

学 位 論 文 題 名

Nutritional and physiological studies on
the regulatory mechanism for apolipoprotein
A- I and A-IV gene expression in rats

（ラットを用いたアポリポタンパク質A-I及びA-IVの
遺伝子発現調節機構に関する栄養生理学的研究）

学位論文内容の要旨

冠状動脈心疾患は我が国の死因の第二位を占めており、本疾患の主要な危険因子はコレステロールである。いくつかの食物繊維が血漿コレステロール低下作用を有することは良く知られており、食物繊維の生体調節機能のひとつとして注目されている。しかしながらその機構としては、中性ステロイドや胆汁酸の吸着とその糞中排泄の促進、ミセル形成の阻害によるコレステロール吸収の抑制、食物繊維の発酵産物である短鎖脂肪酸による肝臓でのコレステロール合成の抑制などが提唱されているが、そのいずれもが観察されるコレステロール低下作用を十分説明するに到っていない。コレステロールは循環血中でリポタンパク質の構成要素として運搬され、そのタンパク構成要素であるアポリポタンパク質（apo）はコレステロール等の脂質の輸送と代謝に中心的な役割を果たしており、冠状動脈心疾患の発症に密接に関与している。したがって、apoの遺伝子発現を制御する機構を明らかにすることは、本疾患の発症過程の理解、及び予防・治療に理論的根拠を与えることとして重要である。そこで本研究では、apoの遺伝子発現調節機構に関する知見を得ることを目的とし、とりわけ食物繊維の血漿コレステロール低下作用におけるその役割、ならびに小腸広範囲切除後の残存小腸の適応に関して、ラットを用いた全動物レベルの実験により検討を加えた。その概要を示すと、以下の通りである。

- (1) 食物繊維の血漿コレステロール低下作用におけるapo A-I及びA-IV遺伝子

発現動態の解析

ビートファイバー (BF) のコレステロール低下作用は主として高密度リポタンパク質 (HDL) コレステロールの低下によることが知られており、HDLの主要なapoはapo A-I及びA-IVである。ラットにBFを含む飼料を摂取させ、血漿apo A-I濃度をWestern blottingで分析した結果、無繊維飼料を摂取したラットに比べて低下傾向を示した。またapo A-I、A-IVの合成臓器である小腸及び肝臓のapo A-I、A-IV mRNAレベルをNorthern blottingにより分析した結果、回腸 (下部小腸) 及び肝臓において無繊維飼料摂取ラットに比して有意な低下が見られた。BFは胆汁酸の糞中排泄を促すが、同様に胆汁酸を吸着して糞中排泄を増加させる陰イオン交換樹脂 (コレステラミン) を摂取させても、血漿コレステロール及びapo A-I濃度は低下せず、またapo A-I、A-IV mRNAレベルは回腸では低下するものの肝臓では低下しなかった。更に、BFの血漿コレステロール及び肝臓apo A-I mRNA低下作用は、BFが発酵を受ける主要臓器である盲腸の切除により消失した。これらの結果は、胆汁酸の糞中排泄増加がBFのコレステロール低下作用の要因ではなく、BFの盲腸における発酵が肝臓apo A-I遺伝子発現に影響を及ぼし、その低下が血漿apo A-I及びコレステロール濃度の低下と関連することを示唆している。更に、回腸apo A-I、A-IV mRNAレベルが、コレステラミン摂取や胆汁迂回術により低下したことから、胆汁酸あるいはその他の胆汁成分が回腸におけるこれらapoの遺伝子発現制御に重要な役割を果たしていると考えられるが、これらの条件において血漿apo A-I及びコレステロール濃度は変化しないことから、血漿コレステロール濃度の変動に対する回腸由来のこれらapoの寄与は小さいものと推測した。

(2) 小腸広範囲切除に対する残存回腸apo A-I及びA-IV遺伝子発現の適応的応答

小腸広範囲切除後に残存小腸は構造的機能的適応を示すことが知られている。しかしながら、小腸を主要な発現臓器とするapo A-I、A-IVの遺伝子発現が、広範囲切除に対していかなる応答を示すのか不明であった。そのことを明らかにすることによりapo A-I、A-IVの恒常性制御の新たな機構を示すことが可能と考え、以下のような検討を行った。

回腸約5 cmを除く全小腸を切除 (85%切除) した後、15日間の血漿コレステロール、apo A-I、A-IV濃度の変化を追跡したところ、それらは一時的な低下を

示し、その後回復した。最終日の残存回腸apo A-I、A-IV mRNAレベルは各々1.2、3.2倍に増加していた。また、手術後24時間の残存回腸mRNAレベルの経時変化を絶食状態で観察したところ、apo A-IV mRNAは術後1時間で既に増加傾向が見られ、12時間でプラトーに達したのに対し、apo A-I mRNAは変化を示さなかった。これらの結果より、小腸広範囲切除により小腸からのapo A-I、A-IVの供給が減少する結果としてこれらの血漿濃度が低下するが、残存回腸における遺伝子発現の適応的増加により回復すること、また少なくともapo A-IVに関しては、mRNAレベルの増加は迅速であり食餌成分の吸収に依存しないことが明かとなった。また、*In situ* hybridizationにより、小腸切除に対する残存回腸apo A-IV mRNAレベルの増加は、発現している細胞数の増加ではなく、細胞内mRNA濃度の増加によるものと推測した。更に、小腸広範囲切除と同時に胆汁迂回術を施した場合にapo A-IV mRNAの増加は完全に阻止されたことから、小腸切除後の残存回腸apo A-IV mRNAレベルの増加は胆汁中の何らかの成分の吸収増加に依存していることが明かとなった。

