

ファルネソイド X 受容体 (FXR) 活性評価による 豚胆の肝臓脂質低下作用の機構解明

申請代表者 井口 裕介 広島国際大学薬学部
所内共同研究者 藤田 恭輔 栄養代謝学分野

講師
助教

【報告セミナー要旨】

【背景】

動物胆は動物の胆嚢から製した生薬であり、古来より健胃や利胆など消化器系の薬として用いられている。動物胆として熊胆、牛胆、豚胆が使用されるが、それぞれに含まれる動物胆の主要胆汁酸の構成は異なり、その作用にも違いが見られる。最近我々は、豚胆およびその主要構成胆汁酸であるヒオデオキシコール酸 (HDCA) が、高脂肪食負荷マウスの肝臓において脂質低下作用を示すことを明らかにした。一方で、通常食下で肥満を呈する TSOD マウスに HDCA を与えると、肝臓における炎症反応が亢進することを明らかにした。しかし、これらの詳細な作用機序は明らかになっていない。ところで、胆汁酸をリガンドとする核内受容体として、ファルネソイド X 受容体 (FXR) が知られている。その活性化は、脂質や胆汁酸の生合成や炎症反応を抑制するため、本研究では HDCA や HDCA により変動する内在性胆汁酸が、FXR の活性調節に寄与している可能性について検証した。

【方法】

ヒトおよびマウス FXR に対する各種胆汁酸の活性は、ヒト FXR 発現 Hep3B 細胞およびマウス FXR 発現 hep1-6 細胞に FXR 応答性エレメント-ルシフェラーゼベクターを導入し、ルシフェラーゼ活性を用いて評価した。マウス肝臓における胆汁酸構成は、肝臓から抽出した胆汁酸を脱抱合後、LC/MS を用いて解析した。

【結果と考察】

ヒトおよびマウス FXR に対する各種胆汁酸およびそのタウリン抱合体のアゴニスト活性を検証すると、ケノデオキシコール酸、デオキシコール酸およびそのタウリン抱合体に高いアゴニスト活性が見られ、HDCA およびそのタウリン抱合体は弱いアゴニスト活性を有することが分かった。5 μ M ケノデオキシコール酸刺激下における、各種胆汁酸の FXR アンタゴニスト活性を検証したところ、HDCA のタウリン抱合体が濃度依存的に FXR 活性を抑制した。これらの結果より、HDCA は FXR に対しパーシャルアゴニストとして作用する可能性が推察された。高脂肪食負荷マウスおよび TSOD マウスの肝臓における胆汁酸構成の解析を行うと、HDCA の投与により、HDCA の増加とコール酸および β ムリコール酸の減少が見られ、アゴニストとして作用するケノデオキシコール酸やデオキシコール酸の量には変化は見られなかった。マウス肝臓において、FXR 活性化により発現が誘導される SHP や BSEP の mRNA 発現量は、高脂肪食負荷マウス、TSOD マウスのいずれにおいても HDCA の投与により減少した。一方で、HDCA は FXR の発現量そのものには影響を与えなかった。これらの結果により、HDCA の投与は、マウス肝臓において HDCA の量を増加させ、FXR 活性を抑制することが示唆された。本研究により、HDCA が TSOD マウスの肝炎を増悪させるメカニズムは、肝臓

における FXR の活性抑制によるものである可能性が示された。一方、HDCA の投与は高脂肪食負荷マウスの肝臓における脂質蓄積を抑制したが、このことは HDCA による FXR の活性抑制では説明できない。したがって、このメカニズムを明らかにするには、FXR 活性以外の観点から検討する必要があると考える。

■背景・目的

動物胆は動物の胆嚢から製した生薬であり、古来より健胃や利胆など消化器系の薬として用いられている。動物胆として熊胆、牛胆、豚胆が使用されるが、それぞれに含まれる動物胆の主要胆汁酸の構成は異なり、その作用にも違いが見られる。最近我々は、豚胆およびその主要構成胆汁酸であるヒオデオキシコール酸 (HDCA) が、高脂肪食負荷マウスの肝臓において脂質低下作用を示すことを明らかにした。しかし、HDCA の作用するメカニズムは詳細には明らかになっていない。そこで、胆汁酸をリガンドとする核内受容体であるファルネソイド X 受容体 (FXR) に着目した。FXR の活性化は、脂質や胆汁酸の生合成や炎症反応を抑制することが知られている。本研究では HDCA 投与が FXR 活性に対する効果を明らかにするため、FXR 活性評価系を構築し各種胆汁酸の作用を評価する。また *in vivo* においても、活性評価系で示した FXR 活性に対する HDCA の作用が反映される可能性を検討した。

