al., 1999)、 $12\alpha\text{OH}$  は胆汁酸の中でも体内で増加しやすい分子種と言える。

$12\alpha\text{OH}$  濃度の増加が NCD の発症と密接に関連する事が複数の文献で報告されている。インスリン抵抗性を生じたヒト集団において、血中  $12\alpha\text{OH}$  濃度が肝臓脂肪蓄積と正の相関を示す (Haeusler et al., 2013)。また、NAFLD (Chashmian et al., 2019; Mouzaki et al., 2016; Puri et

al., 2018) や肥満 (Haeusler et al., 2016) においても、血中  $12\alpha\text{OH}$  濃度の増加が観察される。特筆すべきは non- $12\alpha\text{OH}$  濃度は一定値もしくは減少する一方で、 $12\alpha\text{OH}$  が先行して特異的に増加する点である。同様の現象は高脂肪食 (high-fat diet、HFD) を与えたラットおよびマウスにおいても観察される (Devkota et al., 2012; Yoshitsugu et al., 2019)。これらの研究報告は何らかの機構で特異的に増加した  $12\alpha\text{OH}$  が肝臓脂質蓄積を引き起こす可能性を示す。しかしながら、食事要因を発端に体内で生理的なレベルで変動する  $12\alpha\text{OH}$  の増加機構、および  $12\alpha\text{OH}$  による直接的な肝臓脂肪蓄積効果の検討はなされていない。

本研究は、NAFLD の中核を成す肝臓脂肪蓄積を引き起こす媒介物質として  $12\alpha\text{OH}$  に着目し、食事要因により  $12\alpha\text{OH}$  が特異的に増加する機構および  $12\alpha\text{OH}$  が肝臓脂肪蓄積へ及ぼす影響を明らかにする事を目指した基盤研究である。全世界で 10 億人もの罹患者が存在する NAFLD の肝臓脂肪蓄積を起こす原因物質の特定は、NAFLD の予防策および治療策の策定における重要課題である。

本論文は上述の目的に沿って行った研究内容を章立てて記載した。序論では本研究遂行にあたっての基盤的背景を端的に纏め、実験内容を第 1 章から第 3 章に記載した。各章ごとに背景と目的、実験方法、結果、考察を記述し、考察の冒頭には概要を各章で明らかになった事象の概要を示した。第 1 章では、HFD による  $12\alpha\text{OH}$  特異的増加機構の解明および  $12\alpha\text{OH}$  が肝臓脂質蓄積に及ぼす影響の評価を試みた。具体的には、HFD を与えたラットにおける腸肝循環および糞中の胆汁酸組成、胆汁酸代謝に関わる遺伝子発現レベルを解析し、肝臓脂質代謝との関係性を評価した。第 2 章では  $12\alpha\text{OH}$  による肝臓脂肪蓄積へ及ぼす影響およびその機構を検討するために、HFD で増加する主要な  $12\alpha\text{OH}$  の一次胆汁酸、CA を与えたラットの胆汁酸代謝および肝臓脂質代謝を解析した。更に、腸内細菌による  $12\alpha\text{OH}$  の代謝が肝臓脂肪蓄積に関与するかどうかを検証するために、CA とバンコマイシン (vancomycin、VCM) の飲水投与を組み合わせたラットの肝臓脂質代謝を解析した。第 3 章では、第 2 章および 3 章で観察された肝臓鉄濃度低下と肝臓脂肪蓄積の密接な相関関係の因果関係を調べた。総括では、以上の実験結果を包括的に纏め、既存研究から眺めた本研究の立ち位置および今後の展望を示した。末尾には本論文中で引用した文献および著者の学術雑誌に掲載された論文を記載した。



# 第 1 章 HFD による $12\alpha$ 水酸化胆汁酸の増加機構と脂肪肝 発症への関与

## 1-1. 背景と目的

脂肪肝は食事習慣と密接に関連して発症する肝臓におけるメタボリックシンドロームの発現型の1つである。疫学調査によると、脂肪肝は肥満や糖尿病、心血管系疾患等の将来的なNCDの発症リスクを上げる事が報告されている (Lonardo et al., 2015)。脂肪肝の発症において食事習慣が重要な要因の1つであり、過剰なエネルギー摂取は肝臓脂肪の蓄積を促進する。特に、飽和脂肪酸を多く含む食事を過剰に摂取させた場合 (1日当たり 1000 kcal 過剰)、不飽和脂肪酸やショ糖を豊富に含む食事の過剰摂取よりも強力に肝臓脂肪蓄積を起こすことがランダム化比較試験において報告されている (Luukkonen et al., 2018)。類似の現象は動物モデルでも観察されており、飽和脂肪酸および n-6 系の多価不飽和脂肪酸を比較的豊富に含むラードベースの HFD を与えると肝臓脂肪濃度が顕著に増加する (Buettner et al., 2006)。一方、これらの現象は n-3 系の不飽和脂肪酸を豊富に含む魚油ベースの HFD の摂取では起こらず (Buettner et al., 2006)、ヒトおよびラットの脂肪肝発症後に n-3 系の多価不飽和脂肪酸を与えるとむしろ改善に向かう (Marsman et al., 2011; Nobili et al., 2011)。つまり、n-3 系の多価不飽和脂肪酸を豊富に含む食事が脂肪肝に対して抑制的に働く一方で、飽和脂肪酸や n-6 系の多価不飽和脂肪酸リッチな食事は脂肪肝の発症に促進的に働く。しかしながら、これらの食事誘導性の脂肪肝発症を媒介する因子の存在は明らかになっていない。

12 $\alpha$ OH は食餌誘導性脂肪肝、特に HFD による脂肪肝発症を媒介する宿主因子の1つである可能性がある。ラットに HFD を摂取させると、腸肝循環および糞中排泄における 12 $\alpha$ OH が特異的に増加する一方で、non-12 $\alpha$ OH は一定値、もしくは減少する (Yoshitsugu et al., 2019)。同様の現象は高脂肪高ショ糖食を摂取させたラット (Yoshitsugu et al., 2020) や糖尿病モデルマウス (Li et al., 2012) においても観察されている。さらに、マウスに飽和脂肪酸を豊富に含む食事を与えた場合には胆汁中のタウロコール酸 (taurocholic acid、TCA) が増加するが、多価不飽和脂肪では同様の現象は観察されない (Devkota et al., 2012)。更に、12 $\alpha$ OH 産生が低下した *Cyp8b1* ノックアウト (knock-out、KO) マウスでは食餌脂肪吸収の低下を伴って高脂肪・高コレステロール食誘導性の脂肪肝が抑制されるが、TCA を補給すると脂肪吸収不全が解消される (Bertaggia et al., 2017)。これらの報告は 12 $\alpha$ OH が脂肪吸収を促進することで食餌誘導性の脂肪肝発症を媒介する

可能性を示すが、そもそも HFD を与えた場合に起こる  $12\alpha\text{OH}$  の特異的な増加機構および詳細な胆汁酸代謝と脂肪肝の関係性は不明である。

本章では、HFD を与えたラットにおける腸肝循環および糞中の胆汁酸代謝を詳細に解析し、胆汁酸代謝に関わる遺伝子発現を調べることで  $12\alpha\text{OH}$  特異的な増加機構の一端を明らかにする事を目的として研究を行った。また、糞中脂質排泄および肝臓脂質代謝に関わる遺伝子発現を解析する事で  $12\alpha\text{OH}$  の特異的な増加と脂肪肝との関係性を分析した。

## **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**

AIN-93G をベースとしたコントロール飼料 (Reeves et al., 1993) で 1 週間以上順化させた 5 週齢の雄性 WKAH/HkmSlc ラット (日本エスエルシー、東京、日本、NBRP ラット No:0154) を実験動物として使用した。明期は 08:00~20:00、温度  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$  の管理された環境で個別に飼育した。試験食としてコントロール ( $n = 6$ ) または HFD 食 ( $n = 7$ ) を 8 週間与えた (Table 1-1)。ラットは全試験期間中を通して自由摂食・自由飲水の条件下で飼育を行い、試験期間および解剖時を含め絶食はかけなかった。飼料中のカゼインおよびラード中に含まれるコレステロール量はそれぞれ 80 mg/kg および 860 mg/kg であった。体重および食餌摂取量は 2 日ごとに測定した。この試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: 17-0050、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、組織および糞の回収**

試験終了日にペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内投与する事で麻酔をかけ、大動脈血をヘパリン (50 IU/mL) とアプロチニン (500 KIU/mL) 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肝臓および精巣上体脂肪組織を動物から取り出して重量を測定し、4 時間以内にすべての組織サンプルを採取した。糞は実験終了時に 24 時間採取した。血液は  $2000 \times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心分離することで血漿を回収した。回収したサンプルは、分析に使用するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### **1-2-3. 胆汁酸解析**

各組織・血漿における胆汁酸を萩尾らの報告に従って抽出 (Hagio et al., 2009, 2011)、解析 (Hori et al., 2020) した。測定した胆汁酸分子種の詳細は Table 1-2 に示した。



#### 1-2-4. 酸化コレステロール解析

肝臓中酸化コレステロール濃度は既報 (Hori et al., 2020; Shirouchi et al., 2017) に従って測定した。測定した酸化コレステロールの詳細は Table 1-3 に記載した。

#### 1-2-5. qRT-PCR

肝臓中の胆汁酸代謝、脂質代謝、繊維化および炎症に関わる遺伝子発現を既報に記載された通りに解析した (Hori et al., 2018, 2020)。検量線を用いて各遺伝子の発現量を測定した後に、ハウスキーピング遺伝子として 60S 酸性リボソームタンパク質 *P0* (*ribosomal protein lateral stalk subunit P0*, *Rplp0*) の発現量を使って補正した相対的な mRNA レベルを算出した。TaqMan Gene Expression probes (サーモフィッシャーサイエンティフィック、ウォルサム、アメリカ) は以下を使用した。Rn03302271\_gH: *Rplp0*, Rn00561420\_m1: インターロイキン 6 (*interleukin 6*, *Il6*)、Rn00580432\_m1: インターロイキン 1 $\beta$  (*interleukin-1 beta*, *Il1 $\beta$* )、Rn99999017\_m1: 腫瘍壊死因子 (*tumor necrosis factor alpha*, *Tnf $\alpha$* )、Rn01759928\_g1: アクチン  $\alpha 2$  (*actin alpha 2*, *Acta2*)、Rn00569575\_m1: フィブロネクチン 1 (*fibronectin 1*, *Fn1*)、Rn01463848\_m1: コラーゲンタイプ 1  $\alpha 1$  (*collagen type I alpha 1*, *Col1  $\alpha 1$* )、Rn01495769\_m1: *Srebp1*、Rn01463550\_m1: *Fasn*, Rn00580702\_m1: カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I (*carnitine O-palmitoyltransferase 1*, *Cpt1*)、Rn04181355\_m1: 細胞死誘導 DNA 断片化因子 A 様エフェクター A (*cell death-inducing DNA fragmentation factor A-like effector A* (*Cidea*), Rn01502638\_m1: *Srebp2*, Rn00565598\_m1: ヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼ (*hydroxymethylglutaryl-CoA reductase*, *Hmgcr*)、Rn00756461\_m1: シトクロム P 4 5 0 ファミリー 3 サブファミリー A メンバー (*cytochrome P450 family 3 subfamily A member 2*, *Cyp3a2*) which is a ortholog of human *Cyp3a4*, Rn00572658\_m1 for *Fxr*, Rn00589173\_m1: *Shp*, Rn00581185\_m1: 肝臓 X 受容体 (*liver X receptor*, *Lxr*)、Rn01445029\_s1: *Cyp8b1*, Rn00564065\_m1: *Cyp7a1*, Rn00710297\_m1: 27 位水酸化酵素 (*Sterol 27-hydroxylase*, *Cyp27a1*)。SYBR Green method は以下の配列のプライマーを使用した: *Rplp* (forward: 5'-GGCAAGAACACCATGATGCG-3', reverse: 5'-GTGATGCCCAAAGCTTGGAA-3', 5  $\mu$ M) and スteroid 産生急性調節タンパク質 (*steroidogenic acute regulatory protein*, *Star*, forward: 5'-GCCACACACTTTGGGGAGAT-3', reverse: 5'-GTGGTGGGCAGTCCTTAACA-3', 2.5  $\mu$ M)。

#### **1-2-6. 肝臓、糞中および食餌中脂質の測定**

肝臓および糞中脂質を既報に記載された通りに抽出した (Hori et al., 2018, 2020)。抽出液中の TG、遊離脂肪酸 (FFA)、コレステロールはそれぞれトリグリセライド E-テストワコー (和光純薬、大阪、日本)、および NEFA C-テストワコー、コレステロール E-テストワコー (富士フイルム和光純薬、大阪、日本) を用いて解析した。肝臓中遊離コレステロール濃度は Sperry および Webb の報告に従って測定した (Sperry et al., 1950)。食餌中脂質はイソプロパノールを用いて抽出し、コレステロール E-テスト (富士フイルム和光純薬) を用いて解析した。

#### **1-2-7. 血中脂質およびアミノトランスアミナーゼの測定**

血漿中 TG、FFA およびコレステロールはトリグリセライド E-テストワコー (和光純薬)、NEFA C-テストワコー、コレステロール E-テストワコー (富士フイルム和光純薬) を用いて解析した。血中トランスアミナーゼ活性をトランスアミナーゼ CII-テストワコー (富士フイルム和光純薬) を用いて測定した。

#### **1-2-8. 統計解析**

特に言及しない限り、データの数値は平均値 + SEM で示した。図では箱ひげ図を用いて最大値、最小値、中央値、そして個体値のプロットを示した。JMP 14.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて、Student's *t*-test によって 2 群間の平均値有意差検定を行った。有意差水準は  $P < 0.05$  に設定した。

**Table. 1-1. Diet compositions in control and HFD**

|                                        | Control   | HFD   |
|----------------------------------------|-----------|-------|
|                                        | g/kg diet |       |
| Casein <sup>1</sup>                    | 200       | 200   |
| Dextrin <sup>2</sup>                   | 529.5     | 299.5 |
| Sucrose <sup>3</sup>                   | 100       | 100   |
| Soybean oil <sup>4</sup>               | 70        | 70    |
| Lard                                   | -         | 230   |
| 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   |

<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-93 Vitamin mixture (Reeves et al., 1993)

<sup>8</sup> Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan

**Table. 1-2. Molecular species of bile acid**

| Systemic name                                                                                          | Trivial name                                          | Abbreviations  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------|
| <b>Primary 12<math>\alpha</math> OH</b>                                                                |                                                       |                |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol                                  | Cholic acid                                           | CA             |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol- <i>N</i> -(2-sulphoethyl)-amide | Taurocholic acid                                      | TCA            |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -triol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide | Glycocholic acid                                      | GCA            |
| <b>Secondary 12<math>\alpha</math> OH</b>                                                              |                                                       |                |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diol                                               | Deoxycholic acid                                      | DCA            |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(2-sulphoethyl)-amide              | Taurodeoxycholic acid                                 | TDCA           |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide              | Glycodeoxycholic acid                                 | GDCA           |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,12 $\alpha$ -diol-7-one                                         | 7-oxo-deoxycholic acid                                | 7oDCA          |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ -ol-12-one                                                       | 12-oxo-lithocholic acid                               | 12oLCA         |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-12 $\alpha$ -ol-3-one                                                       | 3-oxo-12 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -cholanolic acid | 3o12           |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,12 $\alpha$ -triol                                   | Ursocholic acid                                       | UCA            |
| <b>Primary non-12<math>\alpha</math> OH</b>                                                            |                                                       |                |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diol                                                | Chenodeoxycholic acid                                 | CDCA           |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(2-sulphoethyl)-amide               | Taurochenodeoxycholic acid                            | TCDCA          |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -di-ol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide              | Glycochenodeoxycholic acid                            | GCDCA          |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -triol                                    | $\alpha$ -Muricholic acid                             | $\alpha$ MCA   |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\beta$ -triol                                     | $\beta$ -Muricholic acid                              | $\beta$ MCA    |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -triol- <i>N</i> -(2-sulphoethyl)-amide   | Tauro- $\alpha$ -muricholic acid                      | T $\alpha$ MCA |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,7 $\beta$ -triol- <i>N</i> -(2-sulphoethyl)-amide    | Tauro- $\beta$ -muricholic acid                       | T $\beta$ MCA  |
| <b>Secondary non-12<math>\alpha</math> OH</b>                                                          |                                                       |                |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -triol                                    | $\omega$ -Muricholic acid                             | $\omega$ MCA   |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -triol- <i>N</i> -(2-sulphoethyl)-amide   | Tauro- $\omega$ -muricholic acid                      | T $\omega$ MCA |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -triol                                   | Hyochoolic acid                                       | HCA            |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diol                                                | Hyodeoxycholic acid                                   | HDCA           |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(2-sulphoethyl)-amide               | Taurohyodeoxycholic acid                              | THDCA          |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -diol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide               | Glycohyodeoxycholic acid                              | GHDCa          |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diol                                                 | Ursodeoxycholic acid                                  | UDCA           |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diol- <i>N</i> -(2-sulphoethyl)-amide                | Tauroursodeoxycholic acid                             | TUDCA          |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ ,7 $\beta$ -diol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide                | Glycoursodeoxycholic acid                             | GUDCA          |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ -ol                                                              | Lithocholic acid                                      | LCA            |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ -ol- <i>N</i> -(2-sulphoethyl)-amide                             | Taurolithocholic acid                                 | TLCA           |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ -ol- <i>N</i> -(carboxymethyl)-amide                             | Glycolithocholic acid                                 | GLCA           |
| 5 $\beta$ -cholanolic acid-3 $\alpha$ -ol-7-one                                                        | 7-oxo-lithocholic acid                                | 7oLCA          |

**Table. 1-3. Molecular species of oxysterol**

| Systemic name                                         | Trivial name                                           | Abbreviations   |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|-----------------|
| 5-cholesten-3 $\beta$ ,4 $\beta$ -diol                | 4 $\beta$ -hydroxycholesterol                          | 4 $\beta$ -OH   |
| 5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol-6-one             | 6-ketcholestanol                                       | 6keto           |
| 5-cholesten-3 $\beta$ -ol-7-one                       | 7-ketcholesterol                                       | 7keto           |
| 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    |
| 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  |
| Cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol     | 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -trihydroxycholestane | $\beta$ -triol  |
| 5-cholesten-3 $\beta$ ,25-diol                        | 25-hydroxycholesterol                                  | 25OH            |
| 25R-cholest-5-en-3 $\beta$ ,26-diol                   | 27-hydroxycholesterol                                  | 27OH            |
| 5-cholestene-3 $\beta$ ,22(R)-diol                    | 22(R)-hydroxycholesterol                               | 22OH            |
| 5-cholesten-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ ,25-triol           | 7 $\alpha$ ,25-dihydroxycholesterol                    | 7,25OH          |
| 5-cholesten-3 $\beta$ ,24(S)-diol                     | 24(S)-hydroxycholesterol                               | 24OH            |

### 1-3. 結果

#### 1-3-1. 食餌摂取量および体重・臓器重量

HFD 群はコントロールと比較して飼料摂取量は有意に減少したが摂取エネルギー量は有意に増加した (Table 1-4)。摂取エネルギー量の増加と一致して、HFD 群の体重および体重あたりの脂肪組織重量も増加した (Table 1-4)。また、肝臓総重量は増加したものの (control:  $10.3 \pm 0.4$  g vs HFD:  $11.7 \pm 1.3$  g、 $P = 0.016$ )、体重あたりの肝臓重量には変化がなかった (Table 1-4)。

#### 1-3-2. 血中・肝臓中脂質パラメータ

脂肪肝の発症を確認するために肝臓中脂質濃度を測定したところ、予想通り HFD 群で肝臓 TG、FFA 濃度が有意に上昇した (Figure 1-1A)。血漿中の FFA 濃度は HFD 群で有意に上昇したものの、血漿 TG 濃度 (Figure 1B) およびトランスアミナーゼ活性に有意な変動はなかった (Figure 1-1C)。肝臓中の炎症性マーカー IL6 および TNF  $\alpha$  の遺伝子発現に群間差はなかった一方で、肝臓 IL1 $\beta$  の遺伝子発現レベルは HFD 群において有意に減少した (Figure 1-1D)。線維化遺伝子マーカー ACTA2 遺伝子発現はコントロールに比べて HFD 摂取群で増加傾向にあったものの ( $P = 0.054$ )、線維化マーカー FN1 および COLA1 の遺伝子発現同様に有意な変動は認められなかった (Figure 1-1D)。

#### 1-3-3. 腸肝循環および循環血・糞中胆汁酸組成

HFD 誘導性脂肪肝における腸肝循環に関連する組織・体液および糞中の胆汁酸組成を解析したところ、糞中および門脈血漿中の総胆汁酸 (Figure 1-2A) と総 12 $\alpha$  OH 濃度 (Figure 1-2B) が HFD 群で有意に増加した一方で、総 non-12 $\alpha$  OH 濃度に有意な変化はなかった (Figure 1-2C)。HFD 摂取による変動が顕著だった 12 $\alpha$  OH に着目して胆汁酸分子種を個別に見ると、肝臓、門脈血漿、大動脈血漿では一次胆汁酸である CA や TCA、糞中では二次胆汁酸である DCA が主要な 12 $\alpha$  OH だった (Figure 1-3A-D)。HFD 群の糞中 DCA およびその誘導体 3 $\alpha$ 12 $\alpha$  濃度が有意に増加

し、それに伴って肝臓ではタウロデオキシコール酸 (taurodeoxycholic acid、TDCA) 濃度が有意に上昇した (Figure 1-3A、D)。

#### **1-3-4. 肝臓酸化コレステロールおよび胆汁酸代謝に関わる遺伝子発現**

HFD 誘導性の  $12\alpha$  OH 特異的な増加機構を調べた。肝臓の遊離コレステロールおよび血中総コレステロール濃度に群間差はなかったものの、HFD 群で肝臓中の総コレステロール濃度 (Figure 1-4B) および胆汁酸前駆体の  $7\alpha$  OH 濃度 (Figure 1-4C)、 $7\alpha$  OH を産生する CYP7A1 の遺伝子発現が増加傾向を示した ( $P = 0.062$ ) (Figure 1-4D)。 $12\alpha$  OH 合成を司る CYP8B1 の遺伝子発現が有意に増加した一方、non- $12\alpha$  OH の合成に関与する CYP27A1 および STAR の遺伝子発現に変化はなかった。このとき胆汁酸合成の遺伝子発現を抑制する FXR、LXR および SHP の遺伝子発現にも有意な変化はなかった (Figure 1-4D)。

#### **1-3-5. 各部位胆汁酸濃度と肝臓脂質濃度の相関解析**

$12\alpha$  OH 特異的な増加と脂肪肝の関係をピアソン相関分析によって調べたところ、肝臓 TG およびコレステロールの濃度は肝臓、門脈血漿および糞中の  $12\alpha$  OH の濃度と正の相関を示した一方で、non- $12\alpha$  OH のいずれも肝臓パラメータとの相関を示さなかった (Figure 1-5A)。糞中の胆汁酸分子種を個別に見ても、 $12\alpha$  OH の大半が肝臓 TG 濃度と相関を示す一方で、non- $12\alpha$  OH の相関は一部しか観察されなかった (Figure 1-5B)。総エネルギー摂取量は体重と密接に相関していたが ( $r = 0.97$ 、 $P < 0.001$ ) (Figure 1-5C)、総エネルギー摂取量と肝臓 TG との関連は比較的弱かった (Figure 5D)。また、総脂肪摂取量は肝臓 TG 濃度と数値上は高い正の相関を示したが ( $r = 0.91$ 、 $P < 0.01$ ) (Figure 1-5D)、群ごとに値が局在しており明瞭な相関関係とはいえなかった。総エネルギー摂取量も肝臓 TG 濃度と正の相関を示したが、糞便  $12\alpha$  OH と肝臓 TG 濃度の間ではより直線的で強い相関が観察された ( $r = 0.87$ 、 $P < 0.001$ ) (Figure 1-5D)。

#### **1-3-6. 肝臓脂質代謝に関わる遺伝子発現の解析**

HFD 誘導性脂肪肝における肝臓脂質代謝を調べるために、肝臓の脂質代謝に関連する遺伝子発現を解析した (Figure 1-6)。HFD 群では脂肪酸合成を正に制御する転写因子 SREBP1 とコレ

ステロール合成を正に制御する転写因子 SREBP2 の遺伝子発現が顕著に減少していた。これらの動きと一致して、HFD 群で脂肪酸合成の律速酵素である FASN、コレステロール合成の律速酵素である HMGCoR の遺伝子発現レベルがそれぞれ有意に減少していた。その一方で、肝臓脂肪滴合成に関与する CIDEA および脂肪酸酸化に関わる CPT1 の遺伝子発現は有意に増加していた。

### **1-3-7. 食餌脂質摂取量と糞中脂質排泄の解析**

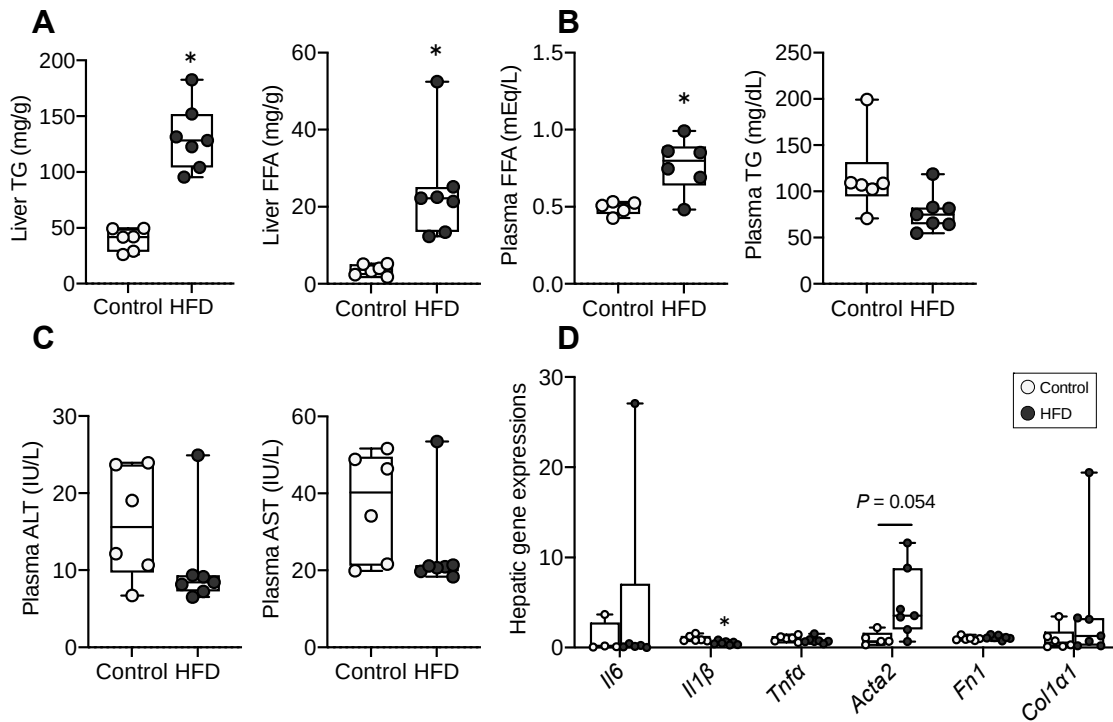
12 $\alpha$ OH の特異的な増加が食事脂肪吸収を促進するかどうかを検証するために、脂質摂取量および糞中脂質排泄量を調べた。HFD 群では脂質摂取量 (Figure 1-7A) および TG および FFA の糞中排泄量が増加した (Figure 1-7B)。また、見かけの脂質吸収量 (Figure 1-7C) および吸収率が HFD 群で有意に上昇した (control :  $96.1 \pm 1.4\%$  vs HFD :  $97.5 \pm 0.4\%$ ,  $P = 0.014$ )。



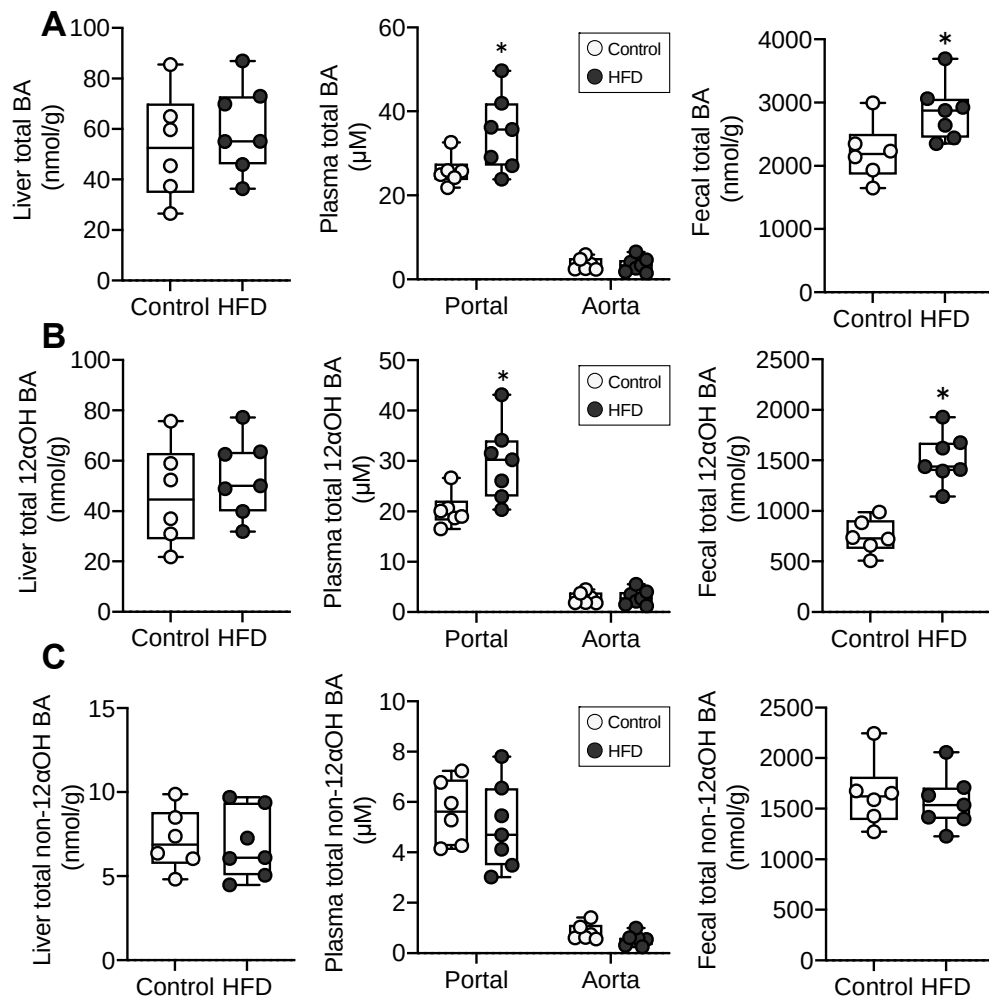
**Table. 1-4. Food intake, growth, and organ weights in male WKAH/HkmSlc rats fed either control or HFD for 8 weeks.**

|                                           | Control     | HFD           |
|-------------------------------------------|-------------|---------------|
| Cumulative food intake (per entire study) |             |               |
| (g)                                       | 848 ± 14    | 722 ± 57*     |
| (kcal)                                    | 3426 ± 58   | 3745 ± 297*   |
| Final body weight (g)                     | 316.7 ± 7.0 | 348.4 ± 28.3* |
| Organ weight (g/100g body weight)         |             |               |
| Liver                                     | 3.25 ± 0.12 | 3.34 ± 0.16   |
| Epididymal adipose tissue                 | 2.23 ± 0.24 | 2.63 ± 0.20*  |

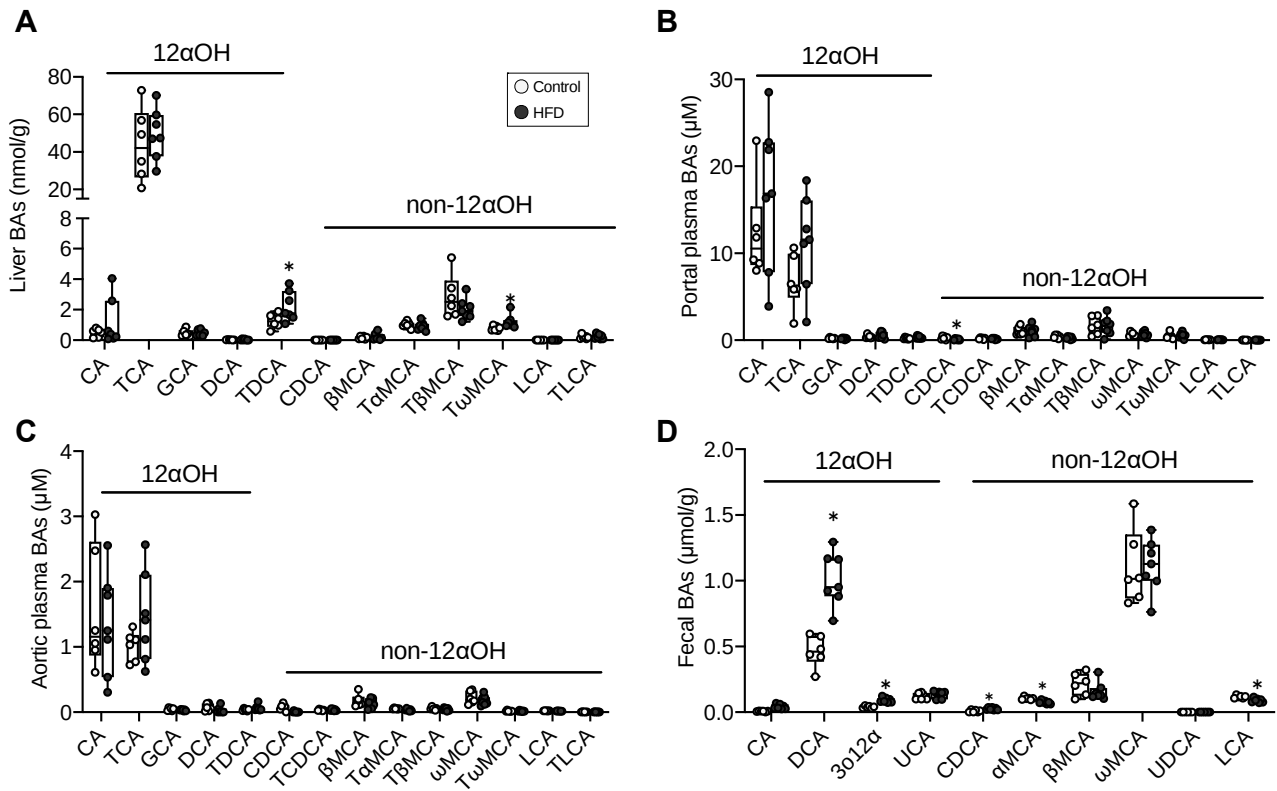
Means values with SEM. \* Significant difference from the values of control (Student's *t*-test, *P* < 0.05, n = 6 for control; n = 7 for HFD).



