

博士論文

ヒト肝キメラマウス由来肝細胞に蓄積された脂質の 減少を目的とした高酸素培養系の構築

広島大学 大学院医系科学研究科

医歯薬学専攻 薬学専門プログラム

平成 31 年度入学 大月 佑也

主指導教員 古武 弥一郎

目次

略語一覧.....	1
第1章 緒言	4
第2章 高酸素培養がキメラマウス肝細胞におよぼす影響評価	9
第1節 緒言	9
第2節 高酸素培養が肝細胞内脂質におよぼす影響.....	10
第1項 高酸素培養による脂肪滴量の変化.....	10
第2項 高酸素培養による TG 量の変化.....	13
第3節 高酸素培養による肝細胞内脂質の減少メカニズムの探索.....	15
第1項 高酸素培養が FAO 活性におよぼす影響.....	16
第2項 高酸素培養が脂質代謝関連経路におよぼす影響.....	19
第3項 高酸素培養が肝細胞機能におよぼす影響	21
第4項 脂質代謝に関連した上流制御因子および下流機能の探索	23
第5項 高酸素培養が脂質の取り込みにおよぼす影響.....	26
第4節 高酸素培養したキメラマウス肝細胞における細胞応答経路の網羅的評価 28	
第1項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞における細胞ストレスおよび細胞障害 応答関連経路におよぼす影響	29
第2項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞におけるアミノ酸代謝関連経路におよ ぼす影響.....	32
第3項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞におけるグルコース代謝関連経路にお よぼす影響.....	34
第4項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞における細胞成長および増殖関連経路 におよぼす影響	36
第5項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞におけるサイトカインシグナル関連経 路におよぼす影響	38
第6項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞における細胞死および生存関連経路に およぼす影響.....	40
第7項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞における細胞機能および維持関連経路 におよぼす影響	42
第5節 高酸素培養条件下の肝細胞近傍の酸素濃度変化.....	45
第6節 小括	47
第3章 高酸素培養により <i>in vivo</i> 由来の脂質を減少させたキメラマウス肝細胞を 用いた薬剤誘発性脂肪肝の予測評価.....	51

第1節	緒言	51
第2節	検証化合物を用いた薬剤誘発性脂肪肝の予測評価	52
第3節	小括	54
第4章	総括	56
実験の部	58
引用文献の部	73
本論文に関連した学会発表	83
基礎となる原著論文	84
謝辞	85

略語一覽

ABCD3; ATP binding cassette subfamily D member 3
ACAA1; acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1
ACOX1; acyl-CoA oxidase 1
ACSL1; acyl-CoA synthetase long-chain family member 1
ACSS2; acyl-CoA synthetase short-chain family member 2
AHR; aryl hydrocarbon receptor
AICAR; 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside
AKT (PKB); v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (protein kinase B)
ANOVA; analysis of variance
ASH; alcoholic steatohepatitis
ATP; adenosine triphosphate
CD36; cluster of differentiation 36
CDK5; cyclin-dependent kinase 5
CoA; coenzyme A
CXCR4; C-X-C chemokine receptor type 4
CYP; cytochrome p450
DEG; differential expression gene
DILI; drug-induced liver injury
DMEM; dulbecco's modified eagle medium
DMSO; dimethyl sulfoxide
DW; distilled water
EDN1; endothelin 1
EGF; epidermal growth factor
EHHADH; enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase
ErbB2 (HER2); EGF receptor family 2 (human epidermal growth factor receptor 2)
ErbB3 (HER3); EGF receptor family 3 (human epidermal growth factor receptor 3)
ErbB4 (HER4); EGF receptor family 4 (human epidermal growth factor receptor 4);
ErbB; EGF receptor family
FA; fatty acid
FAO; fatty acid β -oxidation
FATP; fatty acid transporter protein
FBS; fetal bovine serum
FLT3; fms like tyrosine kinase 3
FXR; farnesoid X receptor

GH; growth hormone
GTP; guanosine triphosphate
hAlb; human albumin
HEPES; 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HGF; hepatocyte growth factor
HIF; hypoxia-inducible factor
HMGB1; high-mobility group protein 1
IGF-1; insulin-like growth factor 1
IL 3; interleukin-3
IL 8; interleukin-8
IL 9; interleukin-9
IL-1; interleukin-1
IL15; interleukin-15
IL33; interleukin-33
ILK; integrin-linked kinase
IPA; ingenuity pathway analysis
JAK; Janus kinase
KLF6; krüppel like factor 6
LCFA; long-chain fatty acids
LPS; lipopolysaccharide
LXR; liver X receptor
MAPK; mitogen-activated protein kinase
MCFA; medium-chain fatty acids
MEOX2; mesenchyme homeobox 2
NAD; nicotinamide adenine dinucleotide
NASH; nonalcoholic steatohepatitis
NAFLD; nonalcoholic fatty liver disease
NR2F2; nuclear receptor subfamily 2 group F member 2
NRF2; nuclear factor erythroid 2-related factor 2
PAK; p21-activated kinase
PBS; phosphate-buffered saline
PDGF; platelet-derived growth factor
PDK4; pyruvate dehydrogenase kinase 4
PEDF; pigment epithelium-derived factor
PI3K; phosphoinositide 3-kinase
PLIN2; perilipin 2

PPAR α ; peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PPAR γ ; peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PTEN; phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
PXR; pregnane X receptor
QRFP; pyroglutamylated RFamide peptide
RXR; retinoid X receptor
Rac; ras-related C3 botulinum toxin substrate
Ras; rat sarcoma
Rho; ras homology
S.D.; standard deviation
SCARB1; scavenger receptor class B member 1
SCFA; short-chain fatty acids
SCID; severe combined immunodeficient
SLC27A1; solute carrier family 27 member 1
SLC27A5; solute carrier family 27 member 5
SLCO1B3; solute carrier organic anion transporter family member 1B3
STAT3; signal transducer and activator of transcription 3
STAT; signal transduction and activator of transcription
TG; triglyceride
TGF- β ; transforming growth factor β
uPA; urokinase-type plasminogen activator
USP7; ubiquitin specific peptidase 7
UVA; ultraviolet A
UVC; ultraviolet C
VLCFA; very long-chain fatty acids

第1章 緒言

脂肪肝は肝細胞に脂質が蓄積した状態であり、肝臓組織切片において脂肪性肝細胞の5%以上が顕微鏡観察下において認められる (Pirmoazen *et al.*, 2020)。脂肪肝疾患は一般的に alcoholic steatohepatitis (ASH) あるいは nonalcoholic steatohepatitis (NASH) と呼ばれる2つのカテゴリーに分類される (Joshi-Barve *et al.*, 2015)。前者の場合、慢性的なアルコール摂取によるアルデヒドを含むアルコールの有毒な代謝産物の生成や cytochrome P450 (CYP) 2E1 が生成する過酸化水素やスーパーオキシドイオンなどの活性酸素種により生じる肝細胞障害が肝臓中への脂質蓄積につながるということが知られている (Rocco *et al.*, 2014)。後者の場合、飽和・トランス脂肪酸やフルクトースなどの栄養素、医薬品、肝毒性物質、脂質代謝障害などの複数の非アルコール性要因により疾患が発生・進行する (Klaunig *et al.*, 2018; Rives *et al.*, 2020)。非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD) は、慢性肝疾患の原因として世界的に最も一般的な疾患であり (Younossi *et al.*, 2016)、NAFLD は脂肪症から脂肪性肝炎、肝硬変、肝細胞がんに至るまでの肝疾患の病理学的スペクトルを網羅しているとされる。実際、NAFLD は単純な脂肪症に始まり、NAFLD 患者の約10%が NASH へと進行し、さらに NASH 患者の15~25%が肝硬変、最終的には肝細胞がんへと進展することが報告されている (Rinella and Sanyal, 2016)。NAFLD の世界的な有病率は約25%と推定されている (Younossi *et al.*, 2016)。2016年時点において、日本には2,000万人以上の NAFLD 患者が存在しており、今後、患者数が増加することが懸念されている (Estes *et al.*, 2018)。これらのことから、NASH や肝硬変、肝細胞がんを惹起する NAFLD を未然に回避することは重要である。