■結果・考察

1) ヒト FXR に対する胆汁酸の活性評価

in vitro による FXR 活性評価は、ヒトまたはマウスの FXR および RXR を発現させた培養細胞において、FXR 応答性エレメント-ルシフェラーゼベクターを導入し、ルシフェラーゼ活性を測定することで行った。ヒト FXR 活性評価系には、ヒト肝癌由来細胞の中でも形質導入効率が比較的高いこと、及び胆汁酸を比較的高濃度で使用できることから、本研究では Hep3B を使用した。これを用いて各種胆汁酸のヒト FXR 活性化作用を評価したところ、コール酸 (CA)、ウルソデオキシコール酸 (UDCA)、 β ムリコール酸 (β -MCA)、 α ムリコール酸 (α -MCA) 及びヒオコール酸 (HCA) には全く活性を認めず、HDCA には弱い活性を認めた。またケノデオキシコール酸 (CDCA)、デオキシコール酸 (DCA) 及びリトコール酸 (LCA) には比較的高い活性が見出され、これらの結果はこれまでに報告されている複数の研究結果と一致していた (Fig.1A)。胆汁酸は生体内においてアミノ酸と結合し抱合型胆汁酸となっていることから、タウリン抱合型胆汁酸の FXR に対するアゴニスト活性を検討した。抱合型胆汁酸は非抱合型に比べて極性が高く、細胞内に入りにくくなることが予想され、このことから検討した各胆汁酸濃度は非抱合型のときよりも高く設定した。概ね、非抱合型胆汁酸と同様の結果となったが、T-HCA に弱い FXR アゴニスト活性を認めた (Fig.1B)。この理由は不明であるが、タウリン部分が FXR との作用に寄与している可能性が示唆された。

次に、これら胆汁酸の FXR アンタゴニスト活性について検討するため、CDCA 5 μ M 存在下での活性を評価した。CDCA 共存下において、CDCA、DCA 及び HDCA はその活性を用量依存的にさらに増加させた (Fig.2A)。CA、UDCA、 α -MCA 及び HCA は有意な変化を認めなかった。また β -MCA には用量依存的な活性の減少傾向が認められた。LCA は 12.5 μ M までは用量依存的な活性のさらなる増加を示したが、25 μ M 以降その活性は一転減少した。高濃度での活性の減少について特に 50 μ M での活性は、5 μ M CDCA 単独よりもさらに低下しており LCA がアンタゴニスト活性を有している