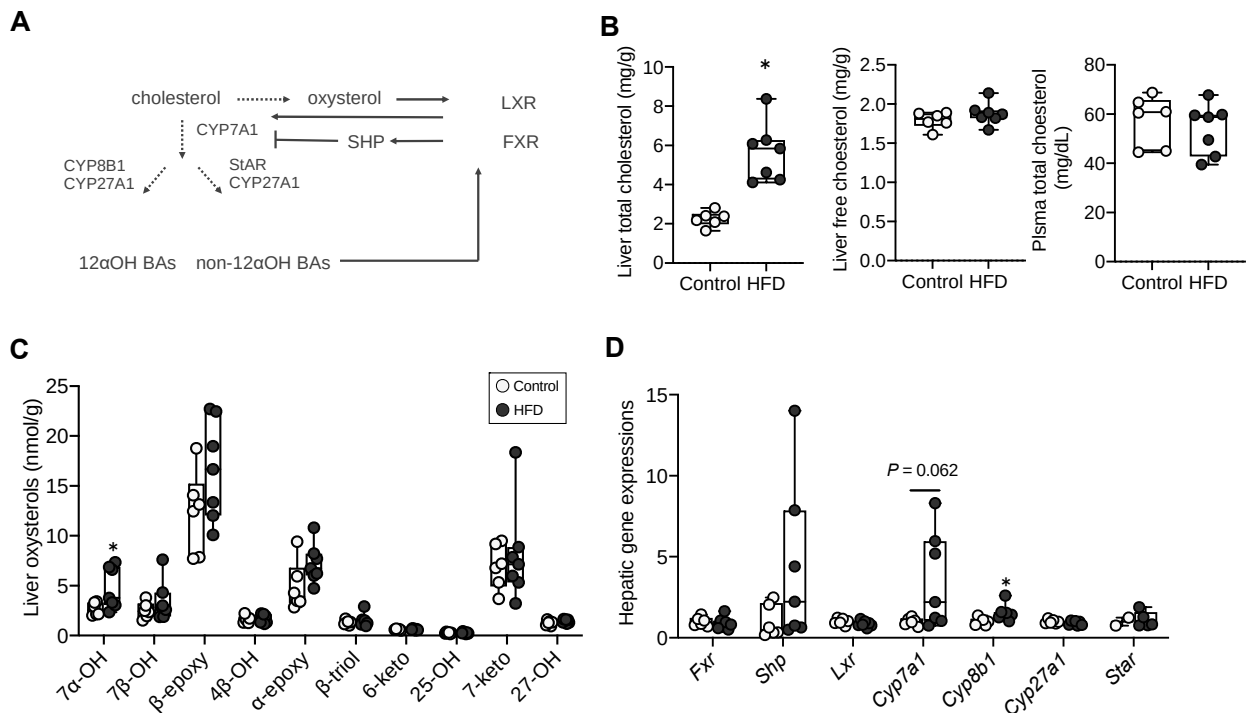
**Figure 1-1. HFD induces hepatic steatosis.** (A) Concentration of liver TG, FFA, (B) plasma FFA, and TG. (C) Plasma aminotransferase activities. (D) mRNA expression of genes involved in hepatic lipid metabolism. Open circles,  $n = 6$  for control; filled circles,  $n=7$  for HFD. In D, data were normalized to *Rplp0* mRNA expression. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum. Asterisks indicate a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ). *Acta2*, *actin alpha 2*; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; *Col1  $\alpha$  1*, *collagen type I alpha 1*; FFA, free fatty acid; *Fn1*, *fibronectin 1*; HFD, high-fat diet; *Il1  $\beta$* , *interleukin-1beta*; *Il6*, *interleukin 6*; *Rplp0*, *ribosomal protein lateral stalk subunit P0*; TG, triglyceride; *Tnf  $\alpha$* , *tumor necrosis factor alpha*.



**Figure. 1-2. HFD increases specifically 12 $\alpha$  OH in enterohepatic circulation.** (A) Total bile acid concentration, (B) total 12 $\alpha$  OH concentration, (C) total non-12 $\alpha$  OH concentration in the liver, portal plasma, aortic plasma, and feces of rats fed control or HFD for 8 weeks. Open circles, n = 6 for control; filled circles, n=7 for HFD. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum. Asterisks indicate a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ). HFD, high-fat diet; non-12 $\alpha$  OH, non-12 $\alpha$  -hydroxylated bile acid; 12 $\alpha$  OH, 12 $\alpha$  -hydroxylated bile acid.

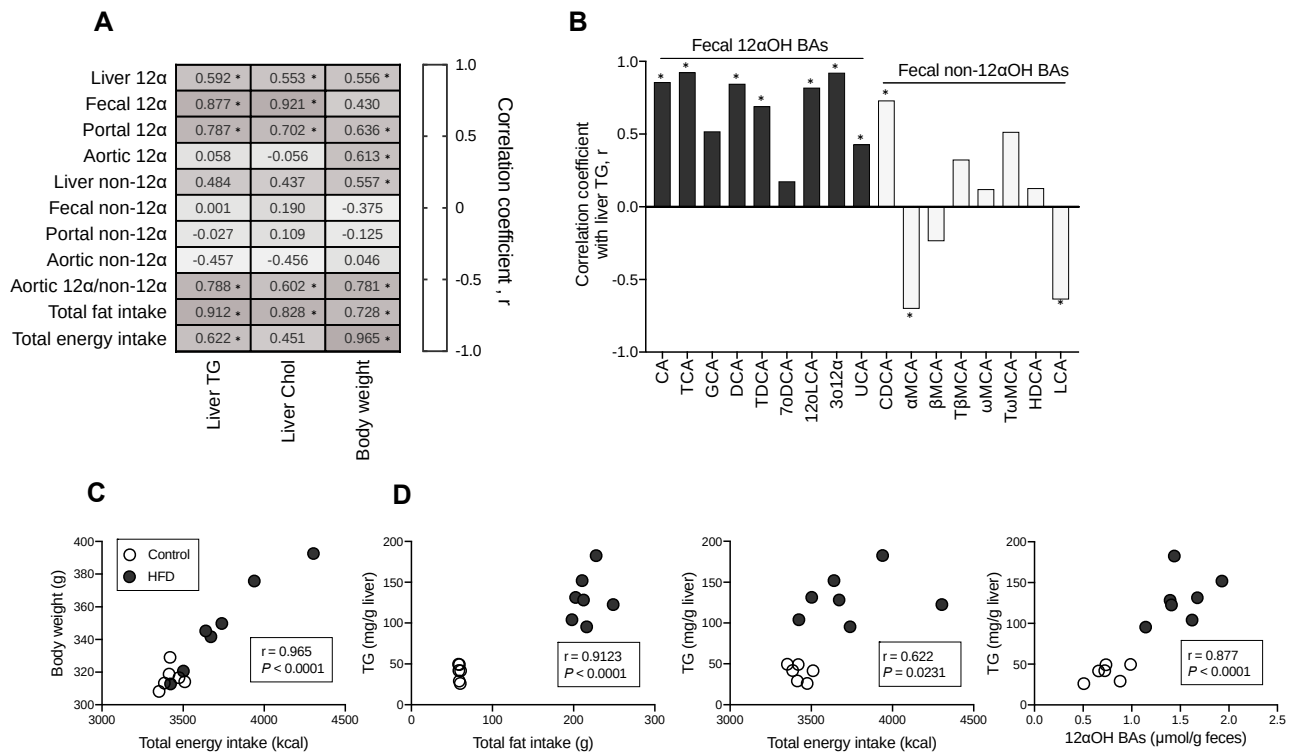


**Figure. 1-3. HFD increases specific 12 $\alpha$ OHs.** Bile acids concentration in (A) liver, (B) portal plasma, (C) aortic plasma, and (D) feces in the rats fed control or HFD diet for 8 weeks. Open circles,  $n = 6$  for control; filled circles,  $n = 7$  for HFD. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum. Asterisks indicate a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ). CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; DCA, deoxycholic acid; GCA, glychocholic acid; HFD, high-fat diet; LCA, lithocholic acid;  $\alpha$  MCA, arupha-muricholic acid;  $\beta$  MCA, beta-muricholic acid,  $\omega$  MCA, omega-muricholic acid; 3 $\alpha$ 12 $\alpha$ , 5 $\beta$ -cholanic acid-12 $\alpha$ -ol-3-one; TCA, taurocholic acid; TCDCA, taurochenodeoxycholic acid; TDCA, taurodeoxycholic acid; TLCA, tauroolithocholic acid; T $\alpha$  MCA, tauroarupha-muricholic acid; T $\beta$  MCA, taurobeta-muricholic acid, T $\omega$  MCA, tauroomega-muricholic acid; UCA, ursocholic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid.

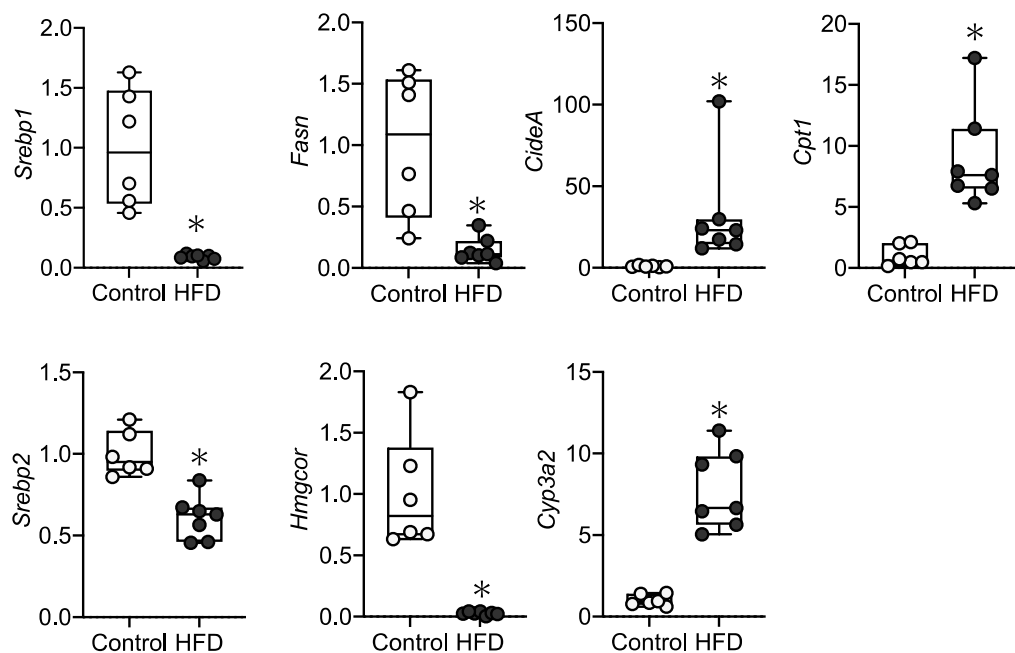


**Figure. 1-4. HFD modulates cholesterol metabolism in a direction favorable to 12 $\alpha$ OH**

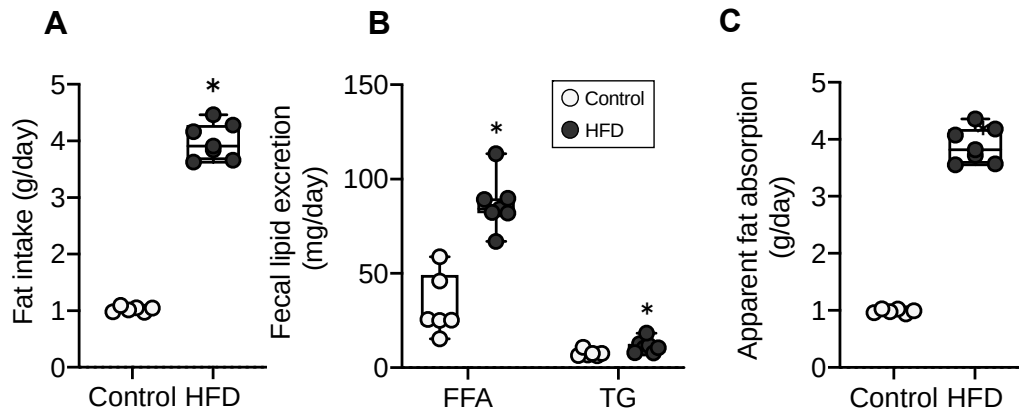
**synthesis.** (A) Bile acid metabolism in the liver. (B) mRNA level of hepatic bile acid synthesis genes expression in rats fed control or HFD for 8 weeks. In C and D, data were normalized to *Rplp0* mRNA expression. Open circles, n = 6 for control; filled circles, n=7 for HFD. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum. Asterisks indicate a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ). *Cyp7a1*, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase; *Cyp27a1*, sterol 27-hydroxylase; *Cyp8b1*, sterol 12 $\alpha$ -hydroxylase;  $\alpha$ -epoxy, 5 $\alpha$ -epoxycholesterol;  $\beta$ -epoxy, 5 $\beta$ -epoxycholesterol; *Fxr*, farnesoid X receptor; HFD, high-fat diet; 6keto, 6-ketocholestanol; 7keto, 7-ketocholesterol; *Lxr*, liver X receptor  $\alpha$ ; 4 $\beta$ OH, 4 $\beta$ -hydroxycholesterol; 7 $\alpha$ OH, 7 $\alpha$ -hydroxycholesterol; 7 $\beta$ OH, 7 $\beta$ -hydroxycholesterol; 19OH, 19-hydroxycholesterol; 25OH, 25-hydroxycholesterol; 27OH, 27-hydroxycholesterol; *Rplp0*, ribosomal protein lateral stalk subunit P0; *Shp*, small heterodimer partner; *Star*, steroidogenic acute regulatory protein;  $\beta$  triol, cholestan-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol.



**Figure. 1-5. 12 $\alpha$  OH correlates with hepatic steatosis.** (A) The heat map shows Pearson correlation of total 12 $\alpha$  OH in each site and liver lipid. The values of correlations were shown on the cells. Asterisks indicate significant correlations ( $P < 0.05$ ). Pearson correlation of (B) fecal bile acid species and liver TG, (C) the total energy intake and body weight and (D) liver TG concentration and total fat intake, total energy intake and fecal 12 $\alpha$  OH. Total energy intake was calculated from diet consumption throughout the experimental period with the caloric densities of each diet (4.04 kcal/g for control; 5.19 kcal/g for the HFD). Body weight, fecal 12 $\alpha$  OH, Liver TG were shown in Table 1-4, Figure 1-2B, and Figure 1-1A, respectively. Total fat intake was calculated from diet consumption throughout the experimental period and fat content in each diet (7% for control; 30% for the HFD). CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; DCA, deoxycholic acid; GCA, glycocholic acid; HDCA, hyodeoxycholic acid; HFD, high-fat diet; 12 $\alpha$  OH, 12 $\alpha$  -hydroxylated bile acid; LCA, lithocholic acid;  $\alpha$  MCA, arupha-muricholic acid;  $\beta$  MCA, beta-muricholic acid,  $\omega$  MCA, omega-muricholic acid; 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; TCA, taurocholic acid; TCDCA, taurochenodeoxycholic acid; TDCA, taurodeoxycholic acid; TG, triglyceride; TLCA, tauroolithocholic acid; T $\alpha$  MCA, tauroarupha-muricholic acid; T $\beta$  MCA, taurobeta-muricholic acid, T $\omega$  MCA, tauroomega-muricholic acid; UCA, ursocholica acid; UDCA, ursodeoxycholic acid.



**Figure. 1-6. HFD suppresses hepatic gene expression regulates lipid metabolism.** Data in rats fed control or HFD for 8 weeks were normalized to *Rplp0* mRNA expression. Open circles, n = 6 for control; filled circles, n = 7 for HFD. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum. Asterisks indicate a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ). *Cpt1*, carnitine palmitoyltransferase 1; *Cyp3a2*, cytochrome P450 family 3 subfamily A member 2; *Fasn*, fatty acid synthase; HFD, high-fat diet; *Hmgcor*, hydroxymethylglutaryl-CoA reductase; *Srebp1*, sterol regulatory element binding protein 1; *Srebp2*, sterol regulatory element binding protein 2, *Rplp0*, Ribosomal protein lateral stalk subunit P0.



**Figure. 1-7. HFD enhances apparent dietary fat absorption.** (A) Daily fat intake was calculated from diet consumption at the end of this experiment and fat content in each diet (7% for control; 30% for HF diet). (B) Fecal excretion of FFA and TG per day was calculated using fecal weight collected over 24 h at the end of the experiment and the concentrations in the feces. (C) Apparent fat absorption was calculated by subtracting the fecal lipid excretion shown in B from the fat intake shown in A. Open circles,  $n = 6$  for control; filled circles,  $n = 7$  for HFD. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum. Asterisks indicate a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ). HFD, high-fat diet; FFA, free fatty acid; TG, triglyceride.



#### 1-4. 考察

HFD 摂取は  $12\alpha\text{OH}$  を特異的に増加させる事が報告されていたものの (Yoshitsugu et al., 2019)、その機構は明らかになっていなかった。本研究では、HFD 摂取ラットにおけるコレステロール代謝および胆汁酸合成に関わる遺伝子発現レベルを解析する事で、HFD が胆汁酸前駆体となる肝臓コレステロールの蓄積を引き起こし、それに続く中間体  $7\alpha\text{OH}$  合成の増加と肝臓 CYP8B1 の遺伝子発現レベルの上昇を介して  $12\alpha\text{OH}$  を特異的に増加させる事を初めて明らかにした。また、*Cyp8b1*<sup>-/-</sup> マウスでは高脂肪高コレステロール食誘導性の脂肪肝が抑制されるが (Bertaggia et al., 2017)、そもそも  $12\alpha\text{OH}$  が高脂肪高コレステロール食によってどのように変動するかはデータが示されておらず、HFD 誘導性脂肪肝と  $12\alpha\text{OH}$  の関係性は明らかでなかった。本研究は、HFD 誘導性の脂肪肝と  $12\alpha\text{OH}$  特異的増加の関係性を調べる事で、 $12\alpha\text{OH}$  濃度の増加が食餌脂肪吸収および肝臓 CIDEA の遺伝子発現レベルの増加を介して脂肪肝の発症に寄与する新たな可能性も示した。

肝臓コレステロールの一部は胆汁酸に変換される (Zhou & Hylemon, 2014)。HFD 摂取は肝臓総コレステロール濃度および CYP7A1 (Myant & Mitropoulos, 1977) の遺伝子発現レベルの上昇をとまって  $7\alpha\text{OH}$  濃度を増加させていた。 $7\alpha\text{OH}$  は CYP7A1 に対して抑制的に働く FXR は活性化させないが (Parks et al., 1999)、促進的に機能する LXR は活性化させる (Janowski et al., 1996)。すなわち、 $7\alpha\text{OH}$  の増加が CYP7A1 の遺伝子発現をさらに上昇させるポジティブフィードバックにより胆汁酸合成を亢進したと考えられる。更に、肝臓総コレステロール濃度の顕著な増加とは対照的に遊離コレステロール濃度は一定の値を保っていたことから、肝臓の遊離コレステロールが速やかに胆汁酸へと変換されたと推測できる。こうした肝臓コレステロール代謝の動きと一致して、HFD 摂取ラットでは肝臓総コレステロール濃度の増加を伴って門脈血漿中総胆汁酸濃度および糞中への胆汁酸排泄量が増加した (control:  $7.6 \pm 1.7$  vs HFD:  $11.3 \pm 1.8$   $\mu\text{mol/day}$ 、 $P=0.003$ )。HFD 摂取により肝臓に蓄積したコレステロールを胆汁酸として排泄したと考える事が出来る。

興味深いことに、HFD 摂取による門脈胆汁酸濃度および糞中胆汁酸濃度の増加は  $12\alpha$  OH 特異的であり、non- $12\alpha$  OH の排泄量に変化はなかった (Figure 1-2A-C)。この動きは  $12\alpha$  OH の合成を担う酵素 (Hylemon et al., 2009) CYP8B1 の遺伝子発現レベルの上昇と一致していた。ラットにおいて CYP8B1 を過剰発現させると CA 合成が顕著に増加する (Pandak et al., 2001) 事からも HFD 摂取は CYP8B1 の遺伝子発現レベルを上昇させる事で  $12\alpha$  OH 合成を促進したと考えられる。HFD 摂取による CYP8B1 遺伝子発現レベル上昇の機構は不明だが、インスリンシグナルが関連する可能性がある。CYP8B1 の遺伝子発現はインスリンシグナルによって抑制される (Haeusler et al., 2012) 事に加え、肝臓では HFD 摂取によってわずか 3 日で肝臓のインスリン抵抗性が起こることが報告されている (Samuel et al., 2004)。すなわち、本研究における HFD 摂取ラットでも肝臓インスリン抵抗性が起きたことで CYP8B1 遺伝子発現レベルの抑制が解除された結果、遺伝子発現レベルの上昇が起きた可能性がある。

$12\alpha$  OH は胆汁酸分子種の中でも FXR の活性化能力が低い (Parks et al., 1999)。最も強力に FXR を活性化させる胆汁酸分子種は代表的な non- $12\alpha$  OH である CDCA である (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999)。その一方、腸肝循環における主要な  $12\alpha$  OH (CA および TCA) の FXR の活性化能は CDCA に比べると 100 倍以上弱く (Parks et al., 1999)、HFD 摂取ラット門脈血中で観察された  $12\alpha$  OH の濃度に近い  $50\ \mu\text{M}$  の CA や TCA では FXR はほとんど活性化されない (Makishima et al., 1999; Parks et al., 1999)。本章で用いた HFD 群においても FXR の下流に存在する肝臓 SHP の遺伝子発現レベルにも有意な変化はなく、寧ろ CYP7A1 の遺伝子発現レベルは上昇していた。すなわち、HFD 摂取で腸肝循環において増加した  $12\alpha$  OH は FXR の活性化を介した胆汁酸合成のネガティブフィードバックを起こさなかったと言える。この知見と一致して、ラットに同じ組成の HFD を 22 週間に渡って摂取させた試験においても糞中  $12\alpha$  OH 濃度が 4 週目で有意な増加を示した後に、期間の延長とともに徐々にその濃度は増加していた (Yoshitsugu et al., 2019)。HFD 摂取で増加した  $12\alpha$  OH は胆汁酸合成を抑制することなく、慢性的な HFD 摂取によって合成が更に亢進していくと考えられる。

胆汁酸は脂質の可溶化を介して食事脂質の吸収を促進する (Hofmann, 1999)。CYP8B1 の上昇に伴う  $12\alpha$  OH 特異的増加は食餌脂肪吸収を促進することで肝臓脂肪濃度を上昇させた可能性がある。 $12\alpha$  OH 特異的増加は HFD (Yoshitsugu et al., 2019)、高脂肪シヨ糖食摂取ラット

(Yoshitsugu et al., 2020) や糖尿病モデルマウス (Li et al., 2012) 等の複数の動物モデルで観察されており、ヒトでも血中  $12\alpha\text{OH}$  濃度が肝臓脂肪レベルと逆相関を示す (Haeusler et al., 2013)。Bertaggia らは  $12\alpha\text{OH}$  合成が低下する *Cyp8b1*<sup>-/-</sup> マウスにおいて、食餌脂肪吸収が低下することで高脂肪高コレステロール食誘導性の脂肪肝が抑制される事、TCA の補給によって脂肪吸収レベルの低下が解消される事を明らかにした (Bertaggia et al., 2017)。これらの知見と合致して、本研究においても HFD 摂取が  $12\alpha\text{OH}$  特異的増加を伴って見かけの脂肪吸収量を増加させる事を見出した。糞中  $12\alpha\text{OH}$  濃度の増加は HFD 摂取の 4 週間後と比較的遅いタイミングで観察される事から (Yoshitsugu et al., 2019)、食餌脂肪量の増加は直接的に肝臓の脂肪量を増加させる一方で、 $12\alpha\text{OH}$  は慢性的な HFD 摂取によって上昇し、二次的に食餌脂肪吸収量を増加させることで脂肪肝を更に促進するのかもしれない。

HFD 摂取による肝臓脂質蓄積の機構の 1 つとして CIDEA 遺伝子発現レベルの上昇が挙げられる。CIDEA は肝臓脂質蓄積を促進する脂肪滴関連のタンパクである (Zhou et al., 2012)。*ob/ob* マウスを用いた実験では、HFD 摂取が肝臓 CIDEA の遺伝子発現レベルを上昇させる事、*Cidea*<sup>-/-</sup> により HFD 誘導性の肝臓脂肪蓄積が抑制される事が報告されている (Zhou et al., 2012)。HFD 摂取による CIDEA の遺伝子発現レベル上昇は少なくとも部分的に SREBP1 を介すと報告されているが (Zhou et al., 2012)、本章における HFD 摂取ラットでは肝臓 SREBP1 の遺伝子発現レベルは大幅に低下したにも関わらず肝臓 CIDEA の遺伝子発現が顕著に増加していた。 $12\alpha\text{OH}$  が SREBP1 とは無関係に肝臓 CIDEA 遺伝子発現レベルを上昇させる事で肝臓脂肪蓄積に寄与するかもしれない。

本章で用いた HFD 摂取ラットで観察された問題点は主に 2 点ある。1 点目はヒト NAFLD で報告される肝臓脂質合成の亢進 (Lambert et al., 2014; Sanders et al., 2018; Smith et al., 2020; Tamura & Shimomura, 2005) と相反して、肝臓脂質合成に関連する遺伝子発現が大幅に低下していた点である。近年、肝臓における DNL の増加が NAFLD の発症に大きく寄与する事が報告されているが (Lambert et al., 2014; Sanders et al., 2018; Smith et al., 2020; Tamura & Shimomura, 2005)、本章の HFD 摂取ラットでは DNL に関与する肝臓 SREBP1、FASN の遺伝子発現レベルは顕著に低下していた。マウスにおいても HFD を与えると肝臓 DNL が低下することも報告されており (Duarte et al., 2014)、HFD 摂取により肝臓に大量の脂肪が流れ込むことで相対的に DNL を低

下するのは自然な結果であるものの、DNL 亢進を引き起こす因子を明らかにするモデルとしては適切ではないかもしれない。

2 点目の問題は、HFD がコントロールと比較して脂肪量のみならずラードは自然に由来するコレステロールを多量に含むため (control: 16 mg/kg、HFD: 214 mg/kg)、HFD による  $12\alpha$  OH 濃度の増加が脂肪そのものに由来するのか、コレステロールによるものなのか、それとも協調的な働きによるものなのかを判断できない点である。一方で、ヒトが本実験で用いた HFD を 1 日あたり 1kg 摂取したと仮定しても、ヒトにおける 1 日の平均コレステロール摂取量 (約 300 mg/day) (Xu et al., 2018) と比較しても過剰な量ではない。また、一般的に動物モデルで用いられる高コレステロール食では 1.5-12.5 g/kg ものコレステロールが含まれる (Bertaggia et al., 2017; Newberry et al., 2006; Schierwagen et al., 2015)。これらの値と比較すると HFD に含まれるコレステロール量は適切な範囲に収まっていると考えられるが、コントロールに含まれる量とは比較するとかなり多い値である点は十分に留意しておく必要があるだろう。

本章の研究成果を纏めると、 $12\alpha$  OH 特異的増加機構の一端として、HFD は肝臓総コレステロールおよび  $7\alpha$  OH 濃度の増加、肝臓 CYP8B1 の遺伝子発現の上昇を介して腸肝循環および糞便中の  $12\alpha$  OH 濃度を特異的に増加させる事が示唆された。こうして増加した  $12\alpha$  OH は食餌脂肪吸収の促進や肝臓 CIDEA の遺伝子発現レベルの亢進を介して肝臓脂肪濃度を更に上昇させている可能性がある。

