

図2 ■ 抱合型胆汁酸

を見ると、その水酸基がすべてステロイド骨格の片面に集中している。これらにカルボン酸も加えた部分が分子内で親水的な領域を形成する一方、反対側の面が疎水的領域を構成することから両親媒性の分子であることがわかる。結果として、食事成分の中の脂質を消化管腔内で分散させることができ、界面でのリパーゼの作用による脂質の消化やその後の吸収に寄与する。

コレステロールから胆汁酸を生合成する経路は単一ではない⁽²⁾。Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) がコレステロールを7 α -コレステロールに変換する経路があり classicあるいはneutral pathwayと呼ばれる。この7 α 水酸化コレステロールが、CYP8B1により12 α 水酸化を受けるかどうかでCA、あるいはCDCAへの分岐点となる。一方、CYP27A1によりコレステロールの27位が水酸化されたあとで、CYP7B1によりステロイド環に水酸基が導入される経路があり、acidic pathwayと呼ばれる。このalternative pathwayで生成される胆汁酸は、多くても胆汁酸合成全体の25%程度までと考えられている。合成された一次胆汁酸は、主としてタウリンあるいはグリシンがアミド結合した抱合型胆汁酸(図2)として胆嚢に蓄積され、食事摂取に応答して胆管を通り十二指腸に分泌される。ヒトではタウリン抱合体とグリシン抱合体が3:1程度であるが、ラット・マウスではほとんどがタウリン抱合である。また、マウスはヒトと同様胆嚢があるが、ラットは胆嚢をもたないという特徴がある。

胆汁酸の腸肝循環にかかわる分子群⁽³⁾

小腸下部の回腸近辺では、抱合型胆汁酸のトランスポーターである apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT)/ileal bile acid transporter (IBAT)/solute carrier family 10 member 2 (SLC10A2) が高発現しており、通常は消化管腔内に分泌された胆汁酸の大部分を消化管上皮が吸収する。吸収された胆汁酸は intestinal bile acid-binding protein (IBABP)/fatty acid-

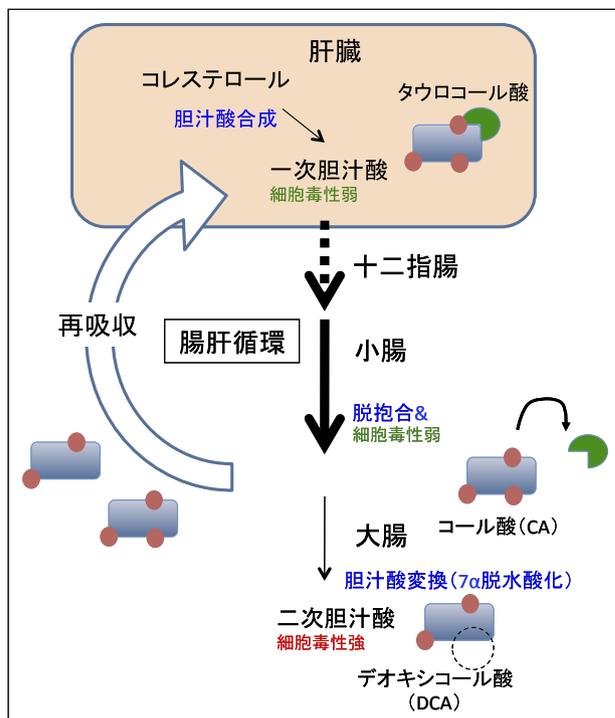


図3 ■ 胆汁酸の腸肝循環と消化管内での代謝

binding protein subclass 6 (FABP6) が腸上皮内の輸送にかかわると考えられている。腸上皮の側底膜では、heterodimeric transporter OST α /OST β が血液への胆汁酸流出にかかわる。門脈血中へ取り込まれた胆汁酸は肝臓へ到達し、sodium-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)/SLC10A1と organic anion transporter (OATP) が肝細胞へ胆汁酸を取り込むが、一部の胆汁酸は体循環血に流入する。肝細胞へ取り込まれた胆汁酸は、再度胆嚢へ蓄えられて次に分泌される機会を待つ。このように、胆汁酸分子自体は消化管から門脈を経て肝臓へ至る経路を循環していることから、腸肝循環と表現される(図3)。通常、消化管腔内へ分泌された胆汁酸の95%程度は腸肝循環により再利用され、一部の胆汁酸は下部消化管へ流入するといわれている。また、胆汁酸の排泄経路としては、胆汁以外にグルクロン酸や硫酸による抱合を受けて尿中へ排泄される経路も存在する。

