

生体内胆汁酸組成評価法の確立と食餌及び運動が 胆汁酸代謝に及ぼす作用の解析

学位論文内容の要旨

胆汁酸 (BA) は肝臓でコレステロールから合成される両親媒性物質である。胆汁に含まれる BA は十二指腸に放出され、小腸下部に移動しながら脂質の吸収に寄与する。小腸下部に到達した BA は腸上皮細胞に取り込まれ、門脈を通過して肝臓に帰還する。その後再び十二指腸に放出されるという腸肝循環機構によって再利用されている。しかし一部の BA は腸肝循環を免れ大腸に流入し、腸内細菌によってその構造に変換を受ける。通常肝臓で合成された一次胆汁酸 (PBA) は十二指腸に放出される際にはタウリンやグリシンで抱合されているが、大腸に到達した BA は脱抱合された後、さらに二次胆汁酸 (SBA) へと変換される。これまでの研究からこの SBA が大腸癌発達を促進するとが示唆されている。BA が大腸癌発生に及ぼす作用に関する研究では、そのほとんどが癌発達のプロモーション段階を対象としたものである。また BA を生体に導入しているにもかかわらず、そのときの BA 代謝、特に腸上皮細胞をとりまく環境に存在する BA の濃度と組成を正確に把握している研究はほとんどない。これまで広く用いられてきた BA 分析法には様々な問題点があり、遊離体と抱合体の BA を同時に分析することは不可能であった。そこで本研究では、生体試料中の BA 濃度及びその組成を精密かつ一斉に分析する方法を確立するとともに、コール酸 (CA) を飼料に加える事で腸肝循環する BA を人為的に増加させた場合の BA 代謝及び腸上皮動態に及ぼす作用を解析した。また、大腸発癌を抑制すると考えられている食餌及び運動が BA 動態に及ぼす作用についても併せて検討した。

1. 生体試料からの胆汁酸抽出及び UPLC-MS を用いた一斉分析法の確立

血清、胆汁、肝臓、消化管内容物及び糞からの BA 抽出法、及び ultra performance liquid chromatography/ESI-MS (UPLC-MS) を用いた BA 検出を検討した結果、様々な生体組織における BA 組成を遊離体、抱合体を含め網羅的に把握する技術を確立した。

UPLC-MS を用いることで 22 種類の BA を一斉分析し、抱合化率を含めた詳細な BA プロファイルを一度の分析で迅速に得ることが可能となった。この分析法を用いることで系統の異なるラットにおける BA 代謝の差異を明確に示すことを可能にした。

2. コール酸摂取が胆汁酸代謝と腸上皮細胞動態に及ぼす影響

CA (2 g/kg 飼料) 摂取により体内の BA 量を人為的に増加させたところ、腸上皮細胞の増殖を促した一方で γ 線照射による DNA 傷害後に腸増殖上皮細胞に誘導される細胞死の頻度には影響を与えなかった。結果として、CA 導入によって増加した増殖上皮細胞の一部は、 γ 線照射後にも確実に残存することを見いだした。このとき糞中における CA とその SBA であるデオキシコール酸が増加するとともに、循環血中への大量の BA 流入が引き起こされた。これらのことは、CA 摂取により管腔側と血液の両方において、通常より極めて多量の BA に腸上皮細胞が曝されることを意味している。そこで、CA 添加食を摂取させたラットの盲腸内容物上清及び血清を添加した培地でラット十二指腸上皮由来 IEC-6 細胞を培養したところ、対照群より得られた盲腸内容物及び血清を添加した場合に比べて細胞増殖頻度が有意に上昇した。これらの結果から、CA 摂取による腸上皮細胞の増殖亢進は管腔側、漿膜側両方からの作用によることが示唆された。また CA 摂取が糞中での抱合 BA 量を増加させたことから PBA と SBA の比率だけではなく、抱合体と遊離体の比率の相違も大腸上皮に対して無視できない影響を及ぼすものと考えられた。

3. 自発走行運動と食餌が大腸内胆汁酸代謝に及ぼす影響

食餌と運動が大腸内 BA 代謝に及ぼす影響について UPLC-MS を用いて検討した。飼料中の糖源をすべてスクロースとした飼料、あるいはその一部をデキストリン又はラクトースに置き換えた飼料をそれぞれ摂取させる 3 群を設定した。さらにそれぞれの飼料に対し非運動群と運動群を設け、計 6 群で 4 週間試験飼育を行った。結果として、食餌は PBA から SBA への変換に関与することだけでなく、運動自体が SBA 比率を低下させることを見いだした。一日の BA 排泄量に変化がなかったことから、運動は BA の量的な恒常性に影響を与えることなく組成を変化させることが示された。以上のことから、飼料組成と運動は大腸管腔内容物中の BA 組成を改善することで大腸癌発生リスク減少に寄与する可能性が示された。

本研究において、生体成分に含まれる BA 組成を極めて精密に測定する方法を確立した。この方法を基盤技術として、ラット体内の BA 量を人為的に増加させる実験モデルから BA が大腸癌発生段階でのリスクに関与している可能性や、生理的条件下での運動や食事が大腸内 BA 組成を改善することを見いだした。以上のことから、本研究で確立した UPLC-MS を用いた詳細な BA 分析法は、BA 代謝の病態発症における役割を解明する上で極めて有用な手段となると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 石 塚 敏
副 査 教 授 原 博
副 査 教 授 横 田 篤