薬剤誘発性肝障害 (Drug-induced liver injury; DILI) は医薬品の開発中止や市場撤退の要因となる主要な副作用として知られている (Hornberg *et al.*, 2014)。薬剤誘発性脂肪肝は DILI の1種であり、DILI 症例の約30%が脂肪肝を発症している (Kleiner *et al.*, 2014; Miele *et al.*, 2017)。薬剤誘発性脂肪肝は NAFLD の1種でもあり、栄養過多や身体活動レベルの低さ、インスリン抵抗性から生じる代謝性 NAFLD に関しては細心の注意が払われているものの (Farrell and Larter, 2006)、医薬品により惹起・促進される、または悪化する医原性 NAFLD の研究にはあまり注意が向けられていない (Benet *et al.*, 2014)。このような背景から、薬剤誘発性脂肪肝を前臨床段階において予測することは重要であり、そのハイスループットな評価系の構築は、創薬の初期段階における重要な課題である。しかしながら、実験動物とヒトにおける種差が原因となり、前臨床段階において DILI を正確に予測することは困難である (Albrecht *et al.*, 2019)。

株式会社フェニックスバイオより生産されているヒト肝キメラマウス (PXB-mice[®]) は、肝障害と免疫不全の形質を併せ持つ urokinase-type plasminogen activator/severe combined immunodeficient (uPA/SCID) mice にヒト肝細胞を脾臓門脈経路で移植することで作成される (Tateno *et al.*, 2015; Tateno and Kojima, 2020)。PXB-mice[®]は肝臓の約 80%がヒト肝細胞で構成されており、様々なヒト型の薬物代謝酵素やトランスポーターを発現している (Katoh *et al.*, 2005; Nishimura *et al.*, 2005)。様々なヒト型の薬物代謝酵素やトランスポーターの発現プロファイルがヒトと類似していることから (Ohtsuki *et al.*, 2014)、ヒトにおける薬物動態を評価するうえで有用なモデルであると考えられている。近年、キメラマウスが薬物代謝酵素による代謝活性化に関連した DILI の予測に有用な動物モデルであることが報告された (Kakuni *et al.*, 2012; Yamazaki *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2022)。さらに、ヒト肝キメラマウスより単離した肝細胞 (PXB-cells[®]) は、ヒトにおける薬物代謝や DILI を評価するための *in vitro* 評価系に採用されており (Ikeyama *et al.*, 2020; Yamasaki *et al.*, 2020)、ヒト肝キメラマウスおよびキメラマウス肝細胞は医薬品の体内動態や毒性評価に有用な、ヒトと実験動物との種差を克服した *in vivo* および *in vitro* モデルであるという知見が蓄積してきている。

一方、PXB-mice[®]は脂肪肝を呈することが報告されている (Tateno *et al.*, 2011)。また、PXB-cells[®]においても脂質滴が認められる (Ikeyama *et al.*, 2020)。PXB-mice[®]は NASH の初期段階における新薬やバイオマーカーの探索に有用であることが報告されており (Kisoh *et al.*, 2021)、ヒト肝がん由来細胞株である HepG2 および HuH-7 と比較して、高レベルのリポタンパク質を産生している PXB-cells[®]は抗脂質血症薬のスクリーニングに適していることも報告されている (Hata *et al.*, 2020)。したがって、PXB-mice[®]および PXB-cells[®]は、ヒトにおける脂質代謝調節機構を調べる上でも非常に有用な *in vivo* および *in vitro* モデルであるといえる。

脂肪の蓄積は組織学的に microvesicular steatosis および macrovesicular steatosis に分けられる (Kristiansen *et al.*, 2019)。microvesicular steatosis は、細胞の中心への核の局在、肝細胞内へのいくつかの脂質小胞の蓄積によって組織学的に特徴付けられる急性肝障害である (Miele *et al.*, 2017)。脂肪酸β酸化 (Fatty acid β-oxidation; FAO) の阻害につながる急性ミトコンドリア機能障害に関連しており、酸化が不十分な脂肪酸は肝細胞の細胞質中にトリグリセリド (Triglyceride; TG) として貯蔵される (Fromenty and Pessayre, 1995)。バルプロ酸やテトラサイクリン、アスピリン、イブプロフェンなどの医薬品がこの microvesicular steatosis を惹起することが報告されている (Miele *et al.*, 2017)。一方、macrovesicular steatosis は、脂肪の大きな空胞の肝細胞全体への蓄積、細胞周辺への核の移動によって組織学的に特徴付けられる (Miele

et al., 2017)。FAO の破綻やミクロソームトリグリセリド伝達タンパク質活性の抑制、TG や Apolipoprotein B などの分泌低下、脂肪酸の *de novo* 合成や肝臓への取り込みの増加などにより肝細胞中に脂質が蓄積する (Laouressergues *et al.*, 2010; Lettéron *et al.*, 2003)。タモキシフェンやシスプラチン、インドメタシン、メフロキンなどが macrovesicular steatosis を引き起こすことが知られる (Miele *et al.*, 2017)。このような知見を鑑みると、PXB-mice[®]および PXB-cells[®]に認められる脂質の蓄積は、DILI、特に薬剤誘発性脂肪肝を定性的・定量的に精度よく予測するにおいて障害となることが懸念される。

PXB-mice[®]に脂質が蓄積する要因として、脂質代謝を調節する成長ホルモン (growth hormone; GH) がマウスとヒトとの間で交差性を有していないために脂肪肝を呈していると考えられており (Tateno and Kojima., 2020)、Human GH を投与するとキメラマウスの脂肪肝が改善することが明らかとなっている (Tateno *et al.*, 2011)。しかしながら、PXB-cells[®]においては、蓄積された脂質を減少させる方法はいまだ確立されていない。PXB-cells[®]を用いて、薬剤誘発性脂肪肝を定性的・定量的に精度良く予測できる評価系を構築するためには、肝細胞に蓄積した脂質を減少させることのできる培養系を確立する必要がある。

酸素は生化学反応で最も利用される基質であり、ATP および NADH などの内在性基質をも上回る (Raymond and Segrè, 2006)。このことから、細胞培養における環境要因として、酸素は重要な位置を占めると考えられる。通常の生理的条件下における肝細胞の酸素消費速度は 40-90 pmol/s/cm² であることが報告されている (Stevens, 1965)。しかしながら、ラット肝細胞を用いた研究において、通常培養条件である 20%酸素条件下では培養液中への酸素溶解度が低いため、液体-気体界面を通過する酸素は 17 pmol/s/cm² しかなく、通常の培養酸素条件では肝細胞の酸素要求量を満たせていないことが示唆されている (Sakai *et al.*, 2012)。近年、インキュベーター内の酸素濃度を通常培養条件である 20%から 80%に上昇させることにより、ラット肝細胞における乳酸放出量が減少し、肝細胞への十分な酸素供給によりミトコンドリアの酸化的リン酸化が活性化することが報告された (Liu *et al.*, 2016)。このように、細胞は培養液中酸素濃度の変化を検出し、培養環境の変化に応答して細胞機能を変動させている。低酸素誘導因子 (hypoxia-inducible factor; HIF) は酸素濃度の検出を担う制御因子であり、細胞を微小環境へ適応させるために中心的な役割を果たす (Choudhry and Harris, 2018)。通常培養条件よりも低酸素条件である 1%酸素培養条件下での HIF-1 α および HIF-2 α の活性化は、peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) を介して FAO 活性を低下させ、HepG2 に脂質を蓄積させる (Liu *et al.*, 2014)。このような知見を鑑みると、通常培養条件である 20%酸素条件下における細胞培養液は、酸素要求量の高い