胆汁酸と腸内細菌の相互作用・二次胆汁酸の生成⁽⁴⁾

小腸管腔内の中でも下部にいくにつれて、腸内細菌の bile salt hydrolase (BSH) により抱合型胆汁酸からアミノ酸が外され脱抱合が起こる。胆汁酸トランスポーター ASBT/SLC10A2は抱合型胆汁酸を取り込みやすい

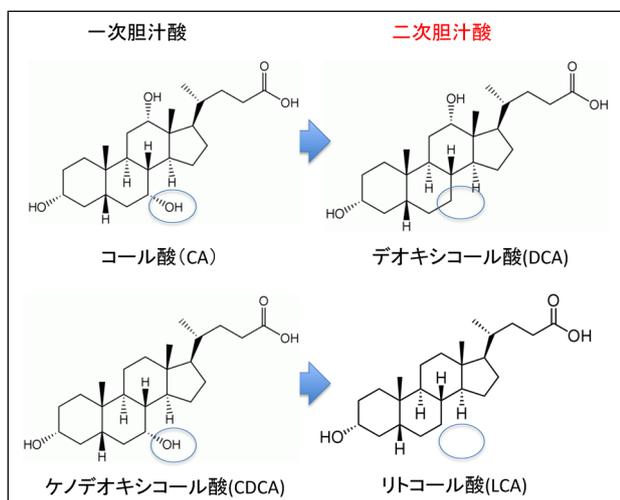


図4 ■ 胆汁酸の7 α 脱水酸化

ことが知られている。消化管腔内で腸内細菌により抱合型胆汁酸の脱抱合が起こると、ASBT/SLC10A2による取り込みを免れて下部消化管へ流れこみ、体内の胆汁酸プールを減少させることが結果として胆汁酸排泄を介するコレステロールの排泄促進に寄与する可能性がある。プロバイオティクスとして用いられるビフィズス菌や乳酸菌の中にはBSH活性をもつことから、その効果が期待されている。

脱抱合された胆汁酸は、腸内細菌による脱水酸化などにより二次胆汁酸となる。CAやCDCAの7 α 水酸基が脱水酸化されると、それぞれデオキシコール酸(DCA)やリトコール酸(LCA)となる(図4)。これらの胆汁酸は水酸基が減ることで相対的に疎水的となり、比較的強い細胞傷害性をもつことが知られている。胆汁酸は、乳酸菌やビフィズス菌などの増殖を阻害する。一次胆汁酸であるCAと、その二次胆汁酸であるDCAを比較した場合、DCAのほうがより低濃度で強力にこれらの増殖を抑制する。食品の大腸菌群の評価にデソキシコレートを含む選択培地が用いられるが、このデソキシコレートはDCAそのものである。消化管内にDCAが増えれば、腸内細菌叢が影響を受けるのは当然とも考えられる。ただし、その腸内環境は選択培地と必ずしも同じではない。生体内では、より注意深く解析する必要がある。

ラットを用いた実験で、消化管の部位ごとに胆汁酸組成を解析することで、脱抱合が起こる部位や、一次胆汁酸から二次胆汁酸への変換が生じる部位を調べることができる。実際に調べてみると、脱抱合は小腸を下るに従い徐々に起こるのに対し、二次胆汁酸への変換は腸内細菌が多数存在する盲腸で速やかに行われる。高脂肪食を

表1 ■ 胆汁酸分子種の例

名称	官能基の配置
CA	3 α OH, 7 α OH, 12 α OH
CDCA	3 α OH, 7 α OH
DCA	3 α OH, 12 α OH
LCA	3 α OH
UCA	3 α OH, 7 β OH, 12 α OH
UDCA	3 α OH, 7 β OH
α MCA	3 α OH, 6 β OH, 7 α OH
β MCA	3 α OH, 6 β OH, 7 β OH
ω MCA	3 α OH, 6 α OH, 7 β OH
HCA	3 α OH, 6 α OH, 7 α OH
HDCA	3 α OH, 6 α OH
7-oxo-DCA	3 α OH, 7O, 12 α OH
7-oxo-LCA	3 α OH, 7O
12-oxo-LCA	3 α OH, 12O

摂取させた状態でも、盲腸内や糞便中の胆汁酸にはCAはほとんど検出されない。このことは、ラットに高脂肪食を摂取させた状態でもCAの7 α 脱水酸化はほぼ完全に行われることを示しており、ヒトでも同様なことが確認されている。

腸内細菌の中にはhydroxysteroid dehydrogenaseをもつものがあり、胆汁酸分子種の水酸基から水素を引き抜くことでオキソ体の生成に関与する⁽⁵⁾。この段階を経て水酸基の向きが逆のエピマーを生じる場合がある。ラットの糞便中に観察される胆汁酸分子種の例を表1に示す。7 β の水酸基をもつウルソデオキシコール酸(UDCA)は胆石の場合に処方される。また、7 β -OHを有するウルソコール酸(UCA)は、CAの7位はオキソ体となった7-オキソデオキシコール酸(7-oxo-DCA)を経て生成されると考えられる。胆汁酸分子種には動物種による差異が知られている。特に、実験動物として汎用されるラットやマウスの肝臓では、CDCAが6 β 水酸化を受けて生成される α ミュリコール酸(α MCA)や、7位の水酸基が α MCAとは逆向きの β MCAが生成されることから、一次胆汁酸分子種がヒトより多様である。 β MCAはラットの消化管や糞中にもかなりの量が存在し、腸内細菌の作用により ω MCAやヒオデオキシコール酸(HDCA)が生成される。マウスやラットの大腸でLCAの濃度が極めて低いのは、肝臓においてCDCAからMCAへの変換経路が存在するため⁽¹⁾、相対的にCDCAが少なくなることが原因と推察される。ヒトでは、MCAが存在しないので、ラットやマウスでLCAを増やすことを目的としてCDCAを投与しても、大半はMCAへ変換されてしまうことになるので注意が必要である。6 α 水酸基をもつヒオコール酸(HCA)やヒオデオキシコール酸(HDCA)は、ブタに特徴的な胆汁酸で

あるが、ラットの糞便中にも検出される。ラットやマウスを用いた実験で胆汁酸代謝を調べる際には、分子種がヒトと異なることをあらかじめ理解しておく必要がある。

Farnesoid X receptor (FXR) を介する胆汁酸の作用⁽²⁾

以前から知られていた胆汁酸の生理作用は、脂質吸収の促進にかかわるものだった。しかし最近では、シグナル分子としての側面が認識されるようになった。情報伝達分子としての胆汁酸の受容体として、複数の核内受容体や、細胞膜表面に存在するGタンパク質共役型受容体(GPCR)が知られている。胆汁酸がFXR α /NR1H4の内在性リガンドであることが示されてから、恒常性維持におけるシグナルとしての胆汁酸の重要性が注目されるようになった。FXRはほかの核内受容体と同様、リガンド結合領域とともにDNA結合領域を有し、retinoid X receptor (RXR) とヘテロダイマーを形成することによりFXR response elementを介してsmall heterodimer partner (SHP) などの遺伝子発現調節に関与する。FXR $^{-/-}$ マウスでは、肝臓での*Cyp7a1*や*Cyp8b1*の発現低下が見られたことから、FXRが胆汁酸生合成調節にかかわることが示された。*Cyp7a1*や*Cyp8b1*発現は、liver receptor homologue 1 (LRH1) やhepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4 α)により正に制御されるが、SHPはこれらの作用を一部抑制する。Shp $^{-/-}$ マウスでも*Cyp7a1*や*Cyp8b1*発現は低下するので、胆汁酸合成調節は必ずしもSHP依存的不是である。しかし、いずれにせよ胆汁酸過多になると肝臓での胆汁酸合成が抑制されるというネガティブフィードバック機構が存在することになる。また、再吸収された胆汁酸による消化管上皮内でのFXR活性化は、fibroblast growth factor 15/19 (FGF15/19)の発現増加と循環血中への分泌を促す。FGF15/19は、肝細胞に発現する受容体FGFR4/ β -Klothoを介して*Cyp7a1*発現を低下させることで胆汁酸生合成を抑制する作用がある。また、肝臓でのFXR活性化は、門脈から胆汁酸を取り込むためのトランスポーター発現を負に制御し、一方で肝細胞から胆汁への胆汁酸排泄にかかわるトランスポーターの発現を増加させる。結果としてこれらの機構は、適切な脂質吸収を行いつつ、肝臓での細胞毒性を起ささないレベルに胆汁酸の量を制御するシステムと考えられる。FXRが活性化されると、リポタンパク質代謝、糖代謝、あるいは炎症などに関連する多様な作用が報告されており、今後の研究の発展が期待される。

FXR以外の核内受容体を介する胆汁酸の作用⁽²⁾

FXR以外にもpregnane X receptor (PXR) やvitamin D receptor (VDR)は胆汁酸を認識する核内受容体である。FXRを活性化する胆汁酸としてはCDCA, DCA, LCA, CAがあるが、このうちCAはその活性化能力は極めて弱い。一方、PXRは、LCAや3-oxo-LCAにより活性化されるが、CDCA, DCA, CAでは活性化されない。また、VDRの強力なアゴニストは1,25-trihydroxyvitamin D3であるが、LCAなどの胆汁酸によっても活性化される。Vdr $^{-/-}$ マウスでは、肝臓での*Cyp7a1*や*Cyp8b1*発現が増加することから、胆汁酸そのもの以外にまたビタミンDも、胆汁酸生合成の制御に関与すると考えられる。

胆汁酸受容体としてのGPCR⁽²⁾

核内受容体ばかりでなく、細胞膜に存在するGPCRの中にも、胆汁酸を認識するものがある。G protein-coupled bile acid receptor (Gpbar1)/GPR131/TGR5がそれである。マクロファージにおけるGpbar1/TGR5の活性化は、LPS誘導性の炎症性サイトカイン発現を抑制する。この機構としては、nuclear factor κ B (NF- κ B)の核内移行を抑え、NF- κ Bによる炎症性サイトカイン発現を抑制する経路が報告されている。また、消化管内分泌細胞であるL細胞に発現するGpbar1/TGR5を活性化させるとglucagon-like peptide 1の分泌が誘導されることから、胆汁酸分子は、消化管ホルモンを介して糖代謝に影響すると考えられる。Gpbar1/TGR5の作用として興味深いのは、エネルギー代謝における関与である⁽⁶⁾。マウスに高脂肪食を摂取させると脂肪組織への脂質蓄積が見られるが、高脂肪食にCAを大過剰加えた飼料を摂取させると、高脂肪食による脂質蓄積を抑制することが見いだされた。このとき、Gpbar1/TGR5活性化を介するエネルギー代謝の亢進が観察されたことから、Gpbar1/TGR5がエネルギー代謝亢進の標的となる可能性が示された。エネルギー代謝にかかわる新規アゴニストを探索するうえでは極めて興味深い報告だが、内在性の胆汁酸にその効果を期待するのは難しいかもしれない。というのも、このときの胆汁酸添加量は通常の胆汁酸代謝を考えると極めて高い濃度に設定されている。投与する胆汁酸分子が、それ以外の別の分子種に変換される経路がある場合に、結果として生体内の胆汁酸代謝を攪乱させて予期しない部分で別の作用を発揮する可能性があることは、CDCAのところでも述べた。胆汁酸の分

子種によって、受容体やトランスポーターによる認識が異なり、過剰に投与することで代謝の様相が通常に比べると大きく逸脱してしまうと、その受容体だけでなく、腸内細菌にも影響を及ぼす可能性がある。宿主だけでなく、腸内細菌叢も動物個体の恒常性維持において無視できない構成要素であるので注意が必要である。

