

## 審査の結果の要旨

氏名 柿元 俊彰

犬の胆嚢粘液嚢腫（GBM）とは、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が、その発生機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。さらに GBM の病態としては、胆嚢内腔におけるムチンの蓄積や食後胆嚢運動性の有意な低下などが報告されている。疎水性胆汁酸は脂質代謝に深く関与する一方で、胆嚢に対してはムチン分泌を増加させ、また胆嚢収縮も障害することが明らかにされている。これらのことから本論文では、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た。

第1章ではまず、犬における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。その結果、高脂肪食群では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を認めた。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、高脂肪食群で有意な増加が見られた。さらに、高脂肪食群では有意な胆嚢運動性の低下も観察された。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。

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。その結果 GBM 群の胆嚢内容では、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種の胆汁酸において有意な濃度低下を認めた。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。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。GBM においても有意な食後胆嚢運動性の低下が報告されており、二次胆汁酸分画比の低下は胆嚢運動性低下による結果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 G タンパク質共役型胆汁酸受容体（TGR5）の活性化を介して嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子（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 でみられるような粘液物質蓄積や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 の発現や機能低下を介して GBM 発生に寄与している可能性も推測された。

第2章での結果を受け、第3章の1節では GBM 症例における TGR5 と CFTR の発現量解析を行なった。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。デオキシコール酸は TGR5 発現量を増加させることが報告されていることから、GBM 群における TGR5 遺伝子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。TGR5 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た。一方 GBM と CFTR 発現量との間には関連性が低いことが示唆され、CFTR の機能と GBM との関連性についてさらに調査する必要があると考えられた。

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について基礎的検討を行なった。作製された犬胆嚢オルガノイドにおいて TGR5 の発現を認め、機能的な CFTR の発現も確認された。このことより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。

これらの研究により、脂質代謝異常に関連した 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、胆汁中の疎水性胆汁酸の増加と胆嚢運動性の低下が起これ、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 の減少が起こる。胆汁中 TDCA の低下は、胆嚢の TGR5 の発現量およびリガンドが減ること意味し、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 でみられる粘液物質の蓄積が始まる。上記の仮説を基に今後さらなる検討を重ねることが GBM 発生機序解明に繋がることを期待したい。

これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。