

博士論文

肝細胞増殖過程における薬物代謝酵素の発現
および関連する内在性物質の変動

広島大学 大学院医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

平成 27 年度入学 藤野 智恵里

主指導教員 古武 弥一郎

目次

略語一覧	1
第一章 序論	3
第二章 肝切除後の肝再生過程における薬物代謝酵素の発現と胆汁酸の影響	6
第一節 緒言	6
第二節 肝切除モデルマウスにおける肝再生評価	8
第三節 肝切除後の肝再生過程における肝臓と小腸での薬物代謝酵素の発現変動	10
第一項 肝切除後における CYP 分子種の mRNA 発現変動	10
第二項 肝切除後における核内受容体の mRNA 発現変動	14
第四節 肝切除後の肝再生過程における胆汁酸プロファイルの変動	17
第一項 肝切除後における胆汁酸関連遺伝子の mRNA 発現変動	17
第二項 肝切除後における胆汁酸濃度と胆汁酸組成の変動	19
第五節 コール酸投与による CYP 分子種の mRNA 発現変化と多変量解析	22
第一項 精製餌群でのコール酸投与における CyclinD1 と Cyp3a11 の mRNA 発現変化	22
第二項 コール酸投与による CYP mRNA 発現の多変量解析	24
第六節 マウス初代肝細胞を用いたコール酸による CYP 誘導の評価	27
第七節 小括および考察	28
第三章 ヒト肝細胞キメラマウスのヒト肝細胞置換率の違いにおける胆汁酸変動	34
第一節 緒言	34
第二節 ヒト肝細胞キメラマウスのヒト肝細胞置換率の違いにおける胆汁酸濃度と胆汁酸組成の変動	37
第三節 小括および考察	41
第四章 総括	44
実験材料および実験方法	49
引用文献	56
謝辞	69

略語一覽

ALT : alanine aminotransferase
AST : aspartate aminotransferase
BA : bile acid
BSEP : bile salt export pump
CA : cholic acid
CAR : constitutive androstane receptor
CDCA : chenodeoxycholic acid
CT : computed tomography
CYP : cytochrome P450
DCA : deoxycholic acid
EGF : epidermal growth factor
FGF 15/19 : fibroblast growth factor 15/19
FGFR4 : fibroblast growth factor receptor 4
Foxm1b : forkhead box protein m1b
FXR : farnesoid X receptor
GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCA : glycocholic acid
GCDCA : glycochenodeoxycholic acid
GDA : glycodeoxycholic acid
HI : hydrophobicity index
LCA : lithocholic acid
LC-MS/MS : liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry
MCA : muricholic acid
MRP2 : multidrug resistance-associated protein 2
Nor-DCA : nor-desoxycholic acid
NTCP : sodium/taurocholate co-transporting polypeptide
PC : principal component
PCA : principal component analysis
PH : partial hepatectomy
PXR : pregnane X receptor
RT-qPCR : real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
SCID : severe combined immunodeficiency disease
TCA : taurocholic acid

TCDCa : taurochenodeoxycholic acid

TDCA : taurodeoxycholic acid

TDM : therapeutic drug monitoring

TMCA : taumuricholic acid

TUDCA : tauroursodeoxycholic acid

UDCA : ursodeoxycholic acid

uPA : urokinase-type plasminogen activator

VDR : vitamin D receptor

第一章 序論

肝臓は高い再生能力を持つ臓器であり、部分的に切除しても残存する肝臓が再生することでその重量や機能を回復することができる。この再生能力を利用して、肝がん患者などにおいて病変部位排除のための肝切除術や生体肝移植が行われることがある。このような手術治療は悪性腫瘍を除去するため、最も確実性が高い治療とされている。

日本肝臓学会の肝臓診療ガイドライン 2017 年版によると、肝切除の適応となる肝細胞癌は、肝臓に腫瘍が限局し、かつその個数が 3 個以下であり、腫瘍の大きさについての制限はない。腫瘍の位置や大きさ、数などに応じて、門脈に沿って分けた区域、亜区域ごとに切除する系統的切除や、腫瘍の周辺のみを切除する部分切除などが選択される。一方、肝切除術や他治療で制御不能な肝細胞癌に対しては生体肝移植が考慮される。成人の生体肝移植では十分な大きさのドナー肝を確保する必要があり、術前に肝臓の容積をコンピュータ断層撮影 (computed tomography : CT) で計測した上で、提供肝の大きさが決定される。一般的には予測される移植肝の大きさがレシピエント体重の 0.7 % 程度以上で、かつドナーに残る肝臓がその摘出前の大きさの 3 割以上となることを基準としている。6 割程度切除したドナーの肝臓は、約 1 ヶ月で急激に大きくなり、その後半年から 1 年以上かけて徐々に回復する (Tanemura et al., 2012)。

肝切除術や肝移植後には免疫抑制薬、抗生物質や鎮痛薬などの薬物投与が行われる場合がある。しかし、肝再生により肝臓の機能が大きく変化するため、これらの医薬品の薬物動態が変動することにより有効血中濃度域から外れ、薬効が十分に得られない場合や、副作用発現につながる可能性がある。その中で、免疫抑制薬であるタクロリムスやシクロスポリンでは有効血中濃度域が狭く、therapeutic drug monitoring (TDM) の対象薬物となっている。

実際に、肝再生過程において医薬品の薬物動態が変動した報告がいくつかある。肝切除患者の中で残存する肝臓が 90.0 % 以上の患者と 35.5 % 以下の患者に分け、解熱鎮痛薬アセトアミノフェンを反復経口投与した場合、肝切除前と比較して手術後 1 日目、3 日目では残存する肝臓が少ない患者群では血漿中濃度の上昇が顕著であった (Hughes et al., 2015)。また、肝切除患者に抗がん薬ウラシルを投与した場合、代謝物ジヒドロウラシルのウラシルに対する血漿中濃度比が肝切除前と比較して肝切除後 1 日目に減少し、肝切除直後は代謝物の生成が減少することが知られている (Jacobs et al., 2018)。これらは肝切除直後の知見であり、肝切除により肝臓が部分的に欠失したことにより肝臓のクリアランスが減少したと想定される。しかしこの後、再生が進むことで薬物代謝がさらに変化する可能性も予想される。

肝移植患者において免疫抑制薬タクロリムスの血中濃度推移を 1 年という長期間測定した報告がある (Muraki et al., 2011)。この報告では、肝再生が進行するにつれ肝

機能が賦活化し、肝臓のクリアランスが数ヶ月から1年かけて徐々に増加していた。また、その中で、肝移植後1ヶ月間において小腸での薬物代謝の寄与が一時的に増加したことも示唆していた。このことから、肝再生過程において肝臓だけでなく小腸の薬物代謝も変動する可能性があると考えられた。このような肝再生過程における肝臓や小腸での薬物代謝の変動は、それぞれの臓器での薬物代謝酵素の発現が変動することにより生じている可能性があるが、ヒトにおいて肝再生過程における薬物代謝酵素の発現を測定することは難しい。

肝臓の再生の現象は魚類からヒトまですべての脊椎動物においてみられることが知られており (Michalopoulos, 2007)、1931年に Higgins と Anderson がラットで肝再生を科学的に証明してから (Higgins and Anderson, 1931)、2/3 肝切除モデル動物は肝再生研究に汎用されてきた。

肝臓はいくつかの葉で構成されているが、葉ごとの機能の差異はなく、一様な組織であるといわれている。ラットやマウスの肝臓は数え方の定義にもよるが、5-7つの葉からできており、そのうちの大きな葉3つ(2つ)で全体の約2/3の重量を占める (Fig. 1a)。それらの葉を根元で結紮切除することにより 2/3 部分肝切除 (partial hepatectomy : PH) モデルを作成することができる。このモデルは肝切除後すぐに肝再生が始まり、マウスでは約7日間、ラットでは7-14日間で元の肝重量と機能を回復する。切除した葉が再建するわけではなく残存している葉が大きくなることを肝再生と呼ぶ (Fig. 1b)。

ラットを用いた 2/3 肝切除モデルでの肝臓の薬物代謝酵素については、シトクロム P450 (CYP) と UDP-グルクロン酸転移酵素の分子種で mRNA やタンパク質発現に変動がみられるという報告が一部ある (Pellizzer et al., 1996; Trautwein et al., 1997; Tamási et al., 2001; Tian et al., 2005; Yao et al., 2011)。CYP1A2、CYP2E1 や CYP3A の mRNA 発現は肝切除後10分から低下し、その後24時間かけて上昇した (Trautwein et al., 1997)。また、CYP2C6 の mRNA 発現は肝切除後6時間と48時間において低下したが、CYP2C11、CYP2E1、CYP3A1 や CYP3A2 は肝切除後6時間と48時間において切除前から変化がなかった (Yao et al., 2011)。このように肝再生過程における薬物代謝酵素の発現変動が一部報告されている一方で、断片的な報告が多く、メカニズムも含め未だ十分にわかっていない (Li et al., 2016)。また肝再生過程における小腸の薬物代謝酵素の発現変動についてはラットにおいてもこれまで報告がない。

そこで本研究では 2/3 肝切除モデルマウスを用いて、肝切除後の肝再生過程における肝臓と小腸の CYP 発現変動とそのメカニズムについて検討した。これにより、肝切除や肝移植患者における薬物代謝の変動が明らかになり、より効果的な薬物治療を行うための最適な薬物投与量の設計に役立つことが期待される。

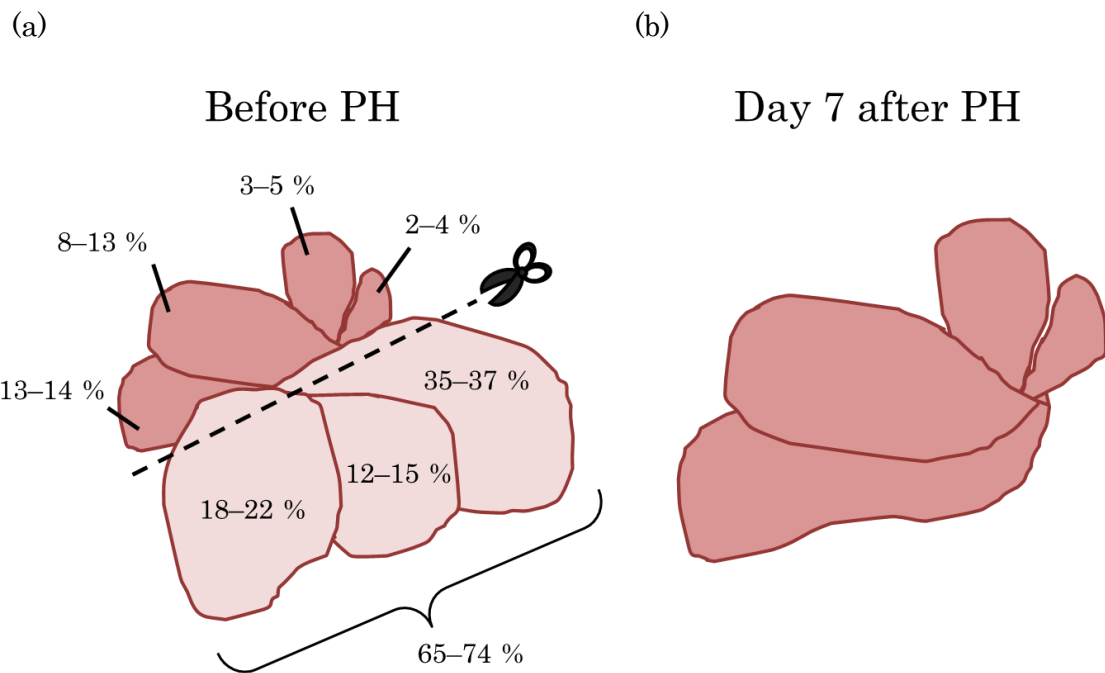


Fig. 1. Liver regeneration in two-thirds partial hepatectomy mouse model. The ratio of each lobe to the total liver weight (a), and regenerated liver at day 7 after PH (b).

This figure was modified from Greene and Puder, 2003; Nikfarjam et al., 2004

第二章 肝切除後の肝再生過程における薬物代謝酵素の発現と

胆汁酸の影響

第一節 緒言

本章では 2/3 肝切除モデルマウスを用いて、肝切除後の肝再生過程における肝臓と小腸の CYP の発現変動を調べた。また、食餌により内在性物質が変動することで肝再生や CYP 発現に影響を与える可能性を考え、動物実験で汎用される通常餌 (MF; オリエンタル酵母株式会社) に加え精製餌 (AIN-93G; 日本クレア株式会社) を与えた肝切除マウスにおいても同様に検討を行った。

食餌成分による肝再生への影響はこれまでいくつか報告がある (Holecek, 1999)。肝切除マウスに炭水化物の量が低い食餌を与えると、肝再生が遅延する (Chen et al., 2017)。また、肝切除モデル動物に高脂肪食を与えた場合は、肝再生が遅延するという報告 (Hamano et al., 2014; Zimmers et al., 2017; Saito et al., 2018) と、変化を与えないという報告 (Sydor et al., 2013; Garnol et al., 2016) がある。このように、食餌が肝再生に影響を与えることが知られている一方で、それぞれの食餌の種類において統一的な見解がなされておらず、またそのメカニズムも十分にわかっていない。

両食餌の組成を Table 1 に示しているが、MF は調製済みの餌から成分構成を測定したものを表しており、AIN-93G は配合内容を表している。AIN-93G はアメリカ国立栄養研究所 (AIN) が、マウス・ラットの成長や発育、妊娠、維持に必要とされる栄養必要量を基礎として組成を決定した飼料である (Reeves et al., 1993)。それぞれの栄養素の由来が明確な精製原料を配合している餌であるため、天然の穀物類を主原料としている通常餌と比較し、固有の未同定成分が少ないことを特徴としている。このような食餌に含まれる未知成分が、マウス・ラットにもともと発現する CYP の量を決定する一因であると考えられるため、精製餌を用いることで肝再生による CYP 発現変動への影響をより観察しやすくなると考えられる。なお、Table 1 より、通常餌と精製餌はカロリーや栄養素の構成割合などは大きく異なっていない。

Table 1 Composition of MF (standard diet) and AIN-93G (purified diet).

MF (standard diet)

moisture	7.90 %
crude protein (protein, amino acids)	23.1 %
crude lipid (fat, fatty acid)	5.10 %
crude ash (mineral)	5.80 %
crude fiber (cellulose)	2.80 %
soluble nitrogen free extract (soluble carbohydrate)	55.3 %
others (vitamin)	
total	100 %

Calories : 3.60 kcal/g

AIN-93G (purified diet)

cornstarch (carbohydrate)	51.9 %
milk casein (protein)	20.0 %
alpha cornstarch (carbohydrate)	1.00 %
granulated sugar (carbohydrate)	10.0 %
purified soybean oil (fat)	7.00 %
crystalline cellulose	5.00 %
mineral mix	3.50 %
vitamin mix	1.00 %
L-cystine (amino acid)	0.300 %
choline bitartrate (vitamin)	0.250 %
tertiary butylhydroquinone (antioxidant)	0.00140 %
total	100 %

Calories : 4.00 kcal/g

This table was adapted from each company's website as below.

MF; Oriental Yeast Co., LTD.; www.oyc-bio.jp/pages/animal_products/feed/ingredient

AIN-93G; CLEA Japan, Inc.; www.clea-japan.com/Feed/Feed_04_2.html

第二節 肝切除モデルマウスにおける肝再生評価

2/3 肝切除マウスにおける肝再生を評価するため、体重、肝重量体重比および肝障害の指標となる血液生化学検査値であるアラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase : ALT) レベルを測定した。また、細胞増殖の指標である CyclinB1 (*Ccnb1*) と CyclinD1 (*Ccnd1*) の mRNA 発現変動についても検討した。

体重は肝切除後 7 日間において通常餌、精製餌および偽手術群ともに大きな差はみられなかった (Fig. 2a)。肝重量体重比は、通常餌群で肝切除後 1 日の間に大きく上昇し、その後 3 日目から 7 日目までに徐々に増加し偽手術群と同等まで回復した。しかし精製餌群においては肝重量の上昇が十分にみられず、切除後 1 日目から 3 日目までは微増したものの 3 日目から 7 日目にかけて上昇がみられず、回復に至らなかった (Fig. 2b)。ALT レベルは、通常餌群と精製餌群ともに肝切除後 1 日目で大きく上昇したものの、その後回復した (Fig. 2c)。CyclinB1 の mRNA 発現は通常餌群と精製餌群で肝切除後 3 日目に大きく上昇し、その後 7 日目には低下した。CyclinD1 の mRNA 発現は通常餌群で肝切除後 1 日目から上昇しその後維持したが、精製餌群では 1 日目での上昇はみられなかった (Fig. 2d)。これらのことから、両食餌群で 2/3 肝切除後肝再生が生じたことを確認できた一方で、精製餌群では肝再生が遅延したことが明らかになった。

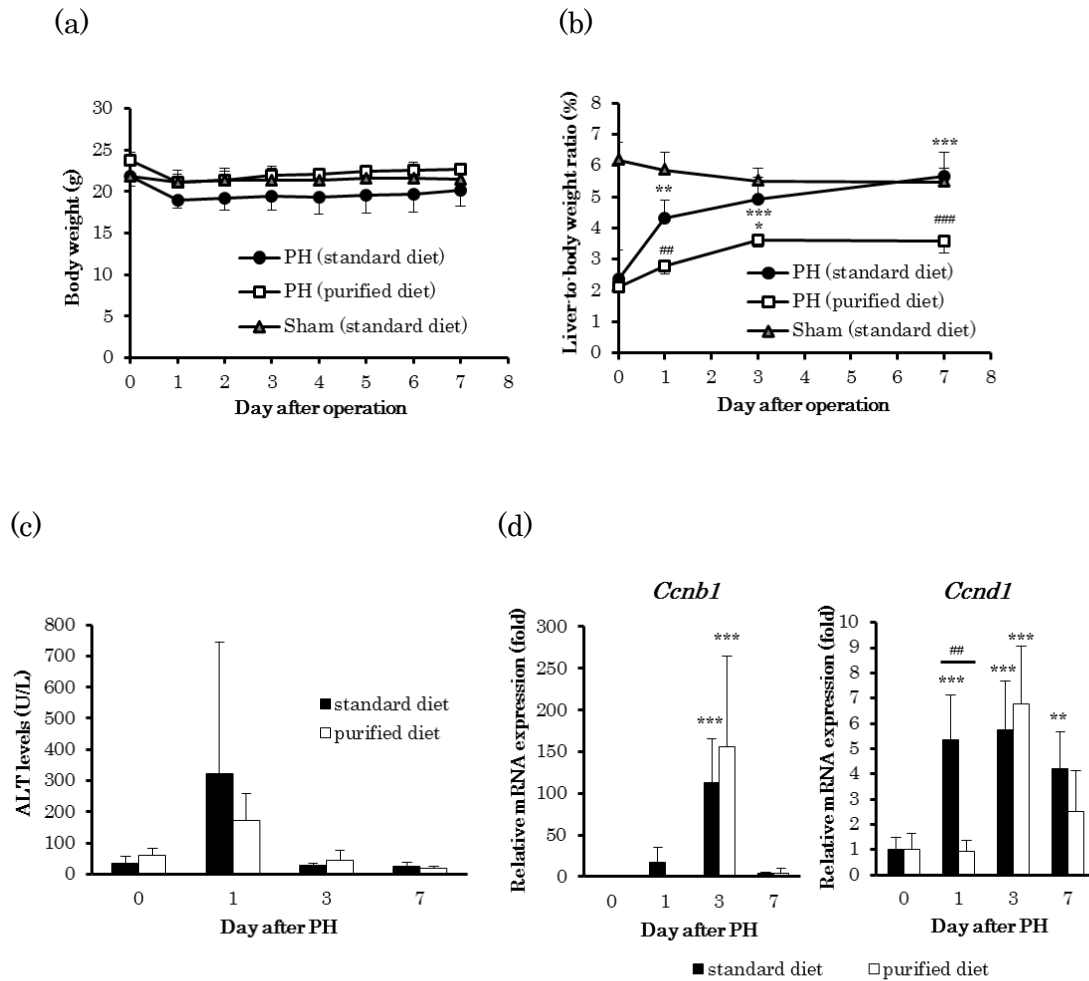


Fig. 2. Body weight (a), liver-to-body weight ratio (b), plasma ALT levels (c), and liver cyclin mRNA expression levels (d) under standard diet or purified diet feeding during liver regeneration after PH.

Mice were fed with standard diet (MF) or purified diet (AIN-93G) from 1 week before PH. Data are expressed as the mean \pm SD (n = 4–5). Cyclin/GAPDH mRNA expression in the PH groups was normalized to that in the sham operation group at each day and calculated relative to day 0. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (vs. day 0 in each diet), ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.001$ (standard diet vs. purified diet).