肝細胞にとって嫌氣的環境であり、これらの微小環境が肝細胞の脂質代謝能を低下させている可能性がある。このような背景から、脂質が蓄積しているキメラマウス肝細胞を通常の培養条件である 20%酸素よりも高濃度の酸素濃度で培養することにより、生体内の肝機能、特に脂質代謝能を模倣した最適な培養環境を形成することができ、肝細胞に蓄積した脂質が減少する可能性があると考えた (Fig. 1)。

ヒト肝細胞の酸素要求量は、マウスやラット肝細胞よりも低いことが報告されており (Stéphenne *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 2011)、キメラマウス肝細胞のミトコンドリア機能は 40%酸素条件下での培養により上昇することが示唆されている (Ikeyama *et al.*, 2020)。しかしながら、高酸素培養がキメラマウス肝細胞に蓄積される脂質に与える影響についてはこれまで研究がなされていなかった。そこで本研究では、脂質代謝機構、特に FAO 活性に着目し、PXB-cells®に蓄積された *in vivo* 由来の脂質に対する高酸素培養条件の影響とその調節機構を明らかにし、定性的・定量的な薬剤誘発性脂肪肝評価系としての高酸素培養系を構築することを目的とする (Fig. 1)。

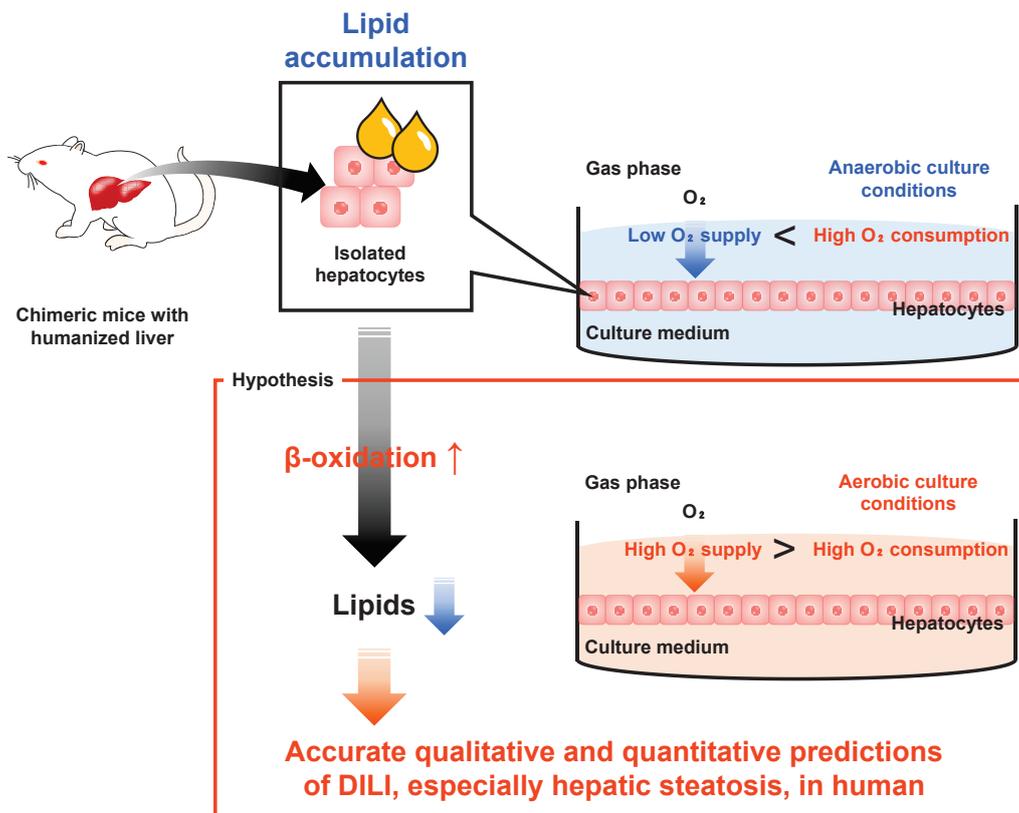


Figure 1. Outline of the present study.

Lipids are accumulated in the chimeric mouse hepatocytes, which may reduce the predictability of DILI. Normal culture conditions may be anaerobic for chimeric mouse hepatocytes and may reduce lipid metabolic capacity, especially FAO activity. In the present study, we focused on the potential of hyperoxic culture to reduce accumulated lipids and investigated the usefulness of the hyperoxic culture system to quantitatively and qualitatively evaluate DILI, especially drug-induced fatty liver.

第2章 高酸素培養がキメラマウス肝細胞におよぼす影響評価

第1節 緒言

本章では、ヒト肝キメラマウス (PXB-mice[®]) より単離した肝細胞 (PXB-cells[®]) を通常培養条件 (20%酸素条件: 5% CO₂、95% atmosphere)、高酸素培養条件 (40%酸素条件: 5% CO₂、40% O₂、55% N₂) 下で培養することにより、高酸素培養がキメラマウス肝細胞におよぼす影響を網羅的に評価した (Fig. 2)。

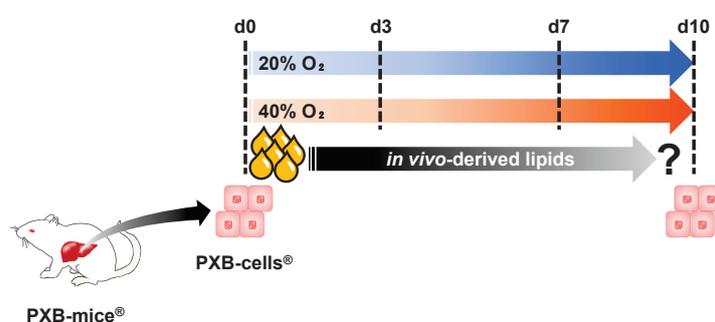


Figure 2. Study design in the chapter.

The effects of hyperoxic culture conditions on cellular response pathways, including the regulation of accumulated lipid levels, were evaluated in chimeric mouse hepatocytes.

第2節 高酸素培養が肝細胞内脂質におよぼす影響

第1項 高酸素培養による脂肪滴量の変化

ヒト肝キメラマウスより単離した肝細胞を 20%酸素条件あるいは 40%酸素条件下で 10 日間培養し、*in vivo* 由来の脂質の変化を Oil Red O 染色およびその色素を抽出・定量することにより評価した (Fig. 3, 4)。

ヒト肝キメラマウスより単離した直後の肝細胞には脂質滴が認められた (Fig. 3, d0)。20%酸素条件と比較して、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞は播種後 7 日目より脂肪滴数の減少が観察された (Fig. 3)。

さらに、Oil Red O 染色およびその色素を抽出・定量することにより脂肪滴の変化を評価した。20%酸素条件と比較して、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞は播種後 7 日目より脂質滴数が減少することが Oil Red O 染色によっても観察された (Fig. 4A)。また、Oil Red O 色素を抽出したところ、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞では 7 日目より脂質が有意に減少し、20%酸素条件下と比較して、播種後 7、10 日目において有意な脂質の減少が認められた (Fig. 4B)。

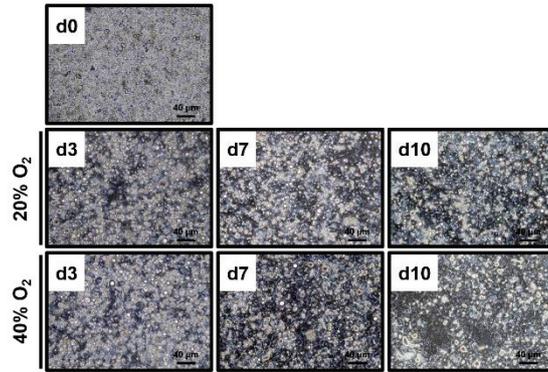


Figure 3. Fluctuations of lipid droplets accumulated in chimeric mouse hepatocytes cultured under each oxygen condition.

Chimeric mouse hepatocytes were cultured in a 24-microwell plate under each oxygen condition. Representative microscopic images of pooled hepatocytes isolated from three chimeric mice cultured under each oxygen condition are shown ($\times 20$ magnification).

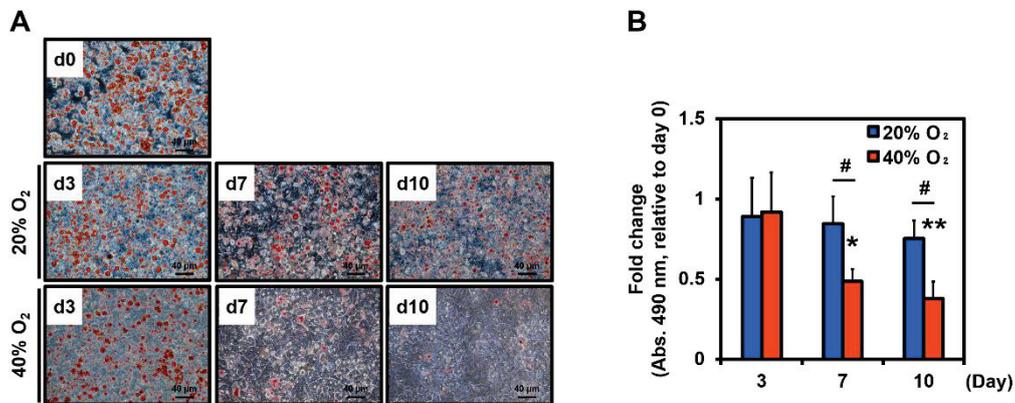


Figure 4. Evaluation of lipid droplet changes in chimeric mouse hepatocytes cultured under each oxygen condition by Oil Red O staining.

Isolated hepatocytes from three chimeric mice were cultured in a 96-microwell plate under each oxygen condition. A) Representative Oil Red O stained images of chimeric mouse hepatocytes cultured under each oxygen condition during culture periods ($\times 20$ magnification). B) Quantitation of dye amounts extracted from chimeric mouse hepatocytes after Oil Red O staining. Two-way ANOVA showed a statistical difference in oxygen conditions and different culture periods. No interaction effect

was detected between oxygen conditions and culture periods. All results are expressed as mean \pm S.D., (n = 3) * p < 0.05, ** p < 0.01 compared to day 0, # p < 0.05 compared to 20% oxygen conditions on the same day.

第2項 高酸素培養による TG 量の変化

ヒト肝キメラマウスより単離した肝細胞を 20%酸素条件あるいは 40%酸素条件下で 10 日間培養し、TG 量の変化を Cholestest® TG キット (Sekisui Medical Co., Ltd.) を用いて評価した (Fig. 5)。

40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞では 7 日目より肝細胞中 TG 量が有意に減少し、20%酸素条件下と比較して、播種後 7、10 日目において有意な肝細胞中 TG 量の減少が認められた (Fig. 5A)。一方、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞の培養上清中 TG 量は、20%酸素条件下と比較して増加する傾向が見られた (Fig. 5B)。

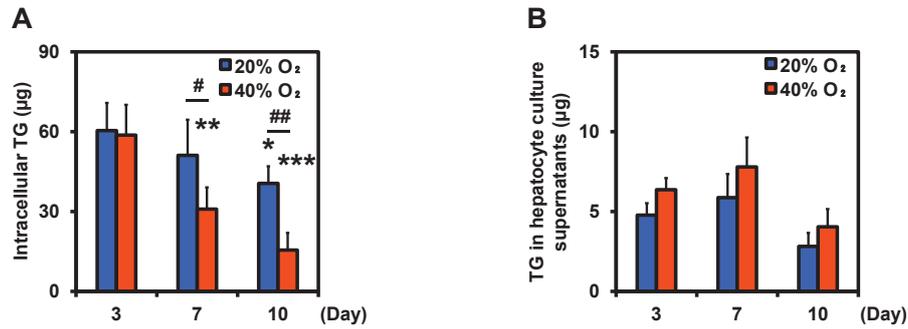


Figure 5. Changes of TG levels in chimeric mouse hepatocytes or culture supernatants under each oxygen condition.

Isolated hepatocytes from three chimeric mice were cultured in a 96-microwell plate under each oxygen condition. A) The intracellular TG levels of chimeric mice hepatocytes cultured under each oxygen condition during culture periods. B) The TG levels in the culture supernatants under each oxygen condition during culture periods. Two-way ANOVA showed a statistical difference in oxygen conditions and different culture periods. No interaction effect was detected between oxygen conditions and culture periods. All results are expressed as mean \pm S.D., ($n = 3$) $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ compared to day 0, $\#p < 0.05$, $\#\#p < 0.01$ compared to 20% oxygen conditions on the same day.

第3節 高酸素培養による肝細胞内脂質の減少メカニズムの探索

第2節では、40%酸素条件下でキメラマウス肝細胞を培養することにより、肝細胞に蓄積した *in vivo* 由来の脂質が減少することを明らかとした (Fig. 3-5)。

本節では、キメラマウス肝細胞を 20%酸素条件あるいは 40%酸素条件下で培養し、FAO 活性の測定、microarray および Ingenuity Pathway Analysis (IPA)[®] (Qiagen N. V.) による網羅的解析を通して、高酸素培養によるキメラマウス肝細胞に蓄積した *in vivo* 由来脂質の減少メカニズムを解明することとした。

第1項 高酸素培養が FAO 活性におよぼす影響

ノナン酸の炭素鎖末端に青色蛍光色素であるクマリン誘導体を付与することにより FAO 活性を蛍光で評価することができるプローブである FAOBlue を用いて (Uchinomiya *et al.*, 2020)、各酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞の FAO 活性を測定した (Fig. 6)。

まず、FAO 活性を簡便に評価できる測定系を構築するため、FAO 活性化剤として汎用される 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) を用いて (Smith *et al.*, 2005)、FAO 活性を定量的に評価できるかを検討した (Fig. 7)。20%酸素条件下で3日間培養したキメラマウス肝細胞を用いて評価を行ったところ、AICAR 濃度依存的に蛍光カウントの増強が認められたことから、FAOBlue を用いて FAO 活性を定量的に評価できることが確認できた (Fig. 7B)。

ヒト肝キメラマウスより単離した肝細胞を 20%酸素条件あるいは 40%酸素条件下で 10 日間培養し、前述の FAO 活性評価系を用いて、高酸素培養が FAO 活性におよぼす影響を評価した。40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞では、播種後 7 日目より FAO 活性が有意に増加した。一方、20%酸素条件下培養したキメラマウス肝細胞では、播種後 10 日目において FAO 活性が上昇した。また、播種後 7 日目において、20%酸素条件下と比較して、40%酸素条件下における FAO 活性は有意に高かった (Fig. 8)。

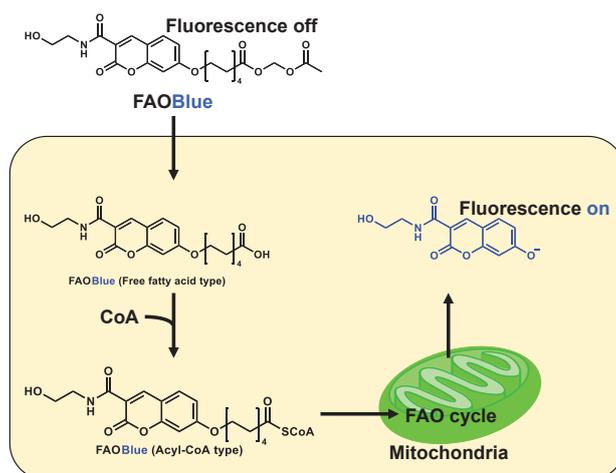


Figure 6. Principle of mitochondrial FAO activity measurement using FAOBlue.

FAOBlue is a fluorescent probe consisting of nonanoic acid with a fluorescent dye, a coumarin derivative. FAOBlue is taken up into the cell and underwent FAO mainly in the mitochondria, causing the entire cell to emit blue fluorescence.

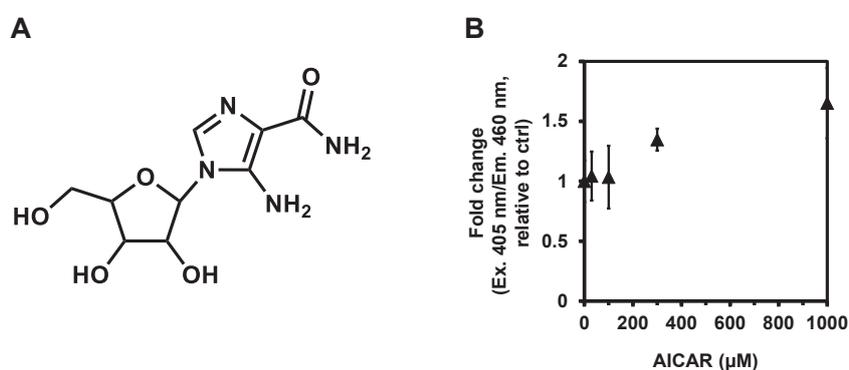


Figure 7. Establishment of a quantitative evaluation system for FAO activity using AICAR.

Isolated hepatocytes from three chimeric mice were cultured in a 96-microwell plate under 20% oxygen conditions for 3 days. A) Chemical structure of AICAR. B) FAO activity in chimeric mouse hepatocytes was measured under 20% oxygen conditions. Results are expressed as mean \pm S.D., (n = 3).

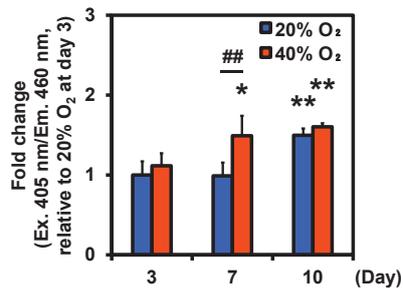


Figure 8. Changes in FAO activity in chimeric mouse hepatocytes under 20% or 40% oxygen culture condition.

Isolated hepatocytes from three chimeric mice were cultured in a 96-microwell plate under 20% or 40% oxygen conditions. The FAO activities in hepatocytes were measured under each oxygen condition. Two-way ANOVA showed a statistical difference in oxygen conditions and different culture periods. No interaction effect was detected between oxygen conditions and culture periods. All results are expressed as mean \pm S.D., (n = 3) * p < 0.05, ** p < 0.01 compared to hepatocytes on day 3 of culture under each oxygen condition, ## p < 0.01 compared to 20% oxygen conditions on the same day.

第2項 高酸素培養が脂質代謝関連経路におよぼす影響

40%酸素条件下における FAO 活性化以外のキメラマウス肝細胞に蓄積された脂質を減少させるメカニズムの関与を網羅的に検討するために、microarray および IPA を行った。IPA とは、microarray、RNA-sequencing、proteomics や metabolomics などの大規模実験や、polymerase chain reaction などの小規模実験といった様々なスケールの実験から得られたデータを用いて、下流機能への影響や上流の制御因子の解明、その制御因子の活性化状態の予測などを目的として行われる解析である (Krämer *et al.*, 2014)。Microarray で得られたデータセットをもとに、各酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞の遺伝子発現プロファイルと単離直後の新鮮肝細胞の遺伝子発現プロファイルとを比較し、高酸素培養が脂質代謝関連経路におよぼす影響を評価した (Fig. 9)。

Canonical pathway は機能カテゴリーに従って分類され、Fig. 9 は脂質代謝関連経路をまとめたものである。Z score は着目している遺伝子の実験値とデータセット全体の平均値の差を標準偏差で割ることにより算出される値であり (Carey and Delaney, 2010)、予測される制御因子の活性化状態を推測するために用いられる (Krämer *et al.*, 2014)。単離直後のキメラマウス肝細胞と比較して、20%酸素および 40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞において有意に阻害された経路 (Z score < -2、 $p < 0.05$) は青色のハイライトで、有意に活性化された経路 (Z score > 2、 $p < 0.05$) はオレンジ色のハイライトで示している。新鮮肝細胞と比較して、脂質代謝に関連する多くの経路が 20%酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞においてダウンレギュレートされていた。また、40%酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞においては脂質代謝に関連するより多くの経路ダウンレギュレートされていた (Fig. 9)。

Lipid Metabolism-related Canonical Pathways	Z Score of 40% O ₂	Z Score of 20% O ₂
Xenobiotic Metabolism PXR Signaling Pathway	-4.009	-3.641
LXR/RXR Activation	-3.683	-3.212
PPAR α /RXR α Activation	-3.363	-3.182
Ethanol Degradation II	-2.714	-2.714
PPAR Signaling	-2.556	-0.853
Acetone Degradation I (to Methylglyoxal)	-2.138	-1.387
Triacylglycerol Degradation	-2.138	-2.496
Fatty Acid Activation	-2.121	-1.633
Ketogenesis	-2.000	N/A
Xenobiotic Metabolism AHR Signaling Pathway	-1.961	-3.138
Ketolysis	-1.000	N/A
Triacylglycerol Biosynthesis	-0.832	-0.905

Figure 9. Summary of lipid metabolism-related canonical pathways.

Changes in mRNA gene clusters were compared between three batches of pooled isolated hepatocytes (day 0, suspension) from 2-4 chimeric mice and three batches of pooled cultured hepatocytes (day 7) from 2-4 chimeric mice under each oxygen condition. Each number represents the Z-score, a statistical measure of the degree of consistency between the direction of the predicted gene-pathway relationship and the observed gene expression alterations. A Z-score >2 or <-2 was considered significant, and blue (inhibited) shades indicated differences in the magnitude of values. N/A; data not available. PXR; pregnane X receptor, LXR; liver X receptor, RXR; retinoid X receptor, PPAR α ; peroxisome proliferator-activated receptor alpha, AHR; aryl hydrocarbon receptor.

第3項 高酸素培養が肝細胞機能におよぼす影響

脂質代謝関連の canonical pathway に着目して網羅的解析を行ったところ、新鮮肝細胞と比較して、20%酸素条件下よりも40%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞において脂質代謝に関連するより多くの経路がダウンレギュレートされていた (Fig. 9)。しかしながら、それぞれの経路の変化がどの程度脂質の変動に寄与するかは不明瞭である。そこで、生理機能に着目して網羅的解析を行った (Fig. 10)。

新鮮肝細胞と比較して、20%酸素条件下よりも40%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞において uptake of lipid、uptake of fatty acid、fatty acid metabolism、synthesis of lipid、oxidation of lipid などが抑制されていた (Fig. 10)。Metabolism of amino acids および synthesis of amino acids も、40%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞において抑制された。一方、transport of molecule、interaction of endothelial cells、secretion of molecule、binding of endothelial cells、interaction of blood cells、phosphorylation of protein、and cell cycle progression は、20%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞では抑制されたが、40%酸素条件では抑制されなかった。さらに、inflammation of organ、cancer of cells、morbidity or mortality は20%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞においてのみ活性化されていた (Fig. 10)。

Diseases and Bio Functions	Z score of 40% O ₂	Z score of 20% O ₂
Uptake of lipid	-3.084	-2.763
Uptake of fatty acid	-3.064	N/A
Fatty acid metabolism	-2.580	-1.664
Synthesis of terpenoid	-2.339	N/A
Synthesis of lipid	-2.185	-1.369
Metabolism of terpenoid	-2.088	-1.584
Quantity of carbohydrate	-2.079	-2.033
Transport of carboxylic acid	-1.674	-1.174
Synthesis of steroid	-1.736	N/A
Metabolism of acylglycerol	-1.708	N/A
Transport of fatty acid	-1.626	-0.992
Metabolism of amino acids	-2.895	-1.456
Synthesis of amino acids	-2.097	-1.489
Progressive neurological disorder	-2.506	N/A
Aggregation of cells	-2.668	N/A
Transport of molecule	-1.743	-2.043
Interaction of endothelial cells	-1.741	-2.660
Secretion of molecule	-1.738	-2.101
Binding of endothelial cells	-1.652	-2.590
Interaction of blood cells	-1.165	-2.277
Phosphorylation of protein	N/A	-2.489
Cell cycle progression	N/A	-2.199
Oxidation of lipid	-2.874	-2.154
Cell death of liver cells	-1.796	-2.681
Inflammation of organ	1.348	2.706
Cancer of cells	1.739	2.436
Morbidity or mortality	0.076	2.112

Figure 10. Summary of IPA-based diseases and bio functions.