学 位 論 文 題 名

生体内胆汁酸組成評価法の確立と食餌及び運動が 胆汁酸代謝に及ぼす作用の解析

本論文は、和文 128 頁、図 20、表 26、5 章からなり、参考論文 4 編が添えられている。

胆汁酸 (BA) は肝臓でコレステロールから合成される両親媒性物質である。胆汁に含まれる BA は十二指腸に放出され、小腸下部に移動しながら脂質の吸収に寄与する。小腸下部に到達した BA は腸上皮細胞に取り込まれ、門脈を通過して肝臓に帰還する。その後再び十二指腸に放出されるという腸肝循環機構によって再利用されている。しかし一部の BA は腸肝循環を免れ大腸に流入し、腸内細菌によってその構造に変換を受ける。通常肝臓で合成された一次胆汁酸 (PBA) は十二指腸に放出される際にはタウリンやグリシンで抱合されているが、大腸に到達した BA は脱抱合された後、さらに二次胆汁酸 (SBA) へと変換される。これまでの研究からこの SBA が大腸癌発達を促進するとが示唆されている。BA が大腸癌発生に及ぼす作用に関する研究では、そのほとんどが癌発達のプロモーション段階を対象としたものである。また BA を生体に導入しているにもかかわらず、そのときの BA 代謝、特に腸上皮細胞をとりまく環境に存在する BA の濃度と組成を正確に把握している研究はほとんどない。これまで広く用いられてきた BA 分析法には様々な問題点があり、遊離体と抱合体の BA を同時に分析することは不可能であった。そこで本研究では、生体試料中の BA 濃度及びその組成を精密かつ一斉に分析する方法を確立するとともに、コール酸 (CA) を飼料に加える事で腸肝循環する BA を人為的に増加させた場合の BA 代謝及び腸上皮動態に及ぼす作用を解析した。また、大腸発癌を抑制すると考えられている食餌及び運動が BA 動態に及ぼす作用についても併せて検討した。

1. 生体試料からの胆汁酸抽出及び UPLC-MS を用いた一斉分析法の確立

血清、胆汁、肝臓、消化管内容物及び糞からの BA 抽出法、及び ultra performance liquid chromatography/ESI-MS (UPLC-MS) を用いた BA 検出を検討した結果、様々な生体組織における BA 組成を遊離体、抱合体を含め網羅的に把握する技術を確立した。UPLC-MS を

用いることで22種類のBAを一斉分析し、抱合化率を含めた詳細なBAプロフィールを一度の分析で迅速に得ることが可能となった。この分析法を用いることで系統の異なるラットにおけるBA代謝の差異を明確に示すことを可能にした。

2. コール酸摂取が胆汁酸代謝と腸上皮細胞動態に及ぼす影響

CA (2 g/kg 飼料) 摂取により体内のBA量を人為的に増加させたところ、腸上皮細胞の増殖を促した一方で γ 線照射によるDNA傷害後に腸増殖上皮細胞に誘導される細胞死の頻度には影響を与えなかった。結果として、CA導入によって増加した増殖上皮細胞の一部は、 γ 線照射後にも確実に残存することを見いだした。このとき糞中におけるCAとそのSBAであるデオキシコール酸が増加するとともに、循環血中への大量のBA流入が引き起こされた。これらのことは、CA摂取により管腔側と血液の両方において、通常より極めて多量のBAに腸上皮細胞が曝されることを意味している。そこで、CA添加食を摂取させたラットの盲腸内容物上清及び血清を添加した培地でラット十二指腸上皮由来IEC-6細胞を培養したところ、対照群より得られた盲腸内容物及び血清を添加した場合に比べて細胞増殖頻度が有意に上昇した。これらの結果から、CA摂取による腸上皮細胞の増殖亢進は管腔側、漿膜側両方からの作用によることが示唆された。またCA摂取が糞中での抱合BA量を増加させたことからPBAとSBAの比率だけではなく、抱合体と遊離体の比率の相違も大腸上皮に対して無視できない影響を及ぼすものと考えられた。

3. 自発走行運動と食餌が大腸内胆汁酸代謝に及ぼす影響

食餌と運動が大腸内BA代謝に及ぼす影響についてUPLC-MSを用いて検討した。飼料中の糖源をすべてスクロースとした飼料、あるいはその一部をデキストリン又はラクトースに置き換えた飼料をそれぞれ摂取させる3群を設定した。さらにそれぞれの飼料に対し非運動群と運動群を設け、計6群で4週間試験飼育を行った。結果として、食餌はPBAからSBAへの変換に関与することだけでなく、運動自体がSBA比率を低下させることを見いだした。一日のBA排泄量に変化がなかったことから、運動はBAの量的な恒常性に影響を与えることなく組成を変化させることが示された。以上のことから、飼料組成と運動は大腸管腔内容物中のBA組成を改善することで大腸癌発生リスク減少に寄与する可能性が示された。

本研究において、生体成分に含まれるBA組成を極めて精密に測定する方法を確立した。この方法を基盤技術として、ラット体内のBA量を人為的に増加させる実験モデルからBAが大腸癌発生段階でのリスクに関与している可能性や、生理的条件下での運動や食事が大腸内BA組成を改善することを見いだした。以上のことから、本研究で確立したUPLC-MSを用いた詳細なBA分析法は、BA代謝の病態発症における役割を解明する上で極めて有用な手段となると考えられる。

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