

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 25 年度博士課程入学

氏 名 柿元 俊彰

指導教員名 辻本 元

論文題目

Studies on pathophysiological roles of bile acids in canine gallbladder mucocele

(犬の胆嚢粘液嚢腫における胆汁酸の病態生理学的役割に関する研究)

犬の胆嚢粘液嚢腫 (GBM) とは、犬の胆嚢内において、胆汁を含むゼリー状の粘液物質が過剰に蓄積する疾患である。近年、GBM は犬における最も一般的な胆道系疾患の一つとして認識されているが、その発生病序は未だ不明のままである。

GBM 発生の危険因子の一つとして脂質代謝異常症が報告されている。疎水性胆汁酸は界面活性剤として小腸における脂溶性物質の吸収に寄与するだけでなく、ファルネソイド X 受容体や G タンパク質共役型胆汁酸受容体 (TGR5) といった胆汁酸受容体のリガンドとしても脂質代謝調節に関与していることが近年明らかにされている。また、GBM の病理組織学的特徴として、胆嚢内腔におけるゲル状内容物の蓄積や粘膜上皮における嚢胞状粘液過形成、および粘液の分泌亢進を示唆する粘膜上皮の粘液化生などが報告されている。胆嚢粘膜上皮の粘液分泌に関連して、疎水性胆汁酸は親水性胆汁酸よりも有意に胆嚢粘膜上皮からのムチン分泌を誘導することが報告されている。さらに、GBM の犬では食後胆嚢運動性の有意な低下が報告されているが、疎水性胆汁酸は胆嚢収縮の低下を誘導することも明らかにされている。以上の背景を踏まえ本論文では、犬における脂質代謝異常症は胆嚢中の胆汁酸組成の変化、特に疎水性胆汁酸分画の変化を介して GBM の病態発生に関与しているのではないかという仮説を立て、第 1 章では高脂肪食負荷が胆汁酸組成と胆嚢運動性に与える影響について検討した。続いて第 2 章では実際の GBM 症例の胆汁酸組成について調査した。第 3 章では第 2 章で得られた結果と考察を基に、1 節では GBM 症例犬の胆嚢組織における TGR5 と嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR) の遺伝子およびタンパ

ク質の発現定量解析を行なった。さらに第3章の2節では、TGR5-CFTR シグナリング経路の新規機能定量法の確立を目指し、その基礎的検討を行なった。

第1章：犬における高脂肪高コレステロール食が胆嚢中の胆汁酸組成および胆嚢運動性に与える影響

本研究では、健常犬に高脂肪高コレステロール食 (HFCD) を2週間給餌した場合、胆嚢中胆汁酸組成と胆嚢運動性はどのように変化するかについて調査した。健常なビーグル犬7頭を2群に分け、1群にはHFCDを給餌しもう1群には低脂肪食 (LFD) を給餌した。その後4ヶ月間のWashout期間を置き、今度はそれぞれの群で食餌内容を入れ替えてさらに2週間給餌を行なった。各給餌期間の前後で胆嚢運動性を超音波検査にて評価し、運動性評価後に胆嚢穿刺により胆汁を採取した。胆汁酸分画は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法にて分析した。その結果、HFCD給餌群では給餌開始前に比べ血中総コレステロール濃度が有意に増加し、同時に疎水性胆汁酸であるタウロケノデオキシコール酸 (TCDCA) やタウロリトコール酸 (TLCA) の胆汁中濃度の有意な増加も認められた。またこれらの胆汁酸の総胆汁酸に占める割合 (分画比) においても、HFCD給餌前後で有意な増加が見られた。さらに、HFCD群では給餌前後でコレシストキニン刺激に対する有意な胆嚢運動性の低下も観察された。一方、これらの胆汁酸組成の変化や胆嚢運動性の変化はLFD給餌群では見られなかった。以上の結果より、脂質代謝異常の犬では胆嚢中の疎水性胆汁酸が増加し、それに伴って胆嚢運動性も低下するという可能性が示された。

第2章：胆嚢粘液嚢腫の犬の胆嚢内容における胆汁酸組成

第1章で示された胆汁酸組成の変化がGBM発生に関連するものであるとするなら、GBM症例の胆嚢内容においても同様に疎水性胆汁酸の増加がみられる可能性が高い。従って第2章では、実際のGBM症例の胆汁酸組成について調査を行なった。GBM症例18頭の胆嚢内容中胆汁酸分画をHPLC法で分析し、14頭の健常犬のものと比較した。その結果、GBM群の胆嚢内容では、健常犬で検出される11種の胆汁酸のうち、TCDCAやTLCA、タウロデオキシコール酸 (TDCA) といった疎水性胆汁酸を含む7種において有意な濃度低下が認められた。さらに、GBM群においてTDCAやTLCA分画比の有意な低下を認めた。また全個体におけるTCDCA分画比と血中トリグリセリド濃度との間には有意な正の相関が見られ、TCDCA分画比が血中トリグリセリド