Changes in mRNA gene clusters were compared between three batches of pooled isolated hepatocytes (day 0, suspension) from 2-4 chimeric mice and three batches of pooled cultured hepatocytes (day 7) from 2-4 chimeric mice under each oxygen condition. Each number represents the Z-score, a statistical measure of the degree of consistency between the direction of the predicted gene-pathway relationship and the observed gene expression alterations. A Z-score >2 or <-2 was considered significant, and orange (activated) and blue (inhibited) shades indicated differences in the magnitude of values, respectively. N/A; data not available.

第4項 脂質代謝に関連した上流制御因子および下流機能の探索

IPA を用いて、microarray のデータセットと既知の報告に基づき、推定される上流制御因子および下流機能、それらを結ぶネットワークを可視化した (Fig. 11)。

Microarray の結果、acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1)、CYP4A11、ATP binding cassette subfamily D member 3 (ABCD3)、pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4)、acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1 (ACAA1)、solute carrier family 27 member 1 (SLC27A1)、peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG)、cluster of differentiation 36 (CD36)、acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 (ACSL1) の発現が抑制されていた。これらの遺伝子発現変動の上流には enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase (EHHADH) の活性化、pyroglutamylated RFamide peptide (QRFP) の抑制が関与しており、その結果、40%酸素条件下では oxidation of lipid、fatty acid metabolism、uptake of fatty acid に関連するシグナル伝達経路が抑制されていることが想定された (Fig. 11A)。

Mesenchyme homeobox 2 (MEOX2)、ubiquitin-specific peptidase 7 (USP7)、interleukin-33 (IL33)、acyl-CoA synthetase short-chain family member 2 (ACSS2)、krüppel-like factor 6 (KLF6)、nuclear receptor subfamily 2 group F member 2 (NR2F2)、farnesoid X receptor (FXR) ligand-FXR-Retinoic acid-retinoid X receptor (RXR) α が endothelin 1 (EDN1)、CD36、perilipin 2 (PLIN2)、PPARG、IL15、scavenger receptor class B member 1 (SCARB1)、PPARA、solute carrier organic anion transporter family member 1B3 (SLCO1B3)、solute carrier family 27 member 5 (SLC27A5) の発現を制御する上流因子として抽出され、その結果、40%酸素条件下では uptake of fatty acid に関連するシグナル伝達経路が抑制されていることが想定された (Fig. 11B)。

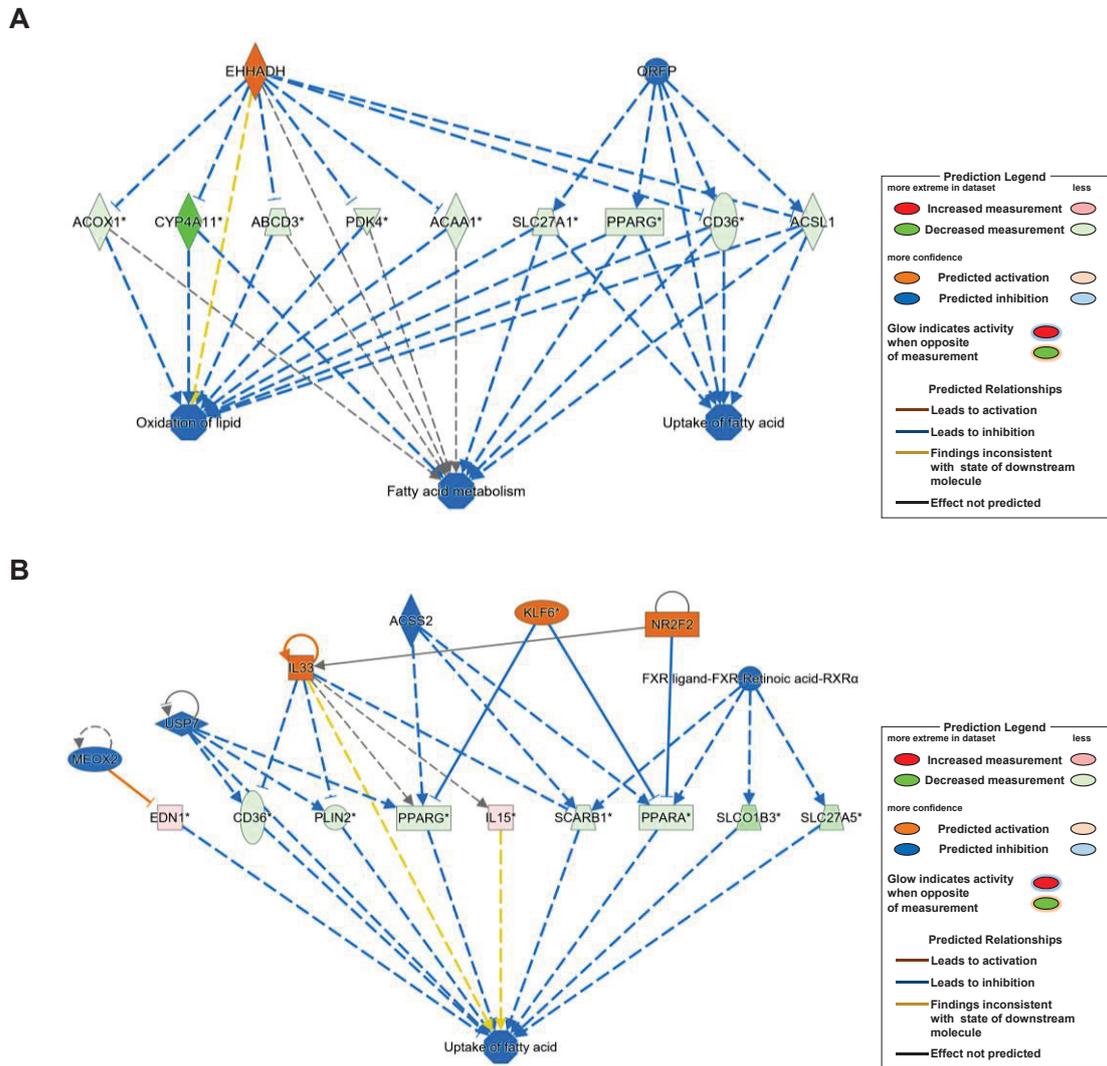


Figure 11. Estimation of upstream regulators and mechanistic networks for biological functions using IPA.