胆汁酸代謝の評価・生体試料中の胆汁酸分析^(7,8)

消化管関連臓器や血中での胆汁酸を正確に測ることは、その代謝を知るうえで必要である。その関連分子種の個別濃度と組成を見ることは、代謝が正常か異常かを判断する有力な拠り所となる。以前はガスクロマトグラフィーによる解析が主流であったが、気化させるために誘導体化するステップを要した。現在、胆汁酸分子種の分析には高速液体クロマトグラフ質量分析装置 (LC-MS) が威力を発揮する。LC-MSではサンプル調製の手間が省けるだけでなく、誘導体化効率を考慮する必要もなくなる。さらに、装置の改良により分析に要する時間も格段に短縮された。脂質分析の際には、抽出過程でのサンプルのロスや測定値のばらつきが大きい。そこで、当初の濃度をできるだけ正確に把握するため、抽出操作の前にあらかじめ既知量の内部標準を添加しておき、分析時に標準物質の回収率を基に目的物質の濃度を定量する内部標準法が用いられる。主要な胆汁酸は炭素数24であるのに対し、炭素数23で側鎖部分が短いノルデオキシコール酸 (NDCA) を内部標準とすることが多い。胆汁酸に限らず、生体内での代謝を考える際には、多くの臓器、血液や消化管内容物など、性状の異なる試料で関連化合物の濃度を解析する必要がある。筆者らの実験系では、これらの生体試料を計量し、凍結乾燥させたものを粉碎した後に、内部標準物質の添加とアルコール抽出を行う。この方法を採用することで、すべてとは言わないが比較的性状の異なる試料でもほぼ同様な抽出操作で胆汁酸抽出が可能である。現在では、血液、肝臓、胆汁、消化管内容物や糞便など、各種生体試料を用いて、抱合体を含む30種程度の胆汁酸濃度と組成を解析している。

CA経口摂取の実験系

高脂肪食を摂取させたとき、糞便中のDCAやLCAが増加することがヒトにおける実験で示されている。したがって、実験動物に餌を介してCAを摂取させる実験系は、高脂肪食で起こりうる胆汁酸分泌の増加を模倣した系と考えることもできる。しかし、問題はその添加量で

ある。多量のCAを経口摂取させると、前述のようにGpbar1/TGR5を介するエネルギー代謝を亢進させることにより高脂肪食による肥満を改善するのではないか。CA摂取の実験系を高脂肪食モデルとするというのは、一見前述の報告と矛盾しているように思える。

どのような実験系を選択するかは、何を目的とするかで決まる。胆汁酸分析の手法をすでに確立していたので、CA摂取ラットの各組織や消化管内容物、胆汁や血液中の胆汁酸組成をモニターすることにより、通常の胆汁酸代謝を逸脱しない程度のCA負荷を導きだすことが可能ではないかと考えた。2g/kg飼料のCA添加飼料(H-CA)をラットに与えた場合には、エネルギー代謝亢進の結果と思しき脂肪組織重量の低下が観察された⁽⁹⁾。このときの胆汁酸組成を調べたところ、H-CAラットでは糞中の抱合型CAが残存しており、糞中の主要な胆汁酸がCAであった。H-CA摂取ラットでは二次胆汁酸であるDCAへの変換だけでなく、脱抱合を完全にできないほど多量のCAが消化管内に供給されていると考えられた。一方、飼料中のCA添加量を0.5g/kg飼料まで減らすと脂肪組織重量の低下は観察されなくなるとともに、糞中での抱合型胆汁酸はほとんど検出されず、主要な胆汁酸分子種はDCAとなることを確認した。このときに腸内細菌叢を調べたところ、高脂肪食で観察されるような腸内細菌叢の変化が、いずれのCA摂取群でも観察された。これらの結果から、胆汁酸が腸内細菌を制御する宿主因子の一つであると考えられる。

一次胆汁酸としてCAが増えると、大腸内ではほぼすべてが7 α 脱水酸化されるので、結果としてDCAの比率が増す。DCAの量的な増加は、細胞老化にかかわるsenescence-associated secretory phenotypeと呼ばれる炎症性サイトカインや発がん促進作用のある多様な分泌性タンパク質発現を肝星細胞に引き起こし、結果として肝がんを悪化させる⁽¹⁰⁾。CAを摂取飼料に添加する単純な実験系でも、その条件を注意深く設定すれば、高脂肪食や加齢で引き起こされるCAへの胆汁酸代謝の偏りを模倣する実験系にすることもできることになる。胆汁酸を受容体分子のリガンドと考えるか、体内で多様な関連分子種に代謝あるいは変換される化合物と考えるかで、実験系の捉え方が異なるということを認識する良い機会となった。昨今、胆汁酸そのものが代謝調節のシグナル分子として認識されるようになり、改めてコレステロール吸収を上げるために胆汁酸を添加するという実験系を眺めると、当初の目的である「コレステロールを増やす」ということ以外に、胆汁酸という「余計なシグナル因子」をわざわざ加えているように思えてくる。胆汁酸そ

のものがコレステロールから生成されるので、胆汁酸の動きも無視できないし、長期の動物実験を行う際には腸内細菌叢の挙動も気にかかる。

おわりに

古典的な実験系であっても、新しい実験・解析技術を導入して注意深く眺めることで、新たな展開の可能性や意義を見いだすことができる可能性はある。前述した、胆汁酸を餌に添加するという実験系もその一例である。現在、胆汁酸経口負荷の実験系において、胆汁酸が腸内細菌叢に及ぼす作用以外に、宿主側においても興味深い応答がいくつか観察されており、それらの機構について解析を進めている。本解説の内容が、メタボリックシンドローム関連の病態生理解明、またその予防・治療対策の一助となれば幸いである。

謝辞：筆者らの研究は、文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラムにより実施している。

文献

- 1) 内田清久：ピフィズス, **5**, 157 (1992).
- 2) 内田清久：“胆汁酸と胆汁”，創英社／三省堂書店，2009.
- 3) T. Q. de Aguiar Vallim, E. J. Tarling & P. A. Edwards: *Cell Metabolism*, **17**, 657 (2013).

- 4) N. Pavlovic, K. Stankov & M. Mikov: *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **168**, 1880 (2012).
- 5) J. M. Ridlon, D.-J. Kang & P. B. Hylemon: *J. Lipid Res.*, **47**, 241 (2006).
- 6) M. Watanabe, S. M. Houten, C. Mataka, M. A. Christoffolete, B. W. Kim, H. Sato, N. Messaddeq, J. W. Harney, O. Ezaki, T. Kodama *et al.*: *Nature*, **439**, 484 (2006).
- 7) M. Hagio, M. Matsumoto & S. Ishizuka: *Methods Mol. Biol.*, **708**, 119 (2011).
- 8) M. Hagio, M. Matsumoto, M. Fukushima, H. Hara & S. Ishizuka: *J. Lipid Res.*, **50**, 173 (2009).
- 9) K. B. L. S. Islam, S. Fukiya, M. Hagio, N. Fujii, S. Ishizuka, T. Ooka, Y. Ogura, T. Hayashi & A. Yokota: *Gastroenterology*, **141**, 1773 (2011).
- 10) S. Yoshimoto, T. M. Loo, K. Atarashi, H. Kanda, S. Sato, S. Oyadomari, Y. Iwakura, K. Oshima, H. Morita, M. Hattori *et al.*: *Nature*, **499**, 97 (2013).

プロフィール



石塚 敏 (Satoshi ISHIZUKA)

＜略歴＞1991年北海道大学農学部畜産学科卒業／1993年同大学大学院農学研究科修士課程修了／1994年同大学農学部助手／2003年同大学大学院農学研究科講師／2005年同助教授／2007年同准教授、現在に至る＜現在の研究テーマ＞胆汁酸代謝の病態生理における役割、食品成分が生理作用を発揮する作用点の探索＜趣味＞歩くこと、身の回りで起こる面白い出来事を見つけること