以上のように、BFの血漿コレステロール低下作用は、その盲腸内発酵に関連することがらにより惹起される肝臓内apo A-I遺伝子発現の低下と関連することを明らかにした。また、胆汁酸あるいはその他の胆汁成分の吸収が抑制される条件では回腸apo A-I、A-IV遺伝子発現の低下が見られるが、それが血漿コレステロール濃度の変化に寄与しないことを示した。更に、小腸切除後の残存回腸がapo A-I、A-IV遺伝子発現を適応的に上昇させ、少なくともapo A-IVの発現に関しては、胆汁に含まれる成分がその調節に重要な役割を担っていることをはじめて見いだした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 仁 木 良 哉

副 査 教 授 葛 西 隆 則

副 査 教 授 島 崎 敬 一

学 位 論 文 題 名

Nutritional and physiological studies on the regulatory mechanism for apolipoprotein A- I and A-IV gene expression in rats

(ラットを用いたアポリポタンパク質A-I及びA-IVの
遺伝子発現調節機構に関する栄養生理学的研究)

本論文は総頁数92の英文論文で、図25、表11、引用文献97を含み、4章で構成されている。別に参考論文10編が添えられている。

冠状動脈心疾患の主要な危険因子はコレステロールであるが、いくつかの食物繊維が血漿コレステロール低下作用を有することが知られており、この現象の発現機構について国内外で精力的に研究が進められている。コレステロールは循環血中でリポタンパク質の構成要素として運搬され、アポリポタンパク質 (apo) はコレステロールの輸送と代謝に中心的な役割を果たしている。本研究は、食物繊維の血漿コレステロール低下作用にapoの遺伝子発現動態が関与しているとの仮説を立て、実験的検討により食物繊維の盲腸内発酵によって惹起される肝臓apo A-I遺伝子発現の低下が血漿コレステロール低下作用の一因であることを明らかにしたものである。更に小腸広範囲切除後の残存回腸におけるapo A-I、A-IV遺伝子発現の適応現象を解析し、胆汁が回腸apo A-I及びA-IVの遺伝子発現に重要な役割を果たしていることをも指摘している。

第一章では本研究の歴史的背景、現時点での研究意義、問題点、目的等について論じている。第二、三章は筆者自身による動物実験に基づく研究内容が記載され、本論文の中心をなすものである。第四章では、本研究で得られた知見を総括し、今後の課題を提出している。主な内容は以下の如く要約される。

(1) ビートファイバー (BF) のコレステロール低下作用は主として高密度リポタンパク質 (HDL) コレステロールの低下によることが知られており、HDLの主要なapoはapo A-I及びA-IVである。本研究ではまず、BF摂取ラットの血漿apo A-I濃度、ならびにapo A-I、A-IVの合成臓器である小腸及び肝臓のapo A-I、

A-IV mRNAレベルが、無繊維飼料摂取ラットに比して低下することを示した。次いで、コレステラミン（ステロイド類の吸収阻害剤）を摂取しても血漿コレステロール及びapo A-I濃度は低下せず、またapo A-I、A-IV mRNAレベルは下部小腸（回腸）では低下するものの肝臓では低下しないこと、更に、BFの血漿コレステロール及び肝臓apo A-I mRNA低下作用は、BFが発酵を受ける主要臓器である盲腸の切除により消失することより、胆汁酸の糞中排泄増加がBFのコレステロール低下作用の要因ではなく、BFの盲腸における発酵が肝臓apo A-I遺伝子発現に影響を及ぼし、その低下が血漿apo A-I及びコレステロール濃度の低下と関連するものと推測している。更に、回腸apo A-I、A-IV mRNAレベルが、コレステラミン摂取や胆汁迂回術により低下したことから、回腸におけるこれらapoの遺伝子発現制御における胆汁成分の重要性を指摘している。

(2) 小腸広範囲切除後の残存回腸におけるapo A-I、A-IV遺伝子発現動態を解析することにより、apo A-I、A-IVの恒常性制御の新たな機構を示唆することが可能と考え、以下のような検討を行った。

小腸広範囲切除術の後、15日間の血漿コレステロール、apo A-I、A-IV濃度の変化を追跡したところ、それらは一時的な低下の後回復すること、また最終日の残存回腸apo A-I、A-IV mRNAレベルが増加していることを見出した。次いで、手術後24時間の残存回腸mRNAレベルの経時変化を絶食状態で観察したところ、apo A-IV mRNAは術後1時間で既に増加傾向が見られ、12時間でプラトーに達したのに対し、apo A-I mRNAは変化を示さなかった。これらの結果より、小腸広範囲切除により小腸からのapo A-I、A-IVの供給が減少する結果としてこれらの血漿濃度が低下するが、残存回腸における遺伝子発現の適応的増加により回復すること、また少なくともapo A-IVに関しては、mRNAレベルの増加は食餌成分の吸収に依存しないことを示唆した。また*In situ* hybridizationの結果より、小腸切除に対する残存回腸apo A-IV mRNAレベルの増加は、発現している細胞数の増加ではなく、細胞内mRNA濃度の増加によるものと推測している。更に、小腸広範囲切除と同時に胆汁迂回術を施した場合にapo A-IV mRNAの増加は完全に阻止されたことから、小腸切除後の残存回腸apo A-IV mRNAレベルの増加は胆汁中の何らかの成分の吸収増加に依存することを示した。

以上のように、本研究は食物繊維の血漿コレステロール低下作用にapo A-I、A-IV遺伝子発現の変動が深く関与していること、及び回腸apo A-I、A-IV遺伝子発現制御に胆汁成分が重要な役割を果たしていることを見出すなど、食物繊維の生理機能及びapo A-I、A-IVの遺伝子発現制御機構に新しい知見を加えた点で、国内外で高い評価を得ている。

よって審査員一同は、別に行った学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者 園山慶は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。