第三節 肝切除後の肝再生過程における肝臓と小腸での薬物代謝

酵素の発現変動

第二節で示した肝再生過程における肝臓と小腸での CYP の mRNA 発現の変動と CYP 発現を制御している核内受容体の mRNA 発現変動を調べた。

第一項 肝切除後における CYP 分子種の mRNA 発現変動

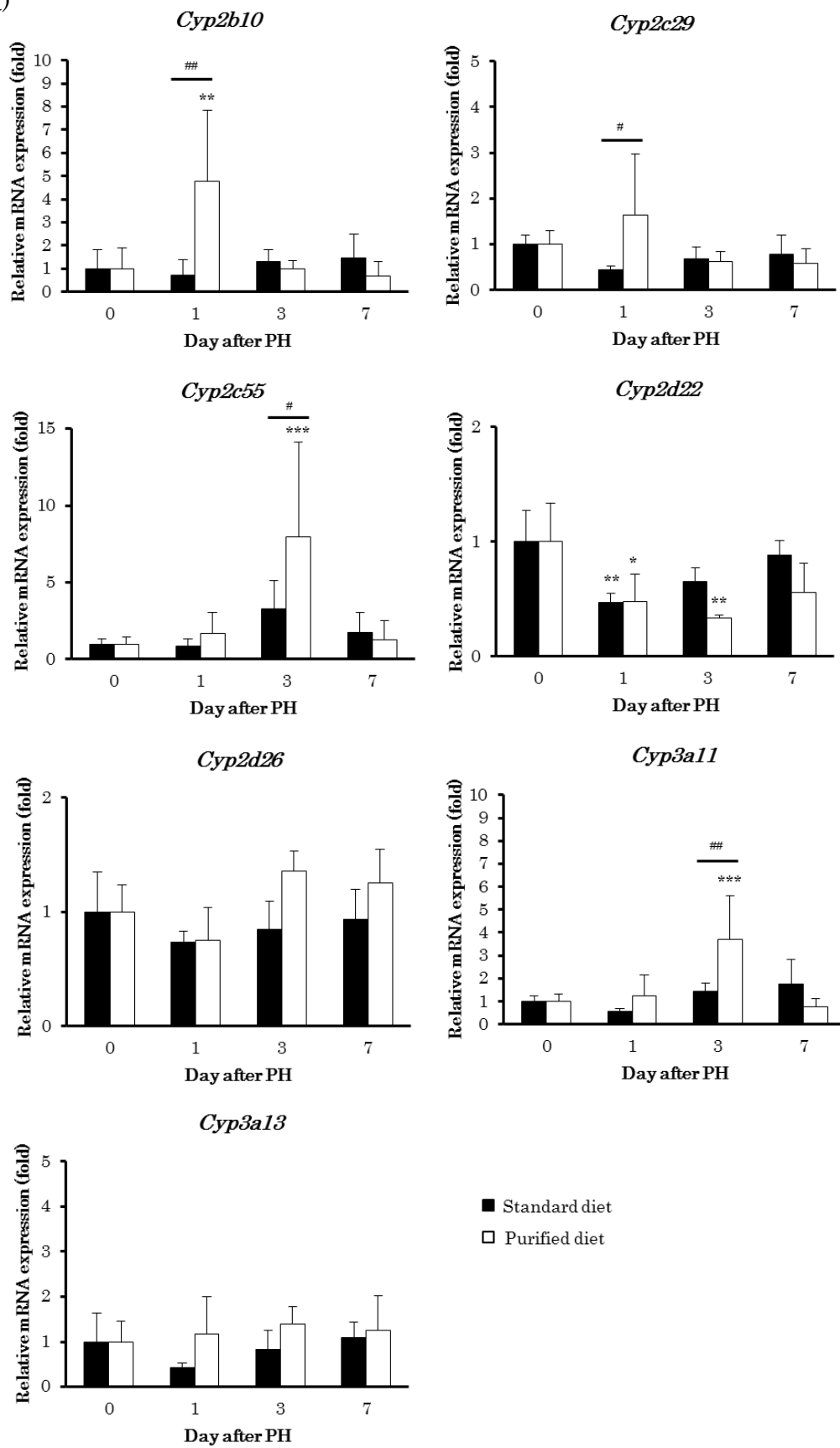
CYP 分子種は肝臓と小腸両方に発現する Cyp2b10、Cyp2c29、Cyp2c55、Cyp2d22、Cyp2d26、Cyp3a11 および Cyp3a13 の 7 種類を選択した (Renaud et al., 2011)。

肝臓では、Cyp2b10 の発現が精製餌群のみ肝切除後 1 日目に上昇した。Cyp2c29 は通常餌群と比較し精製餌群で肝切除後 1 日目において発現が高かった。また、Cyp2c55 の発現は食餌に関係なく肝切除後 3 日目で大きく上昇し、精製餌群の方が顕著にみられた。Cyp2d22 の発現は両方の群において減少しその後回復したが、精製餌群ではその回復が遅れた。Cyp2d26 の発現は両食餌群ともに大きな変動がみられなかった。Cyp3a11 の発現は通常餌群で肝切除後 1 日目に低下する傾向がみられたが、精製餌群では肝切除後 3 日目に発現が上昇し、その後低下した。Cyp3a13 の発現は大きな変動がみられなかったが、通常餌群で肝切除後 1 日目において低下する傾向がみられた (Fig. 3a)。

小腸では、Cyp2b10、Cyp2c29、Cyp2c55 および Cyp3a11 の発現が通常餌と比較し、精製餌群において肝切除後 1 日目で大きく上昇した。Cyp2d26 の発現は肝切除後 7 日目において通常餌群で精製餌群より高かった。Cyp2d22 と Cyp3a13 の発現は精製餌群において肝切除後 1 日目で上昇し、通常餌群でも同等の上昇傾向がみられた (Fig. 3b)。

以上の結果から、肝切除後の肝再生過程において、CYP 発現の変動が肝臓と小腸両方においてみられることが明らかとなった。また、通常餌群と比較し精製餌群ではより多くの CYP 分子種において発現の変動がみられた。

(a)



(b)

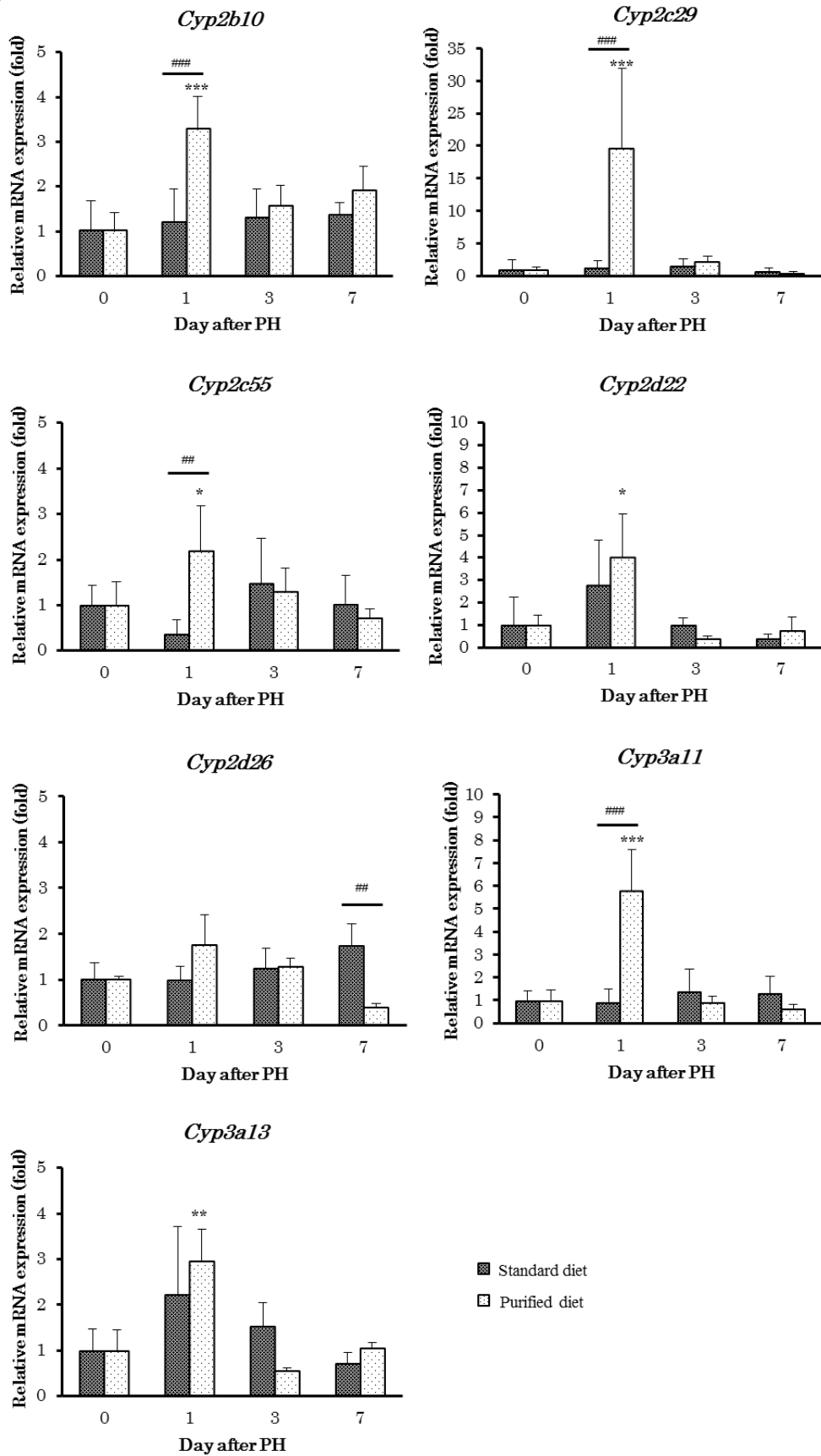


Fig. 3. Changes in CYP mRNA expression levels in the liver (a) and the small intestine (b) under standard diet or purified diet feeding during liver regeneration after PH.

Mice were fed with standard diet (MF) or purified diet (AIN-93G) from 1 week before PH. The mRNA expressions of seven CYP isoforms/GAPDH were normalized to those in the sham operation group at each day and calculated relative to day 0. Data are expressed as the mean \pm SD (n = 3–5). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (vs. day 0 in each diet), #: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$, ###: $p < 0.001$ (standard diet vs. purified diet).

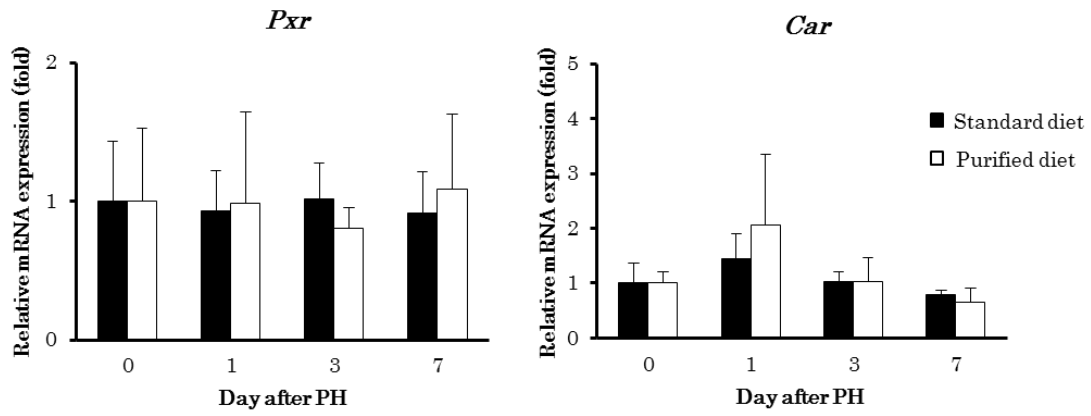
第二項 肝切除後における核内受容体の mRNA 発現変動

第一項で示した7種類のCYP分子種を制御していることが知られている pregnane X receptor (PXR)、constitutive androstane receptor (CAR) および vitamin D receptor (VDR) の mRNA 発現を調べた。

肝臓での PXR 発現は肝切除後大きな変動がみられなかった。CAR の発現は両食餌群において肝切除後1日目で上昇する傾向がみられた (Fig. 4a)。VDR の mRNA 発現はほとんど検出されなかった (data not shown)。一方小腸では、PXR 発現が精製餌群で肝切除後1日目に上昇した。CAR の発現は肝臓と同様に肝切除後1日目で食餌に関係なく上昇する傾向がみられた。VDR の発現は通常餌群で肝切除後1日目に上昇傾向がみられた (Fig. 4b)。

以上の結果から、肝切除後の肝再生過程において CYP 発現を制御する核内受容体の発現も変動することが明らかとなった。

(a)



(b)

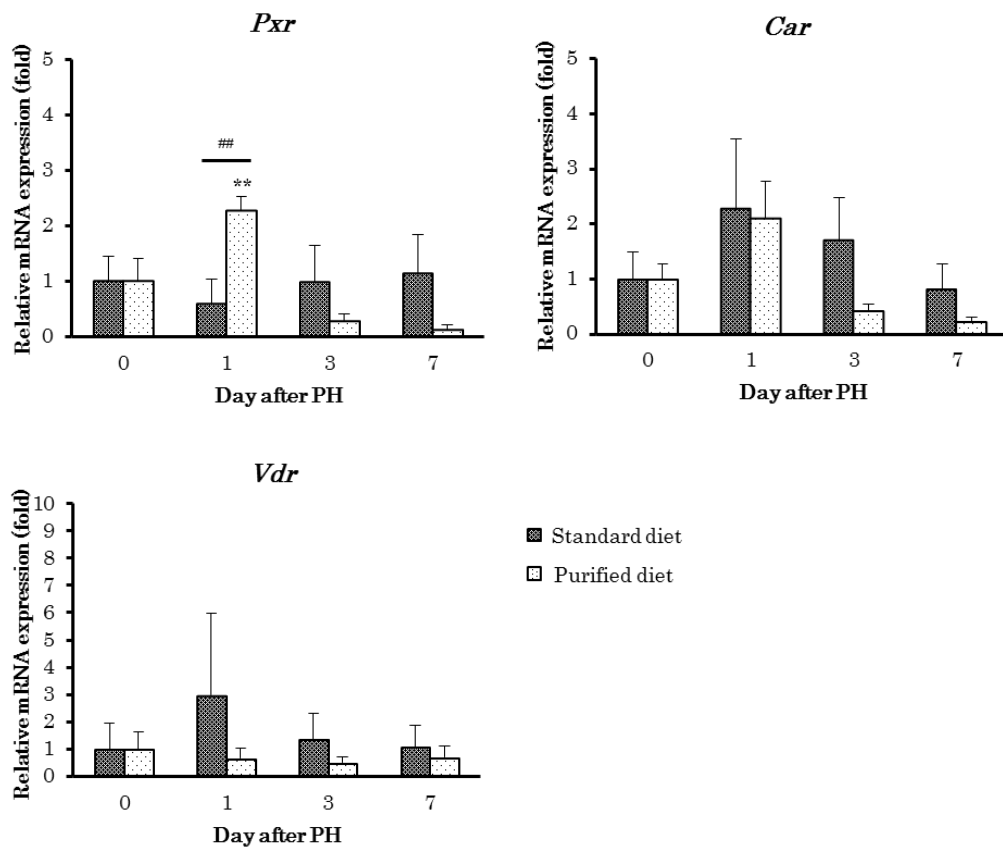


Fig. 4. Changes in nuclear receptor mRNA expression levels in the liver (a) and the small intestine (b) under standard diet or purified diet feeding during liver regeneration after PH.

Mice were fed with standard diet (MF) or purified diet (AIN-93G) from 1 week before PH. The mRNA expressions of three nuclear receptors (*Vdr* was detected only in the small intestine)/GAPDH in the PH groups were normalized to those in the sham operation group at each day and calculated relative to day 0. Data are expressed as the mean \pm SD (n = 3–5). **: $p < 0.01$ (vs. day 0 in each diet), #: $p < 0.01$ (standard diet vs. purified diet).

第四節 肝切除後の肝再生過程における胆汁酸プロファイルの変動

第二節と第三節から、食餌の違いにより肝再生速度や CYP 発現の変動に違いが生じることが明らかとなった。健常マウスに精製餌を与えた場合、通常餌と比較し胆汁酸濃度が低くなるという報告があることから (Zhang et al., 2013)、本研究では胆汁酸に着目した。また、健常マウスの場合、胆汁酸が PXR、CAR および VDR などの核内受容体を介して CYP 発現に影響を与えるということや (Juřica et al., 2016)、肝切除マウスにおいて胆汁酸は肝再生を促進するという報告もあることから (Li and Guo, 2015; van de Laarschot et al., 2016)、食餌の違いによる肝再生速度や CYP 発現の違いに胆汁酸が寄与している可能性があると考えられた。そこで、両食餌を与えた肝切除マウスにおける胆汁酸関連遺伝子の発現と胆汁酸濃度の変動について調べた。

第一項 肝切除後における胆汁酸関連遺伝子の mRNA 発現変動

核内受容体 farnesoid X receptor (FXR) は胆汁酸のホメオスタシスを担う制御因子であり、Cyp7a1、sodium/taurocholate co-transporting polypeptide (NTCP)、multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) および bile salt export pump (BSEP) は FXR の下流遺伝子の一部であることが知られている (Ohno, 2008)。Cyp7a1 はコレステロールから胆汁酸を生合成する律速酵素であり、NTCP は血中から肝臓中に胆汁酸を取り込むトランスポーターである。MRP2 と BSEP は肝臓中から胆管に胆汁酸を排泄するトランスポーターである。これらの因子により生体内胆汁酸量のホメオスタシスを維持している (Chiang, 2002; Modica and Moschetta, 2006; Ohno, 2008)。そこで、肝再生過程におけるこれらの因子の肝臓での mRNA 発現変動を調べた。

FXR と Cyp7a1 の発現は通常餌群のみで肝切除後 1 日目に低下する傾向がみられ、その後回復した。Cyp7a1 は通常餌群で肝切除後 7 日目に肝切除前より高い発現がみられた。NTCP の発現は通常餌群において肝切除後 1 日目と 3 日目で低下傾向がみられ、7 日目に回復したが、精製餌群では 1 日目から 7 日目まで低下傾向が継続していた。MRP2 と BSEP の発現は肝再生過程において両食餌群で大きな変動がみられなかった (Fig. 5)。

以上の結果から、これらの胆汁酸関連遺伝子の発現変動も両食餌群間において異なっていることが示唆された。

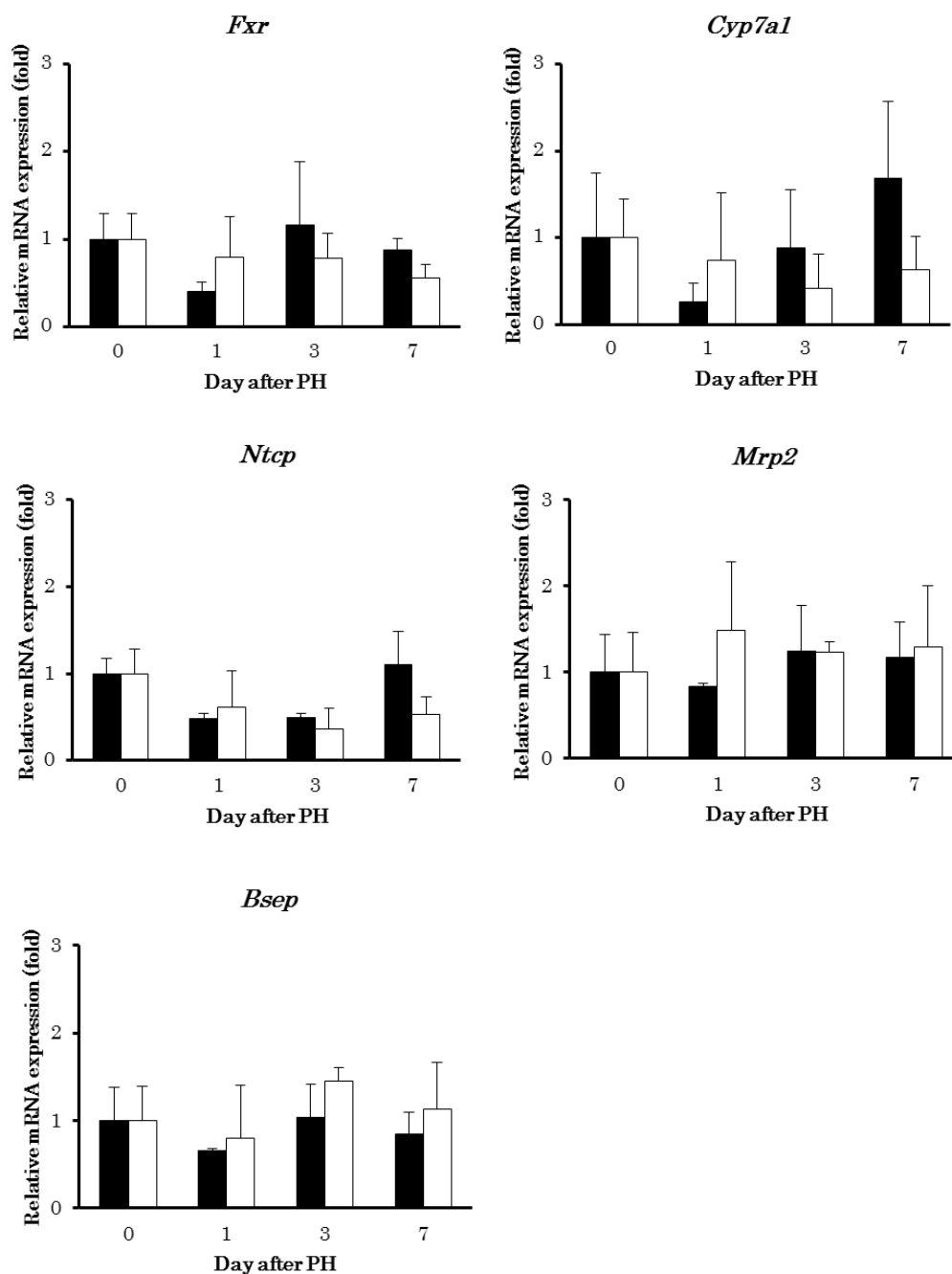


Fig. 5. Differences in bile acid-related gene expression in the liver between the standard diet group and the purified diet group during liver regeneration after PH. Mice were fed with standard diet (MF) or purified diet (AIN-93G) from 1 week before PH. The mRNA expressions of bile acid-related genes/GAPDH were normalized to those in the sham operation group at each day and calculated relative to day 0. Data are expressed as the mean \pm SD (n = 3–5).