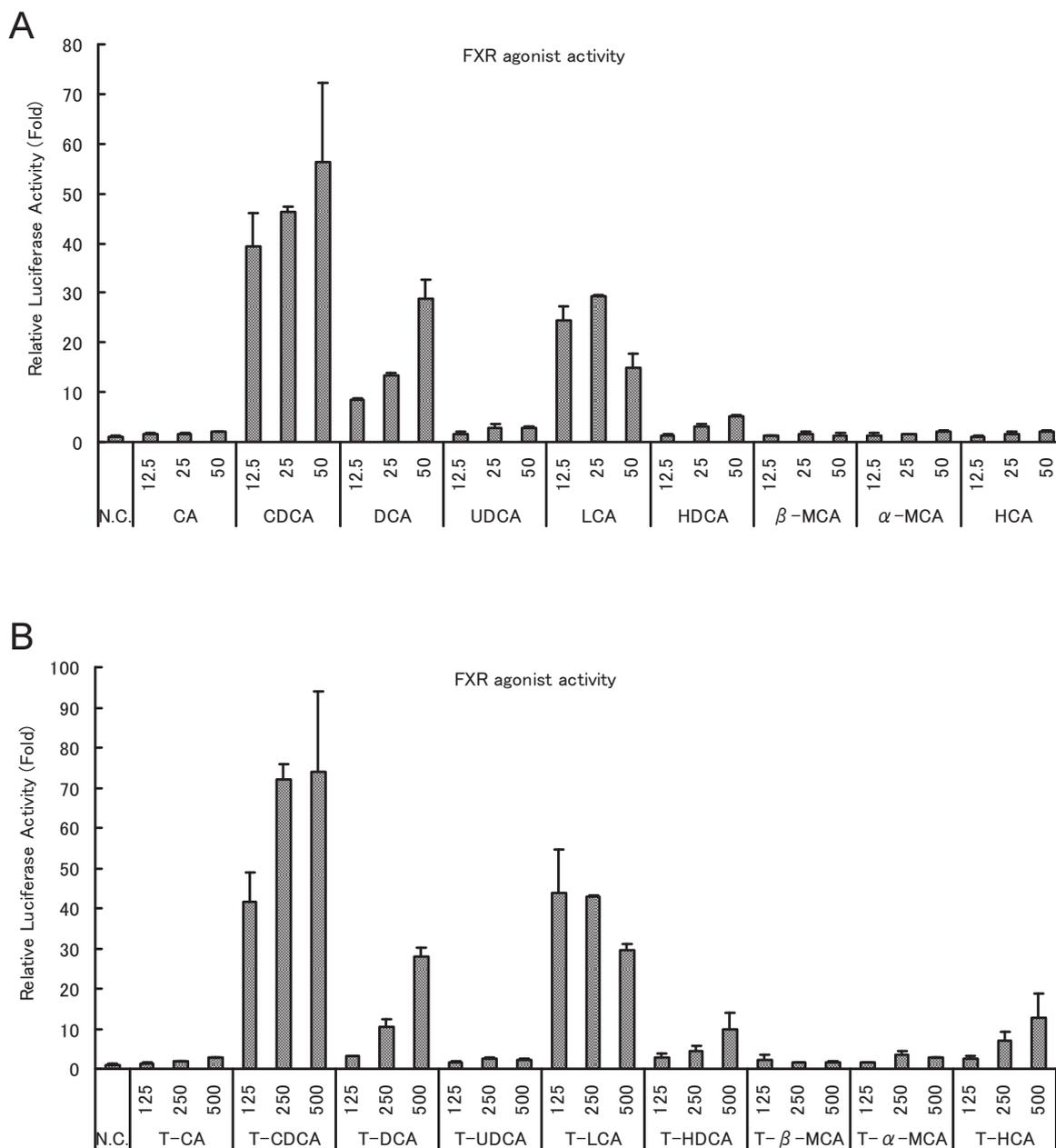