## 第 2 章 12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸による脂肪肝発現機構の解析

## 2-1. 背景と目的

第1章より、HFDが $12\alpha\text{OH}$ 濃度の上昇および食餌脂肪吸収量の増加、肝臓 CIDEA の遺伝子発現レベルの上昇を伴って脂肪肝を発症させる事が示された。*Cyp8b1*<sup>-/-</sup> マウスを用いた試験でも、 $12\alpha\text{OH}$ が脂肪吸収の促進を介して脂肪肝に寄与する事が示唆されている (Bertaggia et al., 2017)。しかしながら、肝臓の脂肪蓄積において重要な役割を担う肝臓 DNL (Lambert et al., 2014; Sanders et al., 2018; Smith et al., 2020; Tamura & Shimomura, 2005) に $12\alpha\text{OH}$ が及ぼす影響は明らかでない。第1章のHFD摂取ラットでは、肝臓 DNL に関連する遺伝子発現が顕著に低下しており、HFDに含まれる脂肪量がコントロール食に比べ多いことに起因するネガティブフィードバックと考えられるが、 $12\alpha\text{OH}$ 濃度の増加による肝臓脂質蓄積への影響を正確に評価する上では適切なモデルとは言えなかった。食餌脂肪量やミネラル組成等の摂取栄養素量が同等になるように設定した上で、体内の $12\alpha\text{OH}$ 濃度を特異的に増加させる系を用いる必要がある。

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HFD摂取時の $12\alpha\text{OH}$ 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) を用いた。HFD摂取ではCA関連の胆汁酸 (TCA 等) やその腸内細菌代謝物 DCA (Ridlon et al., 2006) が増加するが (第1章)、CA添加食も類似の胆汁酸組成を形成する事ができる (Islam et al., 2011)。このモデルを用いることで、 $12\alpha\text{OH}$ 特異的な増加が肝臓脂質蓄積へ及ぼす影響およびその機構を解析する。具体的には、腸肝循環に関連する組織および血液において胆汁酸濃度を測定し、肝臓脂質濃度、肝傷害マーカー、糞中脂質排泄および肝臓の脂質代謝に関連する遺伝子発現を解析する。また、ヒト臨床試験により肝臓脂肪蓄積と関与することが示唆されている肝臓鉄濃度 (Britton et al., 2018) を測定し、変化があった場合は血中の鉄関連タンパク質および肝臓鉄関連の遺伝子発現レベルを評価する。加えて、ラットへのCA添加食にVCMの飲水投与を組み合わせることで、腸内細菌による $12\alpha\text{OH}$ 代謝が肝臓脂肪蓄積へ及ぼす影響を明らかにする。本章では、これらの包括的な解析を介して $12\alpha\text{OH}$ 濃度の上昇が脂肪肝に及ぼす影響とその機構の一端を明らかにする事を目的として研究を行った。

## 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

AIN-93G をベースとしたコントロール飼料 (Reeves et al., 1993) で 1 週間順化させた 4 週齢の雄性 WKAH/HkmSlc ラット (日本エスエルシー) を実験動物として使用した。明期は 08:00～20:00、温度  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$  の管理された環境で個別に飼育した。全試験期間中を通してラットには自由摂食・自由飲水させ、試験期間および解剖時を含め絶食はかけなかった。体重および食餌摂取量は 2 日ごとに測定した。CA 添加食摂取試験 (試験 2-1) では、コントロール ( $n = 12$ ) または CA 食 ( $n = 12$ ) を 13 週間与えた (Table 2-1)。VCM 飲水投与試験 (試験 2-2) では同様の食餌を与えた上で、飲用水単体もしくは VCM (富士フィルム和光純薬) 200 mg/L を添加した飲み水を与え、4 週目に VCM 投与により糞中の DCA 濃度が低下することを確認した。これらの試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: 19-0161)、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。

### 2-2-2. 血漿、組織および糞の回収

第 1 章実験材料および実験方法の “血漿、組織および糞の回収” と同様に実施した。

### 2-2-3. 胆汁酸解析

第 1 章実験材料および実験方法の “胆汁酸解析” と同様に実施した。

### 2-2-4. qRT-PCR

第 1 章実験材料および実験方法の “qRT-PCR” と同様に実施した。第 1 章実験材料および実験方法の “qRT-PCR” と同様に実施した。TaqMan Gene Expression probes (サーモフィッシュャーサイエンティフィック) はそれぞれ以下を使用した。Rn00432095\_m1: 骨形成タンパク質 6 (*bone morphogenetic protein 6*, *Bmp6*)、Rn00591187\_m1: フェロポエチン 1 (*ferroportin 1*, *Fpn*)、Rn00820640\_g1: フェリチン重鎖 1 (*ferritin heavy chain 1*, *Fth1*)、Rn00584987\_m1: ヘプシジン抗菌ペプチド (*hepcidin antimicrobial peptide*, *Hamp*)、Rn01265685\_g1: 鉄恒常性制御

体 (*homeostatic Fe regulator 2*, *Hfe2*)、Rn00561387\_m1 : ヘムオキシゲナーゼ 1 (*heme oxygenase 1*, *Hmox1*)、Rn00561393\_m1 : ヘパトグロビン (*haptoglobin*, *Hp*)、Rn00584069\_m1 : ヘモペキシン (*femopexin*, *Hpx*)、Rn03302271\_gH : Rplp0、Rn01474701\_m1 : トランスフェリン受容体 1 (*transferrin receptor 1*, *Tfr1*)、and Rn01468336\_m1 : ZRT、IRT 様タンパク質 (*zrt- and irt-like protein 14*, *Zip14*)。SYBR Green method は以下の配列のプライマーを使用した : 二価金属トランスポーター 1 (*divalent metal transporter 1*, *Dmt1*, forward: 5' -GAGCCTACAGCTCCCCTTTG-3' 、reverse: 5' -CCACCACATACAGTGCCACA-3' ; 10  $\mu$ mol/L)、リポカリン 2 (*lipocalin-2*, *Lcn2*, forward: 5' -ACTTCCATCCTCGTCAGGGG-3' 、reverse: 5' -TCCGTACAGGGTGACTTTGAA-3' ; 10  $\mu$ mol/L)、リポカリン 2 受容体 (*lipocalin 2 receptor*, *Lcn2r*, forward: 5' -GCACGGTGGCTGATAGTGAA-3' 、reverse: 5' -GTAGTTGAGGAGGGAGGCGA-3' ; 10  $\mu$ mol/L)、*Rplp0* (forward: 5' -GGCAAGAACACCATGATGCG-3' 、reverse: 5' -GTGATGCCCAAAGCTTGGAA-3' ; 5  $\mu$ mol/L)、and トランスフェリン受容体 2 (*transferrin receptor 2*, *Tfr2*, forward: 5' -TCAGACTCTCCGTATCGCCT-3' 、reverse: 5' -AAAAGGTCCGAACCAGCTCC-3' ; 10  $\mu$ mol/L)。

#### **2-2-6. 血中脂質およびアミノトランスアミナーゼの測定**

第 1 章実験材料および実験方法の "血中脂質およびアミノトランスアミナーゼの測定" と同様に実施した。

#### **2-2-7. 肝臓、糞中および食餌中脂質の測定**

第 1 章実験材料および実験方法の "肝臓、糞中および食餌中脂質の測定" と同様に実施した。

#### **2-2-8. 肝臓、糞中および血漿中鉄および LCN2 濃度の測定**

肝臓および糞中の鉄濃度は既報に記載通りに測定した (Hori et al., 2018)。血漿中鉄および LCN2 濃度はメタロアッセイ 鉄 測定 LS (フェロジン法) (メタロジェニクス、千葉、日本) と CircuLex Rat NGAL/Lipocalin-2 ELISA Kit (医学生物学研究所、愛知、日本) を用いて測定した。



### 2-2-9. 統計解析

特に言及しない限り、データの数値は平均値 + SEM で示した。図では箱ひげ図を用いて最大値、最小値、中央値、そして個体値のプロットを示した。コントロールもしくは CA 添加食を与えた試験では (試験 2-1)、Student's *t*-test によって 2 群間の平均値有意差検定を行った ( $P < 0.05$ )。CA 添加食または VCM 飲水投与を行った 2 要因試験では (試験 2-2)、二元配置分散分析 (Two-way ANOVA、CA  $\times$  VCM) で各要因の効果および交互作用を検定した。交互作用 (CA  $\times$  VCM) が有意だった場合 ( $P < 0.05$ )、CA および VCM の単純主効果を一元配置分散分析により検定した。第一種の過誤を避けるため、 $P < 0.0125$  ( $0.05/4$ 、Bonferroni 法) を有意差水準に設定した。

**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

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 食餌摂取量および体重・臓器重量の評価 (CA 負荷試験)

飼料摂取量および体重、副睪丸脂肪組織重量に有意な群間差は観察されなかった。その一方で、CA 群において肝臓重量が有意に増加した (Table 2-2)。

### 2-3-2. 門脈血漿中の胆汁酸組成の解析 (CA 負荷試験)

CA 群で門脈血漿中の総  $12\alpha$  OH 濃度が有意に増加したものの (Figure 2-1A)、総 non- $12\alpha$  OH 濃度に変化はなかった。先行研究と一致して (Islam et al., 2011) CA 摂取により、 $12\alpha$  OH の一次胆汁酸 (Figure 2-1B) だけでなく二次胆汁酸濃度 (Figure 2-1C) も増加していた。 $12\alpha$  OH に着目して胆汁酸分子種を個別に見ると、一次胆汁酸は CA および TCA、GCA が、二次胆汁酸は DCA および TDCA 濃度が CA 摂取により有意に増加していた (Figure 2-1D)。

### 2-3-3. 肝臓・血中脂質および血中トランスアミナーゼ解析 (CA 負荷試験)

CA 群で肝臓中 TG およびコレステロール濃度が増加した (Figure 2-2A-B)。一方で、血漿中 TG、コレステロール、および遊離 FFA 濃度には有意な変化は観察されなかった (Figure 2-2C-E)。また、肝臓脂質蓄積と関連して血漿中アラニンアミノ基転移酵素 (alanine aminotransferase、ALT) およびアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (aspartate aminotransferase、AST) 活性が CA 群で上昇した (Figure 2-2F-G)。

### 2-3-4. 糞中脂質排泄および肝臓脂質代謝に関わる遺伝子発現の解析 (CA 負荷試験)

CA 群の糞脂質およびコレステロール排泄量は減少した (Figure 2-3A-B)。CA 群の肝臓では DNL を正に制御する転写因子 SREBP1 の遺伝子発現レベルが上昇しており (Figure 2-3C)、この動きと一致して SREBP1 の下流に存在する CIDEA の遺伝子発現レベルが CA 群で有意な増加を示した (Figure 2-3C)。更に、DNL 亢進に伴うマロニル CoA 濃度の上昇が脂質  $\beta$  酸化を阻害する事 (Foster, 2012) と一致して、脂質  $\beta$  酸化の律速酵素である CPT1 の遺伝子発現が低下した (Figure

2-3C)。コレステロールは胆汁酸合成の前駆体となるため、CA 摂取によりコレステロール合成酵素 HMGCR の遺伝子発現は低下した一方で、コレステロール代謝により酸化コレステロール合成に関わる CYP3A2 の遺伝子発現は有意に増加した (Figure 2-3C)。

### 2-3-5. 肝臓ミネラル濃度および関連遺伝子発現の解析 (CA 負荷試験)

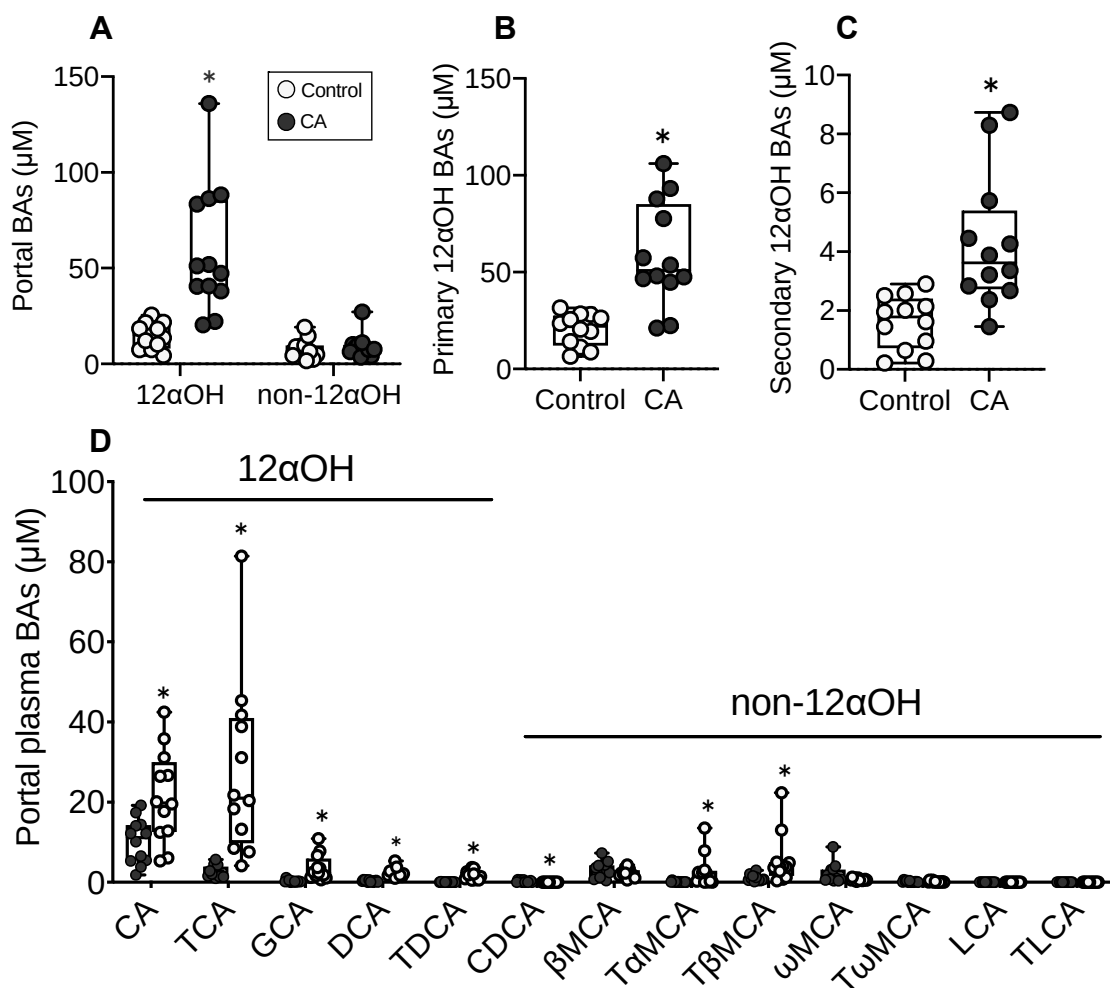
興味深い事に、CA 群において肝臓脂質蓄積と負の相関を示して肝臓鉄濃度がおよび含有量が低下した (Figure 2-4、 $r = -0.87$ 、 $P < 0.001$ )。肝臓鉄濃度および含有量 (Figure 2-5A-B) と関連して、肝臓フェリチン濃度も減少する傾向を見せた ( $P = 0.056$ ) (Figure 2-5C)。一方、全身の鉄欠乏で変動する大動脈ヘモグロビン、大動脈血漿鉄、フェリチン、トランスフェリン、UIBC、TIBC、トランスフェリン飽和度に変化はなかった (Figure 2-5D-J)。

CA 摂取による肝臓鉄濃度の低下は糞中鉄排泄の増加によるものと推測し、糞中鉄排泄量を測定した。しかしながら、糞中鉄排泄量の有意な群間差は認められなかった (Figure 2-5K)。飼料鉄含量はコントロールと CA 群で同等であり。飼料摂取量にも差はなかった (Table 2-2)。血中鉄関連パラメータにも変動が無い事から (Figure 2-5D-J) 体内の鉄量は同等と考えられる。そこで、CA 摂取による肝臓鉄濃度の低下は肝臓の鉄代謝変動によるものと仮説を立て、肝臓の鉄代謝に関連する遺伝子発現を測定した。その結果、CA 群の肝臓において鉄輸送タンパクである LCN2 の遺伝子発現の顕著な増加を伴って血漿中 LCN2 濃度が有意に増大する事を見出した (Figure 2-5L-M)。興味深いことに、CA 群の鉄関連遺伝子発現の変動は LCN2 特異的であり、鉄輸送体 (TFR1、TFR2、LCN2R、ZIP14、DMT1、FPN)、鉄調節ホルモン (HAMP)、ヘムオキシゲナーゼ (HMOX1)、鉄貯蔵タンパク質 (FTH1)、HAMP 調節転写因子 (BMP6、HFE2)、ヘムトランスポーター (HPX) およびヘモグロビントランスポーター (HP) 等の肝臓鉄代謝に関与するタンパクの遺伝子発現に有意な差は認められなかった (Figure 2-5L)。

**Table. 2-2. Food intake, growth, and organ weights in WKAH/HkmSlc male rats fed either control or CA diet for 13 weeks**

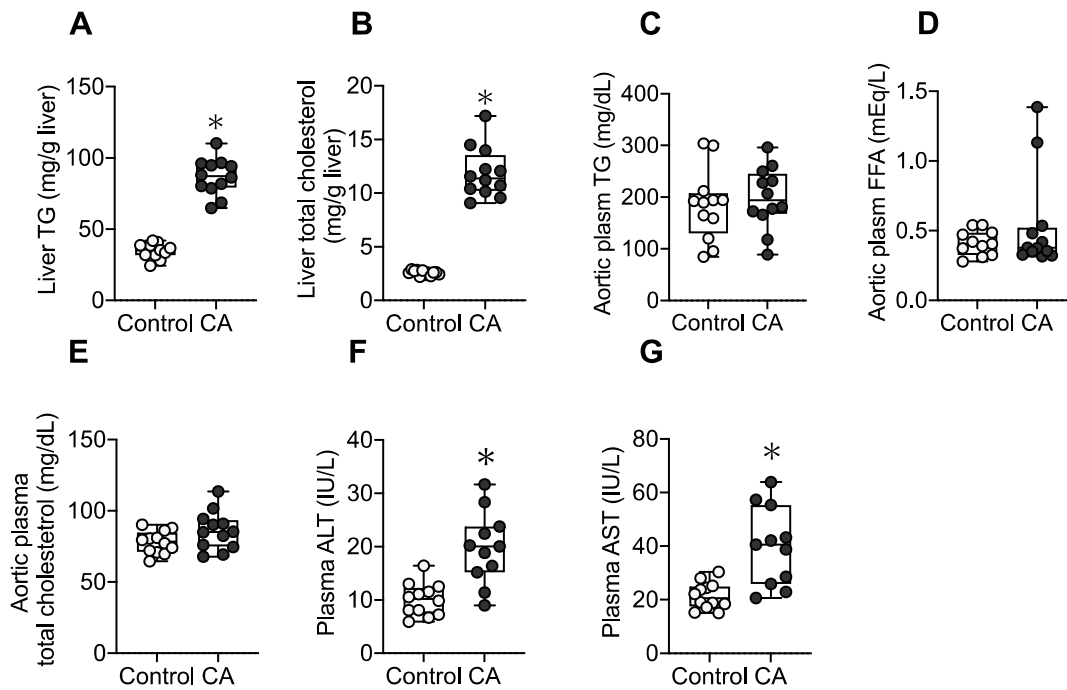
|                               | Control    | CA          | <i>P</i> -value |
|-------------------------------|------------|-------------|-----------------|
| Total food intake, g/13 weeks | 1614 ± 26  | 1617 ± 24   | 0.94            |
| Final body weight, g          | 387 ± 7.8  | 390 ± 5.4   | 0.75            |
| Liver weight, g               | 12.0 ± 0.4 | 14.4 ± 0.3* | < 0.001         |
| Epididymal adipose tissue, g  | 8.5 ± 0.3  | 8.1 ± 0.3   | 0.30            |

Values are shown as the mean ± SEM (n = 12). Significant difference of mean value between two groups was determined using the Student's *t*-test. \*Significantly different from the control (*P* < 0.05).



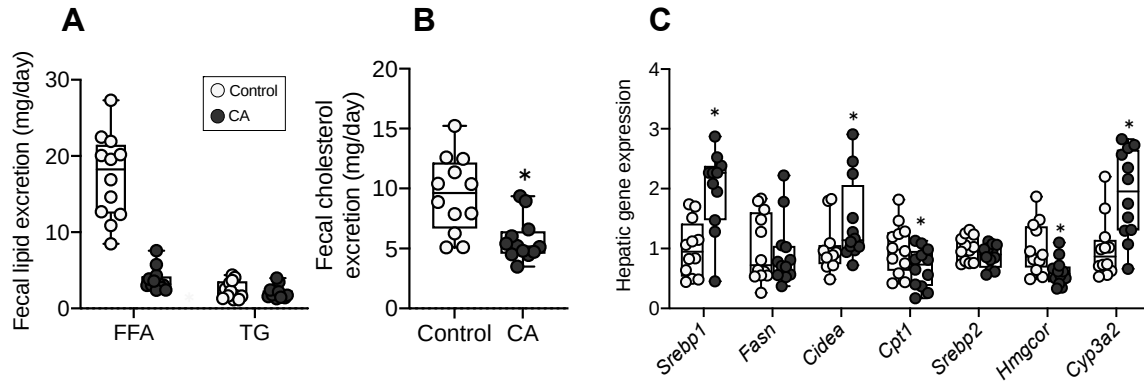
**Figure. 2-1. CA diet increases specifically 12 $\alpha$ OH.** Concentration of (A) total 12 $\alpha$ OH and non-12 $\alpha$ OH, (B) total primary 12 $\alpha$ OH, (C) total secondary 12 $\alpha$ OH concentration, (D) each bile acid in the portal plasma of rats fed control or CA diet for 13 weeks. Open circles,  $n = 12$  for control; filled circles,  $n = 12$  for CA. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum. Asterisks indicate a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ). CA, cholic acid; CDCA, chenodeoxycholic acid; DCA, deoxycholic acid; GCA, glychocholic acid; HFD, high-fat diet; LCA, lithocholic acid;  $\beta$ MCA, beta-muricholic acid,  $\omega$ MCA, omega-muricholic acid; 3 $\alpha$ , 5 $\beta$ -cholanic acid-12 $\alpha$ -ol-3-one; TCA, taurocholic acid; TCDCA, taurochenodeoxycholic acid; TDCA,

taurodeoxycholic acid; TLCA, tauroolithocholic acid; T  $\alpha$  MCA, tauroarupha-muricholic acid; T  $\beta$  MCA, taurobeta-muricholic acid, T  $\omega$  MCA, tauroomega-muricholic acid.

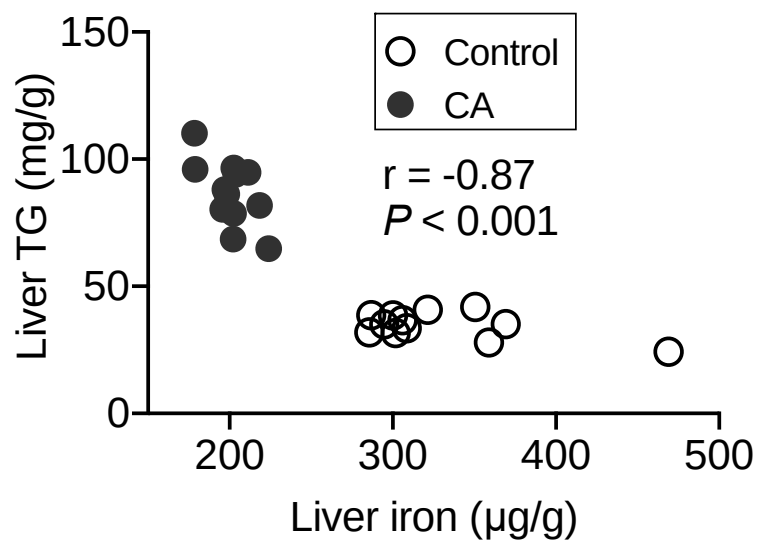


**Figure. 2-2. CA diet induces hepatic steatosis and liver injury.** Hepatic concentration of (A) TG and (B) cholesterol, aortic plasma concentration of (C) TG, (D) FFA, and (E) total cholesterol, aortic plasma activities of (F-G) aminotransferase in rats fed control or CA diet for 13 weeks. Open circles,  $n = 12$  for control; filled circles,  $n = 12$  for CA. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum. Asterisks indicate a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ). ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; FFA, free fatty acid; TG, triglyceride.

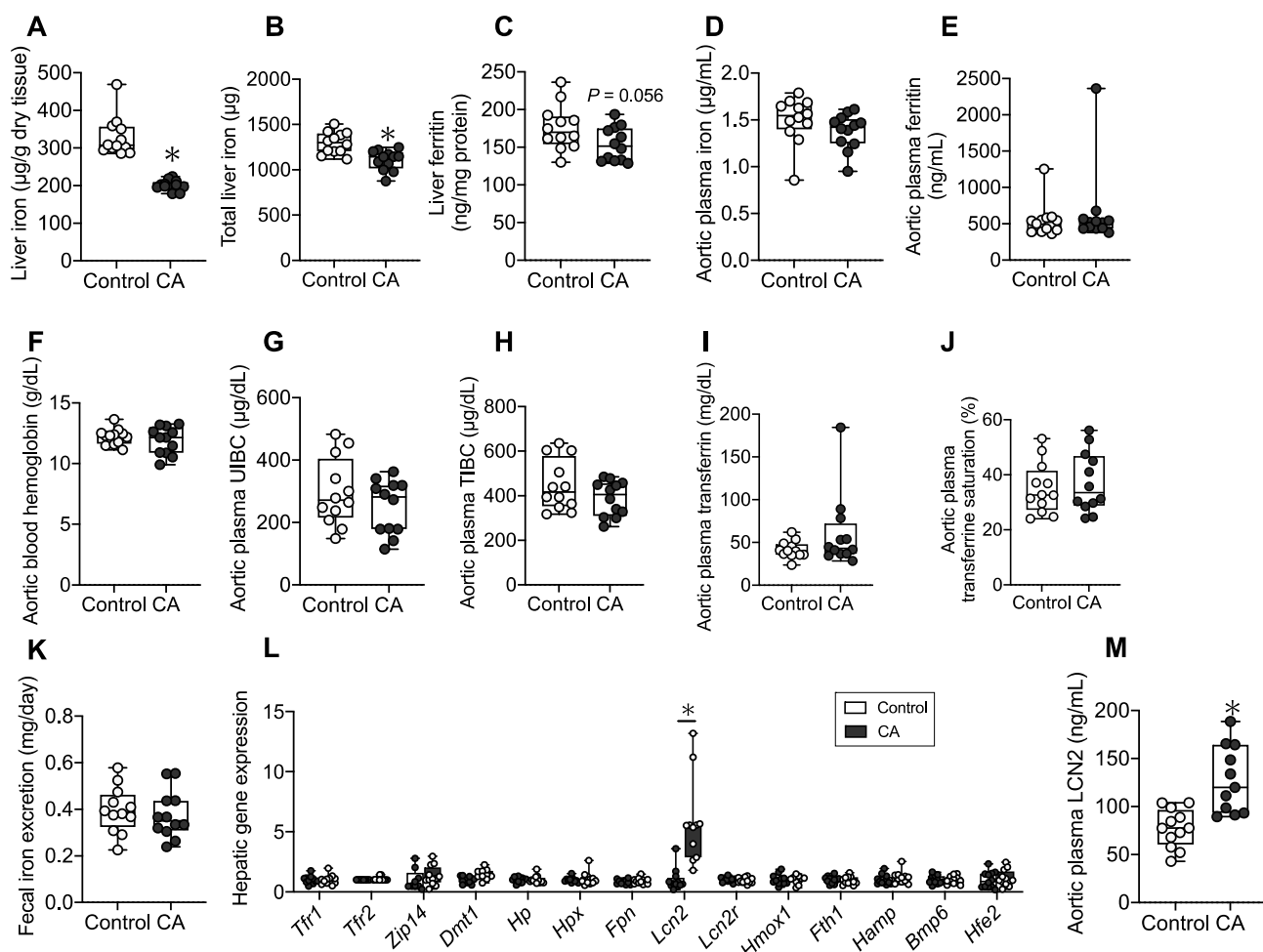




**Figure. 2-3. CA diet reduces fecal lipid excretion and modulates liver lipid gene expression in a direction favorable to lipid accumulation.** Fecal excretion of (A) lipid (FFA and TG) and (B) total cholesterol, and (C) hepatic gene expression involved in lipid metabolism in rats fed control or CA diet for 13 weeks. Open circles,  $n = 12$  for control; filled circles,  $n = 12$  for CA. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum. Asterisks indicate a significant difference compared to control ( $P < 0.05$ ). FFA, free fatty acid; TG, triglyceride; CA, cholic acid; *Cidea*, cell death inducing DFFA like effector A; *Cpt1*, carnitine palmitoyltransferase 1; *Cyp3a2*, cytochrome P450 family 3 subfamily A member 2; *Fasn*, fatty acid synthase; *Hmgcor*, hydroxymethylglutaryl-CoA reductase; *Srebp1*, sterol regulatory element binding protein 1; *Srebp2*, sterol regulatory element binding protein 2, *Rplp0*, Ribosomal protein lateral stalk subunit P0.



**Figure. 2-4. Liver iron concentration negatively correlates with liver lipid accumulation.** Data were from rats fed control diet and CA diet for 13 weeks. Open circles,  $n = 12$  for control; filled circles,  $n = 12$  for CA. CA, cholic acid; TG, triglyceride.



**Figure. 2-5. CA diet induces liver iron deficiency.** Hepatic (A) iron concentration, and (B) iron content, (C) hepatic ferritin concentration (D) aortic plasma iron concentration, and (E) ferritin, (F) aortic hemoglobin, (G) aortic plasma UIBC, and (H) TIBC, (I) transferrin concentration, (J) transferrin saturation, (K) fecal iron excretion, (L) hepatic mRNA expression of iron-related genes, and (M) aortic plasma LCN2 concentration in rats that were fed either a control or CA diet for 13 weeks. In (H), the TIBC was calculated as the sum of the aortic plasma iron concentration (D) and the UIBC (G). In (J), the transferrin saturation was calculated by dividing the aortic plasma iron concentration in (D) by the TIBC in (H). In (L), the data were normalized to *Rplp0* mRNA expression. \*Significantly different from the control ( $P < 0.05$ ). Open circles,  $n = 8$  for control; filled circles,  $n = 8$  for CA. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum ( $n = 8$ ). CA, cholic acid; LCN2, lipocalin 2; *Lcn2*, lipocalin 2; *Rplp0*, ribosomal protein lateral stalk subunit P0; TIBC, total iron-binding capacity; UIBC, unsaturated iron-binding capacity.

### 2-3-6. 大動脈血漿中の胆汁酸組成、脂質および鉄代謝 (CA 負荷と VCM 投与の組み合わせ試験)

CA 添加食を与えたラットの門脈血では CA や TCA 等の一次胆汁酸のみならず、これらの腸内細菌代謝物である二次胆汁酸濃度も顕著に増加していた (Figure 2-1B-C)。CA 添加食で引き起こされる肝臓鉄濃度の低下や SREBP1 遺伝子発現レベルの上昇を伴った肝臓脂肪蓄積等の諸症状は、腸内細菌による  $12\alpha$  OH の二次胆汁酸生成に依存している可能性がある。この仮説を検証するために CA 添加食と VCM を組み合わせた試験を行った。摂食量や体重、臓器重量に群間差はなかった (Table 2-3)。このとき、VCM は大動脈血中の総  $12\alpha$  OH 濃度にほとんど影響を与えずに  $12\alpha$  OH の二次胆汁酸濃度を低下させた (Table 2-4、Figure 2-6A-C)。しかしながら、期待に反して、依然として肝臓脂質濃度、肝臓 SREBP1 の遺伝子発現レベル、血中 ALT 活性、肝臓 LCN2 遺伝子発現レベルおよび血中 LCN2 濃度は CA 群において有意に上昇し、肝臓鉄濃度も肝臓脂質蓄積と負に関連して減少した (Figure 2-6D-G)。

**Table. 2-3. Food intake, growth, and organ weights in WKAH/HkmSlc male rats fed either control or CA diet treated with or without VCM in drinking water for 6 weeks (Study 3)**

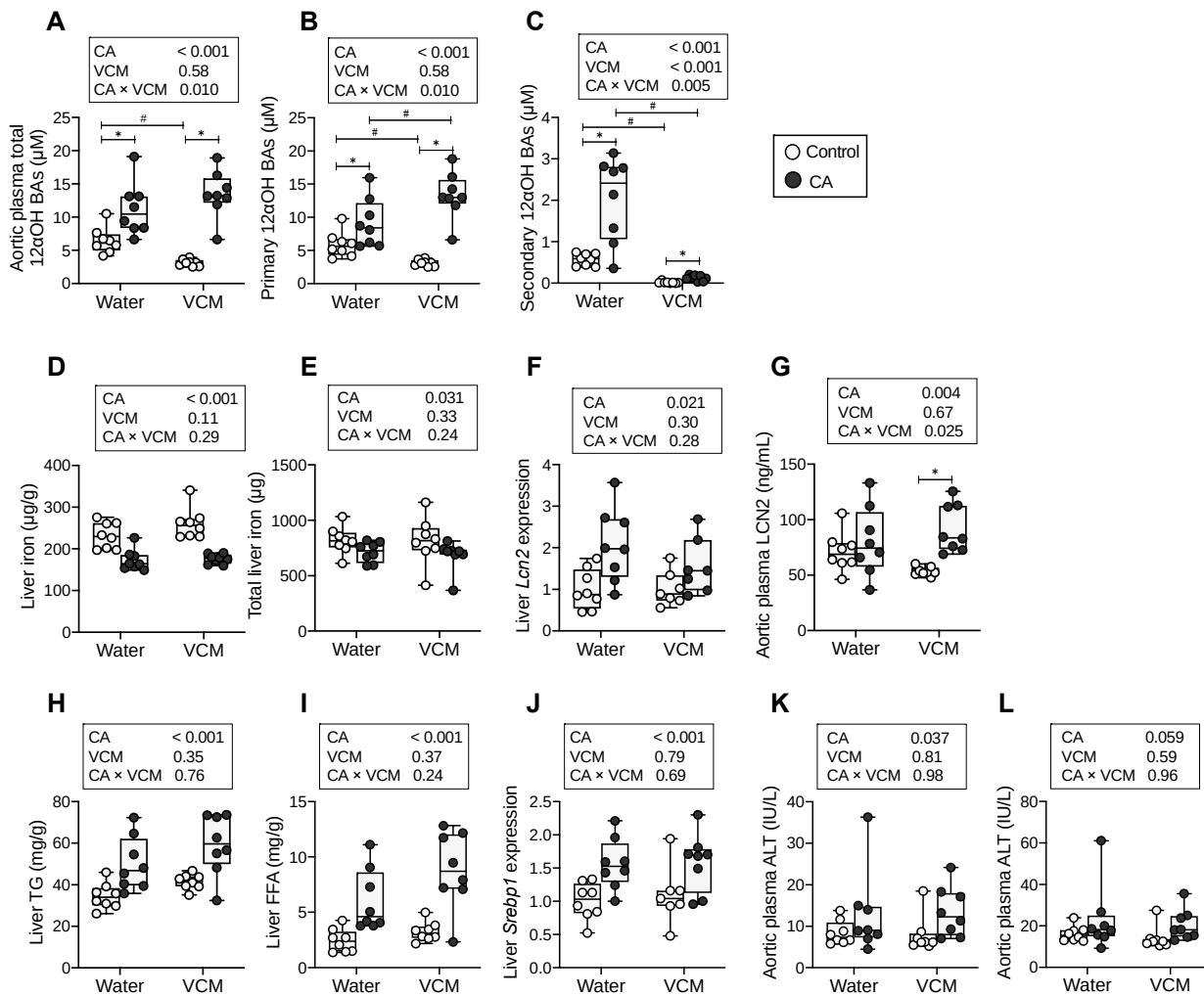
|                                     |            |            |           |            | Two-way ANOVA <i>P</i> -value |       |          |
|-------------------------------------|------------|------------|-----------|------------|-------------------------------|-------|----------|
|                                     | Control    | CA         | VCM       | CA + VCM   | CA                            | VCM   | CA × VCM |
| Total food intake g/6 weeks         | 661 ± 15   | 649 ± 19   | 619 ± 17  | 649 ± 20   | 0.61                          | 0.25  | 0.26     |
| Final body weight, g                | 279 ± 6.8  | 279 ± 7.9  | 257 ± 5.2 | 272 ± 9.3  | 0.34                          | 0.053 | 0.33     |
| Liver weight, g,                    | 10.7 ± 0.4 | 11.7 ± 0.5 | 9.8 ± 0.9 | 11.0 ± 0.8 | 0.041                         | 0.13  | 0.79     |
| Epididymal adipose tissue weight, g | 6.5 ± 0.4  | 6.0 ± 0.2  | 5.3 ± 0.2 | 5.1 ± 0.3  | 0.2                           | 0.001 | 0.61     |

Values are shown as the mean ± SEM (n = 8). Two-way ANOVA (CA and VCM) was used to evaluate differences.

**Table. 2-4. Aortic plasma bile acid profile in WKAH/HkmSlc male rats fed either control or CA diet treated with or without VCM in drinking water for 6 weeks (Study 3)**

|                                                    |            |             |             |              | Two-way ANOVA <i>P</i> -value |         |          |
|----------------------------------------------------|------------|-------------|-------------|--------------|-------------------------------|---------|----------|
|                                                    | Control    | CA          | VCM         | CA + VCM     | CA                            | VCM     | CA × VCM |
| <b>Primary 12 α OH, nmol/L aortic plasma</b>       |            |             |             |              |                               |         |          |
| CA                                                 | 2828 ± 541 | 2035 ± 804  | 287 ± 39 #  | 2673 ± 249*  | 0.12                          | 0.068   | 0.004    |
| TCA                                                | 2951 ± 402 | 6994 ± 1524 | 2744 ± 154  | 9211 ± 1252  | < 0.001                       | 0.33    | 0.24     |
| GCA                                                | 114 ± 20   | 148 ± 20    | 78 ± 10     | 1415 ± 316*# | < 0.001                       | < 0.001 | < 0.001  |
| <b>Secondary 12 α OH, nmol/L aortic plasma</b>     |            |             |             |              |                               |         |          |
| DCA                                                | 232 ± 34   | 781 ± 186*  | 1.3 ± 1.3 # | 2.2 ± 2.2 #  | 0.008                         | < 0.001 | 0.008    |
| TDCA                                               | 209 ± 186  | 971 ± 274*  | 0 #         | 0 #          | 0.006                         | < 0.001 | 0.006    |
| GDCA                                               | 8.2 ± 4.1  | 18 ± 4.7    | 0           | 0            | 0.11                          | < 0.001 | 0.11     |
| 7oDCA                                              | 52 ± 10    | 130 ± 49    | 16 ± 4.6    | 105 ± 19     | 0.003                         | 0.27    | 0.72     |
| 12oLCA                                             | 0          | 7.4 ± 7.4   | 0           | 0            | 0.33                          | 0.33    | 0.33     |
| 3o12 α                                             | 12 ± 0.7   | 30 ± 6.7    | 0           | 0            | 0.074                         | < 0.001 | 0.074    |
| UCA                                                | 59 ± 12    | 90 ± 29     | 2.8 ± 2.8   | 22 ± 52      | 0.13                          | < 0.001 | 0.78     |
| <b>Primary non-12 α OH, nmol/L aortic plasma</b>   |            |             |             |              |                               |         |          |
| CDCA                                               | 107 ± 26   | 18 ± 12*    | 2.5 ± 2.5 # | 3.9 ± 3.9    | 0.005                         | < 0.001 | 0.004    |
| TCDCa                                              | 57 ± 6.2   | 25 ± 3.0    | 61 ± 7.2    | 36 ± 5.3     | < 0.001                       | 0.19    | 0.54     |
| GCDCA                                              | 4.1 ± 4.1  | 0           | 0.3 ± 0.3   | 0            | 0.29                          | 0.37    | 0.37     |
| α MCA                                              | 163 ± 31   | 13 ± 8.9*   | 3.3 ± 3.3 # | 11 ± 7.0     | < 0.001                       | < 0.001 | < 0.001  |
| β MCA                                              | 876 ± 104  | 883 ± 262   | 211 ± 18    | 398 ± 63     | 0.4                           | < 0.001 | 0.051    |
| T α MCA                                            | 143 ± 17   | 68 ± 10     | 135 ± 15    | 87 ± 15      | < 0.001                       | 0.71    | 0.37     |
| T β MCA                                            | 514 ± 62   | 383 ± 69    | 289 ± 29    | 275 ± 59     | 0.22                          | 0.007   | 0.31     |
| <b>Secondary non-12 α OH, nmol/L aortic plasma</b> |            |             |             |              |                               |         |          |
| ω MCA                                              | 1566 ± 207 | 462 ± 67*   | 0 #         | 0 #          | < 0.001                       | < 0.001 | < 0.001  |
| T ω MCA                                            | 137 ± 14   | 19 ± 10*    | 0 #         | 0            | < 0.001                       | < 0.001 | < 0.001  |
| HCA                                                | 0          | 0           | 0           | 0            |                               |         |          |
| HDCA                                               | 23 ± 11    | 0           | 0           | 0            | 0.048                         | 0.048   | 0.048    |
| THDCA                                              | 13 ± 3.9   | 0*          | 0 #         | 0            | 0.002                         | 0.002   | 0.002    |
| GHDCA                                              | 3.7 ± 3.7  | 0           | 0           | 0            | 0.33                          | 0.33    | 0.33     |
| UDCA                                               | 46 ± 9.0   | 15 ± 8.8    | 0 #         | 0            | 0.020                         | < 0.001 | 0.020    |
| TUDCA                                              | 2.5 ± 2.5  | 0           | 0.4 ± 0.4   | 0            | 0.26                          | 0.41    | 0.41     |
| GUDCA                                              | 3.4 ± 3.4  | 0           | 0           | 0            | 0.33                          | 0.33    | 0.33     |
| LCA                                                | 15 ± 8.5   | 0           | 0           | 0            | 0.088                         | 0.088   | 0.088    |
| TLCA                                               | 13 ± 11    | 0           | 0           | 0            | 0.25                          | 0.25    | 0.25     |
| GLCA                                               | 6.1 ± 6.1  | 0           | 0           | 0            | 0.33                          | 0.33    | 0.33     |
| 7oLCA                                              | 0          | 0           | 0           | 0            |                               |         |          |

Values are shown as the mean ± SEM (n = 8). Values of undetectable parameters were considered to be 0 in the statistical analysis. Two-way ANOVA (CA and VCM) was used to evaluate differences. When there was a significant interaction (*P* < 0.05), further analysis of CA simple effects and VCM simple effects were then performed. \*Statistically significant effects of CA diet within the same treatment (*P* < 0.0125). #Statistically significant effects of vancomycin treatment within the same diet (*P* < 0.0125).



**Figure 2-6. Primary 12α OH is responsible for CA diet-induced disorders.** Aortic plasma concentration of (A) total 12α OH, (B) primary 12α O, (C) secondary 12α OH, and liver (D) iron concentration, (E) total iron content, (F) *Lcn2* gene expression, (G) plasma LCN2 concentration, and liver (H) TG, (I) FFA, (J) *Srebp1* gene expression, (K-L) plasma aminotransferase activities in rats that were fed either a control or CA diet treated with or without vancomycin (200 mg/L) in drinking water for 6 weeks. In (F) and (J), the data were normalized to *Rp/p0* mRNA expression. The P values of the Two-way ANOVA (CA and VCM) are presented in figures, and further analysis of CA simple effects and vancomycin simple effects were then performed when there was a significant interaction ( $P < 0.05$ ). \*Statistically significant effects of CA diet within the same treatment ( $P < 0.0125$ ). #Statistically significant effects of VCM treatment within the same diet ( $P < 0.0125$ ). Open circles,  $n = 8$  for control; filled circles,  $n = 8$  for CA. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum ( $n = 8$ ). ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; FFA, free fatty acid; 12α OH, 12α -

hydroxylated bile acid; *Lcn2*, *lipocalin 2*; LCN2, lipocalin 2; *Rplp0*, *ribosomal protein lateral stalk subunit P0*; *Srebp1*, *sterol regulatory element binding protein 1*; TG, triglyceride; VCM, vancomycin.

## 2-4. 考察

*Cyp8b1*<sup>-/-</sup> マウスでは高脂肪高コレステロール食誘導性の脂肪肝が抑制される (Bertaggia et al., 2017)。しかしながら、*Cyp8b1*<sup>-/-</sup> マウスでは、CYP8B1 による 12 $\alpha$  OH の合成過程で生じうる何らかのイベントが重要なのか、12 $\alpha$  OH そのものが肝臓脂肪蓄積効果を発揮するのかは定かではなかった。一方、Bertaggia らは TCA の補給により *Cyp8b1*<sup>-/-</sup> による食餌脂肪吸収量の低下が解消される事を報告しており (Bertaggia et al., 2017)、少なくとも食餌脂肪吸収量の亢進に関しては 12 $\alpha$  OH が直接的に関与していると考えられる。それでもなお、肝臓脂肪蓄積において重要な役割を果たす DNL (Lambert et al., 2014; Sanders et al., 2018; Smith et al., 2020; Tamura & Shimomura, 2005) への影響は検討されておらず、12 $\alpha$  OH そのものが直接的に DNL へ及ぼす影響を明らかにする必要があった。さらに、12 $\alpha$  OH 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 (Ridlon et al., 2006)、肝臓脂肪蓄積に特に強く寄与する分子種も限定できていなかった。

本章では、まず CA 添加食 (0.5 g/kg diet) (Islam et al., 2011) を与えることで 12 $\alpha$  OH 特異的な増加状況を作り出し、12 $\alpha$  OH が脂肪肝へ及ぼす影響を調べた。CA 群の大動脈血漿中 12 $\alpha$  OH 濃度はコントロール群の 1.7 倍であり (Figure 2-6)、2 型糖尿病かつ肥満のヒトの血漿中 12 $\alpha$  OH 濃度 (健常者の約 1.8 倍高い値を示す) と近い値を示した (Haeusler et al., 2013)。このとき、CA 添加食を与えたラットにおいて、食餌摂取量および体重の変化を伴わずに肝臓 TG およびコレステロール濃度が有意に増加し、12 $\alpha$  OH の増加が直接的に肝臓脂肪蓄積を促す事が初めて示された。また、糞中脂質排泄および肝臓の脂質代謝に関連する遺伝子発現の解析から、CA 摂取は糞中脂質排泄量の減少だけでなく、DNL を正に制御する肝臓 SREBP1 の遺伝子発現レベルの上昇が観察された。つまり、12 $\alpha$  OH は脂肪吸収量の促進のみならず、肝臓 DNL の亢進を介して脂肪肝を引き起こすも新たに示された。さらに、VCM 飲水投与により 12 $\alpha$  OH の二次胆汁酸産生を抑制しても CA 摂取は VCM 投与の有無に関わらず肝臓 SREBP1 の遺伝子発現レベルの上昇および肝臓脂肪蓄積を引き起こす事を発見した。この結果は、腸内細菌が生成する二次胆汁酸も含めた 12 $\alpha$  OH 全体ではなく、肝臓で合成される 12 $\alpha$  OH 自体が特に肝臓脂肪蓄積に強く寄与する事を示唆している。



NAFLD の肝臓脂肪蓄積の原因として肝臓 DNL の亢進が注目されている (Lambert et al., 2014)。興味深い事に、CA 添加食による  $12\alpha\text{OH}$  濃度の増加は肝臓 SREBP1 の遺伝子発現レベル上昇を伴って脂肪肝を発症させた。SREBP1 は肝臓 DNL を正に制御する転写因子であり、NAFLD の肝臓脂質蓄積を媒介する因子と考えられている (Higuchi et al., 2008; Kohjima et al., 2008)。第 1 章の HFD 摂取では、食餌脂肪流入量の増大に伴って肝臓 SREBP1 の遺伝子発現レベルが大幅に抑制されていたために、二次的に増大した  $12\alpha\text{OH}$  が SREBP1 へ与える影響を評価する事が難しかった。本章における CA 添加食はコントロールと食餌脂肪量は同等であり、 $12\alpha\text{OH}$  による DNL への影響をより明確に評価できたと考えられる。一方で、SREBP1 の下流に存在する FASN の遺伝子発現レベルに有意な変化はなく、タンパクレベルの測定や安定同位体標識を用いた脂肪酸合成の直接的な評価により  $12\alpha\text{OH}$  による DNL への影響をより慎重に明らかにする必要がある。

$12\alpha\text{OH}$  による肝臓脂肪蓄積の別の機構として、食餌脂質吸収の促進が考えられる。 $12\alpha\text{OH}$  合成が低下する *Cyp8b1*<sup>-/-</sup> マウスでは、食餌脂肪吸収が低下することで高脂肪高コレステロール食誘導性の脂肪肝が抑制される (Bertaggia et al., 2017)。この時、TCA の補給によって脂肪吸収レベルの低下が解消されることから (Bertaggia et al., 2017)、胆汁酸総量のみならず  $12\alpha\text{OH}$  特異的な増減であっても食餌脂質吸収量に影響が出る事が予想される。これらの知見と一致して、CA 添加食によって  $12\alpha\text{OH}$  を特異的に増加させると糞中脂質排泄が有意に減少した。この時、 $12\alpha\text{OH}$  の中で脂肪吸収促進に関わる分子種は TCA 等の一次胆汁酸が有力である。 $12\alpha\text{OH}$  の二次胆汁酸である DCA や TDCA の臨界ミセル濃度はそれぞれ 2.3~2.5 M (Reis et al., 2004) と 0.7 M 前後だが (Carey & Small, 1969)、HFD を与えたラットでさえ胆汁中の TDCA 濃度は 0.069 M 以下と (Yoshitsugu et al., 2019)、脂質吸収促進に必要なミセル形成濃度に比べて遥かに低い。その一方で、胆汁中の TCA 濃度は HFD 摂取で臨界ミセル濃度である約 8~12 mM (Meyerhoffer & McGown, 1990) を超えて 25mM 程度まで上昇する (Yoshitsugu et al., 2019)。すなわち、 $12\alpha\text{OH}$  は特に TCA 等の一次胆汁酸が関与して食餌脂質吸収を促進させる事で肝臓脂肪蓄積に寄与すると考えられる。

NAFLD 患者において肝臓脂肪蓄積と逆相関して肝臓鉄濃度が低下する事が報告されているが (Britton et al., 2018)、その要因は明らかになっていなかった。興味深いことに、CA 添加食は摂食量や糞中鉄排泄量を変化させる事なく肝臓局所的に鉄濃度を低下させた。さらに、VCM を飲水

投与した場合にも同様に CA 食は肝臓鉄濃度を減少させた。シンバイオティクスによって糞中脂肪排泄増加を介して CA 食誘導性の脂肪肝を改善させた場合にも、肝臓鉄濃度は依然として低下した（データは示していない）。すなわち、肝臓鉄濃度の低下は脂肪肝の結果ではなく、 $12\alpha\text{OH}$  による直接的な作用であり、特に肝臓で合成される  $12\alpha\text{OH}$  が肝臓鉄濃度の低下を媒介する新規因子である事が示唆される。

興味深いことに、鉄欠乏食をラットもしくはマウスに与えると肝臓脂質濃度が上昇する事が複数の文献で報告されている (Bartholmey & Sherman, 1985; Davis et al., 2012; Sherman, 1978; Sherman et al., 1978, 1982)。すなわち、 $12\alpha\text{OH}$  は肝臓鉄濃度低下を介して肝臓脂肪蓄積を引き起こすユニークな機構を有している可能性がある。一方で、先行研究で使われている鉄欠乏食は貧血や摂食量の低下が起こる重度鉄欠乏状態を誘導してしまう事から (Bartholmey & Sherman, 1985; Davis et al., 2012; Sherman, 1978; Sherman et al., 1978, 1982)、肝臓局所的な鉄濃度低下が脂質代謝に及ぼす影響を明確に評価する必要がある。

食餌鉄吸収は CA 添加食による肝臓鉄濃度低下の要因としては無関係に見える。1900 年代の *ex vivo* 試験を用いた研究では、TCA などの一次胆汁酸がキレート効果により腸内鉄取り込みを促進する事が報告されていた (Sanyal et al., 1991, 1992)。しかしながら、鉄取り込みの促進は主に TCA のミセル前濃度で発生し、その臨界ミセル濃度以上では鉄取り込みの促進はほとんど起こらなかった (Sanyal et al., 1991, 1992)。ラット小腸内の TCA 濃度は、臨界ミセル濃度 (8-12 mM) (Meyerhoffer & McGown, 1990) より明らかに高い (Yoshitsugu et al., 2019)。実際、CA 群における食餌摂取量および糞中への鉄排泄量に変動はなかった事から、CA 給餌による TCA 濃度の上昇は、*in vivo* での鉄吸収の変動に寄与するものではなく肝臓鉄濃度の低下は鉄吸収とは無関係であると推測できる。

食餌鉄吸収に変化がないとすれば体内の鉄量はコントロールと同等であり、CA 添加食による肝臓鉄濃度の低下は体内で鉄の移動が起きた結果と考える事が出来る。興味深いことに、CA 添加食摂取ラットにおいて鉄代謝に関連するタンパク質の中で、肝臓 LCN2 の遺伝子発現が特異的に増加していた。このとき、肝臓が LCN2 の主要な産生臓器である (Xu et al., 2015) 事と一致して CA 群における血漿中 LCN2 濃度も有意に増加していた。LCN2 は特定の条件に基づいて細胞から鉄を輸送または除去する鉄輸送タンパク質であり、鉄負荷型の LCN2 は細胞内の鉄濃度を上昇させ

る一方で、鉄欠乏型 LCN2 は細胞内の鉄濃度を低下させる (Devireddy et al., 2005)。CA 群の血漿で増加した LCN2 がいずれの形で存在するかは不明であるものの、腸肝循環における  $12\alpha\text{OH}$  の増加が血漿中の鉄欠乏型 LCN2 濃度を増加させることにより、肝臓鉄濃度を低下させるのかもしれない。

CA 添加食は HFD 誘導性の  $12\alpha\text{OH}$  特異的な増加を模倣した系であることから (Islam et al., 2011; Yoshitsugu et al., 2019)、HFD で起こる事象から  $12\alpha\text{OH}$  で起こる現象を切り取って観察できる。 $12\alpha\text{OH}$  による肝臓鉄濃度低下作用を発見した事で、HFD 誘導性の肝臓鉄濃度低下の理由を部分的に説明できるようになった。HFD の摂取は時間依存的に肝臓鉄濃度低下もしくは蓄積を起こす事が報告されている (Jiang et al., 2018)。5~12 週間の HFD 摂取試験では肝臓鉄濃度が上昇する一方で (Ahmed & Oates, 2013; Dongiovanni et al., 2015; Meli et al., 2013)、10~12 週間の試験では群間差は見られない (Bertinato et al., 2014; Sonnweber et al., 2012)。驚くべきことに、さらに長期間 (12 週間、16 週間、18 週間、31 週間) HFD を摂取すると、肝臓鉄濃度は低下に転じる (Chung et al., 2016; Chung et al., 2011; Jiang et al., 2018; Orr et al., 2014; Yamano et al., 2015)。第 1 章において HFD 摂取 8 週間後のラット門脈血漿中で  $12\alpha\text{OH}$  濃度が上昇する事を見出しており、HFD を 12 週間与えたマウスでは、血清 LCN2 の増加が観察されている (Yan et al., 2007)。すなわち、慢性的な HFD 摂取で起こる  $12\alpha\text{OH}$  濃度の増加が血中 LCN2 濃度上昇を引き起こし、結果的に肝臓鉄濃度低下に寄与する可能性がある。

腸内細菌は宿主の健康と密接に関連している (Gangarapu et al., 2014)。ヒト脂肪肝患者の血中において DCA 濃度の上昇 (Haeusler et al., 2013; Jiao et al., 2018)、肥満患者において Firmicutes 門に属する *Clostridium cluster XI* および *XIVa* 等の DCA 産生に寄与する腸内細菌の割合が増加する (Turnbaugh et al., 2006)。本研究において、VCM 処理が二次胆汁酸生成を抑制したものの、CA 群における血中 LCN2 濃度上昇を伴った肝臓鉄濃度低下や肝臓 SREPB1 遺伝子発現レベルの発現上昇、肝臓脂質蓄積は全く抑制されなかった。すなわち、CA 添加食で引き起こされる現象は腸内細菌の  $12\alpha\text{OH}$  代謝とは無関係であり、 $12\alpha\text{OH}$  の中でも門脈血中で最も高濃度で存在する TCA 等の一次胆汁酸が主体となって引き起こすと考ええる事ができる。CA 群の腸肝循環 TCA の存在濃度は DCA の 10 倍以上である事からも (Figure 2-1D) 妥当な結果と見る事が出来る。腸肝循環における TCA 濃度が増加すれば、大腸への流入も増大するとみるのが自然であり、NAFLD 患

者で観察される血中 DCA 濃度の上昇は肝臓脂肪蓄積の原因ではなく、TCA 濃度が増大した結果に過ぎないのかもしれない。

本章の成果により、NAFLD 患者 (Chashmniam et al., 2019; Mouzaki et al., 2016; Puri et al., 2018) や HFD 摂取で起こる  $12\alpha$  OH 特異的な増加 (第 1 章) は肝臓脂肪蓄積の結果ではなく、原因となり得る事が示された。 $12\alpha$  OH が肝臓脂肪蓄積を起こす機構の一端として、食餌脂質の吸収促進および SREBP1 遺伝子発現上昇を介した肝臓 DNL の亢進が関与すると見られる。別の機構として、 $12\alpha$  OH が血中 LCN2 濃度上昇を介して肝臓鉄濃度を低下させる新規の宿主因子であり、その結果として肝臓脂肪蓄積を促進するユニークな機構を有する可能性も浮上した。一連の  $12\alpha$  OH 誘導性の肝臓鉄濃度低下、肝臓 SREBP1 遺伝子発現レベルの上昇は腸内細菌による  $12\alpha$  OH 代謝と無関係であり、TCA 等の一次胆汁酸の存在量が重要であると考えられる。

### 第 3 章 軽度鉄欠乏による肝臓脂質蓄積への影響評価

### 3-1. 背景と目的

第1章および第2章の研究から、 $12\alpha\text{OH}$ による肝臓脂質蓄積を肝臓鉄濃度の低下が媒介する可能性が示された。CA食を与えたラットでは摂食量の低下および見かけの鉄吸収量に有意な変化が認められないにも関わらず肝臓鉄濃度が低下しており、貧血を伴わない軽度な鉄欠乏状態であるものの、肝臓鉄濃度と肝臓脂質濃度の間には強い負の相関が観察された。同様の現象は、複数回のCA食負荷試験において再現性よく観察できた（データは示していない）。すなわち、肝臓局所的な鉄濃度の低下が肝臓脂肪蓄積を促進する可能性がある。貧血を伴わないID (marginal iron deficiency、MID) の患者数は貧血を伴った鉄欠乏 (ID) の4倍にも上るとされていることから (Ioannou et al., 2002)、MIDが肝臓脂肪蓄積に及ぼす影響を明らかにする意義は大きい。特筆すべきは、鉄欠乏食を与えたラットにおいて脂質合成に関連する遺伝子発現および肝臓TG濃度の上昇が報告されている事だ (Davis et al., 2012)。一方、これらのIDは血中ヘモグロビン濃度の低下 (貧血) や摂食量・体重の減少を伴っており、肝臓鉄濃度低下以外に明確な症状が現れないCA負荷の状態とは大きく異なり、MIDが肝臓の脂質代謝に影響を及ぼすかどうかは明らかになっていない。MIDでも認知機能 (Black, 2003) や運動機能 (Brownlie et al., 2002, 2004)、および心機能 (Hoes et al., 2018) に及ぼすことが臨床試験および細胞試験が報告されている事に加え、肝臓は鉄代謝および脂質代謝が盛んに行われる臓器であることから、MIDによる肝臓鉄濃度の低下は肝臓脂質代謝に何らかの影響を及ぼす可能性がある。

本章では、食餌に含まれる鉄量を調整することで貧血や摂食量および体重の減少を伴わないMID状態を構築する。このモデルを利用し、通常の食餌もしくはスクロース食を与えたラットにおいてMIDが肝臓脂質、血中脂質、肝臓脂質代謝遺伝子発現レベル、および血中トランスアミナーゼ活性に及ぼす影響を評価することで、CA食で観察されたMIDが肝臓脂肪蓄積を促進するという仮説を検証する。

## 3-2. 実験材料および実験方法

### 3-2-1. 実験動物および食餌

全ての実験において AIN-93G をベースとしたコントロール飼料 (Reeves et al., 1993) で 1 週間順化させた 4 週齢の雄性 Wistar ラット (日本エスエルシー) を実験動物として使用した。明期は 08:00~20:00、温度  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $55 \pm 5\%$  の管理された環境で個別に飼育し、体重および食餌摂取量は 2 日ごとに測定した。全試験期間中を通してラットは自由摂食・自由飲水させ、試験期間および解剖時を含め絶食はかけなかった。試験 3-1 では、鉄充足食 (iron-adequatet、IA)、鉄を除いた ID 食、鉄充足食の鉄量を半分に設定した MID (IA : ID = 1/1、w/w) (Table 3-1) を与える 3 群に分け、3 週間飼育した。試験 3-2 では、IA、MID、高スクロース (high-sucrose、HS) の IA 食、もしくは HS の MID 食を与えた 4 群に分け (Table 3-2)、3 週間飼育した。これらの試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 および 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。

### 3-2-2. 血漿、組織および糞の回収

第 1 章実験材料および実験方法の “血漿、組織および糞の回収” と同様に実施した。

### 3-2-3. qRT-PCR

第 1 章実験材料および実験方法の “qRT-PCR” と同様に実施した。TaqMan Gene Expression probes はそれぞれ以下のものを使用した (サーモフィッシャーサイエンティフィックス) : The qPCR was performed using an Mx3000P real-time PCR system (Stratagene、La Jolla、CA、USA) with TaqMan Gene Expression Assays (Rn03302271\_gH : *Rp1p0*、Rn01495769\_m1 : *Srebp1*、Rn01463550\_m1 : *Fasn*、Rn00580702\_m1 : *Cpt1*、Rn00580432\_m1 : *Il1 $\beta$* 。