第二項 肝切除後における胆汁酸濃度と胆汁酸組成の変動

次に血漿中の胆汁酸濃度を液体クロマトグラフ質量分析計（Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry : LC-MS/MS）により測定した。測定した胆汁酸は、コール酸（cholic acid : CA）、ケノデオキシコール酸（chenodeoxycholic acid : CDCA）、デオキシコール酸（deoxycholic acid : DCA）、ウルソデオキシコール酸（ursodeoxycholic acid : UDCA）、リトコール酸（lithocholic acid : LCA）、タウロコール酸（taurocholic acid : TCA）、タウロケノデオキシコール酸（taurochenodeoxycholic acid : TCDCA）、タウロデオキシコール酸（taurodeoxycholic acid : TDCA）、タウロウルソデオキシコール酸（tauroursodeoxycholic acid : TUDCA）、タウロミュリコール酸（taumuricholic acid : TMCA）、グリココール酸（glycocholic acid : GCA）およびグリコケノデオキシコール酸（glycochenodeoxycholic acid : GCDCA）の12種類である。Fig. 6にそれぞれの胆汁酸の構造式と生合成経路を示す。

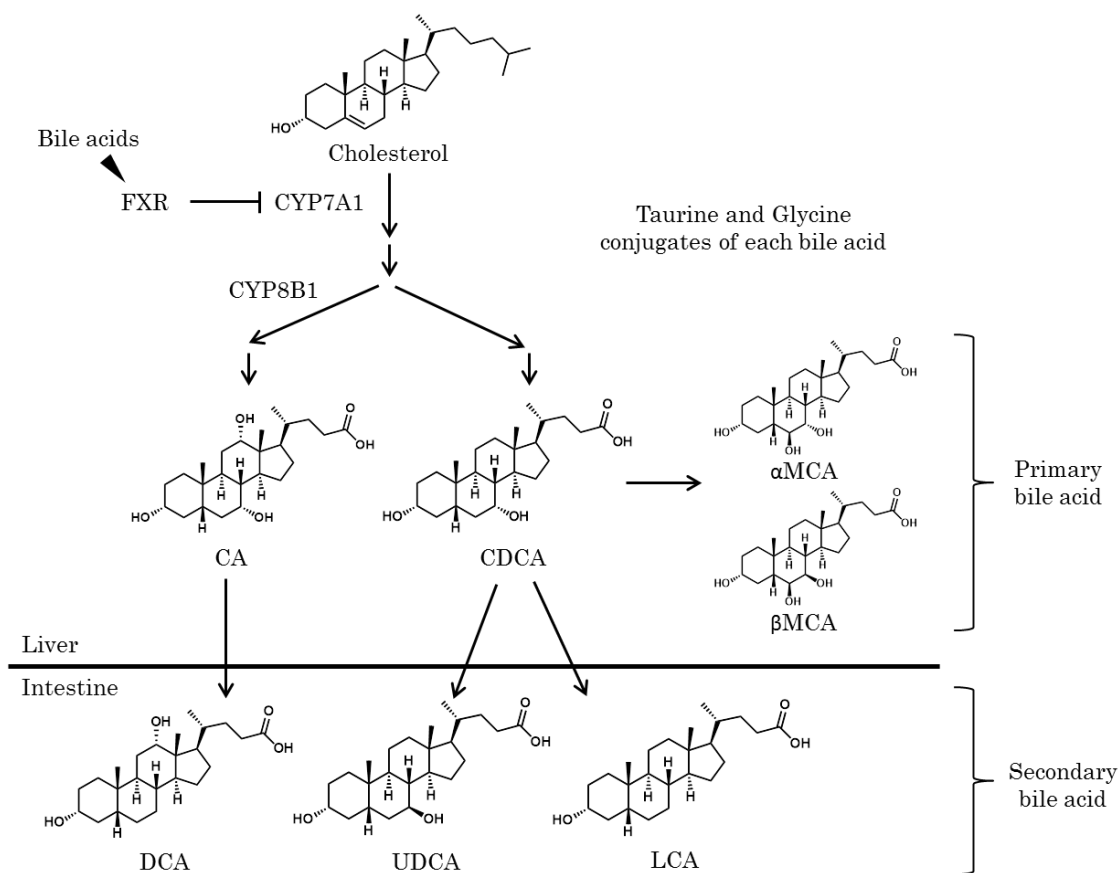


Fig. 6. Chemical structures and biosynthesis pathway of bile acids.

結果として、これらの総胆汁酸濃度は肝切除前において精製餌群で通常餌群の 1/3 程度であった。また、通常餌群では肝再生中胆汁酸濃度の大きな変動はみられなかったが、精製餌群では肝切除後 3 日目に大きく上昇した (Fig. 7a)。胆汁酸組成については、肝切除前の通常餌群において、CA のタウリン抱合体である TCA が一番多く、次いで TMCA、CA、DCA であった。一方肝切除前の精製餌群では、CA、CDCA、DCA、TCA、TDCA、TMCA のそれぞれの割合が同程度であった。肝切除後 1 日目において、通常餌群では TCA の割合が 36.6 % と高かったが、精製餌群では 15.1 % と低くみられ、DCA が 28.5 % と一番高かった。肝切除後 3 日目では、通常餌群において TCA の割合が一番高く 31.5 %、次いで CA が 29.2 % であった。精製餌群においては TMCA の割合が 57.1 % と一番高かった。肝切除 7 日目では両食餌群とも肝切除前と類似した組成がみられた (Fig. 7b)。

以上の結果から、通常餌群と精製餌群で胆汁酸濃度と胆汁酸組成のプロファイルが異なっていることが明らかとなった。

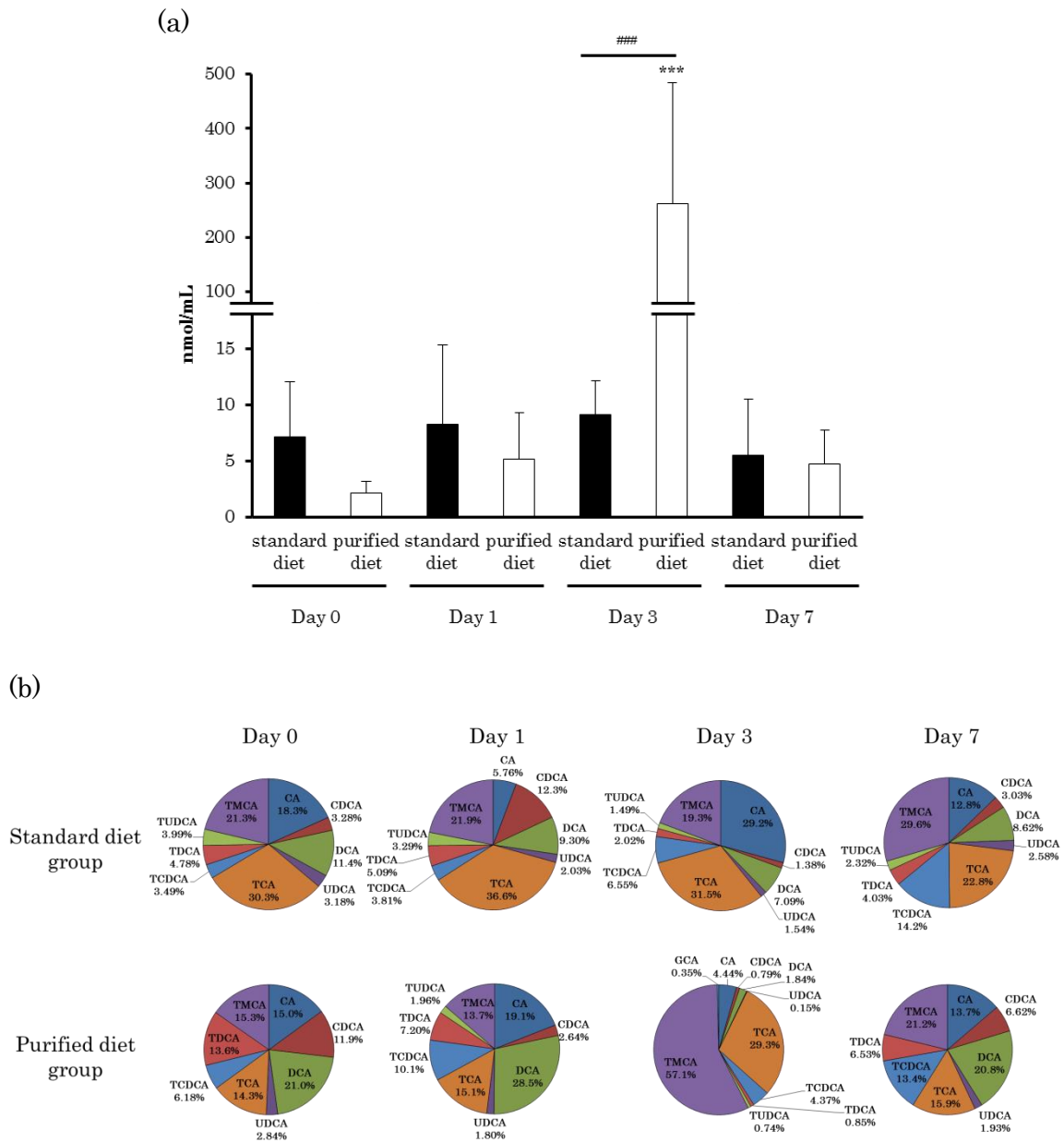


Fig. 7. Differences in totals of 12 bile acid concentration (a) and percentages of individual bile acids (b) in the plasma between the standard diet group and the purified diet group during liver regeneration after PH.

Mice were fed with standard diet (MF) or purified diet (AIN-93G) from 1 week before PH. The concentration of individual bile acids in the plasma was measured by LC-MS/MS. Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 3-5$). ***: $p < 0.001$ (vs. day 0 in each diet), ###: $p < 0.001$ (standard diet vs. purified diet).

第五節 コール酸投与による CYP 分子種の mRNA 発現変化と

多変量解析

第一項 精製餌群でのコール酸投与における CyclinD1 と Cyp3a11

の mRNA 発現変化

第四節から、通常餌群と精製餌群で胆汁酸濃度のプロファイルが異なっていることが示された。そこで、精製餌群において肝切除前の低い胆汁酸濃度を上昇させ、肝切除後 3 日目の濃度上昇を肝切除直後から引き起こした場合に、肝再生速度や CYP 発現もそれに伴い変化する可能性があると考えられた。

胆汁酸の一つである CA は肝切除後の肝再生を促進するという報告がある (Huang et al., 2006)。また、健常マウスにおいて CA の 5 日間投与により肝臓の Cyp3a11 の発現が上昇するという報告もある (Miura et al., 2017)。そこで精製餌を与えた肝切除マウスに CA を経口投与することにより、肝切除後 1 日目に上昇がみられなくなっていた CyclinD1 および精製餌群のみで肝切除後 3 日目で発現上昇していた肝臓での Cyp3a11 の発現に、変化が生じる可能性があると考えた。そこで、精製餌群において肝切除 1 時間前とその後 2 日間 CA を 200 mg/kg 反復経口投与した。この CA の投与量は 0.2 %CA 混餌投与を行っていた Huang ら (2006) の報告から 1 日量を算出した。その結果、CyclinD1 の mRNA 発現は、肝切除後 1 日目の CA 投与群において上昇した (Fig. 8)。Cyp3a11 の発現も肝切除後 1 日目で CA 投与により上昇する傾向がみられた (Fig. 8)。

以上の結果から、CA 投与により肝再生が促進され、CYP 発現にも影響を与えたことが明らかとなった。

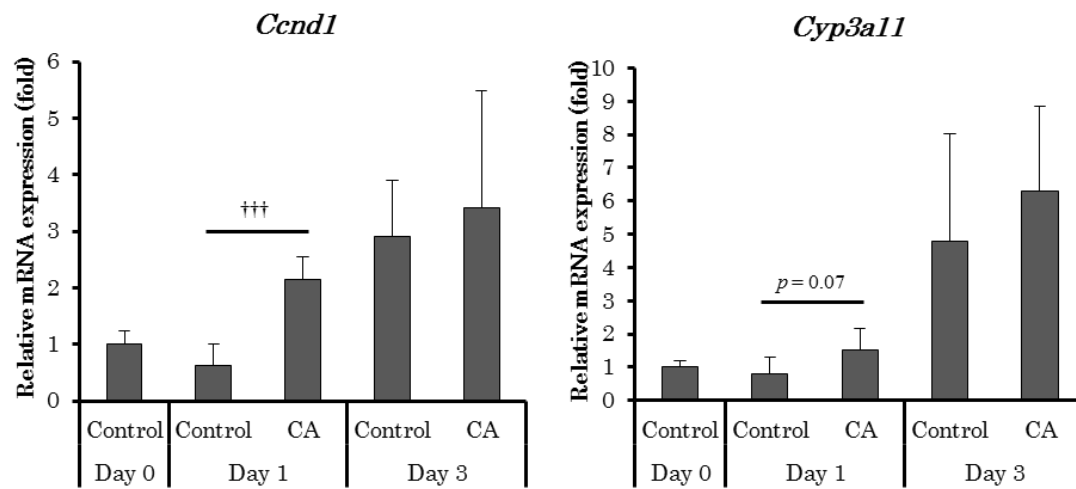


Fig. 8. Effects of CA on Cyclin D1 and Cyp3a11 mRNA expression after PH.

Mice were fed with purified diet (AIN-93G) from 1 week before PH, and CA (200 mg/kg) was orally administered at 1 h before PH and once per day for 3 days. The mRNA expression of CyclinD1 and Cyp3a11/GAPDH in the PH groups were normalized to those in the sham operation group at each day and calculated relative to day 0. Data are expressed as the mean \pm SD (n = 3–5). †††: $p < 0.001$ (control vs. CA).

第二項 コール酸投与による CYP mRNA 発現の多変量解析

第一項では精製餌群において胆汁酸濃度の上昇と同時に増加した Cyp3a11 の発現に着目した。一方で、胆汁酸は健常マウスの CYP 発現に影響を与え (Juřica et al., 2016)、また、胆汁酸は肝再生に対し重要な役割を示すことから (Zhang et al., 2012)、両食餌群でみられた肝再生過程における肝臓と小腸の CYP 発現変動に胆汁酸が寄与している可能性が考えられた。そこで、食餌の種類によらない肝再生過程における肝臓と小腸の CYP 発現と胆汁酸との関係性を明らかにするために、両食餌群の肝切除マウスに CA を 3 日間経口投与する実験を行い、その結果を主成分分析 (principal component analysis : PCA) にて網羅的に評価した。

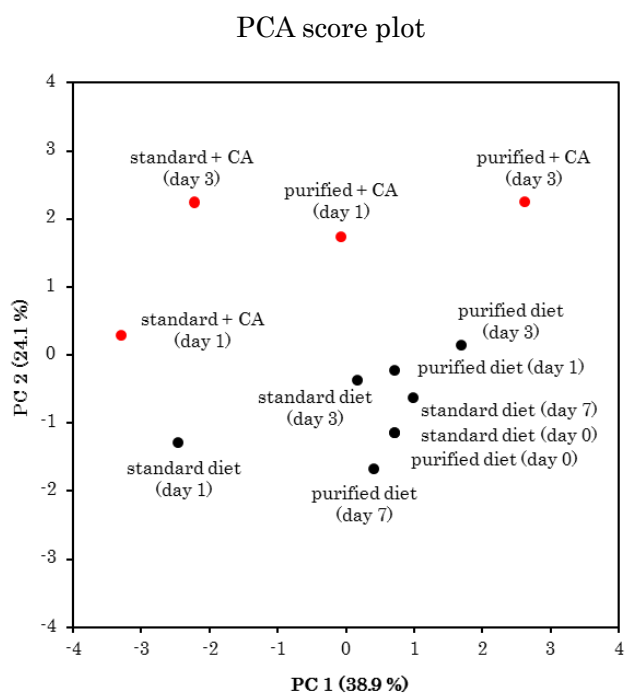
主成分分析とは、変数が多い場合に主成分 (principal component : PC) と呼ばれる新たな変数を合成することで元のデータの次元を圧縮する多変量解析の一つである。肝臓で 8 つ (Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp2c55, Cyp2d22, Cyp2d26, Cyp3a11, Cyp3a13, Cyp7a1)、小腸で 7 つ (Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp2c55, Cyp2d22, Cyp2d26, Cyp3a11, Cyp3a13) の変数を用いて各サンプル平均間における特徴を解析した。

肝臓では、主成分 1 と主成分 2 によって元のデータの 63.0 % (それぞれ 38.9 %、24.1 %) が説明できた。主成分得点プロット (PCA score plot) より、通常餌群の肝切除後 1 日目、通常餌+CA 投与群の肝切除後 1 日目と 3 日目が主成分 1 によって特徴づけられた。また、CA 投与群が主成分 2 によって概ね分けられた (Fig. 9a)。主成分負荷量 (PCA loading values) の結果から、主成分 1 はいずれの CYP 分子種とも正の相関がみられ、主成分 2 は Cyp2b10、Cyp3a11、Cyp2c55 と正の相関、Cyp7a1 と負の相関がみられた (Fig. 9a)。

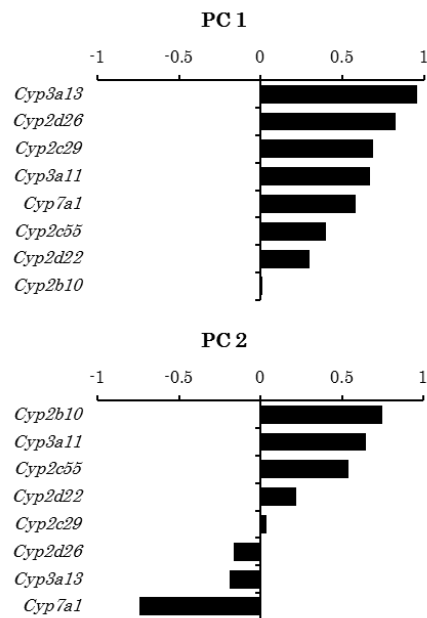
一方小腸では、主成分 1 と主成分 2 によって元のデータの 79.6 % (それぞれ 57.0 %、22.6 %) が説明できた。主成分得点プロットより、精製餌群の肝切除後 1 日目と精製餌+CA 投与群の肝切除後 1 日目が主成分 1 によって分けられたが、CA 投与群による顕著な群分けはみられなかった (Fig. 9b)。主成分負荷量の結果から、主成分 1 はいずれの CYP 分子種とも正の相関がみられ、主成分 2 は Cyp2d22、Cyp3a13 と正の相関、Cyp2b10、Cyp2c55 と負の相関がみられた (Fig. 9b)。

以上の結果から、肝臓では CA 投与群に共通した CYP 発現の変動が一部みられたが、小腸では CA 投与群による CYP 発現の変動は認められなかった。

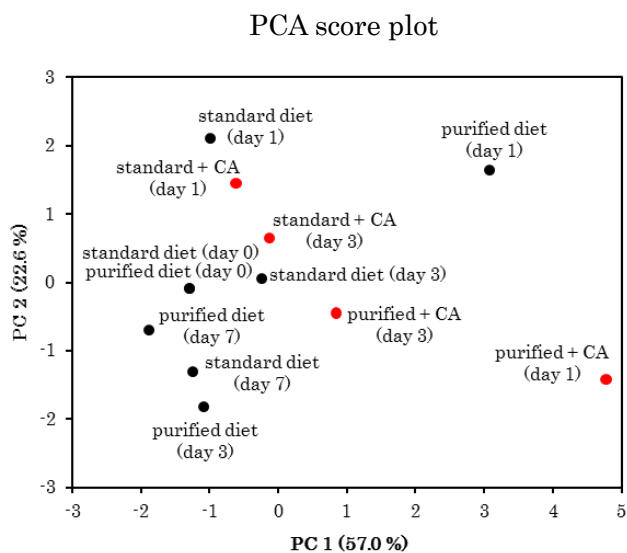
(a)



PCA loading values



(b)



PCA loading values

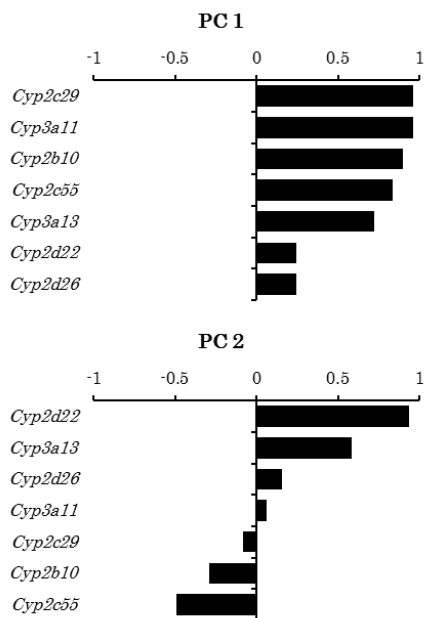


Fig. 9. PCA score plot and PCA loading values based on the CYP expression levels in the liver (a) and small intestine (b) at days 0, 1, 3, and 7 after PH in the standard diet, purified diet, and both diets with CA administration groups.

CA (200 mg/kg) was orally administered at 1 h before PH and once per day for 3 days. Data labels of the PCA score plot indicate the type of diet (standard diet, purified diet) and days after PH. The red plots mean CA administration groups.

第六節 マウス初代肝細胞を用いたコール酸による CYP 誘導の評価

第五節では、肝切除モデルマウスの肝再生過程における胆汁酸と CYP 発現変動との関係性について述べてきた。次にマウス初代肝細胞を用いた *in vitro* の系での CA による CYP mRNA 発現への影響を検討した。第五節から、*in vivo* での CA 投与群において肝臓の mRNA 発現との関係性が示唆された *Cyp2b10*、*Cyp2c55* および *Cyp3a11* の分子種について着目し、これらの mRNA 発現量を測定した。また、肝細胞増殖時における CYP 発現の変動を検討するため、細胞増殖促進作用を有する上皮成長因子 (epidermal growth factor : EGF) を 50 ng/mL 共添加した場合においても CYP 発現変動を測定した。

CA 100 μ M 曝露 24 時間後、*Cyp2b10* の発現に大きな変化はみられなかったが、EGF 共添加により発現が上昇する傾向がみられた。*Cyp2c55* の発現は CA 曝露により上昇する傾向がみられ、EGF 共添加でも変わらず上昇していた。*Cyp3a11* は CA 曝露により大きな変化はみられなかったが、EGF 共添加によりコントロールと比較して有意に上昇した (Fig. 10)。

以上の結果から、CA は肝細胞増殖時に *Cyp2b10*、*Cyp2c55* および *Cyp3a11* 発現を誘導する可能性があることを示唆した。

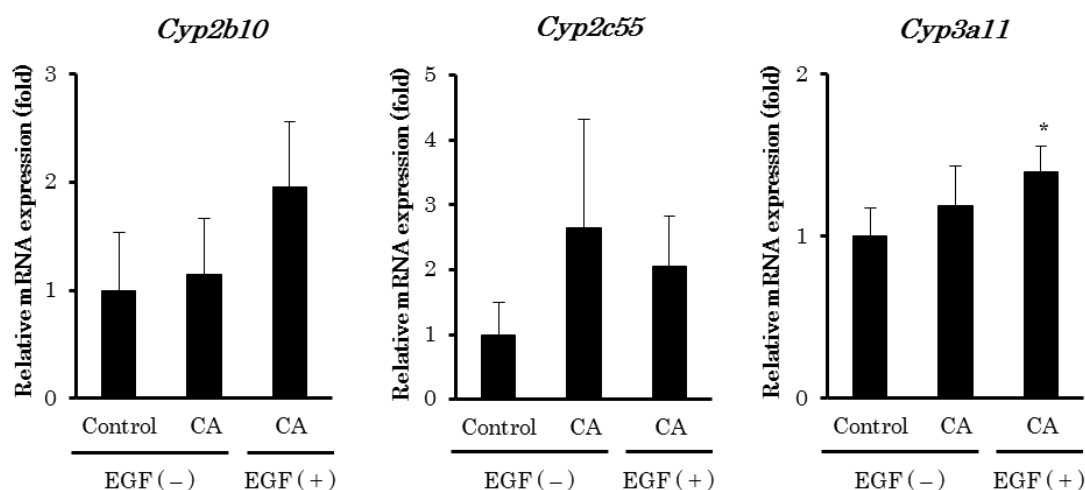


Fig. 10. Effects of CA with or without EGF on *Cyp2b10*, *Cyp2c55*, and *Cyp3a11* mRNA expression in mouse primary hepatocytes.

Isolated mouse primary hepatocytes were treated with or without CA (100 μ M) and EGF (50 ng/mL). The mRNA expressions of three CYP isoforms/GAPDH were calculated relative to control. Data are expressed as the mean \pm SD (n = 3). *: $p < 0.05$ (vs. control).

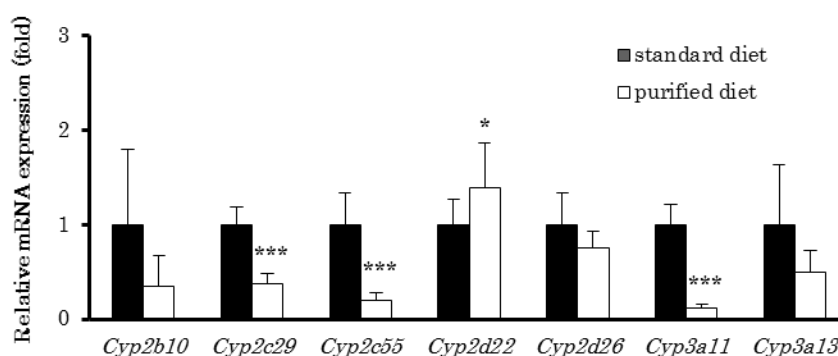
第七節 小括および考察

第二章では、2/3 肝切除モデルマウスを用いて肝再生過程における肝臓と小腸での CYP 発現の変動を検討した。また、通常餌を与えた肝切除マウスと精製餌を与えた肝切除マウスを比較し、食餌の違いによる肝再生速度や CYP 発現への影響を検討した。

まず第二節では肝切除後の肝再生評価を行い、両食餌群で肝再生が生じていることを確認した。肝切除後初期には肝臓の細胞が傷害されることにより ALT レベルが増加し、再生が進むことで低下する。この一時的な ALT レベルの上昇は肝切除割合が多いほど上昇することが知られている (Meier et al., 2016)。それと同時にサイトカインや増殖因子、胆汁酸などが上昇し (Michalopoulos, 2007)、細胞周期を制御する Cyclin の発現を上昇させ (Wang et al., 2001)、肝細胞の増殖が生じて肝重量の増加につながる。Fig. 2 の通常餌群における 2/3 肝切除後の肝重量体重比、Cyclin mRNA 発現および ALT の変動は以前の報告を反映していた (Wang et al., 2001; Lin et al., 2015; Meier et al., 2016)。一方で、精製餌群では通常餌群と比較し肝重量の増加割合が低く、CyclinD1 の発現も 1 日目で低かった。ALT レベルは通常餌群と変わらなかった。つまり、精製餌群では通常餌群と同等の肝切除による肝障害が生じたにも関わらず、肝再生が遅延したと考えられる。このメカニズムについては、食餌中に含まれる未知成分の違いにより胆汁酸のプロファイルが変化することが一因であると考えられるが (Fig. 7, Fig. 8)、他の内在性物質が関与している可能性や未知成分そのものが肝再生に重要である可能性も考えられた。

第三節で、2 種類の食餌を与えた肝切除マウスにおいて肝再生過程での CYP 発現の変動を検討した。肝臓では、通常餌群の肝切除後 1 日目で Cyp2d22 の発現が有意に減少し、また Cyp2b10、Cyp2c29、Cyp2d26、Cyp3a11 および Cyp3a13 の発現も減少する傾向がみられた (Fig. 3a)。肝切除ラットを用いたこれまでの報告に、切除後 10 分から Cyp3a の mRNA 発現が減少し 24 時間以上かけて徐々に回復するというものがあり (Trautwein et al., 1997)、また CYP2B1/2 と CYP3A1/2 のタンパク質発現が 24 時間と 36 時間で減少するという報告もある (Tamási et al., 2001)。肝再生直後には、TNF や IL-6 などの炎症性サイトカインが増加することが知られており (Vacca et al., 2013)、肝切除後の CYP の一時的な発現低下は炎症性サイトカインによるものであると推察されている (Li et al., 2016)。このことから、本研究でみられた肝切除後初期の発現減少もこれらのサイトカインの影響によると考えられる。Fig. 11 に通常餌群に対する精製餌群の肝切除前における CYP 発現を示した。精製餌群では肝切除前において肝臓と小腸両方で多くの CYP 分子種の発現が通常餌群より低くなり、これは以前の報告と一致していた (Tajima et al., 2013; Zhang et al., 2013; Guo et al., 2015)。精製餌群では、もともとの発現が低くなっているため、肝切除後 1 日目のサイトカインによる発現減少

(a)



(b)

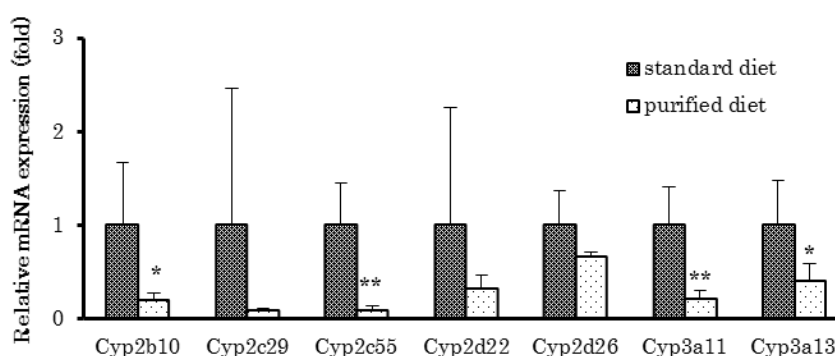


Fig. 11. CYP mRNA expression levels in the liver (a) and the small intestine (b) under standard diet or purified diet feeding in healthy mice.

Mice were fed with standard diet (MF) or purified diet (AIN-93G) for 1 week. The mRNA expressions of seven CYP isoforms/GAPDH were calculated relative to standard diet group. Data are expressed as the mean \pm SD (n = 4). *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ (vs. standard diet).

がみられにくくなったと考えられる。

肝臓の Cyp2b10 と Cyp2c29 の発現は、精製餌群のみで肝切除後 1 日目に上昇した (Fig. 3a)。また小腸でも Cyp2b10 と Cyp2c29 の発現が上昇しており、さらにこれらの CYP を制御していることが知られている核内受容体 CAR の mRNA 発現も肝切除後 1 日目に肝臓と小腸で上昇する傾向がみられた (Fig. 3b, Fig. 4)。CAR の転写活性化は肝細胞増殖に関連していることが知られており (Kazantseva et al., 2016)、肝切除マウスにおいても CAR の活性化は肝再生に重要であると考えられている。Tschuor ら

(2016) は、2/3 肝切除マウスにおいて CAR の mRNA 発現の上昇とともに細胞増殖に関連する下流遺伝子が増加し、CAR ノックアウトマウスで肝切除を行った場合に肝重量の増加が抑えられることを報告している。このことから、肝切除により、特に精製餌群において CAR の活性化の影響が現れやすくなり、下流遺伝子である Cyp2b10、Cyp2c29 の発現が上昇した可能性が考えられる。また、肝臓において Cyp2c55 の発現が両食餌群で肝切除後 3 日目に上昇した (Fig. 3a)。Cyp2c55 は Cyp3a ノックアウトマウスにおいてその発現が上昇することが知られており、食餌を精製餌に変えることでその上昇が抑えられた (van Waterschoot et al., 2009)。このことから、本研究で肝臓の大部分が切除され肝臓全体の Cyp3a が大きく減少したことは、Cyp3a ノックアウトマウスの生体内環境と類似し、残存する肝臓において Cyp2c55 の代償誘導につながった可能性が考えられた。しかし、食餌を精製餌に変更してもその上昇は抑えられるどころかさらに上昇したことから、異なるメカニズムによって引き起こされた可能性がある。

PXR の肝臓での mRNA 発現は両食餌群とも肝再生過程において変動がみられなかった (Fig. 4a)。しかし、PXR の下流遺伝子である Cyp3a11 は精製餌群で肝切除後 3 日目に発現上昇していることから、PXR を介さず他の制御因子により Cyp3a11 が誘導された可能性も考えられる。

本研究では、肝切除後の肝再生過程において小腸の CYP 発現が変動することを初めて明らかにした。通常餌群では肝切除後 1 日目に Cyp2d22 と Cyp3a13 の発現が上昇し、精製餌群では肝切除後 1 日目に Cyp2d22 と Cyp3a13 に加え Cyp2b10、Cyp2c29、Cyp2c55 および Cyp3a11 の発現も上昇した (Fig. 3b)。これらの結果から、肝臓の 2/3 が切除され肝臓全体の CYP が大きく減少したことを受け、小腸の CYP 発現が代償的に誘導され、肝臓と小腸における臓器間連動が生じた可能性が考えられる。このメカニズムについては、腸肝循環の動態を示すことから胆汁酸の関与が考えられる。しかし、CA 投与により CA と CA から生合成される胆汁酸 (DCA、TCA、GCA、TDCA) が肝切除後 1 日目において血漿中で 112 倍 (10.7 μM →1193 μM ; 通常餌群) と 17.0 倍 (1.00 μM →17.0 μM ; 精製餌群) 増加したにも関わらず (data not shown)、小腸での CYP 発現変化はそこまで顕著ではなかったことから (Fig. 9b)、他の内在性物質の関与も考えられた。

Fig. 12 に肝再生過程における両食餌群での肝臓と小腸の CYP 発現の関係性を示した。肝再生過程において肝臓と小腸の CYP 発現の上昇が精製餌群では通常餌群より多くの分子種でみられた (Fig. 12)。これは、精製餌を与えたマウスではもともとの CYP 発現が低いために、肝再生中に変化する内在性物質による CYP 誘導がみられやすくなったと考えられる。また、精製餌群において小腸でより多くの CYP 分子種の発現上昇がみられたことは、精製餌群で CAR に加えて PXR の発現も肝切除後 1 日目で上昇していることが原因であると考えられた (Fig. 4)。

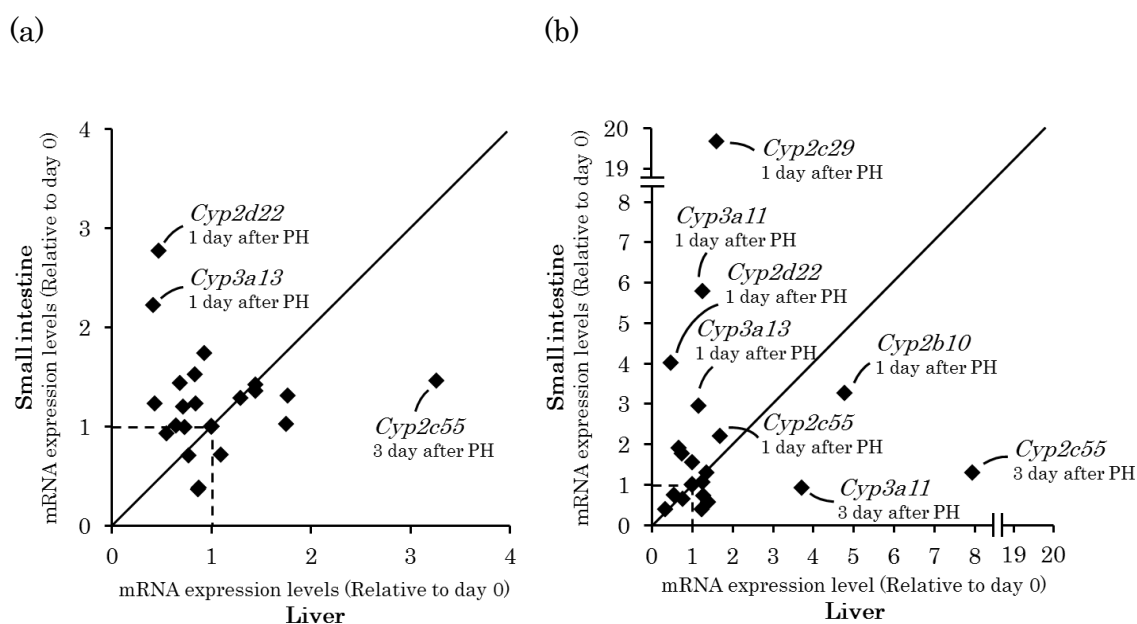


Fig. 12. Relationship of CYP expression between liver and small intestine in the standard diet group (a) and purified diet group (b) after PH.

mRNA expression levels of seven CYP isoforms (Fig. 3) in the liver (x-axis) and the small intestine (y-axis) on day 0, 1, 3, 7 after PH were plotted.

第二節と第三節では、食餌の違いにより肝再生速度や CYP 発現の変動に違いが生じることを明らかにした。第四節では、この違いが胆汁酸によるものであると推察し、胆汁酸関連遺伝子の発現と胆汁酸濃度について検討した。通常餌を与えた肝切除ラットにおいては、FXR、Cyp7a1、NTCP、BSEP および MRP2 の発現変動についてこれまで報告がある (Gerloff et al., 1999; Vos et al., 1999; Yuan et al., 2011)。FXR、Cyp7a1 および NTCP の発現は肝切除後 1 日目で減少し (Gerloff et al., 1999; Vos et al., 1999; Yuan et al., 2011)、その後 Cyp7a1 の発現は肝切除後 7 日目で増加傾向がみられ (Yuan et al., 2011)、また、BSEP と MRP2 の発現は肝切除後 1 日目で変動しないという点において (Gerloff et al., 1999; Vos et al., 1999)、本研究の結果と類似していた (Fig. 5)。精製餌群では、これらの胆汁酸関連遺伝子の発現変動が通常餌群と異なることが明らかとなった (Fig. 5)。また、精製餌を与えた健常マウスでは総胆汁酸濃度が低くなるという報告があり (Zhang et al., 2013)、本研究での結果と類似していた (Fig. 7)。Merlenら (2017) は、肝切除直後 24 時間以内に総胆汁酸濃度が一時的に上昇することを報告していたが、本研究では 0 から 24 時間までの間にサンプリングを行っていなかったため検出できなかったと考えられる。一方精製餌群では、肝切除後 3 日目に胆汁酸濃度の上昇がみられ、さらには胆汁酸組成も通常餌群と異なっていることが明らかとなった (Fig. 7)。

第五節第一項で精製餌群での CA 投与による肝再生と CYP 発現への影響について検討した。Cyclin D1 の発現が CA 投与により肝切除後 1 日目で上昇したことから (Fig. 8)、精製餌群において肝再生が遅延したメカニズムの一つとして胆汁酸が寄与している可能性がある。健常マウスに CA を 5 – 7 日間混餌投与すると Cyp3a11 の発現が上昇するという報告がある (Schuetz et al., 2001; Zollner et al., 2006; Miura et al., 2017)。第五節の結果で CA 投与により肝切除後 1 日目に肝臓の Cyp3a11 が上昇する傾向がみられたことから、精製餌群における肝切除後 3 日目の Cyp3a11 発現上昇に CA が一部寄与している可能性がある。しかし、CA 投与により肝臓中の CA と CA から生合成される胆汁酸が肝切除後 1 日目において 6.34 倍 (36.3 μ M \rightarrow 230 μ M) 上昇したにも関わらず、Cyp3a11 の発現上昇は顕著ではなかったことから、他の内在性物質の影響も考えられた。

第二項では食餌の種類によらない、肝再生過程における CA 投与と CYP 発現との関係性について主成分分析を用いて網羅的に評価した。肝臓では、主成分 2 によって CA 投与群が特徴づけられた。主成分負荷量から、主成分 2 は Cyp2b10、Cyp3a11、Cyp2c55 と正の相関、Cyp7a1 と負の相関がみられた (Fig. 9a)。CA を含む胆汁酸は主に FXR を介して Cyp7a1 の発現を負に制御していることが知られている (Juřica et al., 2016)。また、CA は Cyp3a11 の発現を上昇させる報告もある (Schuetz et al., 2001; Zollner et al., 2006; Miura et al., 2017)。これらの報告は主成分 2 の主成分負荷量の結果を反映していると考えられる。一方小腸の主成分分析において、主成分 1 と主成分 2 ではすべての CA 投与群を特徴づけることができなかった (Fig. 9b)。CA 投与群全体では顕著な CYP 発現変化がみられなかったものの、食餌の種類や肝再生の時点に依存して胆汁酸が CYP 発現に影響する可能性も考えられた。肝再生過程における小腸での CYP 発現変動のメカニズムについてはさらなる検討が必要である。

第六節では、CA による CYP 発現への影響についてマウス初代肝細胞を用いて検討を行った (Fig. 10)。第五節より、肝臓で CA との関係性が示唆された Cyp2b10、Cyp2c55 および Cyp3a11 について着目した。CA により Cyp2b10 と Cyp3a11 発現が上昇するという報告はいくつかあるが、in vivo での 5 – 7 日間投与の報告に限られている (Schuetz et al., 2001; Zollner et al., 2006; Miura et al., 2017)。本研究において、マウス初代肝細胞に CA 100 μ M を 24 時間曝露したところ、Cyp2b10 と Cyp3a11 の発現が顕著に上昇しなかったことから、in vitro と in vivo において CA の影響に違いがみられ、CA の曝露濃度が不十分である可能性や CA から生合成される胆汁酸が異なる可能性などが考えられる。一方 Cyp2c55 の発現は、CA 曝露により上昇する傾向がみられた。また、EGF 共添加により Cyp2b10 と Cyp3a11 の発現が上昇する傾向がみられた。EGF 単独添加は Cyp2b10 と Cyp3a11 の発現を上昇させず、むしろ低下させる傾向があることから (Soldatow et al., 2016)、EGF 自身による誘導ではなく、細胞増殖刺激と CA 相互の作用の可能性が考えられる。肝細胞増殖と CA との相互的な CYP 誘導に

関してはさらなる検討が必要であるが、CA は肝細胞増殖時に Cyp2b10、Cyp2c55 および Cyp3a11 発現を誘導する可能性があることが示唆された。

以上第二章より、2/3 肝切除マウスの肝再生過程において肝臓だけでなく小腸の CYP 発現も変動することが明らかとなった。また、食餌の違いによる胆汁酸の変動が肝再生や CYP 発現に影響を与えることを示唆し、胆汁酸と肝再生、CYP 発現との関係性が示唆された。

第三章 ヒト肝細胞キメラマウスのヒト肝細胞置換率の違いに

おける胆汁酸変動

第一節 緒言

近年、肝臓の再生能力を利用して、肝障害と免疫不全の性質を合わせ持つキメラマウス (uPA/SCID マウス) にヒトの肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウスが作成されている。当研究室では、株式会社フェニックスバイオ (東広島市) の PXB mouse[®]を用いて、これまで主にヒトにおける薬物動態の予測を行ってきた (Sanoh et al., 2012a; Sanoh et al., 2012b; Sanoh and Ohta, 2014; Sanoh et al., 2015; 佐能・太田, 2018)。このマウスは肝障害を引き起こすウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ (urokinase-type plasminogen activator : uPA) のゲノム遺伝子が導入されているトランスジェニックマウス (Alb-uPA マウス) と、T 細胞・B 細胞が欠損した重度免疫不全 (severe combined immunodeficiency disease : SCID) マウスを掛け合わせた cDNA-uPA^{wt}/SCID マウスに、凍結保存ヒト肝細胞を脾臓から移植して作成する (Tateno et al., 2004; Tateno et al., 2013) (Fig. 13)。移植した肝細胞はマウス肝臓中で生着・増殖し、約 2 ヶ月でマウス肝臓の 70%以上がヒトの肝細胞に置換される。ヒト肝細胞の置換率は、肝臓凍結切片の免疫染色によるヒト肝細胞特異的抗体サイトケラチン (hCK8/18) の抗体陽性面積で求められるが、この置換率と血中ヒトアルブミン濃度が正に相関することから、血中ヒトアルブミン濃度より予測置換率を算出している (Tateno et al., 2013)。

本章では、ヒト肝細胞キメラマウスのヒト肝細胞が増殖していく過程に着目することで、2/3 肝切除と共通する肝細胞増殖を非侵襲的に観察できると考え、第二章での 2/3 肝切除マウスの結果のヒトにおける可能性を検討した。

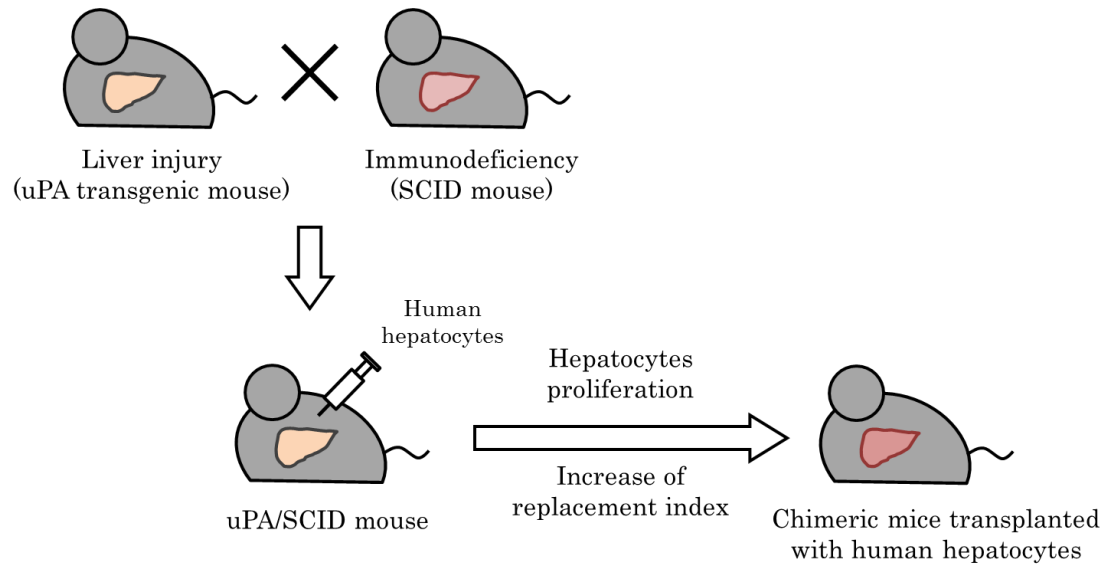


Fig. 13. Production of chimeric mice transplanted with human hepatocytes (PXB mouse®)

PXB mouse®は肝臓でヒト型の薬物代謝酵素やトランスポーターが発現しており (Katoh et al., 2004; Katoh et al., 2005; Ohtsuki et al., 2014)、ヒトの薬物動態を予測できるモデルとして有用であると考えられている (Sanoh et al., 2012a; Sanoh et al., 2012b; Sanoh and Ohta, 2014; Sanoh et al., 2015; 佐能・太田, 2018)。これまでに当研究室では、週齢が進むにつれヒトの肝細胞の置換率が上昇し (Fig. 14a)、その過程においてヒト型の CYP 発現が変動することを示している (品川晃彦 卒業論文 2016、Fig. 14b)。置換率の上昇に伴い CYP2B6 と CYP3A4 の mRNA 発現が上昇し、その後 CYP2B6 は低下したのに対し CYP3A4 はある程度維持されていた (Fig. 14b)。

本章では、ヒト肝細胞置換率の異なるヒト肝細胞キメラマウスの血清中胆汁酸濃度を測定することで、ヒトにおける胆汁酸と肝細胞増殖との関係性を検討した。

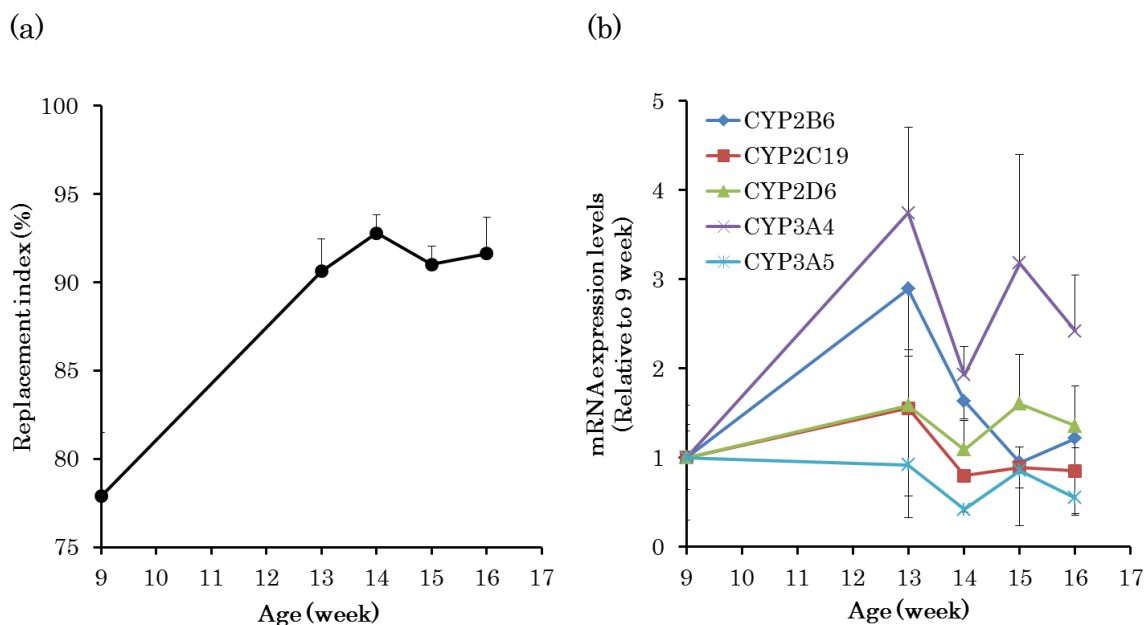


Fig. 14. Replacement index of human hepatocytes (a) and changes in liver CYP mRNA expression (b) in chimeric mice with humanized liver.

The mRNA expression of human CYP isoforms/GAPDH were calculated relative to 9 weeks. Data are expressed as the mean \pm SD (n = 3–4).

Shinagawa A, bachelor thesis, 2016

第二節 ヒト肝細胞キメラマウスのヒト肝細胞置換率の違いに

における胆汁酸濃度と胆汁酸組成の変動

ヒト肝細胞の置換率が 30.2 – 93.8 % であるヒト肝細胞キメラマウスを用いた。このようなヒト肝細胞キメラマウスでは、置換率が高くなるにつれて肝重量も大きくなる傾向が観察された (Fig. 15)。血清中総胆汁酸濃度の結果は、置換率が高くなると総胆汁酸濃度も増加した (Fig. 15)。

Thakare ら (2018a) によって報告された胆汁酸組成の分類に基づき、ヒト肝細胞キメラマウス、マウス (第二章第四節 Fig. 6 と Thakare et al., 2018a) およびヒト (Scherer et al., 2009; Humbert et al., 2012; Thakare et al., 2018a) と比較した (Table 2)。まず、胆汁酸を構造中に含まれる水酸基の数ごとに分類し全体に対する割合を算出した。水酸基を 1 つのみ持つ胆汁酸 (LCA; Fig. 6) の割合 (%Mono-OH BA) は、個体差はあるもののマウスよりヒトで高くみられることが多く、30.2 % の置換率を持つヒト肝細胞キメラマウスでは低くそれ以上の置換率を持つものではそれより高い傾向がみられた。水酸基を 2 つ持つ胆汁酸 (DCA, CDCA, UDCA, TDCA, TCDCA, TUDCA, GDCA, GCDCA; Fig. 6) の割合 (%Di-OH BA) は、ヒトでマウスの約 3 倍高い一方で、ヒト肝細胞キメラマウスでは置換率が高くなるほど若干の増加傾向がみられた。水酸基を 3 つ持つ胆汁酸 (CA, TCA, TMCA, GCA; Fig. 6) の割合 (%Tri-OH BA) は、ヒトでマウスの約 1/5 であり、低い置換率のヒト肝細胞キメラマウス (30.2 – 48.7 %) はマウスと類似した割合を示し置換率が高くなるほど減少傾向がみられた。

肝臓で合成される一次胆汁酸と小腸の腸内細菌により合成される二次胆汁酸に分類し (Fig. 6)、全体に対する割合と二次胆汁酸に対する一次胆汁酸の比を算出した。一次胆汁酸の割合はヒトの方がマウスより若干低くみられ、ヒト肝細胞キメラマウスでは置換率が高くなるほど微減した。二次胆汁酸の割合はヒトの方がマウスより若干高くみられ、ヒト肝細胞キメラマウスでは置換率が高くなるほど微増した。二次胆汁酸に対する一次胆汁酸の比は、マウスでは約 3 – 5 であるのに対しヒトでは約 1 – 3 と低くみられ、ヒト肝細胞キメラマウスでは置換率が高くなるほどマウスに類似した値からヒトに類似した値に近づいた。

次にグリシン抱合体とタウリン抱合体の割合とその比を算出した。グリシン抱合体の割合はマウスでは 0 – 0.300 % と低く、ヒトでは 54.0 – 63.0 % と高かった。ヒト肝細胞キメラマウスでは置換率 30.2 % の時に 0.977 % であり、置換率が高くなるにつれ上昇し置換率 93.8 % の時に 38.3 % であった。タウリン抱合体の割合はマウスでは 63.9 – 71.0 % と高く、ヒトでは 7.79 – 12.0 % と低い。ヒト肝細胞キメラマウスでは置換率 30.2 % の時に 80.9 % であり、置換率が高くなるにつれ低下傾向がみられたが置換率

93.8 %の時に 59.4 %と依然として高かった。タウリン抱合体に対するグリシン抱合体の比はヒト肝細胞キメラマウスの置換率が高くなるにつれ上昇していたが、ヒトの値より低かった。

次に、CA/CDCA 比を算出した。この指標は 12 α 位の水酸化を触媒する酵素である CYP8B1 活性のプローブとして用いられる (Thakare et al., 2018a; Fig. 6)。この値はマウスで高くヒトで低いが、ヒト肝細胞キメラマウスではマウスとヒトの中間程度の値をとっており、置換率が高くなるほど低下する傾向がみられた。

最後に疎水性の指標 (Hydrophobicity index : HI) を算出した。この指標は Heuman (1989) の報告より、逆相高速液体クロマトグラフィーの保持時間から算出した個々の胆汁酸における親水性・疎水性バランスの定数と個々の胆汁酸濃度割合との積をすべて足し合わせたものである。Table 2 より、マウスでは疎水性が低く HI はマイナスの値をとるのに対し、ヒトでは 0.450 – 0.467 と高い値を示す。ヒト肝細胞キメラマウスでは置換率の低いものでもプラスの値を示しており、さらに置換率が高くなるほど上昇した。

以上より、ヒト肝細胞キメラマウスの肝細胞増殖過程において胆汁酸濃度の上昇がみられ、また、胆汁酸組成はヒトの組成に近づく傾向がみられたという結果から、ヒトにおいても胆汁酸と肝細胞増殖との関係性が示唆された。

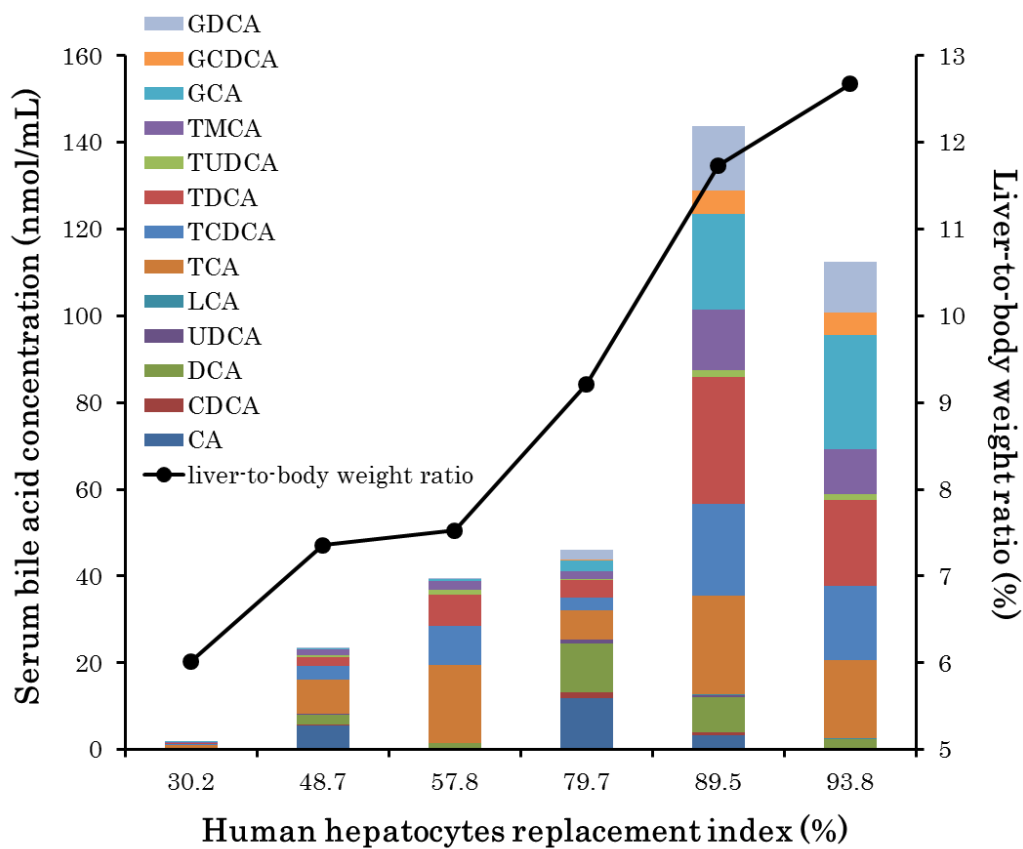


Fig. 15. Relationship among serum bile acid concentration and composition, and liver-to-body weight ratio in chimeric mice with humanized liver.

The concentration of individual bile acids in the serum was measured by LC-MS/MS.

Table 2 Bile acid indices in mice, humans, and chimeric mice with humanized liver

	C57/BL6 mouse		PXB mouse						human		
	Thakare et al., 2018	this study (before PH)	Replacement index (%)						Scherer et al., 2009	Humber t et al., 2012	Thakare et al., 2018
			plasma	plasma	serum	serum	serum	serum			
%Mono-OH BA	0.100	N.D.	N.D.	0.166	0.056	0.195	0.072	0.051	0.756	N.D.	12.0
%Di-OH BA	23.0	30.1	35.0	36.1	47.3	50.3	56.8	50.9	82.7	82.9	74.0
%Tri-OH BA	77.0	69.9	65.0	63.7	52.6	49.5	43.1	49.0	16.6	17.0	12.0
%Primary BA	80.0	76.7	84.2	78.4	75.5	59.9	62.1	69.0	73.5	68.1	45.0
%Secondary BA	20.0	23.3	15.8	21.6	24.5	40.1	37.9	31.0	26.5	31.9	55.0
P/S	4.50	3.29	5.35	3.63	3.09	1.50	1.64	2.22	2.78	2.14	1.10
%G-amidation	0.300	N.D.	0.977	2.27	1.24	10.7	29.5	38.3	63.0	56.7	54.0
%T-amidation	71.0	63.9	80.9	62.5	94.8	34.0	61.7	59.4	7.79	9.11	12.0
G/T	0.004	N.D.	0.012	0.036	0.013	0.314	0.478	0.645	8.09	6.22	4.50
CA/CDCA	14.0	7.18	3.18	3.98	2.05	4.35	1.77	1.99	0.291	0.334	0.340
HI	-0.090	-0.026	0.145	0.172	0.179	0.305	0.251	0.218	0.458	0.467	0.450

N.D.: not detected, BA: bile acid

%Mono-OH BA: the percentages of mono-OH BA (LCA), %Di-OH BA: the percentages of di-OH BAs (DCA, CDCA, UDCA, TDCA, TCDCA, TUDCA, GDCA, GCDCA), %Tri-OH BA: the percentages of tri-OH BAs (CA, TCA, TMCA, GCA), %Primary BA: the percentage of primary BAs (CA, CDCA, TCA, TCDCA, TMCA, GCA, GCDCA), %Secondary BA: the percentage of secondary BAs (DCA, UDCA, LCA, TDCA, TUDCA, GDCA), P/S: the ratio of primary to secondary BAs, %G-amidation: the percentage of glycine amidates (GCA, GDCA, GCDCA), %T-amidation: the percentage of taurine amidates (TCA, TDCA, TCDCA, TUDCA, TMCA), G/T: the ratio of G-amidation to T-amidation, CA/CDCA: the ratio of CA (CA, TCA, GCA) to CDCA (CDCA, TCDCA, GCDCA), HI: hydrophobicity index calculated according to the previous report (Heuman, 1989)

The values of human (Thakare et al., 2018a) were used the values previously described.

第三節 小括および考察

第三章では異なるヒト肝細胞置換率を持つヒト肝細胞キメラマウスの血清中胆汁酸濃度を測定し、ヒトにおける胆汁酸と肝細胞増殖との関係性を検討した。

第二節より、置換率が高くなるほど胆汁酸濃度の顕著な上昇がみられた。正常なマウスの胆汁酸濃度は 3.10 – 7.18 nmol/mL (第二章第四節 Fig. 6 と Thakare et al., 2018a)、ヒトでは 1.89 – 3.94 nmol/mL (Scherer et al., 2009; Humbert et al., 2012; Thakare et al., 2018a) 程度であることが知られているが、ヒト肝細胞キメラマウスでは 93.8% の置換率のもので 112 nmol/mL であり、正常なヒトやマウスとは異なり顕著に高い結果であった。他の種類のヒト肝細胞キメラマウスである hFRGN マウス (FRG マウス [Fah^{-/-}, Rag2^{-/-}, Il2r^{-/-}] と NOD マウスを掛け合わせたマウスにヒトの肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウス) においても顕著に胆汁酸濃度が高くなるという報告がなされており、今回の結果と同様であった (Chow et al., 2017)。胆汁酸の生体内濃度はホメオスタシス機構により一定に保たれており、胆汁酸濃度が上昇すると主に肝臓と小腸の FXR が活性化される。それにより、胆汁酸生合成の律速酵素である肝臓の CYP7A1 発現の減少や BSEP、MRP2 などの排泄トランスポーター発現の増加、NTCP などの取り込みトランスポーター発現の減少が生じ、胆汁酸量を調節している。小腸で FXR が活性化されると fibroblast growth factor 15/19 (FGF 15/19) が腸管特異的に上昇し、肝臓に移行して fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) に結合後 CYP7A1 の転写が抑制される。FGF15/19 はマウスで FGF15、ヒトで FGF19 と種差があるため、ヒト肝細胞キメラマウス肝臓中のヒトの肝細胞はマウス小腸由来の FGF15 を認識できず、生合成が過剰に促進されてしまうといわれている (Naugler et al., 2015; Chow et al., 2017)。また、胆汁酸ホメオスタシスの破綻により FXR が過剰に活性化されると、forkhead box protein m1b (Foxm1b) 転写因子が過剰に誘導され、異常な肝細胞増殖を引き起こす。そのためホメオスタシスが破綻したことによる胆汁酸濃度の上昇は肝重量体重比を異常に上昇させると考えられている (立野, 2012; Naugler et al., 2015)。実際に Fig. 15 では胆汁酸濃度の上昇に伴い肝重量体重比も上昇していた。

ヒト肝細胞キメラマウスの血清中胆汁酸濃度が顕著に上昇した一方で、胆汁酸組成に関して様々な指標を算出しマウス・ヒトと比較した結果、置換率が高くなるほどヒト型の胆汁酸組成に近づく傾向がみられた。水酸基を 3 つ持つミュリコール酸 (muricholic acid : MCA) はげっ歯類特異的な胆汁酸であり、ヒトに発現しておらずホモログも知られていない Cyp2c70 がげっ歯類の肝臓で CDCA や UDCA の酸化を触媒することにより、MCA を生成することが知られている (Takahashi et al., 2016)。しかし、ヒト肝細胞キメラマウスでは置換率が高くなっても TMCA の濃度が減少しておらず、%Tri-OH BA の値も減少傾向はあるものの十分ではない。ヒト肝細胞キメラマウス

の肝臓に残存するマウス *Cyp2c70* や他の臓器中の *Cyp2c70* が MCA 生成を引き起こした可能性が考えられる。

一次胆汁酸と二次胆汁酸の割合や比については、ヒト肝細胞キメラマウスの置換率が高くなるほどマウスの値からヒトの値に近づいた。このことから、ヒト肝細胞キメラマウスでは二次胆汁酸の生合成を行う腸内細菌叢はマウス型であるが、一次胆汁酸と二次胆汁酸の指標には影響を与えなかったと考えられる。

グリシン抱合体とタウリン抱合体の割合について、マウスとヒトでは顕著な差がみられた。ヒト肝細胞キメラマウスではヒト型に近づきつつあるものの、依然としてタウリン抱合体が多くみられた。ヒトではタウリン抱合体よりグリシン抱合体が多く、マウスではその反対であることが知られているが、アミノ酸抱合を触媒する胆汁酸-CoA : アミノ酸 *N*-アシルトランスフェラーゼ (Bile acid-CoA: amino acid *N*-acyltransferase) のヒトにおける活性は、タウリン抱合とグリシン抱合ともに同程度である (Solaas et al., 2000)。このため、アミノ酸抱合活性の種差ではなく、原料となるアミノ酸生合成に種差があるといわれており (Thakare et al., 2018b)、ヒトのペルオキシソームにおけるアラニン : グリオキシル酸アミノトランスフェラーゼ (alanine: glyoxylate aminotransferase) の特異的な活性が、グリシンを増加させることが要因と考えられている (Solaas et al., 2000)。また、タウリンの生合成酵素であるシステインスルフィン酸脱炭酸酵素の活性がヒトの肝臓では低いこともその理由であると考えられている (山口, 1985)。このことから、ヒト肝細胞キメラマウスでは、残存するマウス肝臓や他の臓器からタウリンが供給されグリシン抱合体とタウリン抱合体両方が生成された可能性が考えられる。

CYP8B1 活性のプロープである CA/CDCA 比は、ヒト肝細胞キメラマウスでヒト型に近づいていたものの、ヒトと比較して高い値を示していた。これは、ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓に残存するマウス *Cyp8b1* によって CA が生成された可能性が考えられた。

最後に、疎水性の指標である HI は、ヒト肝細胞キメラマウスでヒト型に近いことが示された。一般的に胆汁酸の疎水性の大きさは毒性の強さに相関しているといわれている。エンドセリン受容体拮抗薬である肺高血圧症治療薬ボセンタンは、ヒト特異的に肝障害が生じるといわれている (Fattinger et al., 2001; Humbert et al., 2007)。このボセンタンをヒト肝細胞キメラマウス的一种である Hu-liver TK-NOG マウス (thymidine kinase transgene NOG マウスにヒトの肝細胞を移植したヒト肝細胞キメラマウス) に反復投与すると、ALT が上昇し血漿中総胆汁酸濃度も上昇していたことから、胆汁うっ滞型肝障害を生じた可能性が考えられている (Xu et al., 2015)。ボセンタンによる肝障害の種差についてのメカニズムは未だ不明であり、ボセンタン投与による HI の変化も知られていない。しかし、もともとのヒト肝細胞キメラマウスの胆汁

酸組成がヒトに近いことが一因となり、ヒト特異的な胆汁うっ滞型肝障害を再現できた可能性も考えられる。

以上のことから、ヒト肝細胞キメラマウスでは胆汁酸濃度の上昇がみられたもののヒトに近い胆汁酸組成であることが明らかとなり、ヒトにおいても胆汁酸と肝細胞増殖との関係性が示唆された。

第四章 総括

本研究では、第二章より 2/3 肝切除マウスの肝再生過程において肝臓と小腸の CYP 発現が変動すること、また、食餌の違いによる胆汁酸の変動が肝再生や CYP 発現に影響を与えることが明らかとなり、2/3 肝切除マウスにおける胆汁酸と肝再生、CYP 発現との関係性が示唆された。さらに第三章よりこれらの結果がヒトでも生じうることを示唆した。

肝切除や肝移植患者における薬物治療と薬物動態

肝切除や肝移植を受けた患者では、抗がん剤、免疫抑制薬、抗生物質や鎮痛薬などの静注や経口による薬物投与が行われる場合がある。本研究の結果で、肝切除後の肝再生過程において CYP 発現の変動が肝臓だけでなく小腸においてもみられ、臓器間連動が生じた可能性を示唆したことから、肝切除や肝移植を受けた患者では肝臓だけでなく小腸の薬物代謝にも注意する必要があると考えられた。

実際に臨床で、肝移植患者において小腸の薬物代謝が変動したことを示唆するような報告がある。免疫抑制薬であるタクロリムスは生体肝移植の拒絶反応を抑制するため、初めに点滴静注で投与されその後内服可能となった場合は経口投与に切り換えて投与される。タクロリムスは肝臓と小腸で代謝され、代謝酵素である CYP3A5 遺伝多型の影響を受けることが知られている。CYP3A5 の遺伝多型における*3 (A6986G) アレルは、スプライシング異常により CYP3A5 タンパク質を発現せず代謝活性が無いため、*1 (Wild type) アレルと比較しタクロリムスの代謝が減少する。肝移植患者ではドナーの肝臓とレシピエントの小腸で CYP3A5 の遺伝多型が異なることがある。CYP3A5*3/*3 を持つレシピエント (小腸で CYP3A5 が発現していない患者) と CYP3A5*1/*1 または*1/*3 を持つレシピエント (小腸で CYP3A5 が発現している患者) に対し、CYP3A5*1/*1 または*1/*3 を持つ肝臓 (CYP3A5 が発現している肝臓) を移植した場合にタクロリムスの血中濃度推移を比較すると、肝移植後 4 週間においてのみ血中濃度に差がみられ一時的に小腸の薬物代謝の寄与が上昇したことを示唆していた (Muraki et al., 2011, Fig. 16)。Table 3 に本研究で使用したマウス CYP 分子種とヒト CYP 分子種との相同性を示したが、本研究において、食餌に関係なく肝切除後 1 日目に小腸で発現が上昇したマウス Cyp3a13 は (Fig. 3b)、ヒトの CYP3A5 のホモログであるといわれている (Hart et al., 2009)。そのため、臨床でのタクロリムスの事例は本研究の結果を反映していると考えられる。

肝切除マウスにおいて食餌に関係なく小腸で発現上昇がみられた分子種として他に Cyp2d22 (ヒト CYP2D6 に相当) がある (Fig. 3b)。CYP2D6 は肝臓と小腸でその発現が低いながらも (Shimada et al., 1994; Paine et al., 2006) 多くの医薬品の代謝反応

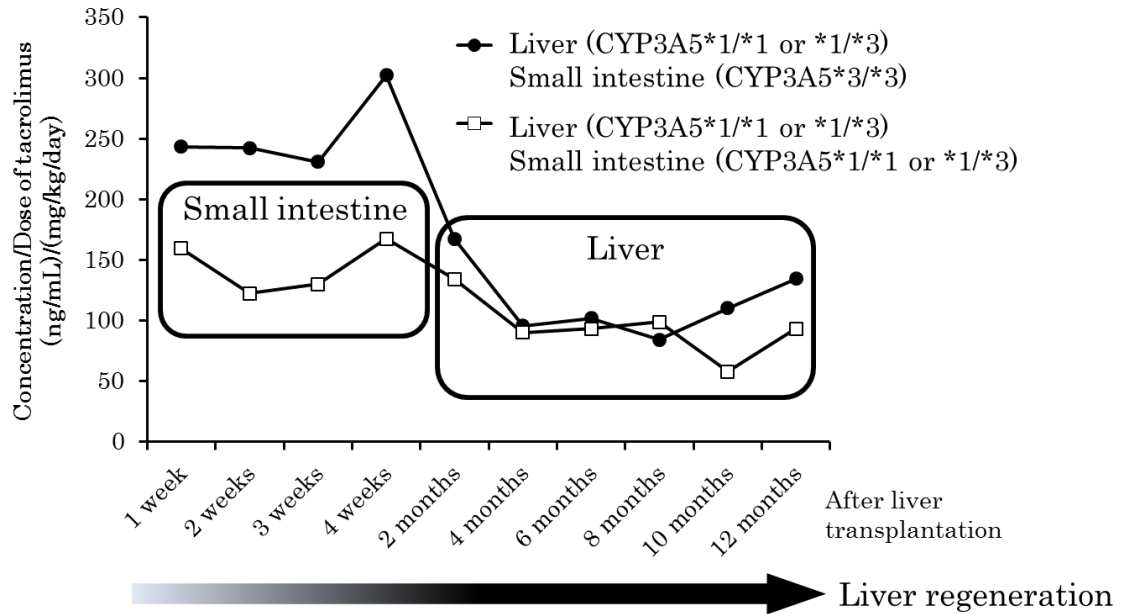


Fig. 16. Ratio of tacrolimus blood concentration to dose for different combinations of CYP3A5 genotype in both recipients (small intestine) and donors (liver) after living-related donor liver transplantation.

This figure was modified from Muraki et al., 2011.

CYP3A5*1/*1 or *1/*3: CYP3A5 expressor, CYP3A5*3/*3: CYP3A5 non-expressor

Table 3 Mouse and human CYP genes used in this study and their homology.

Mouse CYP gene	Human CYP gene	Identity (%) of DNA	Identity (%) of protein
Cyp2b10	CYP2B6	78.1	75.8
Cyp2c29	CYP2C19	79.8	74.7
Cyp2c55	–	–	–
Cyp2d22	CYP2D6	79.9	75.8
Cyp2d26	–	–	–
Cyp3a11	CYP3A4	78.1	72.8
Cyp3a13	CYP3A5	80.1	74.5

–: indicates no data in HomoloGene (NCBI).

This table was modified from Hart et al., 2009.

に関与しているといわれている (Rendic 2002; Williams et al., 2004)。代表的な基質として、ブフラロールやメトプロロールなどの β 遮断薬、イミプラミンやアミトリプチリンなどの抗うつ薬などが挙げられる。肝切除や肝移植患者でこのような医薬品を使用する場合には、肝臓だけでなく小腸の代謝も考慮する必要があると考えられる。また、マウス Cyp2b10 (ヒト CYP2B6 に相当) と Cyp3a11 (ヒト CYP3A4 に相当) は肝切除マウスの精製餌群において肝臓と小腸両方で発現が一時的に上昇していた (Fig. 3)。また、肝切除マウスにおける CA 投与や *in vitro* での CA 処置により、Cyp2b10 と Cyp3a11 の発現は胆汁酸と関連している可能性が示唆された (Fig. 8, 9, 10)。さらに、ヒト肝細胞キメラマウスの置換率が上昇した場合において CYP2B6 と CYP3A4 の発現が増加していた (品川晃彦 卒業論文 2016, Fig. 14b)。CYP3A4 は肝臓と小腸ともに一番多く発現している CYP 分子種であり (Shimada et al., 1994; Paine et al., 2006)、医薬品の代謝反応に一番多く寄与していることが知られている (Rendic 2002; Williams et al., 2004)。肝切除や肝移植患者において食事や他の要因により胆汁酸が変動することで、CYP2B6 や CYP3A4 によって代謝される医薬品の薬物動態が変動する可能性があると考えられる。

本研究の結果は肝細胞増殖過程における CYP 発現の変動を mRNA レベルで解析するのみにとどまっている。ヒトの肝臓組織、肝細胞およびマイクロソームにおいて CYP3A4 と CYP2B6 の mRNA レベルはタンパク質発現や酵素活性と関連するといわれている (Watanabe et al., 2004; Richert et al., 2009; Ohtsuki et al., 2012)。しかし、ヒト CYP2C9 やラット CYP2B1 (マウス Cyp2b10、ヒト CYP2B6 のホモログ) では mRNA 発現とタンパク質発現や代謝活性に相関がみられないという報告もあることから (Ohtsuki et al., 2012; Nishiyama et al., 2016)、肝切除マウスにおける CYP 代謝活性の変動についてはさらなる検討が必要である。また、本研究で測定した 7 種類の CYP 分子種を制御する核内受容体として、PXR (下流遺伝子: Cyp2c55, Cyp3a11) や CAR (下流遺伝子: Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp2c55, Cyp3a11)、VDR (下流遺伝子: Cyp3a11) が知られており (Martignoni et al., 2006)、これらの核内受容体の mRNA 発現を測定したが (Fig. 4)、胆汁酸などの内在性物質によるこれら核内受容体の転写活性化作用や核内移行についても検討する必要があると考えられた。

マウスとヒトにおける肝再生の種差

マウスとヒトでは肝再生速度に種差があることが知られており、2/3 肝切除によりマウスでは約 7 日間、ヒトでは数か月から約 1 年間再生に時間がかかる (Fig. 2; Tanemura et al., 2012)。マウスでは ALT レベルが 2/3 肝切除後 1 日目で上昇していたのに対し (Fig. 2)、ヒトで肝障害の指標であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase : AST) が肝切除後約 2 週間は上昇していることや、有糸分裂のピークがげっ歯類では 24 – 28 時間であるのに対しヒトでは 10 – 35 日である

ことから (Nagasue et al., 1987)、マウスの肝再生期間の1日がヒトでの2-4週間に相当する可能性が考えられる。この種差のメカニズムについては不明であるが、肝重量は体重に比例するといわれていることから、体のサイズや肝再生中の肝臓のサイズを制御することが知られている Hippo-YAP/TAZ シグナル伝達経路が関与している可能性が考えられる (宮村・仁科, 2016; Moya and Halder, 2018)。実際、体のサイズがマウスとヒトの間であるサルでは 60 %肝切除後の肝再生に約 60 日かかるという報告があり (Gaglio et al., 2002)、イヌでは有糸分裂のピークが4日であるという報告もある (Sigel et al., 1965)。このように、肝再生モデル動物を用いる際にはヒトとの種差を考慮する必要があると考えられる。

化学物質による肝再生への影響

医薬品などの化学物質によって肝再生速度に変化が生じることを示した報告がいくつかある。その多くは肝再生を促進する化学物質であり、例えば抗てんかん薬カルバマゼピン (Kawaguchi et al., 2013) や抗不整脈薬アミオダロン (Lin et al., 2015) は、オートファジーに作用することで肝再生を促進するという報告がある。また、降圧薬リシノプリル・カンデサルタン・ロサルタンは主作用であるレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系の阻害により肝再生を促進することが示唆されている (Yayama et al., 2007)。一方、肝再生を遅延させる化学物質として DNA 合成抑制作用を持つ抗がん剤であるオキサリプラチンや5-フルオロウラシルの報告がある (Hubert et al., 2015)。このように、肝再生速度の変化は一つの経路によらず様々な因子を介して生じると考えられる。本研究では、食餌の違いにより肝再生速度に影響を与えることが示され、このメカニズムとして胆汁酸が一部関与していることを示唆した (Fig. 8)。胆管を結紮することにより胆汁酸が肝臓に異常にうっ滞した状態のマウスにおいて 50 %肝切除を行った場合に、肝再生が遅延するという報告がある (Jia et al., 2018)。つまり、肝再生に重要である胆汁酸のプロファイルが正常な肝再生と異なる挙動を示すことで、肝再生が遅延する可能性がある。したがって、胆汁酸ホメオスタシスをかく乱させる化学物質は肝再生を遅延させる可能性が考えられ、ひいては肝毒性につながる可能性も考えられる。

また、肝がんの化学療法に用いられる分子標的薬ソラフェニブは、げっ歯類において肝再生を遅らせるという報告がある (Hora et al., 2011; Andersen et al., 2013; Mollbrink et al., 2013) 一方で、肝再生に影響を与えないという報告もある (Zahavi et al., 2016)。分子標的薬ベバシズマブも同様に肝再生を弱めるという報告と (Aussilhou et al., 2009)、肝再生に影響を与えないという報告がある (Hubert et al., 2015)。つまり、化学物質による肝再生への影響は、複雑な肝再生機構と相まって実験条件の違いによる生理的な状態の違いに左右されることがあると考えられる。本研究により食餌の違いによる内在性物質の変化が肝再生速度や CYP 発現に影響を与えたことから、患者の食事状況などにより内在性物質が変化し、化学物質による肝再生速度への影響も変化す

る可能性が考えられる。

以上のことから、本研究より、肝切除や肝移植患者において、薬物治療を行う場合に肝臓だけでなく小腸の薬物代謝にも注意する必要がある、さらに薬物治療と手術療法をより効果的に行うためには、食事や他の要因による内在性物質の変動にも注意する必要があると考えられる (Fig. 17)。

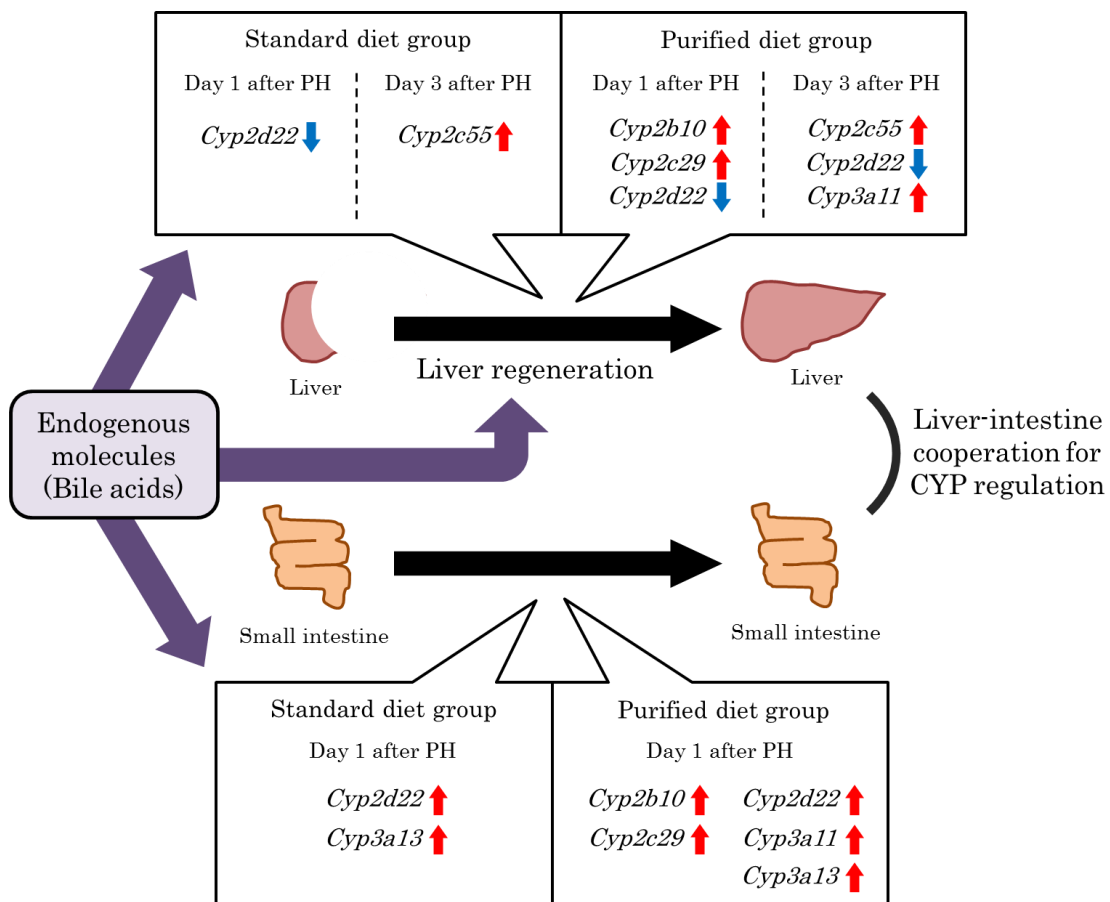


Fig. 17. Possibility of inter-organ cooperation for CYP regulation between liver and small intestine after PH and effects of endogenous molecules on liver regeneration and CYP expression.

実験材料および実験方法

<実験動物>

本動物実験は承認された広島大学動物実験計画に基づいて行った（承認番号：A18-11、A18-16）。

2/3 肝切除モデルマウス

日本クレア株式会社より C57BL/6J 雄マウスを購入した。肝切除 1 週間前より通常餌 (MF; オリエンタル酵母株式会社) または精製餌 (AIN-93G; 日本クレア株式会社) を与えた。イソフルラン (富士フィルム和光純薬株式会社) とソムノペンチル® (共立製薬株式会社) で麻酔した 7 週齢マウスを開腹し、肝臓の中間葉と左葉を切除した (Fig. 1)。偽手術群では開腹のみ行った。肝切除後 0、1、3、7 日目に血液、肝臓、小腸 (空腸) 上皮を回収した。また、胆汁酸の 1 種である CA (ナカライテスク株式会社) を肝切除 1 時間前とその後 3 日間 200 mg/kg 反復経口投与した。CA は 0.5 % methyl cellulose 400 solution (富士フィルム和光純薬株式会社) を用いて懸濁し、溶媒のみをコントロール群に投与した。CA の投与量は 0.2 % CA 混餌投与を行っていた Huang ら (2006) の報告から 1 日量を算出した。

ヒト肝細胞キメラマウス

株式会社フェニックスバイオより置換率の異なるヒト肝細胞キメラマウスの血清を提供していただいた。PXB mouse®の個体情報を以下に記載する (Table 4)。

Table 4 Information of each PXB mouse used in this study.

Replacement index (%)	Donor	Sexuality	Days after transplantation	Body weight (g)	Liver weight (g)	Human albumin (mg/mL)
30.2	BD195	♂	98	24.1	1.45	1.54
48.7	(Hispanic	♂	98	24.2	1.78	4.64
57.8	female two	♂	98	22.5	1.69	5.15
79.7	years old)	♂	98	23.3	2.15	9.21
89.5	from Corning	♂	98	22.2	2.60	12.9
93.8	Japan KK	♂	98	20.4	2.58	14.6

マウス初代肝細胞単離

日本クレア株式会社より C57BL/6J 雄マウスを購入した。8-9 週齢のマウスを用いて Two-step collagenase 灌流法により、マウス初代肝細胞を単離した。

イソフルランで麻酔したマウスを開腹し、門脈に 24G の針を刺しペリスタポンプを用いて前灌流液を流速 1.5 mL/min で流した。下大静脈を切断し、約 5 分灌流した。その後コラゲナーゼ液を同様に約 10–14 分流し、肝臓を摘出した。ハンクス液に肝細胞を分散させ、70 μ m のセルストレイナーでろ過した。50 \times g、2 分遠心し、上清を取り DMEM/F12 (-) で肝細胞を再懸濁させ再度 50 \times g、2 分遠心した。同様に Percoll 液で再懸濁、遠心後、DMEM/F12 (-) で再度再懸濁、遠心した。肝細胞を培養用メディウムに懸濁し、70 μ m のセルストレイナーでろ過後、トリパンブルー (Sigma-Aldrich Co. LLC) を用いて細胞数と生存率を計測した。必要な細胞数を培養用プレートに播種した。各溶液の組成を以下に示す。

前灌流液

Hanks' Balanced Salts (without CaCl₂, MgSO₄ and NaHCO₃) (Sigma-Aldrich Co. LLC) 0.475 g
NaHCO₃ (関東化学株式会社) 0.0175 g EGTA (株式会社 同仁化学研究所) 0.01 g
50 mg/mL Gentamicin (Thermo Fisher Scientific Inc.) 10 μ L
1M HEPES (ナカライテスク株式会社) buffer 0.5 mL 蒸留水 50 mL
攪拌し pH7.4 に合わせ、ろ過滅菌

コラゲナーゼ液

Hanks' Balanced Salts (without CaCl₂, MgSO₄ and NaHCO₃) 0.475 g
NaHCO₃ 0.0175 g CaCl₂ (和光純薬株式会社) 0.007 g
Collagenase (from Clostridium histolyticum) Type IV <125 CDU/mg (Sigma-Aldrich Co. LLC) 0.01g
Trypsin Inhibitor (soybean) >7000 BAEE units/mg (Thermo Fisher Scientific Inc.) 0.0025 g
50 mg/mL Gentamicin 10 μ L 1M HEPES buffer 0.5 mL 蒸留水 50 mL
攪拌し pH7.4 に合わせ、ろ過滅菌

ハンクス液

Bovine serum albumin (ナカライテスク株式会社) 5 g を蒸留水 50 mL に溶解
Hanks' Balanced Salts (without CaCl₂, MgSO₄ and NaHCO₃) 4.75 g NaHCO₃ 0.175 g
50 mg/mL Gentamicin 100 μ L 1M HEPES buffer 5 mL
蒸留水+10%アルブミン液で 500 mL にメスアップ
攪拌し pH7.4 に合わせ、ろ過滅菌

Percoll 液

Percoll (Sigma-Aldrich Co. LLC) 15 mL 10 \times HBSS 5 mL 滅菌水 30 mL

10×HBSS

Hanks' Balanced Salts (without CaCl₂, MgSO₄ and NaHCO₃) 4.75 g NaHCO₃ 0.175 g
蒸留水 50 mL ろ過滅菌

培養用メディウム

DMEM/F12 (Sigma-Aldrich Co. LLC) 500 mL
50mL 抜いて DMEM/F12 (-)として使用
200 mM L-Glutamine (Sigma-Aldrich Co. LLC) 5 mL
10000 units/mL Penicillin+10 mg/mL Straptmycin (Meiji Seika ファルマ株式会社) 5 mL
1M HEPES 5 mL 260 mM Ascorbic acid (Sigma-Aldrich Co. LLC) 1 mL
3.3 M Nicotinamide (Sigma-Aldrich Co. LLC) 1.5 mL
50 mM 2-Mercaptoethanol (ナカライテスク株式会社) 0.5 mL
0.1 mM Dexamethasone (ナカライテスク株式会社) 0.5 mL
1.72 mM Insulin (富士フィルム和光純薬株式会社) 50 µL
Fetal bovine serum (Biosera Ltd.) 50 mL

<血漿中 ALT レベルの測定>

ヘパリン (持田製薬株式会社) を添加した肝切除マウスの血液を 3,000 × g で 15 分遠心し血漿を得た。ALT レベルは富士ドライケム生化学分析装置 (富士フィルム株式会社) によりアラニンアミノトランスフェラーゼキット富士ドライケムスライド GPT/ALT-P III (富士フィルム株式会社) を用いて測定した。

<RT-qPCR による mRNA 発現量の評価>

RNA 抽出・逆転写

サンプル回収には RNAlater Solution (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。Total RNA は TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用し抽出した。抽出した RNA は DNase I Amplification Grade (Thermo Fisher Scientific Inc.) 1 U で室温、15 分 DNase 処理をし、その後、25 mM dNTP mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) 0.8 µL と 500 µg/mL Oligo(dT)15 Primer (Promega Co.) 1 µL を加え、逆転写酵素 ReverTra Ace® 100 units/µL (東洋紡株式会社) 1 µL にて 4 µg/total 20 µL の RNA から cDNA を作製した。逆転写反応は 42 °C、60 分で行い、その後 99 °C、5 分で逆転写酵素を失活させた。

リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は PikoReal Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) にて行った。プライマー (Sigma-Aldrich Co. LLC)、KAPA SYBR® FAST qPCR

Master Mix (2×) Universal (日本ジェネティクス株式会社)、10 倍希釈した cDNA を混合し、反応にかけた。以下に反応液組成と thermocycling parameters を示す。

反応液組成

2.5 μM Primer (Forward + Reverse)	0.6 μL
KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix	5 μL
cDNA	2 μL
Nuclease free water	2.4 μL
<hr/>	
Total	10 μL

Thermocycling parameters

50 °C	2 min	
95 °C	10 min	
95 °C	15 s	} 40 cycles
60 °C	1 min	
60 °C	30 s	
60 °C – 95 °C (melting curve)		
20 °C	10 s	

使用したプライマー配列を Table 5 に示す。これらのプライマーは以前の報告を参考にした (Matsubara et al., 2008; Shmarakov et al., 2013; Kong et al., 2014; Chen et al., 2015; Dong et al., 2015; Elraghy and Baldwin, 2015; Jearapong et al., 2015; Moscovitz et al., 2016)。ターゲット遺伝子の相対的な発現レベルは、*Gapdh* をリファレンス遺伝子として $\Delta\Delta CT$ 法により算出した。

<質量分析装置を用いた胆汁酸濃度測定>

サンプル調整

ヘパリンを添加した肝切除マウスの血液を $3,000 \times g$ で 15 分遠心し血漿を得た。この血漿またはヒト肝細胞キメラマウスの血清と、内部標準物質としてメタノール中の 1 μM ケトプロフェン (富士フィルム和光純薬株式会社) またはノルデオキシコール酸 (nor-desoxycholic acid: Nor-DCA; Toronto Research Chemicals Inc.)、50 %アセトニトリルを氷上で混合し、 $14,000 \times g$ で 5 分遠心した。上清を 10 mM 酢酸アンモニウムで希釈し測定用サンプルとした。

LC 条件

LC として Nexera high-performance liquid chromatography system (株式会社島津

Table 5 Primer sequences used in this study.

Gene (accession number)	Forward	Reverse	Amplicon length
Cell cycle-related genes			
<i>Ccnb1</i> (NM_172301)	5'-AGCAAATATGAGGAGATGTACC-3'	5'-CGACTTTAGATGCTCTACGGA-3'	172 bp
<i>Cend1</i> (NM_007631)	5'-GAAGGAGACCATTCCCTTGA-3'	5'-GTTACCAGAAGCAGTTCCA-3'	100 bp
CYP isoforms			
<i>Cyp2b10</i> (NM_009999)	5'-AAAGTCCCCTGGCAACTTCC-3'	5'-CATCCCAAAGTCTCTCATGG-3'	340 bp
<i>Cyp2c55</i> (NM_028089)	5'-TCAGCAATGGAACAAAATGGAAGG-3'	5'-CACAGCTCAGGATGAATGTGG-3'	177 bp
<i>Cyp2d22</i> (NM_001163472, NM_019823)	5'-TGCTAAAGGTTTCCTGTTGG-3'	5'-GTATCCCTGTTGGGTTCATGG-3'	121 bp
<i>Cyp2d26</i> (NM_029562)	5'-TTCAAAAAGCCTGGAAGCAGT-3'	5'-TCCACCAGAAGCAGGAAGAT-3'	100 bp
<i>Cyp3a11</i> (NM_007818)	5'-AGCATTGAGGAGATCACACAC-3'	5'-TACGAGTCCCATATCGGTAGAG-3'	157 bp
<i>Cyp3a13</i> (NM_007819)	5'-TGTGCTGGCTATCACAGATCC-3'	5'-AAATACCCACTGGACCAAAGC-3'	101 bp
Nuclear receptors			
<i>Pxr</i> (NM_010936)	5'-GCTGATGGACGCTCAGATGC-3'	5'-GAAGCTCACAGCCACTGTGG-3'	95 bp
<i>Car</i> (NM_009803, NM_001243062, NM_001243063)	5'-TCAACACGTTTATGGTGCAA-3'	5'-CTGCGTCCCTCATCTTGTAG-3'	198 bp
<i>Vdr</i> (NM_009504)	5'-CATCACTGATGTCTCCAGAG-3'	5'-CCAGCTTAGCATCCTGTACC-3'	167 bp
Bile acid-related genes			
<i>Fxr</i> (NM_001163700, NM_001163504, NM_009108)	5'-GGTCATGCAGACCTGTTGGA-3'	5'-TGTCTGTCTGGAGAGAGGATGA-3'	161 bp
<i>Cyp7a1</i> (NM_007824)	5'-AACAACTGCCAGTACTAGATAGC-3'	5'-GTGTAGAGTGAAGTCCTCCTTAGC-3'	99 bp
<i>Mrp2</i> (NM_013806)	5'-GTGTGGATTCCCTTGGGCTTT-3'	5'-CACAAACGAACACCTGCTTGG-3'	123 bp
<i>Bsep</i> (NM_021022, NM_001363492)	5'-TCTGACTCAGTGATTCTTCGCA-3'	5'-CCCATAAACATCAGCCAGTTGT-3'	191 bp
<i>Ntcp</i> (NM_001177561, NM_011387, NM_001361972)	5'-ACGTCCTCAAGGCAGGCATGAT-3'	5'-AGCCCATCAGGAAGCCAGTGAAAG-3'	
Reference gene			
<i>Gapdh</i> (NM_001289726, NM_008084)	5'-ACTAACATCAAATGGGGTGAC-3'	5'-ATTGCTGACAATCTTGAGTGA-3'	201 bp

製作所)を用いた。カラムは Inertsil ODS-3 column (5 μ m, 2.1 \times 100 mm; GL Sciences Inc.)を使用した。移動相は 10 mM 酢酸アンモニウム (A) とアセトニトリル (B) を使い、流速 200 μ L/min で以下のグラジエント条件に設定した。

	% B
0 min	25 %
12 min	40 %
16 – 20 min	95 %
20.1 – 23 min	25 %

MS/MS 条件

MS/MS として LCMS-8050 system (株式会社島津製作所)を用いた。ネガティブイオンモード下における各胆汁酸のプリカーサーイオンとプロダクトイオン (m/z) を以下に記載する。

Chemicals	precursor ion → product ion
CA	407.25→407.25
CDCA	391.25→391.25
DCA	391.25→391.25
UDCA	391.25→391.25
LCA	375.25→375.25
TCA	514.30→80.05
TCDCa	498.25→80.10
TDCA	498.20→80.05
TUDCA	498.30→80.05
TMCA	514.20 → 80.05
GCA	464.30→74.20
GCDCA	448.25→74.20
GDCA	448.30→74.20
Ketoprofen	252.95→209.15
Nor-DCA	377.20→377.20

標準品

検量線用に用いた各胆汁酸の詳細を以下に記載する。

CA: cholic acid (ナカライテスク株式会社)

CDCA: chenodeoxycholic acid (東京化成工業株式会社)

DCA: sodium deoxycholate (富士フィルム和光純薬株式会社)

UDCA: ursodeoxycholic acid (東京化成工業株式会社)

LCA: lithocholic acid (東京化成工業株式会社)

TCA: sodium taurocholate (富士フィルム和光純薬株式会社)

TCDCa: taurochenodeoxycholic acid (sodium salt) (Merck KGaA)

TDCA: taurodeoxycholic acid (sodium salt) (Merck KGaA)

TUDCA: tauroursodeoxycholic acid dihydrate (東京化成工業株式会社)

TMCA: tauro- β -muricholic acid (sodium salt) (Cayman Chemical Co. Inc.)

$\alpha + \beta$ TMCA を β TMCA として測定した

GCA: sodium glycocholate hydrate (東京化成工業株式会社)

GCDCA: sodium glycochenodeoxycholate (Sigma-Aldrich Co. LLC)

GDCA: sodium glycodeoxycholate (東京化成工業株式会社)

<マウス初代肝細胞への CA・EGF 処置>

単離したマウス初代肝細胞を 2×10^5 cells/well の密度で 24well プレートに播種し、4 時間後に 0.1 % DMSO (vehicle) または CA 100 μ M、EGF (from murine submaxillary gland) (Sigma-Aldrich Co. LLC) 50ng/mL を添加し、24 時間後に Trizol にて回収した。化合物曝露には播種時と同じ培養用メディウムを使用した。

<統計処理>

全てのデータは mean \pm standard deviation (SD) で表記している。統計学的有意差は BellCurve for Excel 2.14 (株式会社 社会情報サービス) を用いた Tukey-Kramer method (Fig. 2、3、4、5、7) や Dunnet method (Fig. 10)、または Microsoft Excel を用いた Student's t-test (Fig. 8、11) にて判定した。主成分分析には BellCurve for Excel を使用した (Fig. 9)。

引用文献

Andersen KJ, Knudsen AR, Kannerup AS, Sasanuma H, Nyengaard JR, Hamilton-Dutoit S, Ladekarl M and Mortensen FV (2013) Sorafenib inhibits liver regeneration in rats. *HPB (Oxford)* 15(12): 944-950. 10.1111/hpb.12068.

Aussilhou B, Dokmak S, Faivre S, Paradis V, Vilgrain V and Belghiti J (2009) Preoperative liver hypertrophy induced by portal flow occlusion before major hepatic resection for colorectal metastases can be impaired by bevacizumab. *Ann Surg Oncol* 16(6): 1553-1559. 10.1245/s10434-009-0447-z.

Chen H, Lin Y, Sun W, Cai Y and Li H (2017) Liver Regeneration Is Impaired in Mice with Acute Exposure to a Very Low Carbohydrate Diet. *Dig Dis Sci* 62, 1256-1264.

Chen P, Li J, Fan X, Zeng H, Deng R, Li D, Huang M and Bi H (2015) Oleanolic acid attenuates obstructive cholestasis in bile duct-ligated mice, possibly via activation of NRF2-MRPs and FXR antagonism. *Eur J Pharmacol* 765: 131-139. 10.1016/j.ejphar.2015.08.029.

Chiang JY (2002) Bile acid regulation of gene expression: roles of nuclear hormone receptors. *Endocr Rev* 23(4): 443-463.

Chow EC, Quach HP, Zhang Y, Wang JZ, Evans DC, Li AP, Silva J, Tirona RG, Lai Y and Pang KS (2017) Disrupted Murine Gut-to-Human Liver Signaling Alters Bile Acid Homeostasis in Humanized Mouse Liver Models. *J Pharmacol Exp Ther* 360(1): 174-191.

Dong B, Lee JS, Park YY, Yang F, Xu G, Huang W, Finegold MJ and Moore DD (2015) Activating CAR and β -catenin induces uncontrolled liver growth and tumorigenesis. *Nat Commun* 6: 5944. 10.1038/ncomms6944.

Elraghy O and Baldwin WS (2015) Repression of multiple CYP2D genes in mouse primary hepatocytes with a single siRNA construct. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 51(1): 9-14. 10.1007/s11626-014-9803-9.

Fattinger K, Funk C, Pantze M, Weber C, Reichen J, Stieger B and Meier PJ (2001) The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin Pharmacol Ther* 69(4): 223-231.

Gaglio PJ, Liu H, Dash S, Cheng S, Dunne B, Ratterree M, Baskin G, Blanchard J, Bohm R Jr, Theise ND and LaBrecque D (2002) Liver regeneration investigated in a non-human primate model (*Macaca mulatta*). *J Hepatol* 37(5):625-632.

Garnol T, Kučera O, Staňková P, Lotková H and Červinková Z (2016) Does Simple Steatosis Affect Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Rats? *Acta Medica (Hradec Kralove)* 59, 35-42.

Gerloff T, Geier A, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ, Matern S and Gartung C (1999) Differential expression of basolateral and canalicular organic anion transporters during regeneration of rat liver. *Gastroenterol* 117(6): 1408-1415.

Greene AK and Puder M (2003) Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management. *J Invest Surg* 16(2):99-102.

Guo Y, Cui JY, Lu H and Klaassen CD (2015) Effect of various diets on the expression of phase-I drug-metabolizing enzymes in livers of mice. *Xenobiotica* 45: 586-597.

Hamano M, Ezaki H, Kiso S, Furuta K, Egawa M, Kizu T, Chatani N, Kamada Y, Yoshida Y and Takehara T (2014) Lipid overloading during liver regeneration causes delayed hepatocyte DNA replication by increasing ER stress in mice with simple hepatic steatosis. *J Gastroenterol* 49, 305-316.

Hart SN, Cui Y, Klaassen CD and Zhong XB (2009) Three patterns of cytochrome P450 gene expression during liver maturation in mice. *Drug Metab Dispos* 37(1): 116-121. 10.1124/dmd.108.023812.

Heuman DM (1989) Quantitative estimation of the hydrophilic-hydrophobic balance of mixed bile salt solutions. *J Lipid Res* 30(5): 719-730.

Higgins GM and Anderson RM (1931) Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* 12: 186–202.

Holecek M (1999) Nutritional modulation of liver regeneration by carbohydrates, lipids, and amino acids: a review. *Nutrition* 15(10): 784-788.

Hora C, Romanque P and Dufour JF (2011) Effect of sorafenib on murine liver regeneration. *Hepatology* 53(2): 577-586. 10.1002/hep.24037.

Huang W, Ma K, Zhang J, Qatanani M, Cuvillier J, Liu J, Dong B, Huang X and Moore DD (2006) Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science* 312(5771): 233-236.

Hubert C, Dahrenmoller C, Marique L, Jabbour N, Gianello P and Leclercq I (2015) Hepatic regeneration in a rat model is impaired by chemotherapy agents used in metastatic colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 41(11): 1471-1478. 10.1016/j.ejso.2015.08.152.

Hughes MJ, Harrison EM, Jin Y, Homer N and Wigmore SJ (2015) Acetaminophen metabolism after liver resection: A prospective case-control study. *Dig Liver Dis* 47(12): 1039-1046. 10.1016/j.dld.2015.08.005.