Using IPA-based diseases and bio functions analysis, differences in mRNA expression between hepatocytes cultured on day 0 and day 7 under each oxygen were assessed, these differences are displayed as nodes (genes) and edges (biological relationships). The edge connecting the gene and each function indicates the relationship predicted based on the directional information encoded by the gene expression (blue, inhibited; gray, unpredictable) and the Z-score. A) Estimation of mechanistic networks for lipid oxidation, fatty acid metabolism, and fatty acid uptake, B) Uptake of fatty acid. EHHADH; enoyl-CoA hydratase and 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase, QRFP; pyroglutamylated RFamide peptide, ACOX1; acyl-CoA oxidase 1, CYP4A11; cytochrome P450 4 subfamily A member 11, ABCD3; ATP

binding cassette subfamily D member 3, PDK4; pyruvate dehydrogenase kinase 4, ACAA1; acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1, SLC27A1; solute carrier family 27 member 1, PPARG; peroxisome proliferator-activated receptor gamma, CD36; cluster of differentiation 36, ACSL1; acyl-CoA synthetase long-chain family member 1, MEOX2; mesenchyme homeobox 2, USP7; ubiquitin-specific peptidase 7, IL33; interleukin-33, ACSS2; acyl-CoA synthetase short-chain family member 2, KLF6; krüppel-like factor 6, NR2F2; nuclear receptor subfamily 2 group F member 2, farnesoid X receptor (FXR) ligand-FXR- RXR α , EDN1; endothelin 1, PLIN2; perilipin 2, IL15; interleukin-15, SCARB11; scavenger receptor class B member 1, PPARA; peroxisome proliferator-activated receptor α , SLCO1B3; solute carrier organic anion transporter family member 1B3, SLC27A5; solute carrier family 27 member 5.

第5項 高酸素培養が脂質の取り込みにおよぼす影響

IPA の結果、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞において、uptake of fatty acid が抑制されていることが推察された (Fig. 11B)。そこで、キメラマウス肝細胞を 20%酸素条件あるいは 40%酸素条件下で 10 日間培養し、緑色蛍光を発する長鎖脂肪酸アナログである 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-hexadecanoic acid (BODIPY™ FL C₁₆) を用いて、高酸素培養が脂肪酸取り込みにおよぼす影響を評価した (Fig. 12)。

20%酸素条件あるいは 40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞において、播種後 7 日目より脂肪酸の取り込み活性が有意に増加した。また、播種後 7 日目において、20%酸素条件下と比較して 40%酸素条件下における脂肪酸の取り込み活性は有意に高かった (Fig. 12)。

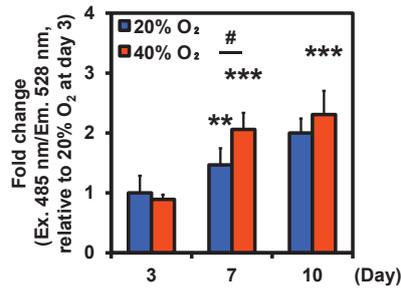


Figure 12. Fluctuations of BODIPY™ FL C₁₆ uptake activity in chimeric mouse hepatocytes cultured under 20% or 40% oxygen conditions.

Isolated hepatocytes from three chimeric mice were cultured in a 96-microwell plate under 20% or 40% oxygen conditions. The BODIPY™ FL C₁₆ uptake activities in hepatocytes were measured under each oxygen condition. Two-way ANOVA showed a statistical difference in different culture periods. No interaction effect was detected between oxygen conditions and culture periods. All results are expressed as mean ± S.D., (n = 3) ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 compared to hepatocytes on day 3 of culture under each oxygen condition, #*p* < 0.05 compared to 20% oxygen conditions on the same day.

第4節 高酸素培養したキメラマウス肝細胞における細胞応答経路の網羅的評価

第3節では、高酸素培養による *in vivo* 由来の脂質減少メカニズムとして、FAOの活性化が関与することを明らかとした (Fig. 8)。また、microarray、IPAの結果より、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞において脂質代謝が全体的にダウンレギュレートされていることも推察された (Fig. 9-12)。

本節では、各酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞の遺伝子発現プロファイルと単離直後の新鮮肝細胞の遺伝子発現プロファイルを比較し、高酸素培養がキメラマウス肝細胞の細胞応答経路におよぼす影響を網羅的に評価した。

第1項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞における細胞ストレスおよび細胞障害応答関連経路におよぼす影響

IPA より、細胞ストレスおよび細胞障害応答に関連する経路を抽出した。新鮮肝細胞と比較して、40%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞において、細胞ストレスおよび細胞障害応答に関連する high-mobility group protein 1 (HMGB1) signaling、nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)-mediated oxidative stress response、senescence pathway などが20%酸素条件下よりも活性化されていることが明らかとなった (Fig. 13)。また、有意ではないものの、新鮮肝細胞と比較して、20%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞において、hypoxia signaling in the cardiovascular system が活性化されていた (Fig. 13)。

40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞において、細胞ストレスおよび細胞障害応答関連経路が20%酸素条件下よりも活性化されており、高酸素培養が肝細胞にダメージを与えている可能性が示唆されたことから (Fig. 13)、細胞生存率の指標として細胞内 ATP 産生量を測定した。その結果、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞は20%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞と同程度に ATP 量が維持されていた (Fig. 14)。

Cellular Stress and Injury Response-related Canonical Pathways	Z Score of 40% O ₂	Z Score of 20% O ₂
HMGB1 Signaling	3.157	2.132
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	2.502	1.147
Senescence Pathway	3.597	2.832
HIF1 α Signaling	1.361	1.443
Hypoxia Signaling in the Cardiovascular System	0.302	2.333 ^a
Hepatic Fibrosis Signaling Pathway	1.222	1.213
Inflammasome pathway	1.890	N/A
UVA-Induced MAPK Signaling	1.606	1.069
UVC-Induced MAPK Signaling	1.807	0.905
Sumoylation Pathway	-1.279	-1.414

Figure 13. Summary of cellular stress and injury response-related canonical pathways.

Changes in mRNA gene clusters were compared between three batches of pooled isolated hepatocytes (day 0) from 2-4 chimeric mice and three batches of pooled cultured hepatocytes (day 7) from 2-4 chimeric mice under each oxygen condition. Each number represents the Z-score, a statistical measure of the degree of consistency between the direction of the predicted gene-pathway relationship and the observed gene expression alterations. A Z-score >2 or <-2 was considered significant, and orange (activated) shades indicated differences in the magnitude of values. ^anot significant compared to day 0. N/A; data not available. HMGB1; high-mobility group protein 1, NRF2; nuclear factor erythroid 2-related factor 2, HIF; hypoxia-inducible factor 1 α , UVA; ultraviolet A, UVC; ultraviolet C, MAPK; mitogen-activated protein kinase.

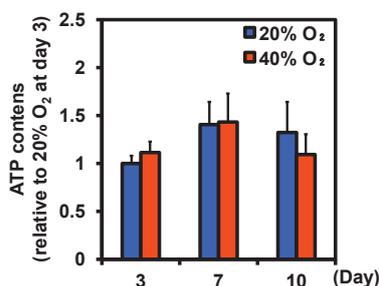


Figure 14. Fluctuations of ATP contents in chimeric mouse hepatocytes under each oxygen condition.

Isolated hepatocytes from three chimeric mice were cultured in a 96-microwell plate under 20% or 40% oxygen conditions. Two-way ANOVA showed no statistical

difference in oxygen conditions and different culture periods. No interaction effect was detected between oxygen conditions and culture periods. Results are expressed as mean \pm S.D., (n = 3).

第2項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞におけるアミノ酸代謝関連経路におよぼす影響

IPA より、脂質代謝以外のエネルギー代謝であるグルコース代謝に関連する経路を抽出した。新鮮肝細胞と比較して、40%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞において、アミノ酸代謝に関連する histidine degradation VI が 20%酸素条件下よりも抑制されていた (Fig. 15)。

Amino Acid Metabolism-related Canonical Pathways	Z Score of 40% O ₂	Z Score of 20% O ₂
Arginine Biosynthesis IV	-2.000	-2.236
Histidine Degradation VI	-2.111	-1.897
Arginine Degradation I (Arginase Pathway)	-1.000	N/A
Arginine Degradation VI (Arginase 2 Pathway)	-1.000	-1.000
Citrulline Biosynthesis	-0.707	-1.134
Cysteine Biosynthesis III (mammalia)	-0.333	-0.447
Folate Transformations I	0.447	N/A

Figure 15. Summary of amino acid metabolism-related canonical pathways.