#### **3-2-4. 血中脂質およびアミノトランスアミナーゼの測定**

第 1 章実験材料および実験方法の “血中脂質およびアミノトランスアミナーゼの測定” と同様に実施した。

#### **3-2-5. 肝臓脂質の測定**

第 1 章実験材料および実験方法の “肝臓、糞中および食餌中脂質の測定” と同様に実施した。

#### **3-2-6. 肝臓、糞中および血漿中鉄濃度の測定**

第 2 章実験材料および実験方法の “肝臓、糞中および血漿中鉄濃度の測定” と同様に実施した。

#### **3-2-7. 統計解析**

特に言及しない限り、データの数値は平均値 + SEM で示した。図では箱ひげ図を用いて最大値、最小値、中央値、そして個体値のプロットを示した。試験 3-1 では Dunnett's test を用いて群間差を評価した。試験 3-2 では MID と Sucrose の 2 要因に対して Two-way ANOVA を行った。有意な相互作用 (MID × Sucrose) があった場合、Student's *t* test により平均値の有意差検定を行った。全ての有意差水準は  $P < 0.05$  に設定し、JMP 14.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて統計解析を行った。



**Table. 3-1. Diet compositions in control, MID, and ID**

|                                         | IA        | MID   | ID    |
|-----------------------------------------|-----------|-------|-------|
|                                         | g/kg diet |       |       |
| Casein <sup>1</sup>                     | 200       | 200   | 200   |
| Dextrin <sup>2</sup>                    | 529.5     | 529.5 | 529.5 |
| Sucrose <sup>3</sup>                    | 100       | 100   | 100   |
| Soybean oil <sup>4</sup>                | 70        | 70    | 70    |
| Cellulose <sup>5</sup>                  | 50        | 50    | 50    |
| Mineral mixture for IA <sup>6</sup>     | 35        | -     | -     |
| Mineral mixture for ID <sup>7</sup>     | -         | -     | 35    |
| Mineral mixture for MID <sup>8</sup>    | -         | 35    | -     |
| Vitamin mixture <sup>9</sup>            | 10        | 10    | 10    |
| L-Cystine <sup>10</sup>                 | 3         | 3     | 3     |
| Choline hydrogen tartrate <sup>10</sup> | 2.5       | 2.5   | 2.5   |

<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> The mineral mixtures for ID (iron-free) were formulated by adding sucrose at the expense of ferric citrate from the mineral mixture for IA

<sup>8</sup> The mineral mixtures for MID were formulated by mixing the mineral mixtures for IA and ID (IA:ID=1:1, w/w)

<sup>9</sup> AIN93 vitamin mixture (Reeves et al., 1993)

<sup>10</sup> Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan



**Table. 3-2. Diet compositions in control and HS either with IA or MIID**

|                                        | Control   |       | HS    |       |
|----------------------------------------|-----------|-------|-------|-------|
|                                        | IA        | MID   | IA    | MID   |
|                                        | g/kg diet |       |       |       |
| Casein <sup>1</sup>                    | 200       | 200   | 200   | 200   |
| Dextrin <sup>2</sup>                   | 529.5     | 529.5 | -     | -     |
| Sucrose <sup>3</sup>                   | 100       | 100   | 629.5 | 629.5 |
| Soybean oil <sup>4</sup>               | 70        | 70    | 70    | 70    |
| Cellulose <sup>5</sup>                 | 50        | 50    | 50    | 50    |
| Mineral mixture for IA <sup>6</sup>    | 35        | -     | 35    | -     |
| Mineral mixture for MID <sup>7</sup>   | -         | 35    | -     | 35    |
| Vitamin mixture <sup>8</sup>           | 10        | 10    | 10    | 10s   |
| L-cystine <sup>9</sup>                 | 3         | 3     | 3     | 3     |
| Choline Hydrogen Tartrate <sup>9</sup> | 2.5       | 2.5   | 2.5   | 2.5   |

<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> The mineral mixtures for MID were exactly the same composition as shown in Table 3-1

<sup>8</sup> AIN93 vitamin mixture (Reeves et al., 1993)

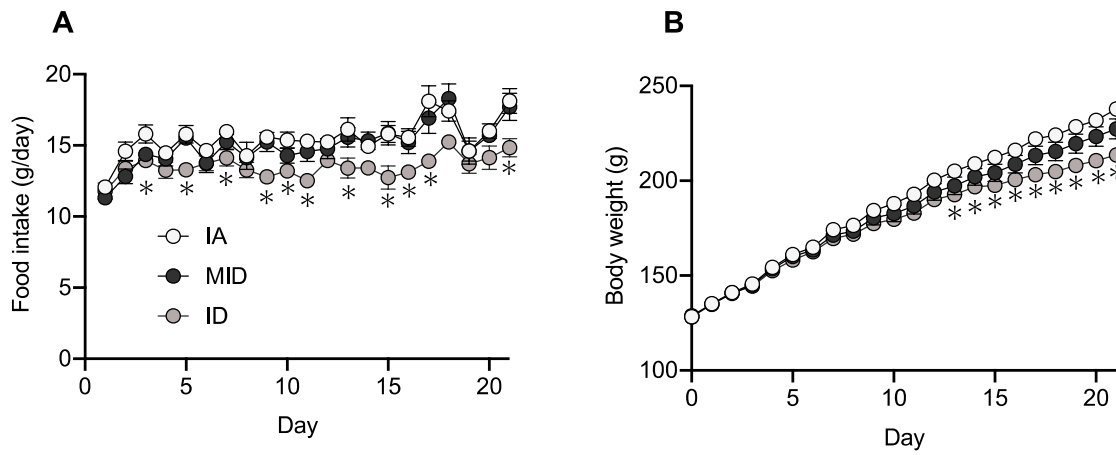
<sup>9</sup> Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan

### 3-3. 結果

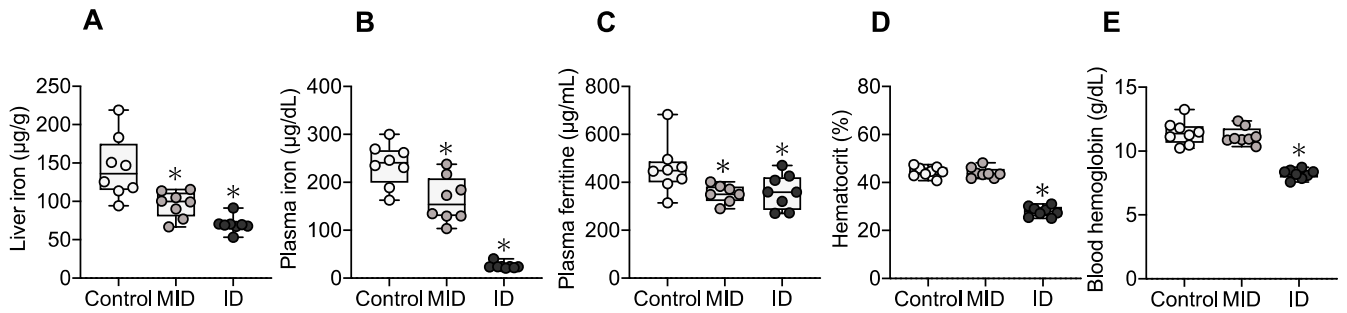
#### 3-3-1. MID 食による貧血を伴わない鉄欠乏の誘導

貧血を伴わない ID を誘導する食餌鉄量を設定するために、ラットに IA、鉄を除いた ID 食、または IA の半量の鉄を含んだ MID 食をラットに 3 週間与えた。ID 群は 3 日目から IA に比べて食餌摂取量が有意に減少し始め (Figure 3-1A-B)、累積の食餌摂取量も IA 群と比較して ID 群で有意に減少した (IA:  $326 \pm 7$  g vs ID:  $284 \pm 4$ g、 $P < 0.001$ )。体重も 13 日目から ID 群で IA 群と比較して有意な低下が起こり、最終日の体重も IA 群と比較して ID 飼育ラット (IA:  $238 \pm 3$  g vs ID:  $213 \pm 3$  g、 $P = 0.001$ ) で有意に減少した (Figure 3-1B)。その一方で、MID 群の食餌摂取量および体重は IA 群と比較して有意な変化は認められなかった (Figure 3-1A-B)。

食餌摂取量および体重の結果と一致して、ID 群では血漿および肝臓鉄および血漿フェリチン濃度の低下に伴ってヘマトクリットおよびヘモグロビン濃度が有意に低下した (Figure 3-2A-D)。一方、MID 食はヘマトクリットおよびヘモグロビン濃度を低下させることなく肝臓鉄、血漿鉄およびフェリチン濃度を低下させた (Figure 3-2A-D)。以上の結果から、中程度の鉄欠乏食 MID 食をラットに与える事で、貧血や摂食量および体重の減少を伴わずに肝臓鉄濃度および血漿鉄濃度を低下させたモデルを構築できる事がわかった。しかしながら、期待に反して MID 食における肝臓 TG 濃度に有意な変化はなかった (IA:  $12.6 \pm 2.1$  mg/g vs MID:  $13.2 \pm 2.5$ mg/g、 $P = 0.32$ )。



**Figure. 3-1. MID diet does not affect growth parameters.** (A) Food intake, (B) body weight in rats fed the IA, MID, and ID diets during the experiment. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. Asterisk represents significant differences from the value of the IA group at each time point ( $P < 0.05$ ,  $n = 8$ ). HS, high sucrose; IA, iron adequate; MID, marginal iron deficiency; ID, iron deficiency.



**Figure. 3-2. MID diet induces iron deficiency without anemia.** Concentration of (A) liver iron, plasma (B) iron and (C) ferritin, blood (D) hematocrit and (E) hemoglobin in rats fed the IA, MID, and ID diets for 3 weeks. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum ( $n = 8$ ). Asterisk represents significant differences from the value of the IA-fed rats (Dunnett's test,  $P < 0.05$ ). HS, high sucrose; IA, iron adequate; MID, marginal iron deficiency; ID, iron deficiency.

### 3-3-2. HS と MID の組み合わせによる肝臓脂質蓄積への影響

第 2 章の CA モデルでは肝臓 SREBP1 の遺伝子発現レベルの亢進を伴って肝臓鉄濃度が低下していた。MID 食の摂取による貧血を伴わない鉄欠乏では肝脂質蓄積を誘導するには不十分であった事からも、MID は脂質合成が亢進された環境で肝臓脂質蓄積を促進する可能性がある。そこで、試験 2 では脂質合成促進作用を持つ HS (Ouyang et al., 2008) をベースに MID 食を 3 週間与えた。試験 1 と同様に、MID は食餌摂取量、体重 (Table 3-3) および血中ヘモグロビン濃度に影響を与えずに肝臓鉄濃度を低下させた (Figure 3-3A-C)。

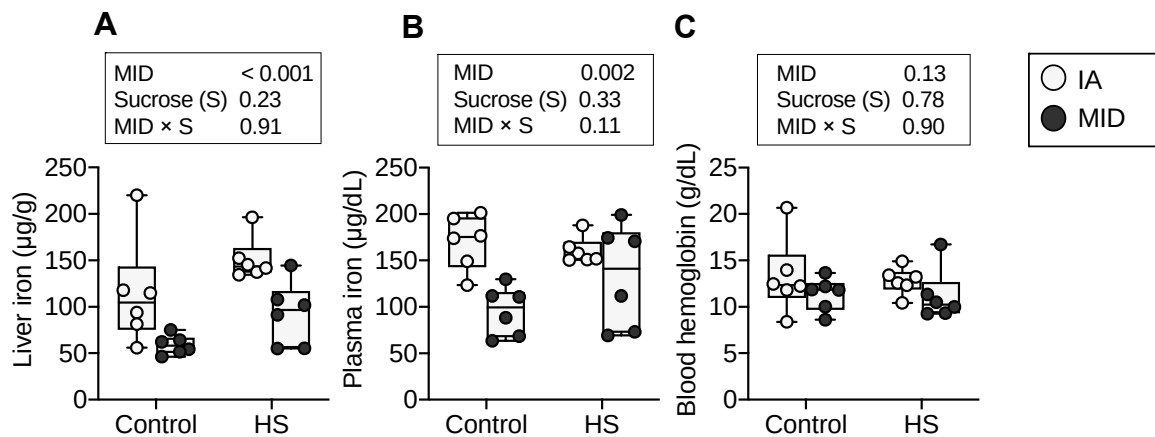
このとき、興味深いことに HS をベースに MID を与えた場合のみ、肝臓 FASN の遺伝子発現の亢進を伴って肝臓 TG 濃度が有意に増加した (Figure 3-4A、G)。一方で、糖源に関わらず MID による肝臓総コレステロール、血中 TG およびコレステロール濃度、血漿中 ALT・AST 活性、肝臓 *Srebp1*、*Cpt1*、*Il1 $\beta$* 、ミトコンドリア量を評価したミトコンドリア DNA/核 DNA (mitochondrial DNA/nuclear DNA、mtDNA/nDNA) に有意な影響は認められなかった (Figure 3-4B-F、H-K)。

**Table. 3-3. Growth parameters and tissue weight in rats fed control and HS either with IA or MID**

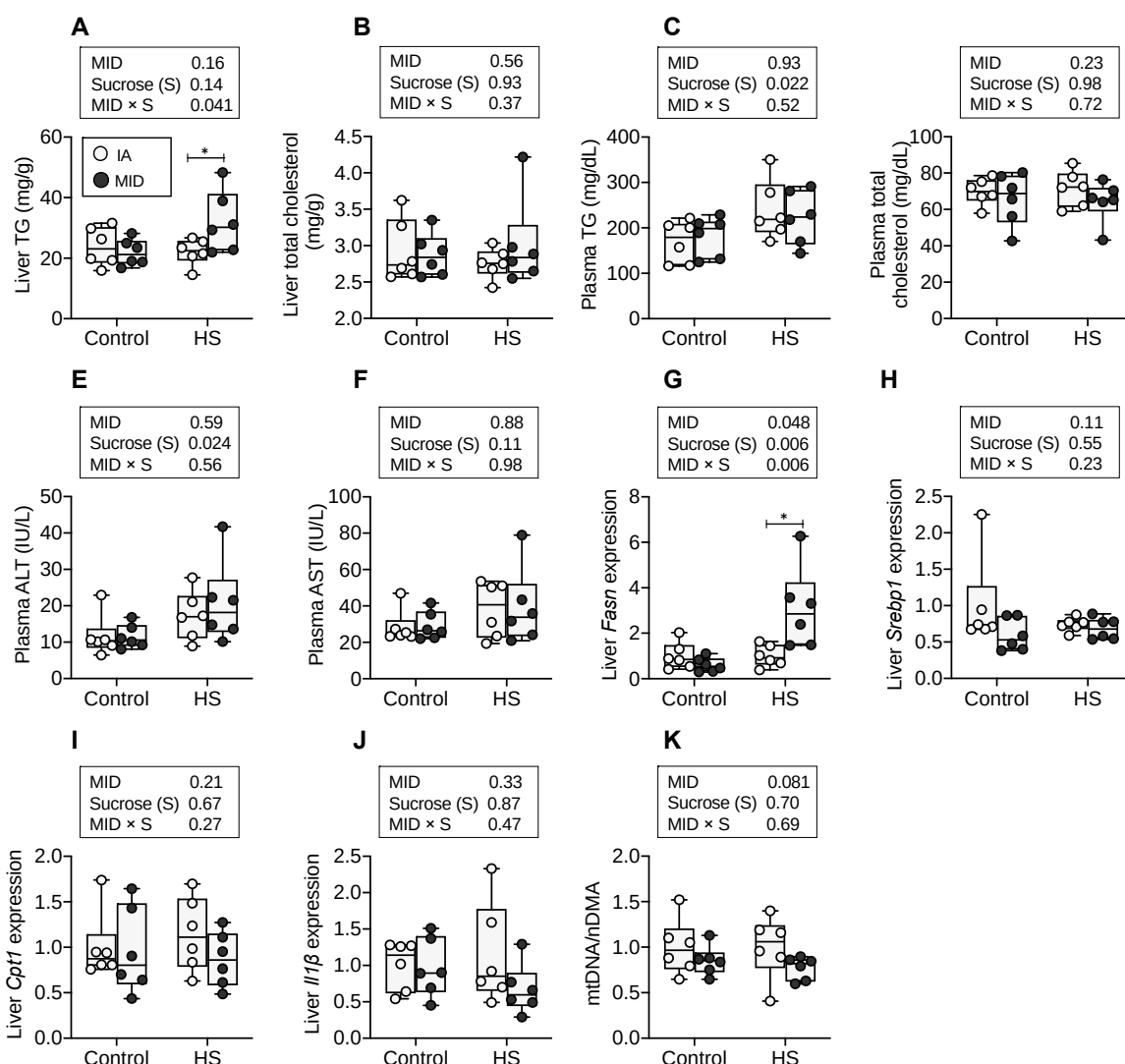
|                                       | Control    |            | HS         |            | Two-way ANOVA, <i>P</i> -value |             |       |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------------------|-------------|-------|
|                                       | IA         | MID        | IA         | MID        | Iron (I)                       | Sucrose (S) | I × S |
| Growth parameters (g)                 |            |            |            |            |                                |             |       |
| Initial body weight                   | 121 ± 2    | 121 ± 3    | 121 ± 4    | 122 ± 3    | NS                             | NS          | NS    |
| Total food intake                     | 287 ± 13   | 310 ± 11   | 301 ± 8    | 294 ± 5    | NS                             | NS          | NS    |
| Final body weight                     | 228 ± 7    | 232 ± 6    | 229 ± 4    | 225 ± 4    | NS                             | NS          | NS    |
| Tissue weight<br>(g 100g body weight) |            |            |            |            |                                |             |       |
| Liver                                 | 4.50 ± 0.1 | 4.30 ± 0.9 | 5.04 ± 0.2 | 4.89 ± 0.1 | NS                             | <0.0001     | NS    |
| Epididymal adipose tissue             | 1.93 ± 0.1 | 1.84 ± 0.1 | 1.86 ± 0.1 | 1.80 ± 0.8 | NS                             | NS          | NS    |

Values are shown as the mean ± SEM (n = 6). Two-way ANOVA (iron and sucrose) was used to evaluate differences.





**Figure. 3–3. MID diet induces iron deficiency without anemia in HS-fed rats.** (A) Liver iron, (B) plasma iron, (C) hemoglobin in rats fed control or the HS diet combined with either IA or MID diet for 3 weeks. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum ( $n = 6$ ). The P values of the Two-way ANOVA (MID and sucrose) are presented in figures. HS, high sucrose; IA, iron adequate; MID, marginal iron deficiency.



**Figure. 3-4. MID combined with HS induces liver TG accumulation.** Liver (A) TG, (B) total cholesterol, and plasma (C) TG, (D) total cholesterol, (E-F) aminotransferase activities, and hepatic gene expression levels of (G) *Fasn*, (H) *Srebp1*, (I) *Cpt1*, and (J) *I11β*, and (K) liver mitochondrial DNA (mtDNA) content was normalized to the nuclear DNA (nDNA) content in rats fed control or the HS diet combined with either IA or MID diet for 3 weeks. In (G-J), the target gene expression levels were normalized to *Rplp0* mRNA expression. Box and whisker plots show median, minimum, and maximum ( $n = 6$ ). The  $P$  values of the Two-way ANOVA (MID and sucrose) are presented in figures, and further analysis of simple effects of MID was then performed when there was a significant interaction ( $P < 0.05$ ). Asterisk represents significant differences from the value of the HS-IA-fed rats ( $P < 0.05$ ). ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; *Cpt1*, carnitine palmitoyltransferase 1; *Fasn*, fatty acid synthase; FFA, free fatty acid; HS, high sucrose; IA, iron

adequate; *Il1 $\beta$* , *interleukin-1 $\beta$* ; MID, marginal iron deficiency; *Srebp1*, *sterol regulatory element binding protein 1*; TG, triglyceride; *Rplp0*, *Ribosomal protein lateral stalk subunit P0*.

### 3-4. 考察

本章では、第2章で提示した仮説「貧血を伴わない鉄欠乏が肝臓脂質蓄積を促進する」を検証する目的で研究を行った。飼料から鉄を除いた ID 食をラットに与えるとヘモグロビン濃度の低下を伴って摂食量および体重の減少が観察された一方で (Sherman et al., 1978)、鉄をコントロールの半分量に抑えた MID 食はヘモグロビン濃度の低下や摂食量および体重減少を伴わずに肝臓鉄濃度および血漿中鉄濃度を低下させた。この状態は CA 食が誘導するヘモグロビン濃度の低下や摂食量、体重の減少を伴わない肝臓鉄濃度の低下と類似しており、MID による軽度の鉄欠乏状態だけでは肝臓 TG 濃度に影響を与えなかったが、HS をベースに MID を与えると肝臓 FASN の遺伝子発現の亢進を伴って肝臓 TG 濃度が増加することを見出した。以上の結果から、貧血を伴わない軽度の鉄欠乏は HS 食のような肝臓 DNL が亢進しやすい環境において肝臓脂質蓄積を促進する可能性が示された。

肝臓鉄濃度の低下は肝臓脂質代謝に影響を及ぼす可能性がある。ヒトにおいて貧血を伴わない MID は重度の ID に比べ遥かに多いにも関わらず (Ioannou et al., 2002)、貧血を伴わない鉄欠乏が肝臓脂質蓄積に及ぼす影響を調べた報告はない。過去の ID モデルは貧血を伴った重度の ID が用いられていた (Sherman et al., 1978)。貧血を伴った重度の ID は摂食量や体重減少を伴うことから肝臓脂肪濃度への影響を評価することが難しかった。一方で、本研究で用いた MID 食はラットにおいて血中ヘモグロビン濃度、摂食量や体重に影響を与えずに肝臓鉄濃度および血漿鉄濃度を低下させた。すなわち、摂取カロリー変動等の影響を排除して鉄欠乏の影響を評価できると考えられる。しかしながら、MID による軽度鉄欠乏のみでは肝臓脂質蓄積を起こすには不十分であった。

肝臓鉄濃度の低下は肝臓 DNL が起きやすい環境でのみ肝臓脂肪蓄積を促進するのかもしれない。これまでの報告でも、貧血を伴った重度の ID でさえ、単独では肝臓脂質蓄積を促進するには不十分であることが示唆されている (Davis et al., 2012; Kamei et al., 2010, 2013; Stangl & Kirchgeßner, 1998)。興味深いことに、Davis ら (Davis et al., 2012) は貧血を伴った ID がスクロースベースの AIN-76 (Reeves et al., 1993) を与えた場合には、血中 TG および肝臓 DNL 遺伝子発現レベルを増加させる一方で、デンプンベースの AIN-93 (Reeves et al., 1993) では同様の現象が

起こらないことを見出した。この知見をもとに過去の研究を眺めてみると、確かに ID における肝脂質蓄積または高脂血症は、スクロースを多く含む食事を摂取した場合にのみ観察されている (Bartholmey & Sherman, 1985; Davis et al., 2012; Sherman, 1978; Sherman et al., 1978, 1982)。グルコースから構成されるデンプンと異なって、スクロースはフルクトースを含む。フルクトースはグルコースよりも DNL を促進する作用が強力であることから (Nakagawa et al., 2006; Stanhope et al., 2009)、スクロースによって DNL が亢進しやすい状況下でのみ肝臓鉄濃度の低下が脂肪蓄積を促進すると考える事ができる。

肝臓鉄濃度の低下は HS 摂取下において肝臓 DNL の亢進を介して肝臓脂質蓄積を促進する可能性がある。肝臓脂質蓄積における肝臓 DNL の寄与は少ないと考えられていたが、近年の研究から、NAFLD の発症において肝臓 DNL が重要な役割を担うことがわかってきた (Lambert et al., 2014; Sanders et al., 2018; Smith et al., 2020; Tamura & Shimomura, 2005)。興味深いことに、HS+MID 群において肝臓 TG 濃度の上昇と関連して肝臓 DNL の最終ステップを触媒する FASN の遺伝子発現が有意に増加していた。一方で FASN 遺伝子発現の正の調節因子である SREBP1 (Horton et al., 2002; Shimano, 2001) の遺伝子発現レベルに変動は観察されず、HS+MID における肝臓 FASN 遺伝子発現レベルの上昇の詳細なメカニズムは明らかになっていない。MID による FASN 遺伝子発現レベルの上昇はコントロール食では観察されず、コントロール食と HS 食の決定的な違いはフルクトース量であることから、貧血を伴わないレベルの肝臓鉄濃度の低下がフルクトースと相乗的に作用することで FASN の遺伝子発現を上昇させているのかもしれない。

スクロースの構成糖の 1 つであるフルクトースはスクロース自体と同等の病理学的作用を持ち (Tappy & Lê, 2010)、グルコースよりもフルクトースは脂質蓄積促進能力が高い事がよく知られている (Nakagawa et al., 2006; Stanhope et al., 2009)。本研究では、比較的多量のスクロースを含む HS 食を使用している事から、その妥当性について議論する。ヒトのフルクトースの平均摂取量は 49 g/日と推定されており (Marriott et al., 2009)、これは 196kcal/日に相当する。ヒトの成人のエネルギー摂取量が 2000~2500kcal/日であることから、フルクトースからの 1 日のエネルギー摂取量 (約 200kcal/日) は 8~10%と推定できる。これに比べて HS 食を与えたラットのフルクトース摂取量は総エネルギー摂取量の 32%とかなり多い。しかしながら、以下の 2 つの理由から本研究における HS 食のフルクトース量は妥当と考えられる。まず、上記のヒトにおける推定フ

フルクトース摂取量が過小評価されていた可能性がある。Ventura ら (Ventura et al., 2011) は、甘味飲料の主要なフルクトース源である高フルクトースコーンシロップが、生産者からの開示よりもフルクトース量が多いことを報告しており、実際のヒトのフルクトース摂取量は以前に推定されていたもの (Marriott et al., 2009) よりも 18% 前後高いと指摘している。また、高用量のフルクトース (~66%) を含む食事を与え、短期間でメタボリックシンドロームを発症させるモデルは多く用いられている (Dornas et al., 2015)。また、スクロース含量のより少ない HS 食を使用すると、MID 食による脂質蓄積のタイミングが遅れる可能性がある。MID 食の長期摂取は貧血の発症にも繋がる可能性が高く、本研究の目的にはそぐわない。最後に、齧歯類はヒトよりもフルクトース摂取に対する抵抗性が高い可能性がある点が重要だ。Jang ら (Jang et al., 2018) はマウスでは摂取したフルクトースのほとんどを肝臓ではなく小腸が最初に代謝することを示した。マウスにフルクトース (0.25 g/kg、グルコースとフルクトースの 1:1 混合物) を摂取させても門脈血中のフルクトース濃度の増加は観察されない一方で (Jang et al., 2018)、ヒトでは低用量のフルクトース (体重が 50~75kg の場合、グルコースとフルクトースの 10:1 混合物として 0.1~0.15 g フルクトース/kg) を摂取するだけで循環血中のフルクトース濃度が 2 倍近く上昇する (Moore et al., 2000)。このように齧歯類はそもそもヒトよりもフルクトース代謝能力が高く (Gonzalez & Betts, 2018; Jang et al., 2018)、齧歯類を用いた試験では、ヒトで起こるフルクトース誘導性の代謝異常を誘発するためには比較的高容量の HS 食を用いる必要があると考えられる。以上の理由から、本研究で用いた多量のスクロースを含んだ HS 食は適切なモデルであったと考えられる。

本章では食餌中鉄量を調節することで、コントロール食の半量の鉄を含んだ MID 食が貧血を伴わない ID を誘導するモデルを確立し、HS をベースに MID 食をラットに与えることで FASN 遺伝子発現レベルの亢進を伴う肝脂質蓄積が増加することを明らかにした。NAFLD 患者では、フルクトースの消費量は健常なヒトに比べて 2 倍以上であり、甘味飲料由来単体で 90 g/日に及ぶと報告されている (Ouyang et al., 2008)。疫学研究では、鉄欠乏状態と疾病の有意な関係性が指摘されており (Yokoi, 2014)、NAFLD 患者では肝鉄濃度と肝臓脂肪濃度との間に逆相関があることが示されている (Britton et al., 2018)。CA 食において肝臓 SREBP1 の遺伝子発現レベルの上昇が観察された状況を考慮すると (第 2 章)、フルクトースを過剰に摂取した状態においてのみ肝臓鉄濃度の

低下が肝脂質蓄積を誘発した結果は、肝臓 DNL が亢進しやすい状態において、肝臓鉄濃度低下が肝臓脂質蓄積を更に促進するという仮説を提示できる。

## 総括

NAFLD の特徴である肝臓脂肪蓄積は NASH および線維化に先立って起こるイベントで (Angulo, 2002)、肝臓局所に留まらない NCD の発症リスクを増加させる (Younossi et al., 2018)。それゆえ、NAFLD における肝臓脂肪蓄積の原因物質の特定とその機構解明は、NAFLD の発症および更なる NCD の併発を防ぐ上で極めて重要な課題であった。総括では、本研究が明らかにした  $12\alpha\text{OH}$  の脂肪蓄積における役割の要約を端緒として、NAFLD の脂肪蓄積の機構について最近明らかになった事柄、それらの事象における本研究の立ち位置、そして本研究で新たに生まれた疑問や課題について議論する。

## 第 1 章：HFD は肝臓脂肪蓄積に比例して $12\alpha\text{OH}$ 産生を増加させる

第 1 章では、HFD 誘導性の脂肪肝において肝臓 CYP8B1 遺伝子発現の上昇を介して  $12\alpha\text{OH}$  が増加し、それに伴って見掛けの脂肪吸収量および肝臓 CIDEA 遺伝子発現レベルが上昇する事を見出した。さらに、腸肝循環中の  $12\alpha\text{OH}$  濃度が肝臓脂肪蓄積と強い正の相関を示したことから、 $12\alpha\text{OH}$  が肝臓脂肪蓄積を起こす物質である事が疑われた。一方、HFD では食餌脂肪摂取量の増大により肝臓 DNL が大幅に抑制されたため、 $12\alpha\text{OH}$  が DNL に及ぼす直接的な寄与を明らかにすることは困難だった。

## 第 2 章： $12\alpha\text{OH}$ が肝臓脂肪蓄積と関連した DNL 亢進および肝臓鉄濃度低下に関与する

第 2 章では、 $12\alpha\text{OH}$  特異的な増加環境を作り出せる CA 摂取モデルを用いて  $12\alpha\text{OH}$  が肝臓脂肪蓄積へ及ぼす影響とその機構を調べた。その結果、HFD 摂取で観察された現象と一致して、糞中脂質排泄量の低下および肝臓 CIDEA の遺伝子発現レベルが上昇する事を明らかにした。また、肝臓 DNL を司る SREBP1 遺伝子発現が上昇する事を見出し、 $12\alpha\text{OH}$  が肝臓 DNL を亢進させる可能性を示した。さらに、CA 摂取が肝臓脂肪蓄積と負に相関して肝臓鉄濃度を低下させる事を明らかにした。興味深いことに、これらの CA 摂取で観察される現象は VCM 投与により二次胆汁酸生成を抑制しても同様に観察できた。腸肝循環に最も豊富に存在する一次胆汁酸は TCA であることから、 $12\alpha\text{OH}$  の中でも TCA が主体となって肝臓鉄濃度の低下や脂質代謝関連の遺伝子発現レベルの変動および肝臓脂肪蓄積を引き起こすと考えられた。

### 第3章：肝臓鉄濃度の低下は肝臓脂肪蓄積を促進する

第3章では、CA 摂取で観察された肝臓鉄濃度の低下が肝臓脂肪蓄積に関与するかどうか調べるために MID 食を与える試験を行った。その結果、HS 食を与えたラットにおいて肝臓局所的な鉄濃度の低下が肝臓 FASN 遺伝子発現レベルの上昇を伴って肝臓脂肪蓄積を促進させる事がわかった。

### ヒトデータから見る NAFLD の発症機構とそこでの $12\alpha\text{OH}$ の役割

以上の成果を纏めると、本研究は HFD が CYP8B1 遺伝子発現の亢進を介して  $12\alpha\text{OH}$  を増加させる事を示し、 $12\alpha\text{OH}$  は食餌脂肪吸収量の増加、肝臓鉄濃度の低下や肝臓 DNL 亢進等の複数の機構で肝臓脂肪蓄積を引き起こす物質である可能性を提示した。 $12\alpha\text{OH}$  と脂肪肝の因果関係を明らかにしただけでなく、ヒト NAFLD で観察される肝臓鉄濃度の低下 (Britton et al., 2018) を引き起こす宿主因子として  $12\alpha\text{OH}$  を見出し、TCA 等の一次胆汁酸が主体となって一連のイベントを引き起こす事を示した点も重要である。これらの発見は、ヒトで見出された以下の知見とも整合性がとれる。(i) 健常なヒトに HFD を摂取させると糞中  $12\alpha\text{OH}$  濃度が上昇する (Wan et al., 2019) (ii) NAFLD 患者において血中一次胆汁酸濃度が上昇する (Chashmniyam et al., 2019; Mouzaki et al., 2016; Puri et al., 2018) (iii) NAFLD 患者において肝臓鉄濃度低下と肝臓脂肪蓄積が負の相関を示す (iv) NAFLD 患者では肝臓 DNL が顕著に増大する (Smith et al., 2020)。ここからは、過去の研究も含めて NAFLD の脂肪蓄積の機構についてより詳しく踏み込み、その中で  $12\alpha\text{OH}$  がどのように関わりうるのか、どのように検証していく必要があるかについて議論していく。

### NAFLD 発症における DNL の役割

ヒト NAFLD のデータ (Smith et al., 2020) からアプローチすると、肝臓脂肪蓄積機構の最有力候補は肝臓 DNL の亢進であるように見える。肝臓は DNL を担う主要な臓器であり、健常者では絶食時の肝臓 DNL の血中 VLDL への寄与は 1-5%程度だが、食後は栄養素組成の影響や性別差、個人差は大きいものの 10-30%程度にまで増加する (Low et al., 2018; Schwarz et al., 2003; Timlin



& Parks, 2005)。この値は NAFLD 患者では約 40%程度にまで増加し、肝臓脂肪蓄積と密接に関連する (Smith et al., 2020)。一方で、NAFLD 患者の脂肪酸酸化は一定か増加 (Bugianesi et al., 2005; Chalasani et al., 2003; Sanyal et al., 2001)、VLDL 放出量も増加を示す (Fabbrini et al., 2008, 2009; Targher et al., 2016)。アセチル CoA を DNL へ流し込む ACC を阻害すると NAFLD 患者の肝臓脂肪蓄積が低下する事からも (Lawitz et al., 2018; Loomba et al., 2018)、DNL の寄与は大きく、肝臓脂肪蓄積の主要な駆動因子と考えられる。

### ***DNL を促進する選択的インスリン抵抗性***

糖および脂質代謝を制御するインスリンは、肝臓 DNL の亢進と密接に関連している。肝臓におけるインスリンの役割の 1 つは糖新生の抑制である。食後血中に分泌されたインスリンが肝臓インスリン受容体に結合すると、インスリン受容体基質 (insulin receptor substrate、IRS)、フォスフォイノチド 3-キナーゼ (phosphatidylinositol-3 kinase、PI3K)、それに続く Akt キナーゼを活性化させる。Akt は糖代謝を制御する転写因子フォークヘッドボックスプロテイン O1 (forkhead box protein O1、FoxO1) をリン酸化し、核内への侵入を防ぐ。その結果、ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (phosphoenolpyruvate carboxykinase、PEPCK) やグルコース-6-ホスファターゼ (glucose 6-phosphatase、G6Pase) の発現は低下し、糖新生が抑えられる (Cherrington, 1999)。インスリンのもう一つの重要な役割は肝臓 DNL の亢進である。その機構は不明な点が多いものの、少なくとも SREBP1 の転写促進 (Foretz et al., 1999) と翻訳後修飾により不活性型から活性型 SREBP1 へと変化させる (Yabe et al., 2003) 2 つの機構で DNL を促進する。興味深い事に、インスリン抵抗性により Akt を活性化できなくなると、FoxO1 は常に核内に局在するために糖新生の抑制が効かなくなる一方で、インスリンによる DNL 亢進作用は保たれる「選択的インスリン抵抗性」と呼ばれる現象が観察される (Matsumoto et al., 2006; Shimomura et al., 2000)。膵臓  $\beta$  細胞は血糖値を下げるためにより多くのインスリンを分泌するため、DNL は更に亢進されるというシナリオである (Li et al., 2010; Matsumoto et al., 2006)。実際、NAFLD 患者の DNL 亢進は血中インスリンおよびグルコース濃度、肝臓インスリン抵抗性と正の相関を示す (Smith et al., 2020)。インスリン抵抗性が更に進むと DNL 亢進作用も消失し、完全なインスリン抵抗性となり得る事か

ら (Brown & Goldstein, 2008)、NAFLD の全てのケースに当てはめる事は出来ないが、糖代謝におけるインスリン抵抗性が NAFLD の肝臓脂肪蓄積と密接に関与していると考えられている。

### **インスリン抵抗性の背後に隠れた $12\alpha\text{OH}$**

本研究の成果と過去の知見を組み合わせると、選択的インスリン抵抗性の背後で  $12\alpha\text{OH}$  が DNL 促進因子として関与する可能性を提示できる。インスリンは糖新生抑制に関わる FoxO1 を阻害する事で  $12\alpha\text{OH}$  合成を司る CYP8B1 の遺伝子発現を抑制する (Haeusler et al., 2012)。選択的インスリン抵抗性の状態では FoxO1 はインスリンによる阻害を受けないため (Brown & Goldstein, 2008)、CYP8B1 の遺伝子発現は上昇すると考える事ができる。実際に、ヒトにおいてインスリン感受性の低下に伴って血中  $12\alpha\text{OH}$  濃度が上昇し、肝臓脂質蓄積と正の相関を示す事が報告されており (Haeusler et al., 2013)、類似の現象が複数の糖尿病モデル動物でも観察される (Akiyoshi et al., 1986; Biddinger et al., 2008; Li et al., 2012; Uchida et al., 1985, 1996)。本研究でも、HFD 摂取ラットにおいて肝臓 CYP8B1 の遺伝子発現上昇を伴って  $12\alpha\text{OH}$  濃度が増加する事を見出しており (第 1 章)、HFD 摂取がわずか三日で肝臓のインスリン抵抗性を引き起こす報告とも矛盾しない (Samuel et al., 2004)。さらに、 $12\alpha\text{OH}$  の増大は肝臓 SREBP1 遺伝子発現の上昇を介して肝臓脂肪蓄積を起こす (第 2 章)。CA 摂取ラットの大動脈血漿中  $12\alpha\text{OH}$  濃度は、コントロール群と比較して 1.7 倍高く (Figure 2-6)、この変動量は健常者と比較した 2 型糖尿病のヒトの血漿中濃度 (約 1.8 倍高い) と近いことから (Haeusler et al., 2013)、本研究の結果は現実的な条件設定の範囲内で観察された事象といえる。選択的インスリン抵抗性が直接的に DNL を促進するのみならず、 $12\alpha\text{OH}$  を媒介物質とする事で潜在的に肝臓 DNL の亢進を底上げする経路が想定できる。

### **本研究で生まれた疑問**

本研究は上述した複数の興味深い知見を提供したが、 $12\alpha\text{OH}$  による脂肪肝の発症には依然として以下の重要な疑問点が残る。

#### **① NAFLD で $12\alpha\text{OH}$ が増加する機構**

- ②  $12\alpha\text{OH}$  が SREBP1 遺伝子発現を上昇させる機構
- ③ SREBP1 の下流の FASN および ACC 遺伝子発現が変動しない理由
- ④  $12\alpha\text{OH}$  誘導性の DNL に使われる基質
- ⑤  $12\alpha\text{OH}$  誘導性脂肪肝における腸内細菌の寄与
- ⑥  $12\alpha\text{OH}$  誘導性の肝臓鉄濃度低下の脂肪肝への関与
- ⑦  $12\alpha\text{OH}$  による食事脂肪吸収増加の脂肪肝への寄与
- ⑧  $12\alpha\text{OH}$  は NASH 進行に関与するか。

ここからは、これらの疑問点について議論する。

### ① **NAFLD で $12\alpha\text{OH}$ が増加する機構**

インスリン抵抗性は CYP8B1 発現上昇を介して  $12\alpha\text{OH}$  産生を増加させる有力な因子に見えるが、それだけでは説明が付かない例もある。健常なヒトにおいてインスリン感受性低下に伴って血中  $12\alpha\text{OH}$  特異的に緩やかに増加していくが、糖尿病を完全に発症した状態では non- $12\alpha\text{OH}$  も含めた総胆汁酸濃度が 2 倍に増加する (Haeusler et al., 2013)。NASH 患者でも  $12\alpha\text{OH}$  に留まらない全体的な胆汁酸濃度の上昇が観察されている事から (Chashmian et al., 2019; Mouzaki et al., 2016; Puri et al., 2018)、CYP8B1 の上昇による組成変化だけでなく、CYP7A1 発現の上昇による胆汁酸合成の亢進も  $12\alpha\text{OH}$  の増加に寄与するようだ。炎症や小胞体ストレスは NASH への進行に関与する因子であるが (Kim et al., 2018)、炎症反応 (Feingold et al., 1996; Li et al., 2006) や小胞体ストレス (Henkel et al., 2017) はむしろ CYP7A1 発現を低下させる。逆に、グルコースが CYP7A1 の発現を促進することから (Li et al., 2012)、インスリンが CYP8B1 制御を介して  $12\alpha\text{OH}$  を特異的に調節する一方で、糖尿病発症にともなった高血糖状態は CYP7A1 発現増加を介して総胆汁酸合成量を押し上げる事で  $12\alpha\text{OH}$  増加に寄与している経路が想定できる。また、肝臓で non- $12\alpha\text{OH}$  の合成に関与する STAR 発現の低下も  $12\alpha\text{OH}$  産生の増大につながり得る (Qiu et al., 2017)。

食事も NAFLD の発症と密接に関連しており、特定の食事要因が  $12\alpha\text{OH}$  濃度上昇に関与する可能性もある。過去の文献から食事との関係性を整理する場合に注意すべき点は、コントロール

群の食餌設定に問題があるが故に間違っ了解釈を生む危険性もある事だ (Dalby et al., 2017; Mandić & Blaut, 2018)。例えば、HFD 試験で対照群として頻繁に使用される固形飼料の中には、植物由来の食物繊維やミネラル、動物由来のタンパク質が豊富に含まれる場合が多い (Warden & Fisler, 2008)。対照群と比較して、HFD 群では脂肪量と炭水化物の変動以外にも、これらの複数の要因が変動しており、正確な解釈が難しい例が散見される (Warden & Fisler, 2008)。この場合、当然解釈は複雑になり、食餌要因を正確に評価できているとは到底思えない。これらの試験条件の確認を怠らずに文献を注意深く比べ、正確に解釈をする必要がある。この点、本研究は一貫してコントロール食として AIN93G をベースに、群間で変動する食事要因が最小限になるように設定した。

ヒトでも HFD を与えると糞中の  $12\alpha\text{OH}$  濃度が上昇する事を考えると (Wan et al., 2019)、脂肪は  $12\alpha\text{OH}$  を増加させる食事要因として有力な候補になる。ただし、多価不飽和脂肪酸を豊富に含む魚油の摂取では胆汁中 TCA 濃度に変化がない一方で、飽和脂肪酸を豊富に含む食事を与えると TCA 濃度が増加する事から (Devkota et al., 2012)、単純な総脂肪摂取量ではなく特定の脂肪酸、もしくはその組み合わせが重要になるように見える。また、本研究で用いた HFD と同様に、飽和脂肪酸を豊富に含む食事はコレステロールも同時に比較的多量に摂取することになる。実際、NAFLD 患者は飽和脂肪酸のみならずコレステロールの摂取量が健常者に比べて多い事が報告されており (Musso et al., 2003)、コレステロールは胆汁酸合成の前駆体となることから、候補として有力である。飽和脂肪酸のみならず、コレステロールの関係も切り分けて調べるアプローチが重要と考えられる。

また、NAFLD 患者は健常なヒトに比べ飽和脂肪酸やコレステロールのみならず (Musso et al., 2003)、フルクトース (Ouyang et al., 2008) や動物肉 (Zelber-Sagi et al., 2007) を多く摂取している。ヒト介入試験によりフルクトース (Stanhope et al., 2009)、高タンパク食 (Charidemou et al., 2019) を摂取させると肝臓脂質および血漿中脂質濃度が増大する。両者の脂肪肝発症を  $12\alpha\text{OH}$  が媒介する可能性があるが、スクロース食をラットに与えると糞中の  $12\alpha\text{OH}$  濃度が上昇するものの (Caderni et al., 1993)、高タンパク食の場合は糞中胆汁酸排泄に影響は見られない (Cummings et al., 1979; Reddy, 1981)。ただし、タンパク質に関しても特定のアミノ酸や HFD との組み合わせが  $12\alpha\text{OH}$  の増大に関与する可能性もある。糖や脂肪、タンパク質といった大枠の切

り分けに始まり、特定の種類の栄養素が  $12\alpha\text{OH}$  に及ぼす影響を相互作用も含めて紐解いて行く必要がある。

## ② $12\alpha\text{OH}$ が SREBP1 遺伝子発現を上昇させる機構

インスリンは肝臓 SREBP1 遺伝子発現を上昇させる因子として有名だが、CA 摂取では絶食時の血中インスリンおよびグルコース濃度に変化は起きないため (Lee et al., 2020)、インスリンの関与はないように見える。しかしながら、 $12\alpha\text{OH}$  は肝臓 SREBP1 遺伝子発現上昇に関わるインスリンシグナルを強化する事に関与する可能性がある。インスリンによる SREBP1 の活性化には LXR が必須であり (Chen et al., 2004)、ヒト NAFLD の肝臓 LXR の遺伝子発現が健常者と比較して 4 倍に増加する事が報告されている (Higuchi et al., 2008)。興味深いことに、CA 摂取は肝臓において LXR のリガンドになる  $4\beta$  酸化コレステロール ( $4\beta$ -hydroxycholesterol,  $4\beta\text{OH}$ ) 濃度を上昇させる (Lee et al., 2020)。 $4\beta\text{OH}$  は強力な LXR のアゴニストであり、猿由来の腎臓細胞に LXR を発現させて行った試験では  $\text{EC}_{50}$  が  $10\text{ }\mu\text{M}$  程度と報告されている (Janowski et al., 1996)。CA 摂取ラットの肝臓  $4\beta\text{OH}$  は約  $6.6\text{ mM}$  まで上昇するため (肝臓の水分率を 75% と仮定) (Lee et al., 2020)、種差や臓器の差を考慮しても LXR が活性化されている可能性は高い。高インスリン血症による DNL 亢進が疑われる背後で (Smith et al., 2020)、 $12\alpha\text{OH}$  が LXR 活性化を介してインスリン誘導性の SREBP1 発現上昇を底上げしているかもしれない。

栄養素に応答して SREBP1 を制御する哺乳類ラパマイシン標的タンパク (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1) (Bakan & Laplante, 2012) も上記の仮説に絡む可能性がある。mTORC1 が SREBP1 を活性化させる機構の全貌は明らかではないものの (Bakan & Laplante, 2012)、LXR 同様にインスリン誘導性の SREBP1 発現には mTORC1 が必須であると報告されている (Li et al., 2010)。特筆すべきは、マウスにおいて CYP8B1 を過剰発現させると  $12\alpha\text{OH}$  産生の増加に伴って mTORC1 の発現が増大し、SREBP1 発現が上昇する点だ (Pathak & Chiang, 2019)。 $12\alpha\text{OH}$  はセラミド産生の増加を介して mTORC1 を活性化させると指摘されているが (Pathak & Chiang, 2019)、詳細な機構は明らかではない。mTORC1 を活性化させる因子として考慮すべき重要な因子の 1 つはアミノ酸である (Sancak et al., 2008)。興味深いことに、肝臓においてアミノ酸が代表的な  $12\alpha\text{OH}$  である TCA の取り込みを阻害する事が報告されている

(Bucuvalas et al., 1985)。逆説的に考えれば、TCA 濃度の増加が肝臓中アミノ酸濃度を上昇させる何らかの機構が存在していても不思議ではない。NAFLD 患者の血中では特定のアミノ酸濃度が上昇すると報告されており(Goffredo et al., 2017)、TCA は肝臓アミノ酸代謝調節を介して mTORC1 を活性化させる可能性がある。インスリン依存的・非依存的な経路いずれにせよ、 $12\alpha\text{OH}$  は LXR および mTORC1 経路の複合的な調節を介して SREBP1 発現を上昇させるのかもしれない。

### ③ *SREBP1* の下流の *FASN* および *ACC* 遺伝子発現が変動しない理由

CA 摂取群では、肝臓 SREBP1 の遺伝子発現上昇が観察された一方で、下流の DNL に関わる遺伝子発現 (*FASN*、*ACLY*) には変化が無かった (データは示していない)。興味深いことに食餌誘導性肥満マウスにおいて、明期の肝臓 *FASN* や *ACC* 遺伝子発現はコントロールと比較してもほぼ同レベルな一方で、暗期において顕著に増加する周期的な動きを見せることが報告されている (Guan et al., 2018)。本研究の解剖は全て明期に行っており (午前 10 時から 3 時間以内に完了)、この回収タイミングによって下流遺伝子の発現上昇が見られなかった可能性はある。ラットの食餌摂取の大部分は夜間に行われており、明期における食餌摂取量は暗期のわずか 10 分の 1 であるため (Hira et al., 2018)、何らかの食後応答因子が関与するかもしれない。例えば、SREBP1 の重要な調節タンパク質、インスリン誘導遺伝子 2 (insulin induced gene 2A、*INSIG2A*) は小胞体の SREBP 切断活性化タンパク質 (sterol regulatory element binding protein cleavage activating protein cleavage activating protein、*SCAP*)/SREBP 複合体を安定化させる事で SREBP1 の核内移行を阻害する役割がある (Yabe et al., 2002)。そのため、SREBP1 の転写が行われても *INSIG2A* により *SCAP*/SREBP 複合体を形成された状態では、SREBP1 が核内に移る事ができず下流の DNL の遺伝子発現は上昇しない。*INSIG2A* を抑制する事で SREBP1 核内移行を促進する重要因子はインスリンであるため (Haas et al., 2012)、明期はインスリンシグナルが不足しているが故に明期 (概ね絶食時) の肝臓では SREBP1 の遺伝子発現が上昇しても下流の DNL 関連遺伝子発現は変動せず、暗期 (食後) に増加する周期的な動きを見せるのかもしれない。

また、細胞内のエネルギー状態は肝臓脂質合成の制御と密接に関係しており、DNL 関連酵素発現に変動が無くとも、細胞内エネルギー状態、特に DNL に必須である ATP および NADPH の存在量に応じて DNL は変化する。興味深いことに、肝臓脂質合成を抑制する薬剤メトホルミンは、

SREBP1 および FASN を過剰発現させた状態であっても、細胞内 ATP 濃度を減少させることで肝臓 DNL を抑制し、同様の作用がミトコンドリア複合体 1 阻害による緩やかな ATP 産生抑制でも確認できる (Loubière et al., 2015)。すなわち、例え脂質合成に関わる酵素の発現量が十分にあって、ATP が不十分であれば DNL は抑制される。逆説的に考えれば、ATP や NADPH の濃度が上昇すれば、肝臓 DNL に関わる発現量に変化がないとしても肝臓 DNL が亢進する可能性がある。NADPH と NADH の正確な測定は難しく、測定法や結果の解釈に十分に注意する必要があるが (Masia et al., 2018) これらの因子を丁寧に押さえた上で、 $12\alpha$  OH による DNL への影響を考える必要がある。

#### ④ $12\alpha$ OH 誘導性の DNL に使われる基質

DNL は肝臓脂肪蓄積の主要な要因である (Smith et al., 2020)。CA 群はコントロールと比較しても摂取エネルギー量に変化がないことから (Table 2-2)、何らかの基質を使って肝臓 DNL が積極的に行われていると考えられる。このとき、DNL で積極的に使われると想定される基質はグルコース、フルクトース、酢酸、そしてアミノ酸である (Wallace & Metallo, 2020)。1 つ目の候補、グルコースは解糖系を経てトリカルボン酸サイクルに入った後、過剰なグルコースがアセチル CoA へと変換された後に脂肪酸合成へと向かう。13 週間の CA 摂取ラットでも絶食後血糖値に変化は起きないが (Lee et al., 2020)、2 週間の CA 摂取試験で解剖時の肝臓中グルコース濃度の上昇を見出している (データは示していない)。肝臓局所的に糖取り込みが促進され、グルコースが DNL の基質として積極的に使われている可能性がある。 $12\alpha$  OH は細胞実験で基底膜側から GLP-1 分泌を促すことが報告されており (Brighton et al., 2015; Katsuma et al., 2005)、分子種を個別に見ると、体内で最も豊富な  $12\alpha$  OH である TCA は  $100\ \mu\text{M}$  で GLP-1 分泌を促進する (Brighton et al., 2015)。CA 摂取ラットにおける門脈血中の TCA 濃度は  $20\text{--}80\ \mu\text{M}$  (Figure 2-1D) であることから、より低濃度で作用するかは不明だが GLP-1 分泌に関与する可能性はある。GLP-1 は肝臓における糖取り込みを促進する事から (Dardevet et al., 2004)、 $12\alpha$  OH が GLP-1 を媒介物質として肝臓糖取り込みを促進する経路が想定できる。あるいは、CA 摂取により肝臓中グルコース濃度上昇にともなってピルビン酸および乳酸濃度の上昇も起こる事から (データは示していない)、肝臓インスリン作用の強化による解糖系の亢進が肝臓グルコース取込み促進の駆動因子となっている可能性も考えられ

る。CA 摂取ラットにおける GLP-1 分泌が実際に増加しているのか、GLP-1 が本当に肝臓糖取り込みを促進するのか、インスリンの関与はあるのか、ヒト NAFLD で頻繁に観察されるインスリン抵抗性との矛盾をどう説明するのか等、課題は複数あるが、 $12\alpha\text{OH}$  が直接的あるいは GLP-1 やインスリンを介した肝臓糖取り込みの促進によってグルコースを DNL 基質として提供しているかもしれない。

2 つ目の候補はフルクトースである。グルコース代謝に関わるホスホフルクトキナーゼと異なり (Kagimoto & Uyeda, 1979)、肝臓でフルクトースを代謝するケトヘキソキナーゼ C (ketohexokinase C、KHKC) は ATP によるネガティブフィードバックを受けないため (Adelman et al., 1967)、摂取後組織に素早く取り込まれ、速やかに血中から消失する (Jang et al., 2018)。代謝速度の速さに起因する DNL 基質へのなりやすさに加え、肝臓の脂質合成関連の酵素を刺激することからも、フルクトースは脂肪肝の原因物質の 1 つと考えられている (Samuel, 2011)。従来、フルクトースは小腸を速やかに通り抜け肝臓が大部分を代謝すると考えられていたが、最近の研究では小腸が第一段階としてフルクトース代謝を行った上で、その代謝能力を超えた分が肝臓や結腸に流れ込むことが明らかになってきた (Jang et al., 2018, 2020)。この発見を発端にフルクトース誘導性 DNL の機序はより複雑に捉えられるようになり、① 肝臓特異的な KHKC 欠損がフルクトース誘導性の肝臓脂肪蓄積を抑制する (Andres-Hernando et al., 2020) ② 無菌マウスではフルクトースを与えると肝臓 SREBP1 遺伝子発現が上昇するものの、肝臓脂肪蓄積が起きない (Kaden-Volynets et al., 2019) ③ フルクトースの腸内細菌代謝物、酢酸が DNL の効率的な基質となる (Zhao et al., 2020) (次段落で詳細を述べる) ことから、(1) フルクトースもしくはその肝臓代謝物が肝臓 DNL 関連酵素の発現上昇を引き起こす (2) 腸内細菌が生成するフルクトース由来の酢酸が DNL の基質を提供する、2 つの経路の両者が揃うことでより強力に肝臓脂肪蓄積効果を発揮すると考えられている (Zhao et al., 2020)。驚くべき事に、CA 摂取ラットではコントロールと同等のフルクトースを摂取しているにも関わらず (3.5% wt/wt、スクロース由来)、肝臓フルクトース濃度および門脈血中酢酸濃度が上昇しており (データは示していない)、 $12\alpha\text{OH}$  が小腸フルクトース代謝を調節する事で肝臓や結腸に流れ込むフルクトース量を増加させる経路を示唆している。NAFLD 患者ではフルクトース吸収量が多く (Sullivan et al., 2015)、フルクトース摂取時の血中脂質増加応答がより強いと報告されており (Jin et al., 2012)、 $12\alpha\text{OH}$  の関与が疑われる。



3 つ目の候補はフルクトースの腸内細菌代謝物の 1 つ、酢酸である。グルコースが脂肪酸合成の前駆体になるアセチル CoA に変換されるまでに複数のステップを要する一方、酢酸はアセチル CoA シンテターゼ 2 (acetyl-CoA synthetase 2、ACSS2) による 1 ステップでアセチル CoA が合成できる。従来、フルクトース自体が DNL の基質に組み込まれると考えられていたが、最近の知見ではフルクトースが腸内細菌に代謝されて生成した酢酸が極めて効率的に DNL に使用されることが分かってきた (Zhao et al., 2020)。興味深いことに、CA 添加食の摂取によって腸内細菌叢組成が変化し、盲腸内酢酸濃度に変化はないものの酢酸生成菌である *Blautia* が顕著に増加し (Lee et al., 2020)、門脈血中の酢酸濃度が上昇する (データは示していない)。上述した仮説と組み合わせると、 $12\alpha\text{OH}$  により何らかの機構で結腸に流れ込んだフルクトースを *Blautia* が代謝する事で、大腸から到達する酢酸が増大し、DNL に寄与する経路が想定できる。

最後の候補はアミノ酸である。興味深い事に、CA 摂取ラット肝臓で複数のアミノ酸濃度が上昇する事を見出しており (データは示していない)、文献を眺めると分岐鎖アミノ酸 (branched chain amino acid、BCAA) が脂肪組織においてアセチル CoA の炭素源として 30% 近くを供給すること (Green et al., 2016; Wallace & Metallo, 2020)、グルタミン酸が低酸素下において脂肪酸合成に積極的に使われる事が報告されている (Metallo et al., 2012)。また、ヒトにおいてグルタミン酸を豊富に含んだ高タンパク食を与えると肝臓 DNL が亢進する (Charidemou et al., 2019)。すなわち、特定のアミノ酸が  $12\alpha\text{OH}$  による肝臓 DNL に積極的に使われる可能性はある。アミノ酸が肝臓における  $12\alpha\text{OH}$  の取込みを阻害する事 (Bucuvalas et al., 1985)、遺伝的肥満 Zucker ラットでは、肝臓アミノ酸取り込みが通常に比べて 2 倍高い事 (Ruiz et al., 1991)、NAFLD 患者の血中では BCAA を中心にアミノ酸濃度が上昇する事 (Goffredo et al., 2017) 等の報告も  $12\alpha\text{OH}$  とアミノ酸代謝との関連性を示唆する。一方、ガン培養細胞を用いてグルタミン酸などの特定のアミノ酸が脂肪細胞や肝細胞において DNL の重要な基質となることを示した報告は複数あるものの (Charidemou et al., 2019; Dai et al., 2020; Green et al., 2016; Metallo et al., 2012)、正常な肝細胞におけるアミノ酸の DNL への寄与は明らかでないため、動物もしくは初代細胞を用いた検証が必要になる。

### ⑤ 12 $\alpha$ OH 誘導性脂肪肝における腸内細菌の寄与

上述したフルクトースと酢酸の話題を考慮すると、腸内細菌の栄養素代謝、特にフルクトース代謝が 12 $\alpha$ OH による肝臓脂肪蓄積に関与する可能性がある。第 3 章では、VCM を投与することで腸内細菌による 12 $\alpha$ OH 代謝を抑制しても肝臓脂肪蓄積への影響はなかった。しかしながら、VCM の主要な標的はグラム陽性菌であり、腸内細菌全体を消去したわけではない。仮に先に述べた酢酸が肝臓 DNL の基質として積極的に使われているとすれば、複数の抗生物質を混合した飲用水を与えて腸内細菌全体を消去した状態で試験を行えば、肝臓脂肪蓄積の抑制が観察できる可能性はある。仮に酢酸生成の影響がないとしても、CA 添加食の摂取で腸内細菌叢組成は大きく変化することから (Lee et al., 2020)、菌叢変化による影響を観察できる。腸内細菌のフルクトース代謝の関与が疑われるのであれば、高フルクトース食をベースに CA 食を与える摂取試験や、CA 摂取させたラットにおいてフルクトースを経口摂取し、門脈血や盲腸内フルクトース濃度を経時的に測定する事で 12 $\alpha$ OH とフルクトース代謝の関係性を明らかに出来るかもしれない。

### ⑥ 12 $\alpha$ OH 誘導性の肝臓鉄濃度低下の脂肪肝への関与

CA 添加食は肝臓鉄濃度と負の相関を示して脂肪肝を引き起こし (第 2 章)、MID が HS 摂取下において肝臓 TG 濃度を有意に上昇させたことから (第 3 章)、12 $\alpha$ OH が肝臓鉄濃度の低下というユニークな機構で肝臓脂肪蓄積を促進する事が示唆された。HS+MID 群において肝臓 FASN 遺伝子発現の上昇 (Figure 3-4G)、重度鉄欠乏ラットにおける肝臓 DNL の亢進が観察されており (Sherman, 1978)、CA 摂取における肝臓鉄濃度低下は DNL 亢進に寄与するかもしれない。また、肝臓培養細胞を用いた実験では、鉄キレート剤デフェロキサミンがインスリン感受性の亢進および肝臓糖取り込み (Dongiovanni et al., 2008)、LDL 取込み (Guillemot et al., 2016) を促進する事が報告されており、DNL 基質の供給や血中リポたんぱく質の取込に関与する経路も想定できる。こうした肝臓鉄濃度の低下が肝臓脂質蓄積に寄与する事が示唆される一方、HS 摂取下における MID の肝臓 TG 増加量 (Figure 3-4A) は第 2 章で観察した CA 誘導性の脂肪肝 (Figure 2-2A) に比べると比較的少なかった。肝臓鉄濃度低下の寄与は小さい、もしくは 12 $\alpha$ OH の存在下においてのみ強力に肝臓脂質蓄積を促進するのかもしれない。また、現段階では CA 摂取ラットにおける肝臓鉄濃度低下と脂肪肝の因果関係を明らかに出来ていないため、食餌中铁濃度を緩やかに増加させた飼料を

