

助教
本間 一江

2008年 静岡県立大学大学院
生活健康科学研究科 修士課程
食品栄養科学専攻 修了
2013年 学位取得 博士（食品栄養科学）
2013年10月～ 現職

短鎖脂肪酸による肝臓の脂質代謝関連遺伝子および 抗酸化関連遺伝子の転写調節

1. 背景と目的

肝臓は、エネルギーホメオスタシスの調節に重要な役割を担う臓器であり、グルコースやアミノ酸などの水溶性栄養素が、消化吸収後に門脈を介して運ばれてくる。絶食後の再摂食時のような急激な糖質の流入は、脂肪合成を促進し、肝臓への脂肪の蓄積につながるだけでなく、急激なダイエットとリバウンドの繰り返しによるエネルギー代謝の恒常性の攪乱は、近年罹患率が増加している非アルコール性脂肪肝炎（NASH）のひとつの要因と考えられており、その進行には活性酸素種（ROS）の関与が指摘されている。

酢酸、プロピオン酸、酪酸などの短鎖脂肪酸（SCFAs：short-chain fatty acids）は、ヒトの大腸において、腸内細菌叢による難消化性多糖類の資化によって生成することが知られており、消化管内で産生された SCFAs は、受動拡散および担体輸送によって吸収上皮細胞に吸収され、細胞のエネルギー源となって消費されるが、一部は門脈を経て肝臓に至る。イヌリンやグァーガムなどの食物繊維を高脂肪食に添加してマウスに与えると、体重増加や肝臓における脂肪合成が抑制され[1]、これらの食物繊維の効果には、大腸で生成した SCFAs が関与していることが推定されている。酪酸には、ヒストン脱アセチル化（HDAC）阻害作用があり、ヒストンタンパクと核内転写因子のアセチル化修飾は、栄養シグナルによって可逆的に調節されている。しかしながら、酪酸をはじめとする HDAC 阻害作用のある物質がどのように肝臓の脂質代謝関連遺伝子や抗酸化関連遺伝子の転写を調節しているかは明らかになっていない。

そこで、本研究では、絶食後の再摂食における酪酸摂取が、肝臓における代謝変動に及ぼす影響を検討するとともに、その代謝を担う遺伝子の発現調節にヒストン修飾の変化が関与しているかを検討した。

2. 方法

2.1. 動物

6週齢のSD系雄ラットを、通常食で馴化させた後、6群に分けた（非絶食、絶食、対照食再摂食12h、酪酸添加食再摂食12h、対照食再摂食24h、酪酸添加食再摂食24h）。非絶食群以外を3日間絶食させ、屠殺時間より12時間もしくは24時間前から、高スクロース含有の対照食または酪酸ナトリウム5%添加食を、自由に再摂食させた。再摂食開始から12時間後または24時間後の午前9時～11時の間にラットを解剖し、肝臓と血清を採取した。本実験は、静岡県立大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号：第165139号）。

2.2. 血清 β -ヒドロキシ酪酸濃度

β -Hydroxybutyrate Fluorometric Assay Kit, PicoProbe（バイオビジョン）を用いて測定した。

2.3. 肝臓トリグリセリド含量・SOD活性・GSH/GSSG比

肝臓をRIPA bufferにてホモジナイズし、トリグリセリドE-テストワコー（富士フィルム和光純薬）を使用してトリグリセリド濃度を測定し、肝臓中のトリグリセリド量を算出した。また、SOD活性およびグルタチオン（GSH）量と酸化型グルタチオン（GSSG）量の測定には、SOD Assay Kit-WSTおよびGSSG/GSH Quantification Kit（同仁化学研究所）をそれぞれ用いて測定した。

2.4. mRNA発現量

肝臓中の総RNAをグアニジンチオシアネート法にて抽出し、Superscript III reverse transcriptase（Invitrogen）を用いて逆転写してcDNAを得た。リアルタイムPCRによって標的遺伝子のmRNA相対発現量を求めた。

2.5. クロマチン免疫沈降

ホルムアルデヒド終濃度1%の固定液で肝臓をホモジナイズし、37°Cで20分間インキュベートした後、グリシンを加えてさらに20分間インキュベートした。遠心分離して上清を除き、ペレットをFACS solutionで洗浄し、SDS lysis bufferに懸濁させた。超音波処理後サンプルは分注して保存し、希釈して免疫沈降に用いた。可溶化したクロマチン画分に、

抗アセチル化ヒストン抗体およびプロテインGセファロースを添加して免疫沈降させた後、DNAを精製して、標的遺伝子周辺に設計したプライマーを用いたPCRにて検出した。