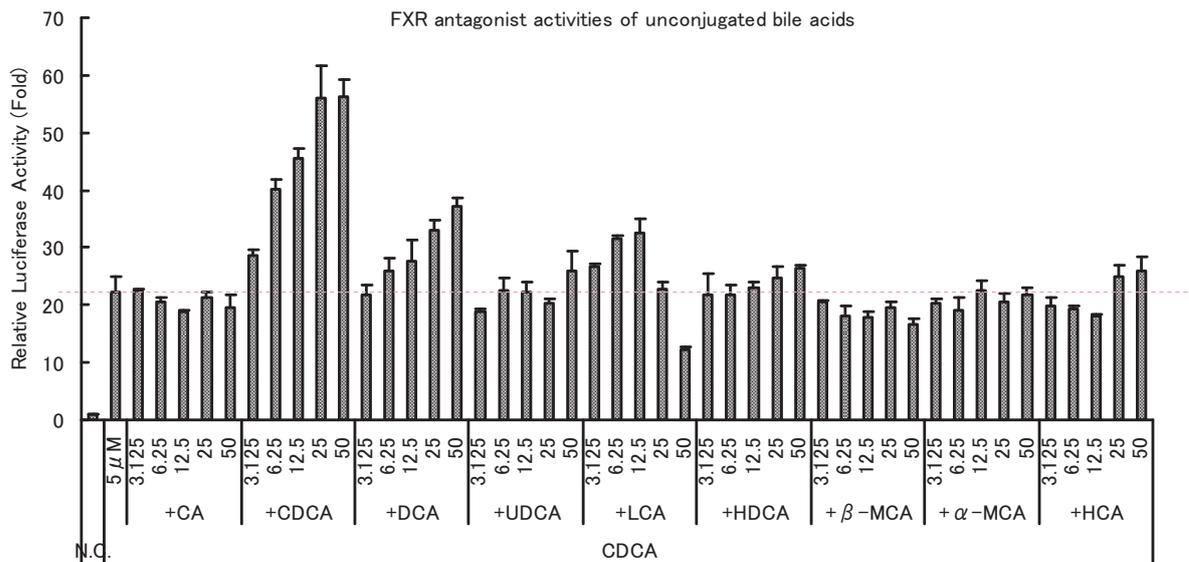


Fig.1 Hep3B 細胞における各種胆汁酸の FXR アゴニスト活性 (A: 非抱合胆汁酸、B: タウリン抱合胆汁酸)

ような結果となっている。LCA 単独処理時でも 50 μM では 25 μM のときと比べて活性は減少していることから、LCA はパーシャルアゴニストとして機能する可能性が考えられた。その一方でタウリン抱合型胆汁酸において T-CDCA、T-DCA、T-LCA 及び T-α-MCA には用量依存的な活性の増加が認められた (Fig.2B)。また、T-CA、T-UDCA 及び T-β-MCA には活性の変化は確認されなかった。T-HDCA 及び T-HCA については用量依存的な活性の更なる増加が認められた後、高濃度での活性の減少が確認された。これらの知見から T-HDCA や T-HCA もパーシャルアゴニストとして機能する可能性が考えられた。Hep3B 細胞を用いた上記の結果から、同じ胆汁酸であってもその抱合形式により FXR に対する作用が異なっていることが示唆された。

A



B

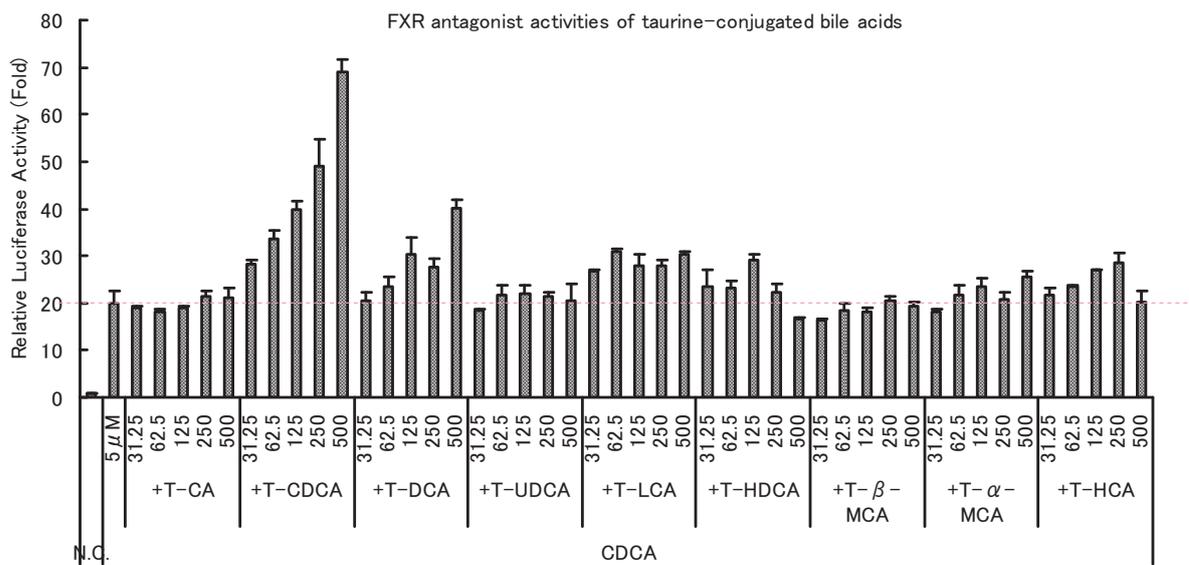


Fig.2 Hep3B 細胞における各種胆汁酸の FXR アンタゴニスト活性 (A: 非抱合胆汁酸、B: タウリン抱合胆汁酸)

2) マウスFXRに対する胆汁酸の活性評価

FXR に対する各胆汁酸の効果を評価する際は、これまでヒト由来の培養細胞もしくはヒト組み換え型 FXR タンパク質を使用していた。ヒトとマウス・ラットの FXR の全アミノ酸配列のアミノ酸相同性は 93%、FXR のリガンド結合領域 (LBD) に限定すれば 95% と非常に高く、このことからヒト及びゲシ動物における FXR とリガンドとの作用は同じと考えられている。よって、*in vivo* で FXR の機能を評価する場合はマウスやラットを使用しているのが実状である。しかし、わずかなアミノ酸の違いが FXR とリガンドとの作用に重要である可能性は捨てきれない。また、あるリガンドのアン

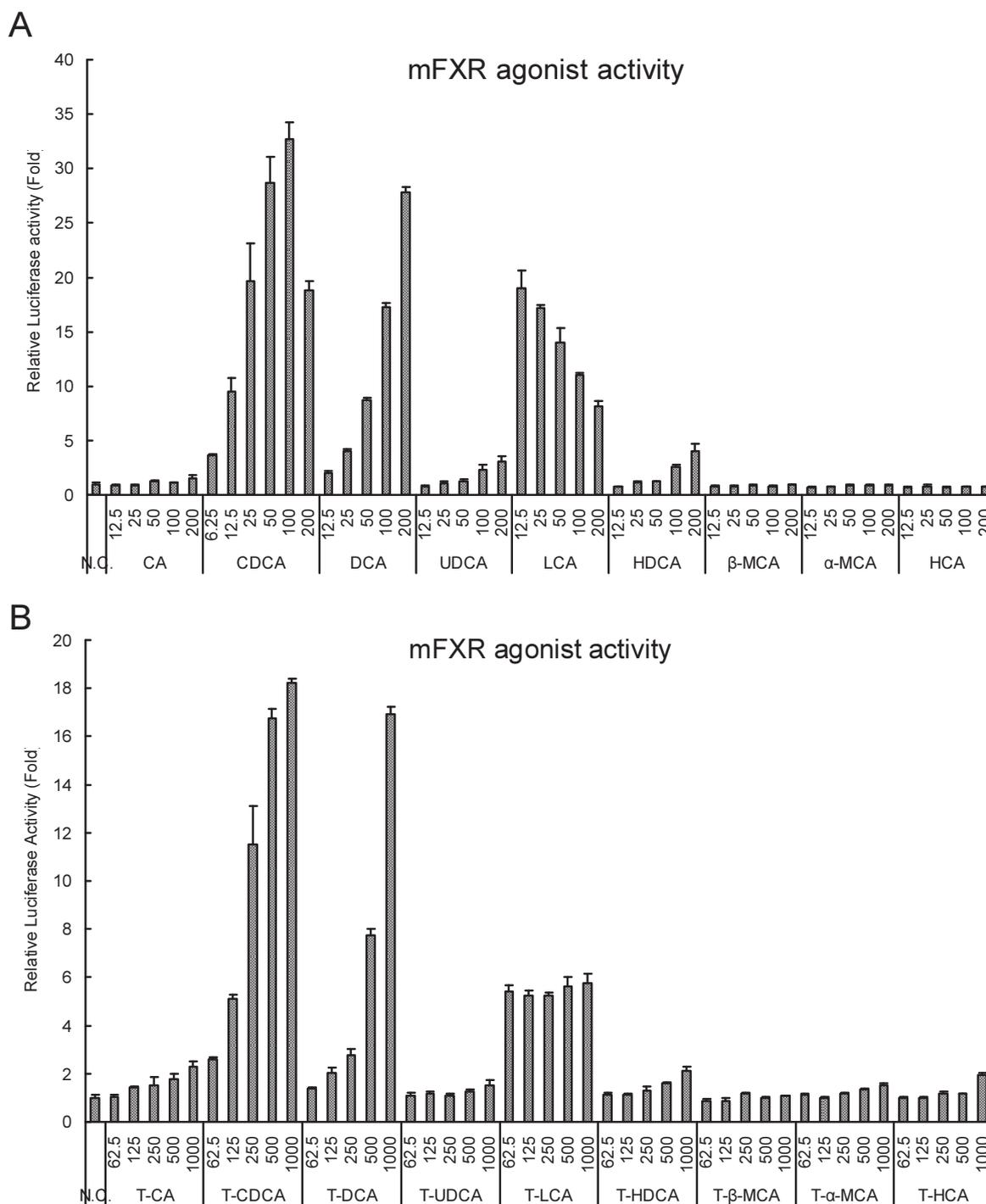


Fig.3 Hepa1-6 細胞における各種胆汁酸の FXR アゴニスト活性 (A: 非抱合胆汁酸、B: タウリン抱合胆汁酸)

タゴニスト活性を評価する場合はアンタゴニストがLBDに作用するとは限らないため、完全なタンパク質として評価する必要がある。そこで、C57BLマウス肝癌由来細胞であるHepa1-6及びマウスFXR発現ベクターを用いて各胆汁酸とFXRの作用を評価した。

ヒトFXRに対する作用と同様にCDCA、DCA及びLCAは高いアゴニスト活性を示し、UDCA及びHDCAはわずかではあるが活性を認めた(Fig.3A)。CA、β-MCA、α-MCA及びHCAについては

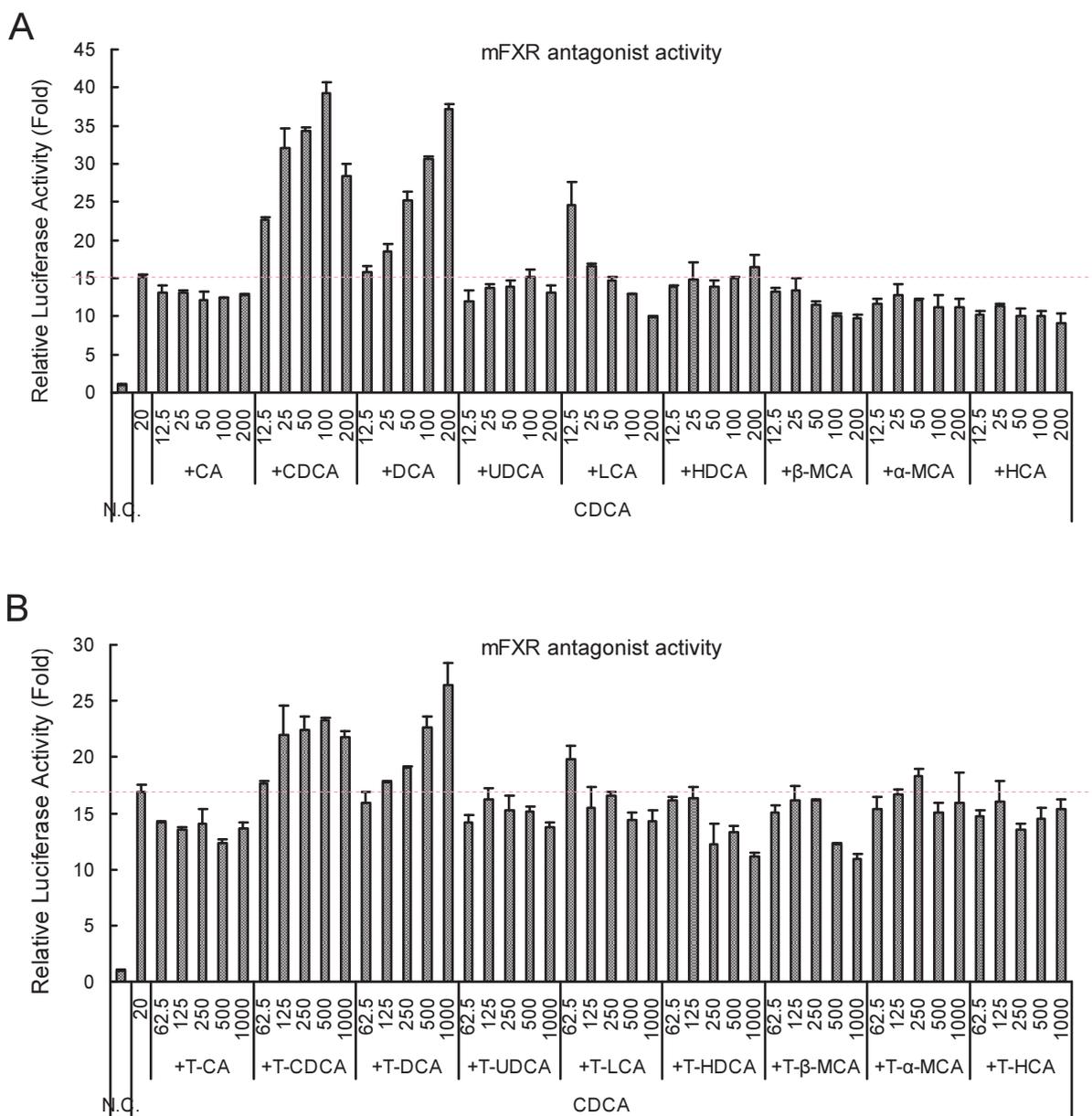


Fig.4 Hepa1-6 細胞における各種胆汁酸の FXR アゴニスト活性 (A: 非抱合胆汁酸、B: タウリン抱合胆汁酸)

わずかな活性も認められなかった。またタウリン抱合型胆汁酸においてはT-β-MCA以外の胆汁酸で用量依存的な活性を示した (Fig.3B)。さらに CDCA 存在下での CDCA もしくは DCA 処理により活性がさらに増加した (Fig.4A)。UDCA 及び HDCA 処理では活性の変化を認めず、CA、LCA、β-MCA、α-MCA 及び HCA との共処理により活性は低下した。加えて T-CDCA もしくは T-DCA により、CDCA による活性はさらに増加した一方で、T-CA、T-UDCA、T-LCA、T-HDCA 及び T-β-MCA 共処理では活性の低下が見られた (Fig.4B)。T-α-MCA 及び T-HCA 処理では活性の変動はなかった。

本研究ではヒト及びマウス由来の細胞を用いてそれぞれの FXR と内因性胆汁酸との作用について検討した。ヒト及びマウス FXR と各胆汁酸との間に様々な作用が見出され、ヒトとマウスの FXR に対して各々の胆汁酸が異なる作用を示したが、程度はわずかであった。一方、両実験系に共通して認

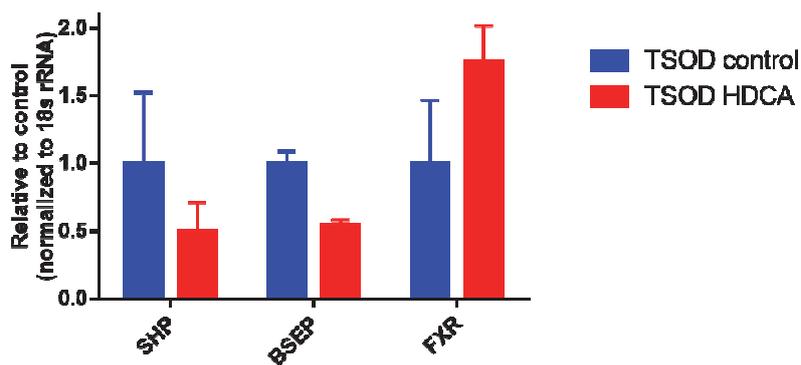


Fig.5 HDCAによるFXRおよびFXR活性により発現誘導される分子(SHP,BSEP)の発現変化

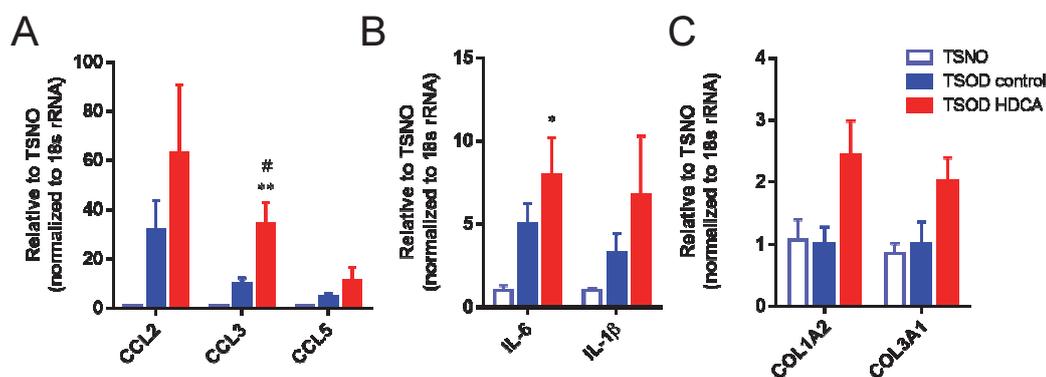


Fig.6 HDCAによる炎症マーカー (A:ケモカイン、B:炎症性サイトカイン) およびコラーゲン (C) の発現量の変化

められたこととしてCDCA、DCA、LCA、T-CDCA及びT-DCAに高いアゴニスト活性が認められたこと、HDCA及びそのタウリン抱合体に弱いアゴニスト活性が認められたこと、及びHDCAのタウリン抱合体に用量依存的なアンタゴニスト活性が認められたことなどが挙げられる。これらのことから、T-HDCAはFXRに対してパーシャルアゴニストとして作用することが示唆される。

3) 肥満モデルマウスに対するFXRを介したHDCAの効果

T-HDCAが生体内でもFXRのパーシャルアゴニストとして作用するかを検討するため、非アルコール性脂肪性肝炎の病態モデルマウスであるTsumura Suzuki Obese Diabetes (TSOD) マウスに対するT-HDCAの効果の評価した。TSODマウスは、通常食下で肥満を呈するマウスであり、加齢に伴い非アルコール性脂肪性肝炎を発症することが報告されている。本研究ではTSODマウス(5週齢、雄性)に0.05%HDCAを含む食餌を24週間与え、肝臓においてどのような影響が見られるのかを検討した。

TSODマウスにHDCAを投与後の肝臓における胆汁酸組成を、抽出した胆汁酸を脱抱合処理した後解析すると、肝臓中の総胆汁酸量には変化は見られなかったが、HDCAの増加およびβ-MCA、

CAの減少が見られた。一方で、FXRに対するアゴニスト作用の強いCDCAやDCAの含量には影響しなかった。この胆汁酸の変化を見ると、FXRアゴニスト量は不変であり、FXRパーシャルアゴニストとなるHDCAが増加しているためFXR活性が相対的に低下している可能性が推察された。そこで、FXRの活性を評価するため、FXR活性により発現誘導される small heterodimer partner (SHP) やbile salt export pump (BSEP) の発現量を、リアルタイムPCR法で定量した。HDCAを投与することによりTSODマウス肝臓のSHPやBSEPの発現量は低下するが、FXRそのものの発現には変化は見られなかった (Fig. 5)。これらの事より、TSODマウスにHDCAを投与すると肝臓内のHDCA量が増加することで、FXR活性の抑制が引き起こされることが示唆された。

FXR活性化は炎症反応の抑制に寄与することが知られているため、TSODマウスの肝炎に対するHDCAの影響を検証した。TSODマウスの肝臓において、炎症マーカーである炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6) やケモカイン (CCL2、CCL3、CCL5) の発現は、正常マウス (TSNOマウス) の肝臓よりも増加している。TSODマウスにHDCAを投与することで、肝臓におけるこれら炎症マーカーの発現がさらに増加した (Fig. 6A,B)。組織学的な評価においても、TSODマウスの肝臓で見られていた白血球の浸潤や肝細胞の壊死等の所見は、HDCAを投与することで増悪していた。また、Azan染色により見られる、肝臓の線維化はTSODマウスよりも進行していた、線維化に伴い、肝臓内のコラーゲン (Col1A2、Col3A1) の発現量も、HDCA投与により増加していた (Fig. 6C)。これらの結果より、HDCAの投与はFXRの活性を抑制し、TSODマウスの肝炎症状を悪化させることが示された。

■結論

HDCAのタウリン抱合体は、FXRのパーシャルアゴニストとして作用することが示唆された。TSODマウスに対するHDCAの投与により、肝臓内のFXR活性が低下し炎症反応の増悪が引き起こされる可能性を明らかにした。