濃度と関連することが示唆されたが、他の胆汁酸分画比と血中脂質濃度との間に有意な相関は見られなかった。TDCA や TLCA は、腸内細菌の代謝を受けて合成される二次胆汁酸である。マウスを用いた報告では、胆嚢運動性の低下により胆汁酸の腸への分泌が障害されると二次胆汁酸の分画比が低下することが示されている。これらのことと第 1 章において疎水性胆汁酸の増加に伴って胆嚢運動性の低下が見られたことを合わせて考察すると、GBM 群で見られた TDCA や TLCA 分画比の低下は、胆嚢運動性低下による二次的な変化である可能性が考えられた。一方で、TDCA は胆嚢粘膜上皮において TGR5 の活性化を介して CFTR の機能を活性化することがわかっている。CFTR ノックアウト動物の胆嚢では、GBM でみられるようなゼリー状粘液物質の蓄積や粘膜上皮の嚢胞状粘液過形成が認められることが報告されており、TDCA 分画比の低下が TGR5 や CFTR の活性低下を介して GBM 発生に寄与している可能性も推測された。

第 3 章：犬の胆嚢粘液嚢腫と TGR5 および CFTR との関連性

GBM 症例で有意な分画比低下がみられた TDCA は、TGR5 発現に対して正の制御を行うことがわかっている。また CFTR 発現が阻害された動物では GBM に類似した胆嚢病変が報告されている。これらのことより、第 3 章の 1 節では GBM 症例の胆嚢では TGR5 と CFTR の発現低下がみられるという仮説を立て、GBM 症例における TGR5 と CFTR の遺伝子およびタンパク質の発現量解析を行なった。10 頭の健常犬と 18 頭の GBM 症例から得た胆嚢組織を用いて、リアルタイム PCR 法により TGR5 と CFTR の遺伝子発現量を定量した。タンパク質発現量は 6 頭の健常犬と 6 頭の GBM 症例から得られた胆嚢組織を用いて、ウェスタンブロット法により定量した。その結果、GBM 群において TGR5 遺伝子発現量の有意な低下が見られたが、タンパク質発現量では健常群と差は検出されず、CFTR の発現量は遺伝子においてもタンパク質においても GBM 群と健常群で有意な差は認められなかった。TDCA は TGR5 発現量を増加させることが報告されていること、またその TDCA 濃度および分画比が GBM 症例で低下していることを考えると、GBM 群における TGR5 遺伝子の発現量低下については TDCA 分画比の低下に関連する可能性が考えられた。しかし、TGR5 のタンパク質発現量に差が見られなかった原因は不明であり、今後例数を増やして再検証する必要があると考えられる。一方、CFTR の発現量は遺伝子レベルでもタンパク質レベルでも両群に差は見られず、GBM と CFTR 発現量との間には関連性が低いことが示

唆された。また、TDCAはTGR5を介してCFTRの機能を活性化することが報告されていることから、CFTRの発現量ではなくCFTRの機能とGBMとの関連性について調査する必要性が考えられた。

CFTRは発現している上皮膜細胞の水輸送において重要な機能を果たしている。近年、三次元構造を形成する細胞組織体（オルガノイド）を用いて、その内腔に流入する液体量を測定することによりCFTR機能を定量する方法が報告された。そこで第3章の2節では、犬の胆嚢オルガノイドを用いたTGR5-CFTRシグナリング経路の新規機能定量法の確立を目指し、基礎的検討を行なった。犬の凍結胆嚢組織から胆嚢オルガノイドを作製し、そのTGR5遺伝子発現量を犬肝臓オルガノイドと肝臓オルガノイドから分化させた胆管様オルガノイドとで比較した。遺伝子発現量はリアルタイムPCR法により定量した。次に肝臓オルガノイドと胆嚢オルガノイドをフォルスコリンにより刺激したもの、またCFTR阻害下でフォルスコリン刺激したものを用意し、それらのxy座標面積の経時的変化を調査した。その結果、胆嚢オルガノイドは肝臓や胆管様オルガノイドよりも有意にTGR5遺伝子の発現量が高いことがわかった。また肝臓オルガノイドと胆嚢オルガノイドの両方において、内腔へのCFTR依存性の液体流入が認められた。これらの結果により、犬胆嚢オルガノイドがTGR5-CFTRシグナリング経路の機能定量に有用であることが示唆された。

これら一連の研究により、脂質代謝異常に関連した犬のGBMの発生機序に関して以下のような新たな仮説が考えられる。すなわち犬の脂質代謝異常ではまず、胆汁中の疎水性胆汁酸の増加とそれに伴う胆嚢運動性の低下が起こり、次に、持続する胆嚢運動性低下により胆汁酸の腸肝循環が障害されると二次胆汁酸であるTDCA分画の減少が起こる。胆汁中TDCA分画の低下は、胆嚢粘膜上皮のTGR5の発現量およびリガンドが減ること意味するため、その結果CFTRの機能障害が引き起こされる。そしてCFTRの機能障害が引き起こす胆汁の粘性変化が持続すると、GBMでみられるような粘液物質の胆嚢内蓄積が始まる。

GBMは犬で好発する疾患であり、他動物で有用なモデルが存在しないことがその病態解明の進展を妨げている。しかし、オルガノイドは器官に類似した組織構造を形成することが示されている。上記の新たな仮説を基に今後さらなる検討を重ねることで、犬胆嚢オルガノイドがGBM発生機序解明の一助となることを信じている。