3. 結果および考察

3.1. 絶食後の高スクロース食の再摂食が肝臓のトリグリセリド量に及ぼす影響

絶食後の再摂食は、急激な血糖値の上昇とインスリン過剰分泌などにより、肝臓の脂質代謝を大きく変化させる。本研究ではまず、肝臓におけるトリグリセリド量と脂肪酸合成酵素の発現量を調べた。肝臓中のトリグリセリド量は、3日間の絶食により有意に減少し、再摂食によって増加した。高スクロース食の再摂食時に酪酸を添加すると、再摂食24時間後に、添加していない対照食群と比較して、脂肪の蓄積は有意に抑制された (Table 1)。

Table 1 Effects of starvation and re-feeding a control diet or a diet containing sodium butyrate on liver triglyceride.

	nonFS	FS	Refeeding 12h		Refeeding 24h	
			Control	NaB	Control	NaB
Liver weight (g)	9.85 ± 0.39	4.76 ± 0.14*	8.54 ± 0.24	8.28 ± 0.57	10.11 ± 0.37	9.57 ± 0.57
Liver weight (g/100g BW)	4.39 ± 0.10	2.71 ± 0.05*	4.33 ± 0.12	4.14 ± 0.25	4.87 ± 0.10	4.74 ± 0.21
Liver triglyceride (mg/g liver)	7.83 ± 0.14	6.30 ± 0.45*	8.46 ± 0.46	7.86 ± 0.59	10.3 ± 0.9	7.59 ± 0.77#
Serum β-hydroxybutyrate (nmol/μL)	0.06 ± 0.02	1.32 ± 0.32*	0.14 ± 0.03	0.25 ± 0.06	0.06 ± 0.02	0.19 ± 0.02##

Data are expressed as means ± SE for 6-7 rats.

*: Significantly different between non-fasting group and fasting group at $p < 0.01$.

#, ##: Significantly different between animals refed a control diet (24h) and those refed a diet containing sodium butyrate (24h) at $p < 0.05$, $p < 0.01$.

酪酸添加食群では、対照食群と比較して、肝臓における Fatty acid synthase (FAS) の mRNA 発現量が低く、Carnitine palmitoyltransferase (CPT) の mRNA 発現量が高かった (Fig. 1)。脂肪酸のβ酸化に働く遺伝子の転写活性化に重要な役割を担う PPARα の発現も酪酸添加食群で高く、再摂食時の酪酸の摂取が脂肪酸酸化を促進していることが示唆された。

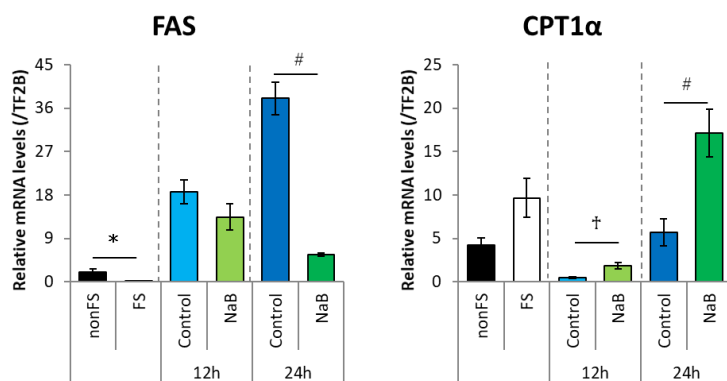


Fig. 1 Effects of starvation and re-feeding a control diet or a diet containing sodium butyrate on the mRNA levels in the liver.

3.2. 絶食後の酪酸添加食の再摂食が肝臓の抗酸化酵素の発現量に及ぼす影響

肝臓 1g あたりの SOD 活性と総肝臓重量あたりの SOD 活性は、再摂食 12 時間後に、酪酸

添加食群では、対照食群と比較して有意に高かった (Fig. 2)。ミトコンドリアマトリックスに局在し、炎症などの酸化ストレスで誘導され、細胞保護的に働く SOD2 の mRNA 発現量は、絶食によって減少し、高スクロース食の再摂食時には、再摂食 12 時間後に、酪酸添加食群で対照食群よりも高まった (Fig. 3)。

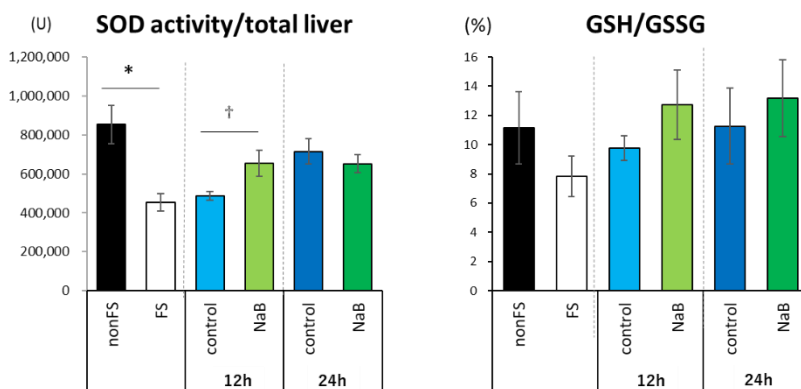


Fig. 2 Effects of starvation and re-feeding a control diet or a diet containing sodium butyrate on the SOD activity and GSH/GSSG ratio.