Humbert M, Segal ES, Kiely DG, Carlsen J, Schwierin B and Hoeper MM (2007) Results of European post-marketing surveillance of bosentan in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 30(2): 338-344.

Humbert L, Maubert MA, Wolf C, Duboc H, Mahé M, Farabos D, Seksik P, Mallet JM, Trugnan G, Masliah J and Rainteau D (2012) Bile acid profiling in human biological samples: comparison of extraction procedures and application to normal and cholestatic patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 899: 135-145. 10.1016/j.jchromb.2012.05.015.

Jacobs BAW, Snoeren N, Samim M, Rosing H, de Vries N, Deenen MJ, Beijnen JH, Schellens JHM, Koopman M and van Hillegersberg R (2018) The impact of liver resection on the dihydrouracil:uracil plasma ratio in patients with colorectal liver metastases. *Eur J Clin Pharmacol* 74(6): 737-744. 10.1007/s00228-018-2426-4.

Jearapong N, Chatuphonprasert W and Jarukamjorn K (2015) Effect of tetrahydrocurcumin on the profiles of drug-metabolizing enzymes induced by a high fat and high fructose diet in mice. *Chem Biol Interact* 239: 67-75. 10.1016/j.cbi.2015.06.022.

Jia WJ, Sun SQ, Huang LS, Tang QL, Qiu YD and Mao L (2018) Reduced triglyceride accumulation due to overactivation of farnesoid X receptor signaling contributes to impaired liver regeneration following 50% hepatectomy in extra-cholestatic liver tissue. *Mol Med Rep* 17(1): 1545-1554. 10.3892/mmr.2017.8025.

Juřica J, Dovrtělová G, Nosková K and Zendulka O (2016) Bile acids, nuclear receptors and cytochrome P450. *Physiol Res* 65(Supplementum 4): S427-S440.

Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K and Yokoi T (2004) Expression of human cytochromes P450 in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* 32(12): 1402-1410.

Katoh M, Matsui T, Okumura H, Nakajima M, Nishimura M, Naito S, Tateno C, Yoshizato K and Yokoi T (2005) Expression of human phase II enzymes in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* 33(9): 1333-1340.

Kawaguchi T, Kodama T, Hikita H, Tanaka S, Shigekawa M, Nawa T, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Hiramatsu N, Tatsumi T and Takehara T (2013) Carbamazepine promotes liver regeneration and survival in mice. *J Hepatol* 59(6): 1239-1245. 10.1016/j.jhep.2013.07.018.

Kazantseva YA, Pustyl'nyak YA and Pustyl'nyak VO (2016) Role of Nuclear Constitutive Androstane Receptor in Regulation of Hepatocyte Proliferation and Hepatocarcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 81(4): 338-347. 10.1134/S0006297916040040.

Kong B, Huang J, Zhu Y, Li G, Williams J, Shen S, Aleksunes LM, Richardson JR, Apte U, Rudnick DA and Guo GL (2014) Fibroblast growth factor 15 deficiency impairs liver regeneration in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 306(10): G893-902. 10.1152/ajpgi.00337.2013.

Li G and L Guo G (2015) Farnesoid X receptor, the bile acid sensing nuclear receptor, in liver regeneration. *Acta Pharm Sin B* 5(2): 93-98. 10.1016/j.apsb.2015.01.005.

Li M, Zhao Y, Humar A, Tevar AD, Hughes C and Venkataramanan R (2016) Pharmacokinetics of drugs in adult living donor liver transplant patients: regulatory factors and observations based on studies in animals and humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 12(3): 231-243. 10.1517/17425255.2016.1139575.

Lin CW, Chen YS, Lin CC, Chen YJ, Lo GH, Lee PH, Kuo PL, Dai CY, Huang JF, Chung WL and Yu ML (2015) Amiodarone as an autophagy promoter reduces liver injury and enhances liver regeneration and survival in mice after partial hepatectomy. *Sci Rep* 5: 15807. 10.1038/srep15807.

Martignoni M, Groothuis GM and de Kanter R (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* (6): 875-894.

Matsubara T, Yoshinari K, Aoyama K, Sugawara M, Sekiya Y, Nagata K and Yamazoe Y (2008) Role of vitamin D receptor in the lithocholic acid-mediated CYP3A induction in vitro and in vivo. *Drug Metab Dispos* 36(10): 2058-2063. 10.1124/dmd.108.021501.

Meier M, Andersen KJ, Knudsen AR, Nyengaard JR, Hamilton-Dutoit S and Mortensen FV (2016) Liver regeneration is dependent on the extent of hepatectomy. *J Surg Res* 205(1): 76-84. 10.1016/j.jss.2016.06.020.

Merlen G, Ursic-Bedoya J, Jourdainne V, Kahale N, Glenisson M, Doignon I, Rainteau D and Tordjmann T (2017) Bile acids and their receptors during liver regeneration: "Dangerous protectors." *Mol Aspects Med* 56: 25-33. 10.1016/j.mam.2017.03.002.

Michalopoulos GK (2007) Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213(2): 286-300.

Miura T, Tachikawa M, Ohtsuka H, Fukase K, Nakayama S, Sakata N, Motoi F, Naitoh T, Katayose Y, Uchida Y, Ohtsuki S, Terasaki T and Unno M (2017) Application of Quantitative Targeted Absolute Proteomics to Profile Protein Expression Changes of Hepatic Transporters and Metabolizing Enzymes During Cholic Acid-Promoted Liver Regeneration. *J Pharm Sci* 106(9): 2499-2508. 10.1016/j.xphs.2017.02.018.

Modica S and Moschetta A (2006) Nuclear bile acid receptor FXR as pharmacological target: are we there yet? *FEBS Lett* 9;580(23): 5492-5499.

Mollbrink A, Augsten M, Hulcrantz R, Eriksson LC and Stål P (2013) Sorafenib prolongs liver regeneration after hepatic resection in rats. *J Surg Res* 184(2): 847-854. 10.1016/j.jss.2013.

Moscovitz JE, Kong B, Buckley K, Buckley B, Guo GL and Aleksunes LM (2016) Restoration of enterohepatic bile acid pathways in pregnant mice following short term activation of Fxr by GW4064. *Toxicol Appl Pharmacol* 310: 60-67. 10.1016/j.taap.2016.08.021.

Moya IM and Halder G (2018) Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10.1038/s41580-018-0086-y.

Muraki Y, Usui M, Isaji S, Mizuno S, Nakatani K, Yamada T, Iwamoto T, Uemoto S, Nobori T and Okuda M (2011) Impact of CYP3A5 genotype of recipients as well as donors on the tacrolimus pharmacokinetics and infectious complications after living-donor liver transplantation for Japanese adult recipients. *Ann Transplant* 16(4): 55-62.

Nagasue N, Yukaya H, Ogawa Y, Kohno H, Nakamura T (1987) Human liver regeneration after major hepatic resection. A study of normal liver and livers with chronic hepatitis and cirrhosis. *Ann Surg* 206(1): 30-39.

Naugler WE, Tarlow BD, Fedorov LM, Taylor M, Pelz C, Li B, Darnell J and Grompe M (2015) Fibroblast Growth Factor Signaling Controls Liver Size in Mice With Humanized Livers. *Gastroenterology* 149(3): 728-740.e15. 10.1053/j.gastro.2015.05.043.

Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Fanartzis M, Daruwalla J and Christophi C (2004) A model of partial hepatectomy in mice. *J Invest Surg* 17(5): 291-294.

Nishiyama Y, Nakayama SM, Watanabe KP, Kawai YK, Ohno M, Ikenaka Y and Ishizuka M (2016) Strain differences in cytochrome P450 mRNA and protein expression, and enzymatic activity among Sprague Dawley, Wistar, Brown Norway and Dark Agouti rats. *J Vet Med Sci* 78(4): 675-680. 10.1292/jvms.15-0299.

Ohno M (2008) [Functional analysis of nuclear receptor FXR controlling metabolism of cholesterol]. *Yakugaku Zasshi* 128(3):343-55.

Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Ishiguro N, Kishimoto W, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T and Terasaki T (2012) Simultaneous absolute protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos* 40(1): 83-92. 10.1124/dmd.111.042259.

Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Nakamura K, Tateno C, Katsukura Y, Obuchi W, Uchida Y, Kamiie J, Horie T and Terasaki T (2014) Validation of uPA/SCID mouse with humanized liver as a human liver model: protein quantification of transporters, cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases by LC-MS/MS. *Drug Metab Dispos* 42(6): 1039-1043. 10.1124/dmd.114.057646.

Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE and Zeldin DC (2006) The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos* 34(5): 880-886.

Pellizzer AM, Smid SA, Strasser SI, Lee CS, Mashford ML and Desmond PV (1996) UDP-glucuronosyltransferase in the regenerating rat liver. *J Gastroenterol Hepatol* 11(12): 1130-1136.

Reeves PG, Nielsen FH and Fahey GC Jr (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123(11):1939-1951.

Renaud HJ, Cui JY, Khan M and Klaassen CD (2011) Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice. *Toxicol Sci* 124(2): 261-277. 10.1093/toxsci/kfr240.

Rendic S (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* 34(1-2): 83-448.

Richert L, Tuschl G, Abadie C, Blanchard N, Pekthong D, Manton G, Weber JC and Mueller SO (2009) Use of mRNA expression to detect the induction of drug metabolizing enzymes in rat and human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 235(1): 86-96. 10.1016/j.taap.2008.11.019.

Saito Y, Kuwahara Y, Yamamoto Y, Suzuki M, Fukumoto M and Yamamoto F (2018) ddY Mice Fed 10% Fat Diet Exhibit High p27KIP Expression and Delayed Hepatocyte DNA Synthesis During Liver Regeneration. *Metab Syndr Relat Disord* 16, 305-313.

Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S and Ohta S (2012a) Prediction of in vivo hepatic clearance and half-life of drug candidates in human using chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* 40(2): 322-328. 10.1124/dmd.111.040923.

Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Uramaru N, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S and Ohta S (2012b) Predictability of metabolism of ibuprofen and naproxen using chimeric mice with human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 40(12): 2267-2272. 10.1124/dmd.112.047555.

Sanoh S and Ohta S (2014) Chimeric mice transplanted with human hepatocytes as a model for prediction of human drug metabolism and pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos* 35(2): 71-86. doi: 10.1002/bdd.1864.

Sanoh S, Naritomi Y, Fujimoto M, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S and Ohta S (2015) Predictability of plasma concentration-time curves in humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica* 45(7): 605-614. 10.3109/00498254.2015.1007112.

Scherer M, Gnewuch C, Schmitz G and Liebisch G (2009) Rapid quantification of bile acids and their conjugates in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877(30): 3920-3925. 10.1016/j.jchromb.2009.09.038.

Schuetz EG, Strom S, Yasuda K, Lecureur V, Assem M, Brimer C, Lamba J, Kim RB, Ramachandran V, Komoroski BJ, Venkataramanan R, Cai H, Sinal CJ, Gonzalez FJ and Schuetz JD (2001) Disrupted bile acid homeostasis reveals an unexpected interaction among nuclear hormone receptors, transporters, and cytochrome P450. *J Biol Chem* 276(42): 39411-39418.

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y and Guengerich FP (1994) Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270(1): 414-423.

Shmarakov IO, Jiang H, Yang KJ, Goldberg IJ and Blaner WS (2013) Hepatic retinoid stores are required for normal liver regeneration. *J Lipid Res* 54(4): 893-908. 10.1194/jlr.M029801.

Sigel B, Pechet G, Que MY and MacDonald RA (1965) Tritiated thymidine autoradiography in the regenerating liver of the dog. *J Surg Res* 5:72-78.

Solaas K, Ulvestad A, Söreide O and Kase BF (2000) Subcellular organization of bile acid amidation in human liver: a key issue in regulating the biosynthesis of bile salts. *J Lipid Res* 41(7): 1154-1162.

Soldatow V, Peffer RC, Trask OJ, Cowie DE, Andersen ME, LeCluyse E and Deisenroth C (2016) Development of an in vitro high content imaging assay for quantitative assessment of CAR-dependent mouse, rat, and human primary hepatocyte proliferation. *Toxicol In Vitro* 36: 224-237. 10.1016/j.tiv.2016.08.006.

Sydor S, Gu Y, Schlattjan M, Bechmann LP, Rauen U, Best J, Paul A, Baba HA, Sowa JP, Gerken G and Canbay A (2013) Steatosis does not impair liver regeneration after partial hepatectomy. *Lab Invest* 93, 20-30. 10.1038/labinvest.2012.142.

Tajima M, Ikarashi N, Igeta S, Toda T, Ishii M, Tanaka Y, Machida Y, Ochiai W, Yamada H and Sugiyama K (2013) Different diets cause alterations in the enteric environment and trigger changes in the expression of hepatic cytochrome P450 3A, a drug-metabolizing enzyme. *Biol Pharm Bull* 36(4): 624-634.

Takahashi S, Fukami T, Masuo Y, Brocker CN, Xie C, Krausz KW, Wolf CR, Henderson CJ and Gonzalez FJ (2016) Cyp2c70 is responsible for the species difference in bile acid metabolism between mice and humans. *J Lipid Res* 57(12): 2130-2137.

Tamási V, Kiss A, Dobozy O, Falus A, Vereczkey L and Monostory K (2001) The effect of dexamethasone on P450 activities in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 286(2): 239-242.

Tanemura A, Mizuno S, Wada H, Yamada T, Nobori T and Isaji S (2012) Donor age affects liver regeneration during early period in the graft liver and late period in the remnant liver after living donor liver transplantation. *World J Surg* 36(5): 1102-1111. 10.1007/s00268-012-1496-1.

Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T and Yoshizato K (2004) Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 165(3): 901-912.

Tateno C, Miya F, Wake K, Kataoka M, Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Kakuni M, Wisse E, Verheyen F, Inoue K, Sato K, Kudo A, Arii S, Itamoto T, Asahara T, Tsunoda T and Yoshizato K (2013) Morphological and microarray analyses of human hepatocytes from xenogeneic host livers. *Lab Invest* 93(1): 54-71. 10.1038/labinvest.2012.158.

Thakare R, Alamoudi JA, Gautam N, Rodrigues AD and Alnouti Y (2018a) Species differences in bile acids I. Plasma and urine bile acid composition. *J Appl Toxicol* 38(10): 1323-1335. 10.1002/jat.3644.

Thakare R, Alamoudi JA, Gautam N, Rodrigues AD and Alnouti Y (2018b) Species differences in bile acids II. Bile acid metabolism. *J Appl Toxicol* 38(10): 1336-1352. 10.1002/jat.3645.

Tian H, Ou J, Strom SC and Venkataramanan R (2005) Activity and expression of various isoforms of uridine diphosphate glucuronosyltransferase are differentially regulated during hepatic regeneration in rats. *Pharm Res* 22(12): 2007-2015.

Trautwein C, Rakemann T, Obermayer-Straub P, Niehof M and Manns MP (1997) Differences in the regulation of cytochrome P450 family members during liver regeneration. *J Hepatol* 26(1): 48-54.

Tschuor C, Kachaylo E, Limani P, Raptis DA, Linecker M, Tian Y, Herrmann U, Grabliauskaite K, Weber A, Columbano A, Graf R, Humar B and Clavien PA (2016) Constitutive androstane receptor (Car)-driven regeneration protects liver from failure following tissue loss. *J Hepatol* 65(1): 66-74. 10.1016/j.jhep.2016.02.040.

Vacca M, Degirolamo C, Massafra V, Polimeno L, Mariani-Costantini R, Palasciano G and Moschetta A (2013) Nuclear receptors in regenerating liver and hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 368(1-2): 108-119.

van de Laarschot LF, Jansen PL, Schaap FG and Olde Damink SW (2016) The role of bile salts in liver regeneration. *Hepatol Int* 10(5): 733-740. 10.1007/s12072-016-9723-8.

van Waterschoot RA, Rooswinkel RW, Wagenaar E, van der Kruijssen CM, van Herwaarden AE and Schinkel AH (2009) Intestinal cytochrome P450 3A plays an important role in the regulation of detoxifying systems in the liver. *FASEB J* 23(1): 224-231. 10.1096/fj.08-114876.

Vos TA, Ros JE, Havinga R, Moshae H, Kuipers F, Jansen PL and Müller M (1999) Regulation of hepatic transport systems involved in bile secretion during liver regeneration in rats. *Hepatology* 29(6): 1833-1839.

Wang X, Quail E, Hung NJ, Tan Y, Ye H and Costa RH (2001) Increased levels of forkhead box M1B transcription factor in transgenic mouse hepatocytes prevent age-related proliferation defects in regenerating liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(20): 11468-11473.

Watanabe M, Kumai T, Matsumoto N, Tanaka M, Suzuki S, Satoh T and Kobayashi S (2004) Expression of CYP3A4 mRNA is correlated with CYP3A4 protein level and metabolic activity in human liver. *J Pharmacol Sci* 94(4): 459-462.

Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR and Ball SE (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* 32(11): 1201-1208.

Xu D, Wu M, Nishimura S, Nishimura T, Michie SA, Zheng M, Yang Z, Yates AJ, Day JS, Hillgren KM, Takeda ST, Guan Y, Guo Y and Peltz G (2015) Chimeric TK-NOG mice: a predictive model for cholestatic human liver toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 352(2): 274-280. 10.1124/jpet.114.220798.

Yayama K, Sugiyama K, Miyagi R and Okamoto H (2007) Angiotensin-converting enzyme inhibitor enhances liver regeneration following partial hepatectomy: involvement of bradykinin B2 and angiotensin AT1 receptors. *Biol Pharm Bull* 30(3): 591-594.

Yao XM, Wang BL, Gu Y and Li Y (2011) Effects of bicyclol on the activity and expression of CYP450 enzymes of rats after partial hepatectomy. *Yao Xue Xue Bao* 46(6): 656-663.

Yuan X, Yan S, Zhao J, Shi D, Yuan B, Dai W, Jiao B, Zhang W and Miao M (2011) Lipid metabolism and peroxisome proliferator-activated receptor signaling pathways participate in late-phase liver regeneration. *J Proteome Res* 10(3): 1179-1190. 10.1021/pr100960h.

Zahavi T, Lanton T, Divon MS, Salmon A, Peretz T, Galun E, Axelrod JH and Sonnenblick A (2016) Sorafenib treatment during partial hepatectomy reduces tumorigenesis in an inflammation-associated liver cancer model. *Oncotarget* 7(4): 4860-4870. 10.18632/oncotarget.6638.

Zhang L, Wang YD, Chen WD, Wang X, Lou G, Liu N, Lin M, Forman BM and Huang W (2012) Promotion of liver regeneration/repair by farnesoid X receptor in both liver and intestine in mice. *Hepatology* 56(6): 2336-2343. 10.1002/hep.25905.

Zhang P, Jia K, Fang C, Zhou X, Ding X and Zhang QY (2013) Dietary regulation of mouse intestinal P450 expression and drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 41(2): 529-535. 10.1124/dmd.112.049403.

Zimmers TA, Jin X, Zhang Z, Jiang Y and Koniaris LG (2017) Epidermal growth factor receptor restoration rescues the fatty liver regeneration in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 313, E440-E449.

Zollner G, Wagner M, Moustafa T, Fickert P, Silbert D, Gumhold J, Fuchsbichler A, Halilbasic E, Denk H, Marschall HU and Trauner M (2006) Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: role of FXR-regulated organic solute transporter-alpha/beta in the adaptive response to bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(5): G923-932.

佐能 正剛、太田 茂 (2018) 創薬におけるヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬効、毒性および薬物動態評価の有用性 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 151, 213-220

品川晃彦、卒業論文、2016

立野 知世 (2012) ヒト肝細胞キメラマウス –肝臓肥大のメカニズムに関して–生化学 第84巻 第8号 pp. 699-706

宮村 憲央、仁科 博史 (2016) 器官のサイズを制御する Hippo-YAP/TAZ シグナル伝達経路 ライフサイエンス 領域融合レビュー 5 e004 10.7875/leading.author.5.e004

山口 賢次 (1985) タウリンを中心とした含硫アミノ酸の代謝と栄養 23 巻 5 号 p. 299-308

一般社団法人 日本肝臓学会 肝臓診療ガイドライン 2017 年版

謝辞

本研究は広島大学大学院医歯薬保健学研究科 太田 茂教授（現・和歌山県立医科大学教授）、古武 弥一郎教授のもとで行われたものであり、幅広い見地、ご経験からご指導ご鞭撻を賜りました両教授に謹んで感謝申し上げます。

また、本研究を進めるにあたり、終始懇切な直接のご指導並びに多大なご助言・ご協力を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究科 佐能 正剛助教に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際して、格別のご高配を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究科 小澤 孝一郎教授、細井 徹准教授に厚く感謝申し上げます。

本研究において、審査・ご助言を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究科 高野 幹久教授、松尾 裕彰教授、猪川 和朗准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、数々のご助言・ご協力を賜りました株式会社フェニックスバイオ 立野 知世博士並びに株式会社フェニックスバイオの皆様にご心より感謝申し上げます。

本研究にご協力頂き、また学生生活を充実したものにしてくださいました広島大学大学院医歯薬保健学研究科 生体機能分子動態学研究室の先輩方、後輩の皆様にご深く感謝致します。

最後に、勉強する機会を与えてくれた家族に心から感謝致します。