ベースに CA 食を作成することで肝臓鉄濃度の低下を回復させ、肝臓脂質蓄積が抑制されるかどうかを検証する必要がある。または、逆に食餌中鉄濃度を低下させた飼料をベースに用いることで CA 食による肝臓脂質蓄積が増大するかどうかの検証も有効だろう。

#### ⑦ $12\alpha\text{OH}$ による食事脂肪吸収増加の脂肪肝への寄与

HFD 摂取では  $12\alpha\text{OH}$  増大に伴って見掛けの脂質吸収量は増加し (第 1 章)、CA 摂取でも糞中脂質排泄量が減少する事を見出した (第 2 章)。ヒト NAFLD において食事脂肪吸収と肝臓脂肪蓄積の関係性を直接的に評価した例はないが、食事脂肪の肝臓脂肪蓄積への寄与は約 15% 程度と見積もられており (Donnelly et al., 2005)。摂取食事エネルギー量に変動がなくとも、脂質吸収量が増大すれば部分的には肝臓脂肪蓄積に寄与すると考えられる。実際に、動物モデルを用いた実験では *Cyp8b1* KO による  $12\alpha\text{OH}$  の低下が脂肪吸収量の低下にともなって肝臓脂肪蓄積が低下する事 (Bertaggia et al., 2017)、マウスで *Asbt* KO により胆汁酸再吸収の阻害により脂肪吸収量が低下する事が報告されている (Peppel et al., 2020)。HFD 誘導性  $12\alpha\text{OH}$  増大に伴った見掛けの脂質吸収率の増加はコントロールと比べてわずか 1.4% 程度だが (control:  $96.1\% \pm 1.4\%$  vs HFD:  $97.5\% \pm 0.4\%$ ,  $P = 0.014$ )、HFD 群が摂取する一日約 4 g の脂質 (Figure 1-7A) のうち 40 mg に相当する。これが仮に 1 ヶ月続けば 1200 mg の脂肪が体内に多く留まる計算になり、HFD 摂取による肝臓総 TG 量の増加量、約 1700 mg (control : 464 mg/liver vs CA : 2166 mg/liver) の大部分を説明できる。同様に、CA 摂取による糞中脂肪酸排泄量は一日あたり約 7.7 mg 減少しており (Figure 2-3A)、仮に試験期間 (13 週間) この差が続いたと仮定した場合、合計約 700 mg の脂質が CA 摂取でより多く体内に留まった計算になる。こちらも CA 摂取による肝臓総 TG 量の増加量、約 800 mg (control : 417 mg/liver vs CA : 1250 mg/liver) の大部分を説明できる。当然のことながら、見かけの脂質吸収率や糞中脂肪酸排泄量は試験期間の最終日に算出した数字であるため、糞中脂肪酸排泄量は試験期間の初期では差がより小さい可能性もある。また、吸収された脂肪は脂肪組織を含めた全身に分配されるため、実際の肝臓への寄与はさらに数分の一程度に下がるだろう。しかしながら、 $12\alpha\text{OH}$  は循環血と比較して門脈血中では 10 倍近い高濃度で存在するため (Figure 1-2)、肝臓特異的な作用で食後血中脂肪の取込みを促進する何らかの機構が働いていても不思議ではなく、実際に CYP8B1 を過剰発現させたマウス肝細胞では脂肪酸取り込みが促進することが報告されている

(Pathak & Chiang, 2019)。また、DNL 同様にインスリンは肝臓におけるキロミクロン取込みを促進する働きがあることから (Laatsch et al., 2009)、 $12\alpha\text{OH}$  により肝臓インスリンシグナルの活性化がここでも関与する可能性がある。

### ⑧ $12\alpha\text{OH}$ は NASH 進行に関与するか

$12\alpha\text{OH}$  で誘導される諸症状は肝臓脂肪蓄積や軽度の肝傷害に留まり (第 2 章)、明確な炎症や繊維化といった NASH 特有の症状は観察されない (Lee et al., 2020)。少なくとも  $12\alpha\text{OH}$  単体では NASH 進行には不十分である事が示唆される。しかしながら、ヒトにおいて単純に肝臓に脂肪が蓄積した単純性脂肪肝よりも炎症をともなった NASH では胆汁酸濃度がより顕著に増加しており (Chashmniyam et al., 2019; Mouzaki et al., 2016; Puri et al., 2018)、 $12\alpha\text{OH}$  濃度の上昇は何らかの形で関わっているだろう。実際、CA 添加食を与えたラットにリポ多糖を腹腔内投与すると、コントロールへの投与に比べて血中 ALT、AST 活性が顕著に増加する (Lee et al., 2020)。NASH の発症には単一要因ではなく複数の要因が同時並行的に起こる想定機序 “Multiple hit theory” (Buzzetti et al., 2016) が提唱される中、特に重要と考えられているインスリン抵抗性や炎症反応、小胞体ストレス、酸化ストレス、ミトコンドリア傷害等 (Buzzetti et al., 2016) との組み合わせにおいて  $12\alpha\text{OH}$  が関与するかもしれない。食事要因の側面からも、HFD+HS を用いた動物実験では、顕著な肝臓脂肪蓄積や HFD 単独では見られない繊維化や炎症が起こる (Ishimoto et al., 2013)。HFD で  $12\alpha\text{OH}$  が増加する前提で考えた場合、 $12\alpha\text{OH}$  とフルクトースの相互作用により NASH 進行に関与する経路も想定できる。

以上、本研究の成果と過去の知見を複合的に纏めると、 $12\alpha\text{OH}$  が腸内細菌による二次胆汁酸生成とは無関係に、インスリン依存的/非依存的な機構の両方で LXR および mTORC1 の活性化、それに続く SREPB1 の発現上昇を引き起こし、グルコースやフルクトース、酢酸、そしてアミノ酸等の多様な栄養素を基質に DNL を亢進する機構を提示できた。肝臓鉄濃度の低下は再現性良く脂肪肝と逆相関して観察される事象であることから、いずれかの作用を媒介する可能性もある。また、DNL とは独立して、食餌脂肪吸収を促進することでも肝臓脂肪蓄積を更に押し上げる機構も示唆された。 $12\alpha\text{OH}$  と肝臓脂肪蓄積に焦点を当てた基盤研究から、両者の因果関係や腸内細菌を含め

た媒介因子を複数提供した本研究の成果が、NAFLD 発症機構の新たな側面と深い理解、NAFLD の新規予防・治療策のアプローチの確立に繋がると期待できる。

## 引用文献

- Achilladelis, B. (1993). The dynamics of technological innovation: The sector of antibacterial medicines. *Research Policy*, 22(4), 279–308.
- Adelman, R. C., Ballard, F. J., & Weinhouse, S. (1967). Purification and properties of rat liver fructokinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 242(14), 3360–3365.
- Ahmed, U., & Oates, P. S. (2013). Dietary fat level affects tissue iron levels but not the iron regulatory gene HAMP in rats. *Nutrition Research*, 33(2), 126–135.
- Akiyoshi, T., Uchida, K., Takase, H., Nomura, Y., & Takeuchi, N. (1986). Cholesterol gallstones in alloxan-diabetic mice. *Journal of Lipid Research*, 27(9), 915–924.
- Alwan, A. (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010. *World Health Organization*.
- Andres-Hernando, A., Orlicky, D. J., Kuwabara, M., Ishimoto, T., Nakagawa, T., Johnson, R. J., & Lanaspa, M. A. (2020). Deletion of fructokinase in the liver or in the intestine reveals differential effects on sugar-induced metabolic dysfunction. *Cell Metabolism*, 32(1), 117–127.e3.
- Angulo, P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England Journal of Medicine*, 346(16), 1221–1231.
- Bakan, I., & Laplante, M. (2012). Connecting mTORC1 signaling to SREBP-1 activation. *Current Opinion in Lipidology*, 23(3), 226–234.
- Bartholmey, S. J., & Sherman, A. R. (1985). Carnitine levels in iron-deficient rat pups. *The Journal of Nutrition*, 115(1), 138–145.
- Bennett, J. W., & Chung, K. T. (2001). Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Advances in Applied Microbiology*, 49, 163–184.
- Bertaggia, E., Jensen, K. K., Castro-Perez, J., Xu, Y., Di Paolo, G., Chan, R. B., Wang, L., & Haeusler, R. A. (2017). Cyp8b1 ablation prevents Western diet-induced weight gain and hepatic steatosis because of impaired fat absorption. *American Journal of Physiology*

*Endocrinology and Metabolism*, 313(2), E121–E133.

- Bertino, J., Aroche, C., Plouffe, L. J., Lee, M., Murtaza, Z., Kenney, L., Laverne, C., & Aziz, A. (2014). Diet-induced obese rats have higher iron requirements and are more vulnerable to iron deficiency. *European Journal of Nutrition*, 53(3), 885–895.
- Biddinger, S. B., Haas, J. T., Yu, B. B., Bezy, O., Jing, E., Zhang, W., Unterman, T. G., Carey, M. C., & Kahn, C. R. (2008). Hepatic insulin resistance directly promotes formation of cholesterol gallstones. *Nature Medicine*, 14(7), 778–782.
- Black, M. M. (2003). Micronutrient deficiencies and cognitive functioning. *The Journal of Nutrition*, 133(11), 3927S–3931S.
- Bloch, K., Berg, B. N., Rittenberg, D., & Others. (1943). The biological conversion of cholesterol to cholic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 149.
- Brighton, C. A., Rievaj, J., Kuhre, R. E., & Glass, L. L. (2015). Bile acids trigger GLP-1 release predominantly by accessing basolaterally located G protein–coupled bile acid receptors. *Endocrinology*, 156(11), 3961–3970.
- Britton, L., Bridle, K., Reiling, J., Santrampurwala, N., Wockner, L., Ching, H., Stuart, K., Subramaniam, V. N., Jeffrey, G., St Pierre, T., House, M., Gummer, J., Trengove, R., Olynyk, J., Crawford, D., & Adams, L. (2018). Hepatic iron concentration correlates with insulin sensitivity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Communications*, 2(6), 644–653.
- Brownlie, T., 4th, Utermohlen, V., Hinton, P. S., Giordano, C., & Haas, J. D. (2002). Marginal iron deficiency without anemia impairs aerobic adaptation among previously untrained women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(4), 734–742.
- Brownlie, T., 4th, Utermohlen, V., Hinton, P. S., & Haas, J. D. (2004). Tissue iron deficiency without anemia impairs adaptation in endurance capacity after aerobic training in previously untrained women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(3), 437–443.
- Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2008). Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metabolism*, 7(2), 95–96.
- Bucvalas, J. C., Goodrich, A. L., Blitzer, B. L., & Suchy, F. J. (1985). Amino acids are potent



- inhibitors of bile acid uptake by liver plasma membrane vesicles isolated from suckling rats. *Pediatric Research*, 19(12), 1298–1304.
- Buettner, R., Parhofer, K. G., Woenckhaus, M., Wrede, C. E., Kunz-Schughart, L. A., Schölmerich, J., & Bollheimer, L. C. (2006). Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36(3), 485–501.
- Bugianesi, E., Gastaldelli, A., Vanni, E., Gambino, R., Cassader, M., Baldi, S., Ponti, V., Pagano, G., Ferrannini, E., & Rizzetto, M. (2005). Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia*, 48(4), 634–642.
- Buzzetti, E., Pinzani, M., & Tsochatzis, E. A. (2016). The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism: Clinical and Experimental*, 65(8), 1038–1048.
- Caderni, G., Dolara, P., Spagnesi, T., Luceri, C., Bianchini, F., Mastrandrea, V., & Morozzi, G. (1993). Rats fed high starch diets have lower colonic proliferation and fecal bile acids than high sucrose-fed controls. *The Journal of Nutrition*, 123(4), 704–712.
- Carey, M. C., & Small, D. M. (1969). Micellar properties of dihydroxy and trihydroxy bile salts: effects of counterion and temperature. *Journal of Colloid and Interface Science*, 31(3), 382–396.
- Chalasani, N., Gorski, J. C., Asghar, M. S., Asghar, A., Foresman, B., Hall, S. D., & Crabb, D. W. (2003). Hepatic cytochrome P450 2E1 activity in nondiabetic patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 37(3), 544–550.
- Charidemou, E., Ashmore, T., Li, X., McNally, B. D., & West, J. A. (2019). A randomized 3-way crossover study indicates that high-protein feeding induces de novo lipogenesis in healthy humans. *JCI Insight*, 4(12), e124819.
- Chashmian, S., Ghafourpour, M., Rezaei Farimani, A., Gholami, A., & Nobakht Motlagh Ghoochani, B. F. (2019). Metabolomic biomarkers in the diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatitis Monthly*, 19(9), e92244.
- Chen, G., Liang, G., Ou, J., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2004). Central role for liver X

receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(31), 11245–11250.

Cherrington, A. D. (1999). Banting Lecture 1997. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. *Diabetes*, 48(5), 1198–1214.

Chiang, J. Y. L. (2009). Bile acids: regulation of synthesis. *Journal of Lipid Research*, 50(10), 1955–1966.

Chung, H., Wu, D., Smith, D., Meydani, S. N., & Han, S. N. (2016). Lower hepatic iron storage associated with obesity in mice can be restored by decreasing body fat mass through feeding a low-fat diet. *Nutrition Research*, 36(9), 955–963.

Chung, J., Kim, M. S., & Han, S. N. (2011). Diet-induced obesity leads to decreased hepatic iron storage in mice. *Nutrition Research*, 31(12), 915–921.

Cummings, J. H., Hill, M. J., Jivraj, T., Houston, H., Branch, W. J., & Jenkins, D. J. (1979). The effect of meat protein and dietary fiber on colonic function and metabolism. I. Changes in bowel habit, bile acid excretion, and calcium absorption. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 32(10), 2086–2093.

Cutler, D., Deaton, A., & Lleras-Muney, A. (2006). The determinants of mortality. *The Journal of Economic Perspectives*, 20(3), 97–120.

Dai, W., Xu, L., Yu, X., Zhang, G., Guo, H., Liu, H., Song, G., Weng, S., Dong, L., Zhu, J., Liu, T., Guo, C., & Shen, X. (2020). OGDHL silencing promotes hepatocellular carcinoma by reprogramming glutamine metabolism. *Journal of Hepatology*, 72(5), 909–923.

Dalby, M. J., Ross, A. W., Walker, A. W., & Morgan, P. J. (2017). Dietary uncoupling of gut microbiota and energy harvesting from obesity and glucose tolerance in mice. *Cell Reports*, 21(6), 1521–1533.

Dardevet, D., Moore, M. C., Neal, D., DiCostanzo, C. A., Snead, W., & Cherrington, A. D. (2004). Insulin-independent effects of GLP-1 on canine liver glucose metabolism: duration of infusion and involvement of hepatoportal region. *American Journal of Physiology*.

*Endocrinology and Metabolism*, 287(1), E75–E81.

Davis, M. R., Hester, K. K., Shawron, K. M., Lucas, E. A., Smith, B. J., & Clarke, S. L. (2012).

Comparisons of the iron deficient metabolic response in rats fed either an AIN-76 or AIN-93 based diet. *Nutrition & Metabolism*, 9(1), 95.

Davis, M. R., Rendina, E., Peterson, S. K., Lucas, E. A., Smith, B. J., & Clarke, S. L. (2012).

Enhanced expression of lipogenic genes may contribute to hyperglycemia and alterations in plasma lipids in response to dietary iron deficiency. *Genes & Nutrition*, 7(3), 415–425.

de Aguiar Vallim, T. Q., Tarling, E. J., & Edwards, P. A. (2013). Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metabolism*, 17(5), 657–669.

Devireddy, L. R., Gazin, C., Zhu, X., & Green, M. R. (2005). A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*, 123(7), 1293–1305.

Devkota, S., Wang, Y., Musch, M. W., Leone, V., Fehlner-Peach, H., Nadimpalli, A.,

Antonopoulos, D. A., Jabri, B., & Chang, E. B. (2012). Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in *Il10*<sup>-/-</sup> mice. *Nature*, 487(7405), 104–108.

Diraison, F., Yankah, V., Letexier, D., Dusserre, E., Jones, P., & Beylot, M. (2003). Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans. *Journal of Lipid Research*, 44(4), 846–853.

Dongiovanni, P., Lanti, C., Gatti, S., Rametta, R., Recalcati, S., Maggioni, M., Fracanzani, A. L.,

Riso, P., Cairo, G., Fargion, S., & Valenti, L. (2015). High fat diet subverts hepatocellular iron uptake determining dysmetabolic iron overload. *PloS One*, 10(2), e0116855.

Dongiovanni, P., Valenti, L., Ludovica Fracanzani, A., Gatti, S., Cairo, G., & Fargion, S. (2008).

Iron depletion by deferoxamine up-regulates glucose uptake and insulin signaling in hepatoma cells and in rat liver. *The American Journal of Pathology*, 172(3), 738–747.

Donnelly, K. L., Smith, C. I., Schwarzenberg, S. J., Jessurun, J., Boldt, M. D., & Parks, E. J. (2005).

Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1343–1351.

Dornas, W. C., de Lima, W. G., Pedrosa, M. L., & Silva, M. E. (2015). Health implications of high-

fructose intake and current research. *Advances in Nutrition*, 6(6), 729–737.

- Duarte, J. A. G., Carvalho, F., Pearson, M., Horton, J. D., Browning, J. D., Jones, J. G., & Burgess, S. C. (2014). A high-fat diet suppresses de novo lipogenesis and desaturation but not elongation and triglyceride synthesis in mice. *Journal of Lipid Research*, 55(12), 2541–2553.
- Eslam, M., Sanyal, A. J., George, J., & International Consensus Panel. (2020). MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease. *Gastroenterology*, 158(7), 1999–2014.
- Fabbrini, E., Magkos, F., Mohammed, B. S., Pietka, T., Abumrad, N. A., Patterson, B. W., Okunade, A., & Klein, S. (2009). Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15430–15435.
- Fabbrini, E., Mohammed, B. S., Magkos, F., Korenblat, K. M., Patterson, B. W., & Klein, S. (2008). Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 134(2), 424–431.
- Faix, D., Neese, R., Kletke, C., Wolden, S., Cesar, D., Coutlangus, M., Shackleton, C. H., & Hellerstein, M. K. (1993). Quantification of menstrual and diurnal periodicities in rates of cholesterol and fat synthesis in humans. *Journal of Lipid Research*, 34(12), 2063–2075.
- Feingold, K. R., Spady, D. K., Pollock, A. S., Moser, A. H., & Grunfeld, C. (1996). Endotoxin, TNF, and IL-1 decrease cholesterol 7 alpha-hydroxylase mRNA levels and activity. *Journal of Lipid Research*, 37(2), 223–228.
- Foretz, M., Guichard, C., Ferré, P., & Foufelle, F. (1999). Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(22), 12737–12742.
- Foster, D. W. (2012). Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(6), 1958–1959.
- Gangarapu, V., Yıldız, K., Ince, A. T., & Baysal, B. (2014). Role of gut microbiota: obesity and

NAFLD. *The Turkish Journal of Gastroenterology: The Official Journal of Turkish Society of Gastroenterology*, 25(2), 133–140.

Goffredo, M., Santoro, N., Tricò, D., Giannini, C., D'Adamo, E., Zhao, H., Peng, G., Yu, X., Lam, T. T., Pierpont, B., Caprio, S., & Herzog, R. I. (2017). A branched-chain amino acid-related metabolic signature characterizes obese adolescents with non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*, 9(7), 642.

Gonzalez, J. T., & Betts, J. A. (2018). Dietary fructose metabolism by splanchnic organs: Size matters. *Cell Metabolism*, 27(3), 483–485.

Green, C. R., Wallace, M., Divakaruni, A. S., Phillips, S. A., Murphy, A. N., Ciaraldi, T. P., & Metallo, C. M. (2016). Branched-chain amino acid catabolism fuels adipocyte differentiation and lipogenesis. *Nature Chemical Biology*, 12(1), 15–21.

Guan, D., Xiong, Y., Borck, P. C., Jang, C., Doulias, P.-T., Papazyan, R., Fang, B., Jiang, C., Zhang, Y., Briggs, E. R., Hu, W., Steger, D., Ischiropoulos, H., Rabinowitz, J. D., & Lazar, M. A. (2018). Diet-induced circadian enhancer remodeling synchronizes opposing hepatic lipid metabolic processes. *Cell*, 174(4), 831–842.e12.

Guillemot, J., Asselin, M.-C., Susan-Resiga, D., Essalmani, R., & Seidah, N. G. (2016). Deferoxamine stimulates LDLR expression and LDL uptake in HepG2 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(3), 600–608.

Haas, J. T., Miao, J., Chanda, D., Wang, Y., Zhao, E., Haas, M. E., Hirschey, M., Vaitheesvaran, B., Farese, R. V., Jr, Kurland, I. J., Graham, M., Crooke, R., Foufelle, F., & Biddinger, S. B. (2012). Hepatic insulin signaling is required for obesity-dependent expression of SREBP-1c mRNA but not for feeding-dependent expression. *Cell Metabolism*, 15(6), 873–884.

Haeusler, R. A., Astiarraga, B., Camastra, S., & Accili, D. (2013). Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12  $\alpha$  –hydroxylated bile acids. *Diabetes*, 62, 4184–4191.

Haeusler, R. A., Camastra, S., Nannipieri, M., Astiarraga, B., Castro-Perez, J., Xie, D., Wang, L., Chakravarthy, M., & Ferrannini, E. (2016). Increased bile acid synthesis and impaired bile

acid transport in human obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 101(5), 1935–1944.

Haeusler, R. A., Pratt-Hyatt, M., Welch, C. L., Klaassen, C. D., & Accili, D. (2012). Impaired generation of 12-hydroxylated bile acids links hepatic insulin signaling with dyslipidemia. *Cell Metabolism*, 15(1), 65–74.

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(1), 173–180.

Hagio, M., Matsumoto, M., & Ishizuka, S. (2011). Bile acid analysis in various biological samples using ultra performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry (UPLC/ESI-MS). *Methods in Molecular Biology*, 708, 119–129.

Hellerstein, M. K., Christiansen, M., Kaempfer, S., Kletke, C., Wu, K., Reid, J. S., Mulligan, K., Hellerstein, N. S., & Shackleton, C. H. (1991). Measurement of de novo hepatic lipogenesis in humans using stable isotopes. *The Journal of Clinical Investigation*, 87(5), 1841–1852.

Henkel, A. S., LeCuyer, B., Olivares, S., & Green, R. M. (2017). Endoplasmic reticulum stress regulates hepatic bile acid metabolism in mice. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 3(2), 261–271.

Higuchi, N., Kato, M., Shundo, Y., Tajiri, H., Tanaka, M., Yamashita, N., Kohjima, M., Kotoh, K., Nakamuta, M., Takayanagi, R., & Others. (2008). Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 38(11), 1122–1129.

Hira, T., Suto, R., Kishimoto, Y., Kanahori, S., & Hara, H. (2018). Resistant maltodextrin or fructooligosaccharides promotes GLP-1 production in male rats fed a high-fat and high-sucrose diet, and partially reduces energy intake and adiposity. *European Journal of Nutrition*, 57(3), 965–979.

Hodson, L., Bhatia, L., Scorletti, E., Smith, D. E., Jackson, N. C., Shojaee-Moradie, F., Umpleby, M., Calder, P. C., & Byrne, C. D. (2017). Docosahexaenoic acid enrichment in NAFLD is

- associated with improvements in hepatic metabolism and hepatic insulin sensitivity: a pilot study. *European Journal of Clinical Nutrition*, 71(10), 1251.
- Hoes, M. F., Grote Beverborg, N., Kijlstra, J. D., Kuipers, J., Swinkels, D. W., Giepmans, B. N. G., Rodenburg, R. J., van Veldhuisen, D. J., de Boer, R. A., & van der Meer, P. (2018). Iron deficiency impairs contractility of human cardiomyocytes through decreased mitochondrial function. *European Journal of Heart Failure*, 20(5), 910–919.
- Hofmann, A. F. (1999). Bile acids: the good, the bad, and the ugly. *Physiology*, 14, 24–29.
- Hofmann, A. F., & Mysels, K. J. (1988). Bile salts as biological surfactants. *Colloids and Surfaces*, 30(1), 145–173.
- Hori, S., Abe, T., Lee, D. G., 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. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 83, 108412.
- 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.
- Horton, J. D., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2002). SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(9), 1125–1131.
- Hoseinpour Dehkordi, A., Alizadeh, M., Derakhshan, P., Babazadeh, P., & Jahandideh, A. (2020). Understanding epidemic data and statistics: A case study of COVID - 19. *Journal of Medical Virology*, 92(7), 868–882.
- Hylemon, P. B., Zhou, H., Pandak, W. M., Ren, S., Gil, G., & Dent, P. (2009). Bile acids as regulatory molecules. *Journal of Lipid Research*, 50(8), 1509–1520.
- Ioannou, G. N., Rockey, D. C., Bryson, C. L., & Weiss, N. S. (2002). Iron deficiency and gastrointestinal malignancy: a population-based cohort study. *The American Journal of Medicine*, 113(4), 276–280.
- Iroz, A., Montagner, A., Benhamed, F., Levavasseur, F., Polizzi, A., Anthony, E., Régnier, M.,

- Fouché, E., Lukowicz, C., Cauzac, M., Tournier, E., Do-Cruzeiro, M., Daujat-Chavanieu, M., Gerbal-Chalouin, S., Fauveau, V., Marmier, S., Burnol, A.-F., Guilmeau, S., Lippi, Y., ... Postic, C. (2017). A specific ChREBP and PPAR $\alpha$  cross-talk is required for the glucose-mediated FGF21 response. *Cell Reports*, 21(2), 403–416.
- Ishimoto, T., Lanaspá, M. A., Rivard, C. J., Roncal-Jimenez, C. A., Orlicky, D. J., Cicerchi, C., McMahan, R. H., Abdelmalek, M. F., Rosen, H. R., Jackman, M. R., MacLean, P. S., Diggle, C. P., Asipu, A., Inaba, S., Kosugi, T., Sato, W., Maruyama, S., Sánchez-Lozada, L. G., Sautin, Y. Y., ... Johnson, R. J. (2013). High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology*, 58(5), 1632–1643.
- Islam, K. B. M. S., 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(5), 1773–1781.
- Jang, C., Hui, S., Lu, W., Cowan, A. J., Morscher, R. J., Lee, G., Liu, W., Tesz, G. J., Birnbaum, M. J., & Rabinowitz, J. D. (2018). The small intestine converts dietary fructose into glucose and organic acids. *Cell Metabolism*, 27(2), 351–361.e3.
- Jang, C., Wada, S., Yang, S., Gosis, B., Zeng, X., Zhang, Z., Shen, Y., Lee, G., Arany, Z., & Rabinowitz, J. D. (2020). The small intestine shields the liver from fructose-induced steatosis. *Nature Metabolism*, 2(7), 586–593.
- Janowski, B. A., Willy, P. J., Devi, T. R., Falck, J. R., & Mangelsdorf, D. J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR $\alpha$ . *Nature*, 383(6602), 728–731.
- Jiang, S., Yan, K., Sun, B., Gao, S., Yang, X., Ni, Y., Ma, W., & Zhao, R. (2018). Long-term high-fat diet decreases hepatic iron storage associated with suppressing TFR2 and ZIP14 expression in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(44), 11612–11621.
- Jiao, N., Baker, S. S., Chapa-Rodriguez, A., Liu, W., Nugent, C. A., Tsompana, M., Mastrandrea, L., Buck, M. J., Baker, R. D., Genco, R. J., Zhu, R., & Zhu, L. (2018). Suppressed hepatic bile acid signalling despite elevated production of primary and secondary bile acids in NAFLD. *Gut*, 67, 1881–1891.



- Jin, R., Le, N.-A., Liu, S., Farkas Epperson, M., Ziegler, T. R., Welsh, J. A., Jones, D. P., McClain, C. J., & Vos, M. B. (2012). Children with NAFLD are more sensitive to the adverse metabolic effects of fructose beverages than children without NAFLD. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(7), E1088–E1098.
- Jones, D. S., Podolsky, S. H., & Greene, J. A. (2012). The burden of disease and the changing task of medicine. *The New England Journal of Medicine*, 366(25), 2333–2338.
- Kaden-Volynets, V., Basic, M., Neumann, U., Pretz, D., Rings, A., Bleich, A., & Bischoff, S. C. (2019). Lack of liver steatosis in germ-free mice following hypercaloric diets. *European Journal of Nutrition*, 58(5), 1933–1945.
- Kagimoto, T., & Uyeda, K. (1979). Hormone-stimulated phosphorylation of liver phosphofructokinase in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 254(13), 5584–5587.
- Kamei, A., Watanabe, Y., Ishijima, T., Uehara, M., Arai, S., Kato, H., Nakai, Y., & Abe, K. (2010). Dietary iron-deficient anemia induces a variety of metabolic changes and even apoptosis in rat liver: a DNA microarray study. *Physiological Genomics*, 42(2), 149–156.
- Kamei, A., Watanabe, Y., Kondo, K., Okada, S., Shinozaki, F., Ishijima, T., Nakai, Y., Kondo, T., Arai, S., & Abe, K. (2013). Influence of a short-term iron-deficient diet on hepatic gene expression profiles in rats. *PloS One*, 8(6), e65732.
- Katsuma, S., Hirasawa, A., & Tsujimoto, G. (2005). Bile acids promote glucagon-like peptide-1 secretion through TGR5 in a murine enteroendocrine cell line STC-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 329(1), 386–390.
- Kawamata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Harada, M., Yoshida, H., Miwa, M., Fukusumi, S., Habata, Y., Itoh, T., Shintani, Y., & Others. (2003). A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9435–9440.
- Kim, J. B., Sarraf, P., Wright, M., Yao, K. M., Mueller, E., Solanes, G., Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (1998). Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(1), 1–9.
- Kim, J. Y., Garcia-Carbonell, R., Yamachika, S., Zhao, P., Dhar, D., Loomba, R., Kaufman, R. J.,

- Saltiel, A. R., & Karin, M. (2018). ER stress drives lipogenesis and steatohepatitis via caspase-2 activation of S1P. *Cell*, 175(1), 133–145.e15.
- Kliwer, S. A., & Mangelsdorf, D. J. (2015). Bile acids as hormones: The FXR-FGF15/19 pathway. *Digestive Diseases*, 33(3), 327–331.
- Kohjima, M., Higuchi, N., Kato, M., Kotoh, K., Yoshimoto, T., Fujino, T., Yada, M., Yada, R., Harada, N., Enjoji, M., Takayanagi, R., & Nakamuta, M. (2008). SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Medicine*, 21(4), 507–511.
- Laatsch, A., Merkel, M., Talmud, P. J., Grewal, T., Beisiegel, U., & Heeren, J. (2009). Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis*, 204(1), 105–111.
- Lambert, J. E., Ramos-Roman, M. A., Browning, J. D., & Parks, E. J. (2014). Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 146(3), 726–735.
- Lawitz, E. J., Coste, A., Poordad, F., Alkhouri, N., Loo, N., McColgan, B. J., Tarrant, J. M., Nguyen, T., Han, L., Chung, C., Ray, A. S., McHutchison, J. G., Subramanian, G. M., Myers, R. P., Middleton, M. S., Sirlin, C., Loomba, R., Nyangau, E., Fitch, M., ... Hellerstein, M. (2018). Acetyl-CoA carboxylase inhibitor GS-0976 for 12 weeks reduces hepatic de novo lipogenesis and steatosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16(12), 1983–1991.e3.
- Lee, J.-Y., Shimizu, H., Hagio, M., Fukiya, S., Watanabe, M., Tanaka, Y., Joe, G.-H., Iwaya, H., Yoshitsugu, R., Kikuchi, K., Tsuji, M., Baba, N., Nose, T., Tada, K., Hanai, T., Hori, S., Takeuchi, A., Furukawa, Y., Shirouchi, B., ... 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*, 158811.
- Li, S., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2010). Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3441–3446.

- Li, T., Francl, J. M., Boehme, S., Ochoa, A., Zhang, Y., Klaassen, C. D., Erickson, S. K., & Chiang, J. Y. L. (2012). Glucose and insulin induction of bile acid synthesis: mechanisms and implication in diabetes and obesity. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1861–1873.
- Li, T., Jahan, A., & Chiang, J. Y. L. (2006). Bile acids and cytokines inhibit the human cholesterol 7  $\alpha$ -hydroxylase gene via the JNK/c-jun pathway in human liver cells. *Hepatology*, 43(6), 1202–1210.
- Lonardo, A., Ballestri, S., Marchesini, G., Angulo, P., & Loria, P. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Digestive and Liver Disease: Official Journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*, 47(3), 181–190.
- Loomba, R., Kayali, Z., Nouredin, M., Ruane, P., Lawitz, E. J., Bennett, M., Wang, L., Harting, E., Tarrant, J. M., McColgan, B. J., Chung, C., Ray, A. S., Subramanian, G. M., Myers, R. P., Middleton, M. S., Lai, M., Charlton, M., & Harrison, S. A. (2018). GS-0976 reduces hepatic steatosis and fibrosis markers in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 155(5), 1463–1473.e6.
- Loubière, C., Goiran, T., Laurent, K., Djabari, Z., Tanti, J.-F., & Bost, F. (2015). Metformin-induced energy deficiency leads to the inhibition of lipogenesis in prostate cancer cells. *Oncotarget*, 6(17), 15652–15661.
- Low, W. S., Cornfield, T., Charlton, C. A., Tomlinson, J. W., & Hodson, L. (2018). Sex differences in hepatic de novo lipogenesis with acute fructose feeding. *Nutrients*, 10(9), 1263.
- Luukkonen, P. K., Sädevirta, S., Zhou, Y., Kayser, B., Ali, A., Ahonen, L., Lallukka, S., Pelloux, V., Gaggini, M., Jian, C., Hakkarainen, A., Lundbom, N., Gylling, H., Salonen, A., Orešič, M., Hyötyläinen, T., Orho-Melander, M., Rissanen, A., Gastaldelli, A., ... Yki-Järvinen, H. (2018). Saturated fat is more metabolically harmful for the human liver than unsaturated fat or simple sugars. *Diabetes Care*, 41(8), 1732–1739.

- Makishima, M., Okamoto, A. Y., Repa, J. J., Tu, H., Learned, R. M., Luk, A., Hull, M. V., Lustig, K. D., Mangelsdorf, D. J., & Shan, B. (1999). Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*, 284(5418), 1362–1365.
- Mandić, A. D., & Blaut, M. (2018). Do we choose control diets wisely? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29(7), 447–448.
- Marques-Lopes, I., Ansorena, D., Astiasaran, I., Forga, L., & Martínez, J. A. (2001). Postprandial de novo lipogenesis and metabolic changes induced by a high-carbohydrate, low-fat meal in lean and overweight men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 253–261.
- Marriott, B. P., Cole, N., & Lee, E. (2009). National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States. *The Journal of Nutrition*, 139(6), 1228S – 1235S.
- Marsman, H. A., Heger, M., Kloek, J. J., Nienhuis, S. L., van Werven, J. R., Nederveen, A. J., ten Kate, F. J. W., Stoker, J., & van Gulik, T. M. (2011). Reversal of hepatic steatosis by omega-3 fatty acids measured non-invasively by 1H-magnetic resonance spectroscopy in a rat model. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26(2), 356–363.
- Maruyama, T., Miyamoto, Y., Nakamura, T., Tamai, Y., Okada, H., Sugiyama, E., Nakamura, T., Itadani, H., & Tanaka, K. (2002). Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(5), 714–719.
- Masia, R., McCarty, W. J., Lahmann, C., Luther, J., Chung, R. T., Yarmush, M. L., & Yellen, G. (2018). Live cell imaging of cytosolic NADH/NAD<sup>+</sup> ratio in hepatocytes and liver slices. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 314(1), G97–G108.
- Matsumoto, M., Han, S., Kitamura, T., & Accili, D. (2006). Dual role of transcription factor FoxO1 in controlling hepatic insulin sensitivity and lipid metabolism. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(9), 2464–2472.
- Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, K., Tomita, S., Sekiya, M., Hasty, A., Nakagawa, Y., Sone, H., Toyoshima, H., Ishibashi, S., Osuga, J.-I., & Yamada, N. (2004). Insulin-independent induction of sterol

regulatory element-binding protein-1c expression in the livers of streptozotocin-treated mice. *Diabetes*, 53(3), 560–569.

- Meli, R., Mattace Raso, G., Irace, C., Simeoli, R., Di Pascale, A., Paciello, O., Pagano, T. B., Calignano, A., Colonna, A., & Santamaria, R. (2013). High fat diet induces liver steatosis and early dysregulation of iron metabolism in rats. *PloS One*, 8(6), e66570.
- Metallo, C. M., Gameiro, P. A., Bell, E. L., Mattaini, K. R., Yang, J., Hiller, K., Jewell, C. M., Johnson, Z. R., Irvine, D. J., Guarente, L., Kelleher, J. K., Vander Heiden, M. G., Iliopoulos, O., & Stephanopoulos, G. (2012). Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, 481(7381), 380–384.
- Meyerhoffer, S. M., & McGown, L. B. (1990). Critical micelle concentration behavior of sodium taurocholate in water. *Langmuir*, 6(1), 187–191.
- Moore, M. C., Cherrington, A. D., Mann, S. L., & Davis, S. N. (2000). Acute fructose administration decreases the glycemic response to an oral glucose tolerance test in normal adults. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 85(12), 4515–4519.
- Mouzaki, M., Wang, A. Y., Bandsma, R., Comelli, E. M., Arendt, B. M., Zhang, L., Fung, S., Fischer, S. E., McGilvray, I. G., & Allard, J. P. (2016). Bile acids and dysbiosis in non-alcoholic fatty liver disease. *PloS One*, 11(5), e0151829.
- Musso, G., Gambino, R., De Michieli, F., Cassader, M., Rizzetto, M., Durazzo, M., Fagà, E., Silli, B., & Pagano, G. (2003). Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 37(4), 909–916.
- Myant, N. B., & Mitropoulos, K. A. (1977). Cholesterol 7  $\alpha$  -hydroxylase. *Journal of Lipid Research*, 18(2), 135–153.
- Nakagawa, T., Hu, H., Zharikov, S., Tuttle, K. R., Short, R. A., Glushakova, O., Ouyang, X., Feig, D. I., Block, E. R., Herrera-Acosta, J., Patel, J. M., & Johnson, R. J. (2006). A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 290(3), F625–F631.
- Newberry, E. P., Xie, Y., Kennedy, S. M., Luo, J., & Davidson, N. O. (2006). Protection against

Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology*, 44(5), 1191–1205.

Nobili, V., Bedogni, G., Alisi, A., Pietrobattista, A., Risé, P., Galli, C., & Agostoni, C. (2011).

Docosahexaenoic acid supplementation decreases liver fat content in children with non-alcoholic fatty liver disease: double-blind randomised controlled clinical trial. *Archives of Disease in Childhood*, 96(4), 350–353.

Orr, J. S., Kennedy, A., Anderson-Baucum, E. K., Webb, C. D., Fordahl, S. C., Erikson, K. M.,

Zhang, Y., Etzerodt, A., Moestrup, S. K., & Hasty, A. H. (2014). Obesity alters adipose tissue macrophage iron content and tissue iron distribution. *Diabetes*, 63(2), 421–432.

Osborne, T. F. (2000). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(42), 32379–32382.

Ouyang, X., Cirillo, P., Sautin, Y., McCall, S., Bruchette, J. L., Diehl, A. M., Johnson, R. J., &

Abdelmalek, M. F. (2008). Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*, 48(6), 993–999.

Pandak, W. M., Bohdan, P., Franklund, C., Mallonee, D. H., Eggertsen, G., Björkhem, I., Gil, G.,

Vlahcevic, Z. R., & Hylemon, P. B. (2001). Expression of sterol 12  $\alpha$  -hydroxylase alters bile acid pool composition in primary rat hepatocytes and in vivo. *Gastroenterology*, 120(7), 1801–1809.

Parks, D. J., Blanchard, S. G., Bledsoe, R. K., Chandra, G., Consler, T. G., Kliewer, S. A., Stimmel,

J. B., Willson, T. M., Zavacki, A. M., Moore, D. D., & Lehmann, J. M. (1999). Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*, 284(5418), 1365–1368.

Pathak, P., & Chiang, J. Y. L. (2019). Sterol 12  $\alpha$  -hydroxylase aggravates dyslipidemia by activating the ceramide/mTORC1/SREBP-1C pathway via FGF21 and FGF15. *Gene Expression*, 19(3), 161–173.

Peppel, I. P., Rao, A., Dommerholt, M. B., Bongiovanni, L., Thomas, R., Bruin, A., Karpen, S. J.,

Dawson, P. A., Verkade, H. J., & Jonker, J. W. (2020). The beneficial effects of apical

sodium - dependent bile acid transporter inactivation depend on dietary fat composition.

*Molecular Nutrition & Food Research*, 2000750.

- Puri, P., Daita, K., Joyce, A., Mirshahi, F., Santhekadur, P. K., Cazanave, S., Luketic, V. A., Siddiqui, M. S., Boyett, S., Min, H.-K., Kumar, D. P., Kohli, R., Zhou, H., Hylemon, P. B., Contos, M. J., Idowu, M., & Sanyal, A. J. (2018). The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology*, 67, 534–548.
- Qiu, Y., Sui, X., Zhan, Y., Xu, C., Li, X., Ning, Y., Zhi, X., & Yin, L. (2017). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) overexpression attenuates HFD-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular Basis of Disease*, 1863(4), 978–990.
- Reddy, B. S. (1981). Diet and excretion of bile acids. *Cancer Research*, 41(9 Pt 2), 3766–3768.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H., & Fahey, G. C., Jr. (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(11), 1939–1951.
- Reis, S., Moutinho, C. G., Matos, C., de Castro, B., Gameiro, P., & Lima, J. L. F. C. (2004). Noninvasive methods to determine the critical micelle concentration of some bile acid salts. *Analytical Biochemistry*, 334(1), 117–126.
- Ridlon, J. M., Kang, D.-J., & Hylemon, P. B. (2006). Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*, 47(2), 241–259.
- Ruiz, B., Felipe, A., Casado, J., & Pastor-Anglada, M. (1991). Amino acid uptake by liver of genetically obese Zucker rats. *Biochemical Journal*, 280 ( Pt 2), 367–372.
- Samuel, V. T. (2011). Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 22(2), 60–65.
- Samuel, V. T., Liu, Z.-X., Qu, X., Elder, B. D., Bilz, S., Befroy, D., Romanelli, A. J., & Shulman, G. I. (2004). Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(31), 32345–32353.

- Sancak, Y., Peterson, T. R., Shaul, Y. D., Lindquist, R. A., Thoreen, C. C., Bar-Peled, L., & Sabatini, D. M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, *320*(5882), 1496–1501.
- Sanders, F. W. B., Acharjee, A., Walker, C., Marney, L., Roberts, L. D., Imamura, F., Jenkins, B., Case, J., Ray, S., Virtue, S., Vidal-Puig, A., Kuh, D., Hardy, R., Allison, M., Forouhi, N., Murray, A. J., Wareham, N., Vacca, M., Koulman, A., & Griffin, J. L. (2018). Hepatic steatosis risk is partly driven by increased de novo lipogenesis following carbohydrate consumption. *Genome Biology*, *19*(1), 79.
- Sanyal, A. J., Campbell-Sargent, C., Mirshahi, F., Rizzo, W. B., Contos, M. J., Sterling, R. K., Luketic, V. A., Shiffman, M. L., & Clore, J. N. (2001). Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, *120*(5), 1183–1192.
- Sanyal, A. J., Hirsch, J. I., & Moore, E. W. (1992). High-affinity binding is essential for enhancement of intestinal Fe<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> uptake by bile salts. *Gastroenterology*, *102*(6), 1997–2005.
- Sanyal, A. J., Shiffman, M. L., Hirsch, J. I., & Moore, E. W. (1991). Premicellar taurocholate enhances ferrous iron uptake from all regions of rat small intestine. *Gastroenterology*, *101*(2), 382–389.
- Schierwagen, R., Maybüchen, L., Zimmer, S., Hittatiya, K., Bäck, C., Klein, S., Uschner, F. E., Reul, W., Boor, P., Nickenig, G., Strassburg, C. P., Trautwein, C., Plat, J., Lütjohann, D., Sauerbruch, T., Tacke, F., & Trebicka, J. (2015). Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Scientific Reports*, *5*, 12931.
- Schwarz, J. M., Linfoot, P., & Dare, D. (2003). Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *77*(1), 43-50.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 18024–18031.
- Sherman, A. R. (1978). Lipogenesis in iron-deficient adult rats. *Lipids*, 13(7), 473–478.
- Sherman, A. R., Bartholmey, S. J., & Perkins, E. G. (1982). Fatty acid patterns in iron-deficient maternal and neonatal rats. *Lipids*, 17(9), 639–643.
- Sherman, A. R., Guthrie, H. A., Wolinsky, I., & Zulak, I. M. (1978). Iron deficiency hyperlipidemia in 18-day-old rat pups: effects of milk lipids, lipoprotein lipase, and triglyceride synthesis. *The Journal of Nutrition*, 108(1), 152–162.
- Shimano, H. (2001). Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Progress in Lipid Research*, 40(6), 439–452.
- Shimomura, I., Bashmakov, Y., Ikemoto, S., Horton, J. D., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1999). Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13656–13661.
- Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R. E., Bashmakov, Y., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2000). Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Molecular Cell*, 6(1), 77–86.
- Shirouchi, B., Kashima, K., Horiuchi, Y., Nakamura, Y., Fujimoto, Y., Tong, L.-T., & Sato, M. (2017). 27-Hydroxycholesterol suppresses lipid accumulation by down-regulating lipogenic and adipogenic gene expression in 3T3-L1 cells. *Cytotechnology*, 69(3), 485–492.
- Smith, G. I., Shankaran, M., Yoshino, M., Schweitzer, G. G., Chondronikola, M., Beals, J. W., Okunade, A. L., Patterson, B. W., Nyangau, E., Field, T., Sirlin, C. B., Talukdar, S., Hellerstein, M. K., & Klein, S. (2020). Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(3), 1453–1460.
- Sonnweber, T., Ress, C., Nairz, M., Theurl, I., Schroll, A., Murphy, A. T., Wroblewski, V., Witcher, D. R., Moser, P., Ebenbichler, C. F., Kaser, S., & Weiss, G. (2012). High-fat diet causes iron

- deficiency via hepcidin-independent reduction of duodenal iron absorption. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(12), 1600–1608.
- Sperry, W. M., Webb, M., & Others. (1950). A revision of the Sehoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *The Journal of Biological Chemistry*, 187, 97–106.
- Stangl, G. I., & Kirchgessner, M. (1998). Different degrees of moderate iron deficiency modulate lipid metabolism of rats. *Lipids*, 33(9), 889–895.
- Stanhope, K. L., Schwarz, J. M., Keim, N. L., Griffen, S. C., Bremer, A. A., Graham, J. L., Hatcher, B., Cox, C. L., Dyachenko, A., Zhang, W., McGahan, J. P., Seibert, A., Krauss, R. M., Chiu, S., Schaefer, E. J., Ai, M., Otokozawa, S., Nakajima, K., Nakano, T., ... Havel, P. J. (2009). Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1322–1334.
- Sullivan, J. S., Le, M. T., Pan, Z., Rivard, C., Love-Osborne, K., Robbins, K., Johnson, R. J., Sokol, R. J., & Sundaram, S. S. (2015). Oral fructose absorption in obese children with non-alcoholic fatty liver disease. *Pediatric Obesity*, 10(3), 188–195.
- Tamura, S., & Shimomura, I. (2005). Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1139–1142.
- Tappy, L., & Lê, K.-A. (2010). Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiological Reviews*, 90(1), 23–46.
- Targher, G., Byrne, C. D., Lonardo, A., Zoppini, G., & Barbui, C. (2016). Non-alcoholic fatty liver disease and risk of incident cardiovascular disease: A meta-analysis. *Journal of Hepatology*, 65(3), 589–600.
- Thomas, C., Gioiello, A., Noriega, L., Strehle, A., Oury, J., Rizzo, G., Macchiarulo, A., Yamamoto, H., Matak, C., Pruzanski, M., Pellicciari, R., Auwerx, J., & Schoonjans, K. (2009). TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metabolism*, 10(3), 167–177.
- Timlin, M. T., & Parks, E. J. (2005). Temporal pattern of de novo lipogenesis in the postprandial state in healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 35–42.

- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027–1031.
- Uchida, K., Makino, S., & Akiyoshi, T. (1985). Altered bile acid metabolism in nonobese, spontaneously diabetic (NOD) mice. *Diabetes*, 34(1), 79–83.
- Uchida, K., Satoh, T., Takase, H., Nomura, Y., Takasu, N., Kurihara, H., & Takeuchi, N. (1996). Altered bile acid metabolism related to atherosclerosis in alloxan diabetic rats. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 3(1), 52–58.
- Ugele, B., Kempen, H. J., Kempen, J. M., Gebhardt, R., Meijer, P., Burger, H. J., & Princen, H. M. (1991). Heterogeneity of rat liver parenchyma in cholesterol 7 alpha-hydroxylase and bile acid synthesis. *Biochemical Journal*, 276(1), 73–77.
- Ventura, E. E., Davis, J. N., & Goran, M. I. (2011). Sugar content of popular sweetened beverages based on objective laboratory analysis: focus on fructose content. *Obesity*, 19(4), 868–874.
- Vernon, G., Baranova, A., & Younossi, Z. M. (2011). Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 34(3), 274–285.
- Verzar, F. (1938). Fat Metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 7(1), 163–188.
- Wallace, M., & Metallo, C. M. (2020). Tracing insights into de novo lipogenesis in liver and adipose tissues. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, in press.
- Wang, H., Chen, J., Hollister, K., Sowers, L. C., & Forman, B. M. (1999). Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Molecular Cell*, 3(5), 543–553.
- Wan, Y., Yuan, J., Li, J., Li, H., Zhang, J., Tang, J., Ni, Y., Huang, T., Wang, F., Zhao, F., & Li, D. (2019). Unconjugated and secondary bile acid profiles in response to higher-fat, lower-carbohydrate diet and associated with related gut microbiota: A 6-month randomized controlled-feeding trial. *Clinical Nutrition*, 39(2), 395–404.
- Warden, C. H., & Fisler, J. S. (2008). Comparisons of diets used in animal models of high-fat feeding. *Cell Metabolism*, 7(4), 277.

- Wiegand, S., Keller, K.-M., Röbl, M., L'Allemand, D., Reinehr, T., Widhalm, K., Holl, R. W., & APV-Study Group and the German Competence Network Adipositas. (2010). Obese boys at increased risk for nonalcoholic liver disease: evaluation of 16,390 overweight or obese children and adolescents. *International Journal of Obesity*, *34*(10), 1468–1474.
- Xu, M.-J., Feng, D., Wu, H., Wang, H., Chan, Y., Kolls, J., Borregaard, N., Porse, B., Berger, T., Mak, T. W., Cowland, J. B., Kong, X., & Gao, B. (2015). Liver is the major source of elevated serum lipocalin-2 levels after bacterial infection or partial hepatectomy: A critical role for IL-6/STAT3. *Hepatology*, *61*(2), 692–702.
- Xu, Z., McClure, S. T., & Appel, L. J. (2018). Dietary cholesterol intake and sources among U.S adults: results from National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES), 2001 - 2014. *Nutrients*, *10*(6), 771.
- Yabe, D., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2002). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(20), 12753–12758.
- Yabe, D., Komuro, R., Liang, G., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (2003). Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(6), 3155–3160.
- Yamano, N., Ikeda, Y., Sakama, M., Izawa-Ishizawa, Y., Kihira, Y., Ishizawa, K., Miyamoto, L., Tomita, S., Tsuchiya, K., & Tamaki, T. (2015). A long-term high-fat diet changes iron distribution in the body, increasing iron accumulation specifically in the mouse spleen. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, *61*(1), 20–27.
- Yamashita, H., Takenoshita, M., Sakurai, M., Bruick, R. K., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Arnot, D., & Uyeda, K. (2001). A glucose-responsive transcription factor that regulates carbohydrate metabolism in the liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(16), 9116–9121.
- Yan, Q.-W., Yang, Q., Mody, N., Graham, T. E., Hsu, C.-H., Xu, Z., Houstis, N. E., Kahn, B. B., &

- Rosen, E. D. (2007). The adipokine lipocalin 2 is regulated by obesity and promotes insulin resistance. *Diabetes*, 56(10), 2533–2540.
- Yokoi, K. (2014). Estimation of iron requirements for women by numerical analysis of population-based data from the National Health and Nutrition Surveys of Japan 2003–2007. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements*, 28(4), 453–458.
- Yoshitsugu, R., Kikuchi, K., Hori, S., Iwaya, H., Hagio, M., Shimizu, H., Hira, T., & Ishizuka, S. (2020). Correlation between 12  $\alpha$ -hydroxylated bile acids and insulin secretion during glucose tolerance tests in rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *Lipids in Health and Disease*, 19(1), 9.
- Yoshitsugu, R., Kikuchi, K., Iwaya, H., Fujii, N., Hori, S., Lee, D. G., & 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(1), 45–51.
- Younossi, Z., Anstee, Q. M., Marietti, M., Hardy, T., Henry, L., Eslam, M., George, J., & Bugianesi, E. (2018). Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 15(1), 11–20.
- Younossi, Z. M., Stepanova, M., Lawitz, E., Charlton, M., Loomba, R., Myers, R. P., Subramanian, M., McHutchison, J. G., & Goodman, Z. (2018). Improvement of hepatic fibrosis and patient-reported outcomes in non-alcoholic steatohepatitis treated with selonsertib. *Liver International*, 38(10), 1849–1859.
- Zelber-Sagi, S., Nitzan-Kaluski, D., Goldsmith, R., Webb, M., Blendis, L., Halpern, Z., & Oren, R. (2007). Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *Journal of Hepatology*, 47(5), 711–717.
- Zhao, S., Jang, C., Liu, J., Uehara, K., Gilbert, M., Izzo, L., Zeng, X., Trefely, S., Fernandez, S., Carrer, A., Miller, K. D., Schug, Z. T., Snyder, N. W., Gade, T. P., Titchenell, P. M., Rabinowitz, J. D., & Wellen, K. E. (2020). Dietary fructose feeds hepatic lipogenesis via

microbiota-derived acetate. *Nature*, 579(7800), 586–591.

Zhou, H., & Hylemon, P. B. (2014). Bile acids are nutrient signaling hormones. *Steroids*, 86, 62–68.

Zhou, L., Xu, L., Ye, J., Li, D., Wang, W., Li, X., Wu, L., Wang, H., Guan, F., & Li, P. (2012). Cidea promotes hepatic steatosis by sensing dietary fatty acids. *Hepatology*, 56(1), 95–107.

## 参考論文

**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.

**Hori, S.**, Abe, T., Lee, D. G., 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. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 83, 108412.

**Hori, S.**, Satake, M., Kohmoto, O., Takagi, R., Okada, K., Fukiya, S., Yokota, A., & Ishizuka, S. Primary 12  $\alpha$  -hydroxylated bile acids lower hepatic iron concentration in rats. *The Journal of Nutrition*, in press.

## その他の論文

Lee, D. G., **Hori, S.**, Kohmoto, O., Kitta, S., Yoshida, R., Tanaka, Y., Shimizu, H., Takahashi, K., Nagura, T., Uchino, H., Fukiya, S., Yokota, A., & Ishizuka, S. (2019). Ingestion of difructose anhydride III partially suppresses the deconjugation and 7  $\alpha$  -dehydroxylation of bile acids in rats fed with a cholic acid-supplemented diet. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83(7), 1329–1335.

Yoshitsugu, R., Kikuchi, K., **Hori, S.**, Iwaya, H., Hagio, M., Shimizu, H., Hira, T., & Ishizuka, S. (2020). Correlation between 12  $\alpha$  -hydroxylated bile acids and insulin secretion during glucose tolerance tests in rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *Lipids in Health and Disease*, 19(1), 9.

Yoshitsugu, R., Kikuchi, K., Iwaya, H., Fujii, N., **Hori, S.**, Lee, D. G., & 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(1), 45–51.

Gowda, S. G. B., Gao, Z.-J., Chen, Z., Abe, T., **Hori, S.**, Fukiya, S., Ishizuka, S., Yokota, A., Chiba, H., & Hui, S.-P. (2020). Untargeted Lipidomic Analysis of Plasma from High-fat Diet-induced Obese Rats Using UHPLC-Linear Trap Quadrupole-Orbitrap MS. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 36(7), 821–828.

Hashimoto, N., Matsui, I., Ishizuka, S., Inoue, K., Matsumoto, A., Shimada, K., **Hori, S.**, Lee, D. G., Yasuda, S., Katsuma, Y., Kajimoto, S., Doi, Y., Yamaguchi, S., Kubota, K., Oka, T., Sakaguchi, Y., Takabatake, Y., Hamano, T., & Isaka, Y. (2020). Lithocholic acid increases

intestinal phosphate and calcium absorption in a vitamin D receptor dependent but transcellular pathway independent manner. *Kidney International*, 97(6), 1164–1180.

Shimoda, T., **Hori, S.**, Maegawa, K., Takeuchi, A., Lee, Y., Joe, G.-H., 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.

Lee, J.-Y., Shimizu, H., Hagio, M., Fukiya, S., Watanabe, M., Tanaka, Y., Joe, G.-H., Iwaya, H., Yoshitsugu, R., Kikuchi, K., Tsuji, M., Baba, N., Nose, T., Tada, K., Hanai, T., **Hori, S.**, Takeuchi, A., Furukawa, Y., Shirouchi, B., … 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*, 158811.



## 国内学会

**堀 将太**、常木 生也、花井 健人、辻 美咲、清水 英寿、原 博、吹谷 智、横田 篤、石塚 敏、コール酸負荷による肝臓での鉄蓄積量減少、日本栄養・食糧学会東北支部会北海道支部会合同支部大会（2015 年、仙台、口頭発表）

**堀 将太**、常木 生也、花井 健人、清水 英寿、原 博、石塚 敏、コール酸添加食の摂取で肝臓中の亜鉛および鉄の濃度が低下する、第 38 回日本分子生物学会（2015 年、神戸、ポスター）

**堀 将太**、常木 生也、花井 健人、清水 英寿、原 博、石塚 敏、コール酸摂取に伴う肝臓鉄濃度減少と脂質蓄積との相関、第 70 回日本栄養・食糧学会（2016 年、神戸、口頭）

**堀 将太**、常木 生也、花井 健人、清水 英寿、原 博、石塚 敏、コール酸誘導性脂肪肝における肝臓ミネラルの網羅的解析、第 39 回日本分子生物学会（2016 年、横浜開催、ポスター）

**堀 将太**、田中愛建、常木 生也、花井 健人、清水 英寿、原 博、石塚 敏、胆汁酸導性脂肪肝における肝臓鉄濃度と糖の関与、農芸化学会北海道支部第 2 回（2016 年、札幌、ポスター）

**堀 将太**、常木 生也、花井 健人、李 娟美、清水 英寿、原 博、石塚 敏、新規非アルコール性脂肪肝モデルでの肝脂質蓄積における鉄濃度減少の寄与、第 24 回日本未病システム学会学術総会（2017 年、横浜、口頭）

**堀 将太**、常木 生也、花井 健人、清水 英寿、原 博、石塚 敏、胆汁酸誘導性の非肥満型脂肪肝における鉄濃度低下と脂質蓄積、第 71 回日本栄養・食糧学会（2017 年、沖縄、ポスター）

**堀 将太**、原 博、石塚 敏、貧血を伴わない鉄欠乏状態と高シヨ糖食摂取の

組み合わせによる肝臓脂質蓄積、日本農芸化学会 2018 年度大会（2018 年、名古屋、口頭）

**堀 将太**、吉次 玲香、菊池 慧大、阿部 隆行、原 博、吹谷 智、横田 篤、石塚 敏、慢性的な高脂肪食

摂取によって腸肝循環で増加する  $12\alpha$  水酸化胆汁酸はインスリン感受性を向上させる一方で肝臓脂質蓄積を亢進する、第 73 回日本栄養・食糧学会（2019 年、静岡、口頭）

**堀 将太**、阿部 隆行、李 東根、吹谷 智、横田 篤、麻生 菜央、城内 文吾、佐藤 匡央、石塚 敏、

$12\alpha$  水酸化胆汁酸と脂肪肝の関係、日本農芸化学会 2020 年度大会（2020 年、福岡、ポスター）

## 国際学会

**Hori S**, Satake M, Abe T, Hara H, Fukiya S, Yokota A, Ishizuka S. An increase of 12  $\alpha$  - hydroxylated bile acid is associated with hepatic steatosis induced by a high-fat diet in rats. Kern Lipid Conference 2019 (Colorado, USA, Poster)

**Hori S**, Tanaka Y, Tsuneki I, Hanai T, Shimizu H, Hara H, Ishizuka S. Modulation of hepatic mineral concentrations in bile acid-induced fatty liver, Experimental Biology 2017 (Chicago, USA, Poster)

## その他、受賞歴

2015 年 日本栄養・食糧学会東北支部会北海道支部会合同支部大会 若手奨励賞

2017 年 第 71 回日本栄養・食糧学会 優秀ポスター賞

2018 年 日本学術振興会特別研究 DC1 採択

2019 年 日本農芸化学会 北海道支部学生会員奨励賞

2019 年 同上 受賞講演

2020 年 日本農芸化学会 2020 年度大会 優秀発表

## 謝辞

本論文は数多くの方々の御協力を賜り、作製されたものであります。研究室配属後から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内の園山慶教授、微生物生理学研究室の吹谷智講師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、御指導いただいた食品栄養学研究室の比良徹准教授に深謝申し上げます。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、長崎県立大学看護栄養学部栄養健康学科の城内文吾准教授には、肝臓の酸化コレステロール解析していただき、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。加えて、食品栄養学研究室の先輩、同期、後輩、事務員の皆様にも筆舌に尽くしがたいほどの御支援をいただきました。全ての皆様に心より御礼申し上げます。また、数多くの犠牲となりましたラットに深く感謝するとともに、心より御冥福を御祈り申し上げます。最後に、学位取得までの9年間にわたって経済的、精神的支援をしてくださいました両親に心より感謝申し上げます。

2021年3月 堀 将太