酸化ストレスの指標として、GSH/GSSG 比について検討したところ、GSH/GSSG 比は絶食によって低下し、酪酸添加食の再摂食によって増大する傾向を示した (Fig. 2)。GSH 合成関連遺伝子の発現も酪酸の添加によって高まり、絶食後の再摂食時に酪酸を摂取することは、肝臓中の GSH 量を増加させる方向、つまり抗酸化能を高めるように代謝が傾くこと考えられた。

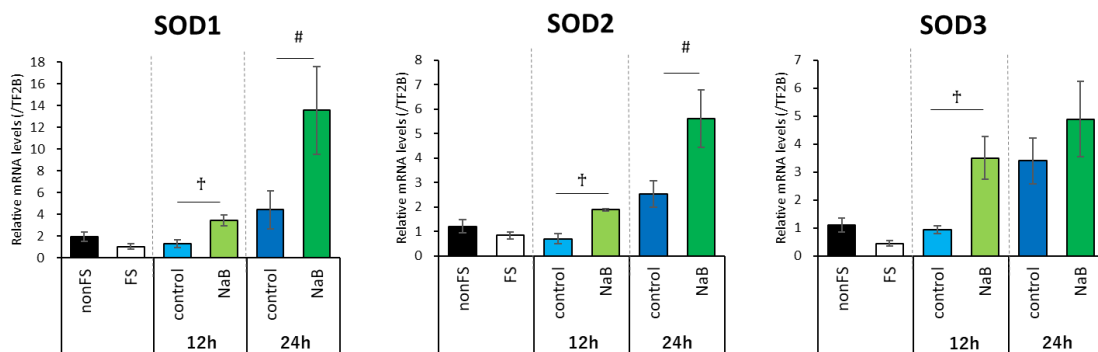


Fig. 3 Effects of starvation and re-feeding a control diet or a diet containing sodium butyrate on the mRNA levels in the liver.

3. 3. 絶食後の酪酸添加食の再摂食が脂質代謝関連遺伝子周辺のアセチル化に及ぼす影響

絶食によって血中濃度の高まるケトン体である β ヒドロキシ酪酸 (β OHB) には HDAC 阻害作用があり、投与濃度依存的に組織中のヒストンアセチル化レベルを増大させることが報告されている [2]。本研究では、 β OHB の血中濃度は再摂食時に低下したが、酪酸添加食群では、その低下が穏やかであった (Table 1)。

酪酸添加によって mRNA 発現の抑制された FAS 遺伝子周辺のヒストンアセチル化レベルは、対照食群と比較して酪酸添加食群で低く、転写活性と関連していた。一方、酪酸添加によって mRNA 発現が増強された SOD2 遺伝子周辺のヒストンアセチル化レベルは、対照食群と比較して酪酸添加食群で高かった。SOD2 の転写を促進する FOXO3 の mRNA 発現量は、再摂食時に酪酸を添加すると高まり、FOXO3 遺伝子周辺では、ヒストン H4 のアセチル化が酪酸の添加で増大する傾向が示された。

以上をまとめると、絶食後に酪酸ナトリウムを添加した食餌を再摂食させた場合には、脂肪酸合成の抑制および脂肪酸酸化の亢進により、肝臓における高スクロース食誘導性の脂肪蓄積が抑制されることが明らかとなった。また、GSH 合成関連遺伝子の発現が亢進し、GSH/GSSG 比が高まることが示唆された。再摂食によるミトコンドリアの酸化的リン酸化の亢進の結果発生する ROS の除去には、SOD2 が寄与していると考えられ、こうした代謝変化の調節メカニズムには、転写因子である FOXO3 が関与することが示唆された。これらの結果から、酪酸添加食の再摂食は、抗炎症作用を高め NASH のような肝疾患リスクを低減する可能性が推察された。

4. 謝辞

本研究を実施するにあたり、ご支援賜りました公益財団法人サッポロ生物科学振興財団に、心より感謝申し上げます。

5. 参考文献

- [1] Weitkunat K., *et al.*, *J Nutr Biochem*. 2015 Sep;26(9):929-37. Effects of dietary inulin on bacterial growth, short-chain fatty acid production and hepatic lipid metabolism in gnotobiotic mice.
- [2] Shimazu T., *et al.*, *Science*. 2013 Jan 11;339(6116):211-4. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor.