

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 21 年度 博士課程 入学

氏 名 貴田 大樹

指導教員名 尾崎 博

論文題目 血管組織における胆汁酸受容体 TGR5 および FXR の機能

[背景・目的]

胆汁酸はコレステロールの異化による代謝物であり、両親媒性の分子構造を有する。そのため、胆汁酸は腸管において脂質をミセル化することで、腸管壁からのその吸収を促進する役割を担う。胆汁酸は肝細胞で合成された後、胆嚢に一旦貯蔵され、腸管へと分泌される。腸管に分泌された胆汁酸の約 5% は糞便とともに排泄されるが、残りの大部分は腸肝壁から再吸収され、門脈を介して再び肝臓へと輸送される。このような胆汁酸の輸送経路は腸肝循環と呼ばれる。

脂質の吸収を促進する作用に加え、近年では胆汁酸のシグナル分子としての役割が注目されている。これまでに、G タンパク質共役型受容体である TGR5 および核内受容体である farnesoid X receptor (FXR) が胆汁酸受容体であることが明らかになっている。TGR5 は全身の組織に発現が認められる一方、FXR は肝臓や消化管など腸肝循環経路を構成する組織での発現が多い。これらの受容体は共に糖や脂質の代謝や炎症反応の制御に関与することが報告されているため、代謝性疾患や炎症性疾患の新たな治療ターゲットとして注目されている。

胆汁酸は腸肝循環経路のみならず、全身の循環血中にも漏れ出る。そのため、血管組織は恒常的に血中の胆汁酸に暴露されていると言える。また、血管組織も FXR と TGR5 を発現することが報告されている。これらのことから、血中の胆汁酸が血管組織の FXR や TGR5 の活性化を介して血管組織の機能に影響を与える可能性が考えられる。しかし、血管組織

における胆汁酸受容体の役割についての報告は少なく、これまでにその全容は明らかになっていない。そこで、本研究は胆汁酸受容体 TGR5 および FXR の活性化が血管組織の機能に与える影響を明らかにすることを目的とした。

[結果]

1) TGR5 の刺激は内皮細胞の NO 産生を促進し、単球の接着を抑制する

TGR5 と最も親和性の高い胆汁酸である tauro lithocholic acid (TLCA) を処置すると、ウシ大動脈内皮細胞 (bovine aortic endothelial cells, BAEC) およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) の一酸化窒素 (NO) 産生量が有意に増加した。この反応は siRNA による TGR5 の遺伝子発現抑制によって解除された。また、HUVEC において TLCA は内皮細胞型 NO 合成酵素 (eNOS) のリン酸化 (ser1177) レベルを上昇させた。さらに TLCA は HUVEC において Akt のリン酸化 (ser473) を引き起こし、細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させた。TLCA による NO 産生量および eNOS のリン酸化レベルの増加は phosphoinositide 3-kinase (PI3K) の阻害剤 LY294002 や Ca^{2+} チャネル阻害剤 La^{3+} の前処置、または細胞外液中の Ca^{2+} 除去によって有意に抑制された一方、protein kinase A (PKA) の阻害剤 (PKA inhibitory peptide, PKAi) の前処置では抑制されなかった。続いて TGR5 刺激による内皮細胞の NO 産生量の増加が内皮細胞の炎症反応に与える影響を検討した。HUVEC において、TLCA の処置は TNF- α 刺激による接着分子 VCAM-1 の発現量増加を抑制し、ヒト単球系細胞株である U937 の接着数を減少させた。また、TLCA は TNF- α 刺激による NF- κ B p65 サブユニットの核内移行を抑制したことから、NF- κ B の活性を阻害したことが示唆された。TLCA によるこれらの抑制効果は NOS の阻害剤である N^G -monomethyl-L-arginine (L-NMMA) の処置によって解除された。またマウス腸間膜の小静脈においても、TLCA の処置は lipopolysaccharide 刺激による単球の接着数の増加を抑制し、この抑制効果は L-NMMA によって解除された。

2) TGR5 の刺激は内皮細胞の透過性を抑制する

BAEC において TLCA の処置は経内皮電気抵抗値 (transendothelial electrical resistance, TER) を増加させた。また、TLCA は thrombin 刺激によって増加した BAEC に対する dextran の透過量を減少させた。この効果は siRNA による TGR5 の遺伝子発現抑制によって解除された。これらの結果から、TGR5 の刺激が内皮細胞のバリア機能を亢進することが示唆された。TLCA による dextran 透過量の減少は PKAi および Rac1 の阻害剤である NSC23766 の前処置によって解除された。また、TLCA は BAEC の細胞内 cAMP 量を増加させた。免疫染色によって内皮細胞の形態に与える TGR5 刺激の影響を検討したところ、TLCA の処置は細胞辺縁での actin 線維の重合を引き起こした。さらに TLCA は thrombin 刺激による細胞中央での actin 重合 (stress fiber の形成)、細胞間隙の拡大を抑制した。マウス耳介組織において、croton oil の塗布による色素漏出と浮腫の形成は TLCA を皮内に後処置することで有意に抑制され

た。さらに vascular endothelial growth factor (VEGF) の皮内投与による色素漏出と浮腫の形成も、TLCA を同時に皮内投与することによって有意に抑制された。

3) FXR の長期刺激は平滑筋の NO への感受性を低下させる

ウサギ腸間膜動脈に FXR 作動薬である GW4064 を 1、4、7 日間処置すると、高濃度 K^+ 、norepinephrine、endothelin-1 による収縮反応は変化しなかった一方、substance P による内皮依存性弛緩反応が時間依存的に抑制された。別の FXR 作動薬である

6 α -ethyl-chenodeoxycholic acid を 7 日間処置した場合も同様に内皮依存性弛緩反応が有意に抑制された。また、GW4064 を 7 日間処置すると Ca^{2+} イオノフォアである ionomycin による内皮依存性弛緩反応も有意に抑制された。GW4064 を 7 日間処置しても、腸間膜動脈の平滑筋細胞および内皮細胞の形態的变化やアポトーシスは観察されなかった。内皮細胞を除去した血管標本において、GW4064 を 7 日間処置すると NO 供与体である sodium nitroprusside による弛緩反応が抑制された。このとき、無刺激時および sodium nitroprusside 刺激時における内皮除去標本の平滑筋細胞内 cGMP 量が有意に減少していた。また、内皮除去血管標本に GW4064 を 7 日間処置しても、膜透過性 cGMP 類似体である 8-Br-cGMP による弛緩反応は変化しなかった。NO の刺激による cGMP 産生反応を担う酵素である soluble guanylyl cyclase の α および β サブユニットの mRNA 発現量は、GW4064 を 7 日間処置しても変化しなかった。

[考察]

本研究は血中の胆汁酸に着目し、循環器系に対するその作用を検討した初めての報告である。本研究により、胆汁酸は血管内皮細胞の TGR5 を刺激することで、NO 産生量の増加によって単球の接着を抑制すること、また透過性抑制能を強化することが明らかになり、これらの機構が炎症性疾患の新たな治療標的になり得ることが示唆された。さらに胆汁酸は血管平滑筋細胞の FXR を長期的に刺激することで、NO への感受性が低下し、内皮依存性弛緩反応が抑制されることが明らかになり、この現象が肝疾患に併発する循環器障害の病態に関わる可能性が示唆された。今後、これらの胆汁酸受容体の機能の解明が進み、これらを標的にした各疾患の治療法開発が進むことが期待される。