Changes in mRNA gene clusters were compared between three batches of pooled isolated hepatocytes (day 0) from 2-4 chimeric mice and three batches of pooled cultured hepatocytes (day 7) from 2-4 chimeric mice under each oxygen condition. Each number represents the Z-score, a statistical measure of the degree of consistency between the direction of the predicted gene-pathway relationship and the observed gene expression alterations. A Z-score >2 or <-2 was considered significant, and blue (inhibited) shades indicated differences in the magnitude of values. N/A; data not available.

第3項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞におけるグルコース代謝関連経路におよぼす影響

IPA より、脂質代謝以外のエネルギー代謝であるグルコース代謝に関連する経路を抽出した。新鮮肝細胞と比較して、40%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞においてはグルコース代謝に関連した経路の変動は認められなかった。一方、グルコース代謝に関連する gluconeogenesis I が 20%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞において活性化されていた。また、有意ではないものの、20%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞において、glycolysis I が活性化されていた (Fig. 16)。

20%酸素条件で7日間培養したキメラマウス肝細胞においてグルコース代謝関連経路の活性化が観察されたが、40%酸素培養条件では有意な変化は認められなかった (Fig. 16)。このことから、キメラマウス肝細胞を高酸素培養することにより、解糖系へのエネルギーシフトが回避されていることが示唆された。そこで、解糖系の指標であるグルコース消費量および乳酸分泌量を評価した。20%酸素条件下と比較して、40%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞においてグルコース消費量と乳酸分泌量が有意に減少していた (Fig. 17)。

Glucose Metabolism-related Canonical Pathways	Z Score of 40% O ₂	Z Score of 20% O ₂
Gluconeogenesis I	0.707	2.111
Glycolysis I	0.000	1.732

Figure 16. Summary of glucose metabolism-related canonical pathways and diseases and bio functions.

Changes in mRNA gene clusters were compared between three batches of pooled isolated hepatocytes (day 0) from 2-4 chimeric mice and three batches of pooled cultured hepatocytes (day 7) from 2-4 chimeric mice under each oxygen condition. Each number represents the Z-score, a statistical measure of the degree of consistency between the direction of the predicted gene-pathway relationship and the observed gene expression alterations. A Z-score >2 or <-2 was considered significant, and orange (activated) shades indicated differences in the magnitude of values.

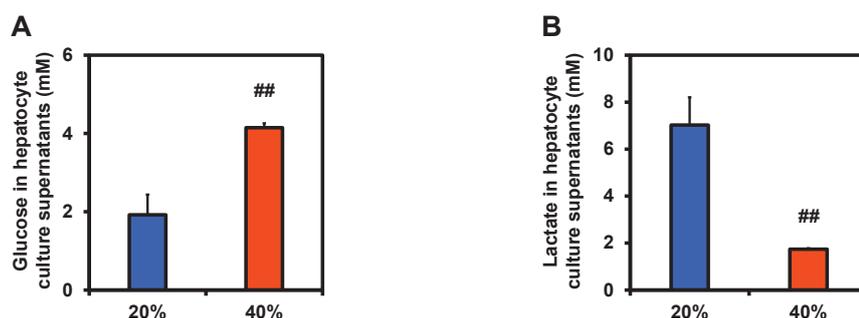


Figure 17. Glucose consumption and lactate secretion under each oxygen condition.

Isolated hepatocytes from three chimeric mice were cultured in a 96-microwell plate under 20% or 40% oxygen conditions for 7 days. A) Glucose consumption by hepatocytes cultured under each oxygen condition. B) Lactate secretion to culture medium under each oxygen condition. Statistical significance was analyzed using Student's t-test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. All results are expressed as mean \pm S.D., (n = 3) ^{##} $p < 0.01$ compared to 20% oxygen conditions.

第4項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞における細胞成長および増殖関連経路におよぼす影響

IPA より、細胞成長および増殖に関連する経路を抽出した。新鮮肝細胞と比較して、20%酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞においては細胞成長および増殖に関連した経路の変動は認められなかった。一方、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog (AKT) signaling、epidermal growth factor (EGF) receptor family (ErbB) signaling、ErbB2-ErbB3 signaling、ErbB4 signaling、oncostatin M signaling が 40%酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞において活性化されていた (Fig. 18)。

Cellular Growth, Proliferation-related Canonical Pathways	Z Score of 40% O ₂	Z Score of 20% O ₂
PI3K/AKT Signaling	2.828	1.460
ErbB Signaling	2.200	1.213
ErbB2-ErbB3 Signaling	2.183	1.508
ErbB4 Signaling	2.065	1.387
Oncostatin M Signaling	2.496	1.134
TGF- β Signaling	1.964	1.500
Thrombopoietin Signaling	1.225	0.728
CDK5 Signaling	1.706	-0.209
Angiopoietin Signaling	1.698	0.577
Renin-Angiotensin Signaling	1.732	0.688
PDGF Signaling	0.392	-0.471
HGF Signaling	0.962	0.447
IGF-1 Signaling	0.209	-0.277
STAT3 Pathway	0.324	0.180
PEDF Signaling	-0.200	-0.728
Erythropoietin Signaling	-0.152	-0.493
Growth Hormone Signaling	-1.460	-1.213

Figure 18. Summary of cellular growth, proliferation-related canonical pathways and diseases and bio functions.

Changes in mRNA gene clusters were compared between three batches of pooled isolated hepatocytes (day 0) from 2-4 chimeric mice and three batches of pooled cultured hepatocytes (day 7) from 2-4 chimeric mice under each oxygen condition. Each number represents the Z-score, a statistical measure of the degree of consistency between the direction of the predicted gene-pathway relationship and the observed gene expression alterations. A Z-score >2 or <-2 was considered significant, and orange (activated) shades indicated differences in the magnitude of values. PI3K; phosphoinositide 3-kinase, AKT; v-akt murine thymoma viral oncogene homolog, ErbB; epidermal growth factor (EGF) receptor family, ErbB2; EGF receptor family 2, ErbB3; EGF receptor family 3, ErbB4; EGF receptor family 4, TGF- β ; transforming growth factor β , CDK5; cyclin-dependent kinase 5, PDGF; platelet-derived growth factor, HGF; hepatocyte growth factor, IGF-1; insulin-like growth factor 1, STAT3; signal transducer and activator of transcription 3, PEDF; pigment epithelium-derived factor.

第5項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞におけるサイトカインシグナル関連経路におよぼす影響

IPA より、サイトカインシグナルに関連する経路を抽出した。新鮮肝細胞と比較して、20%酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞においては C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) signaling の活性化、interferon signaling の抑制が認められた。一方、新鮮肝細胞と比較して、40%酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞においては CXCR4 signaling、IL-3, 8 signaling、cholecystokinin/gastrin-mediated signaling が活性化していた (Fig. 19)。

Cytokine signaling-related Canonical Pathways	Z Score of 40% O ₂	Z Score of 20% O ₂
CXCR4 Signaling	3.000	2.043
IL-3 Signaling	2.132	1.069
IL-8 Signaling	2.064	1.715
Cholecystokinin/Gastrin-mediated Signaling	2.646	1.877
IL-9 Signaling	0.000	N/A
ILK Signaling	-0.289	-0.343
Chemokine Signaling	1.147	0.832
FLT3 Signaling in Hematopoietic Progenitor Cells	1.706	1.213
Interferon Signaling	-0.775	-2.496

Figure 19. Summary of cytokine signaling-related canonical pathways and diseases and bio functions.

Changes in mRNA gene clusters were compared between three batches of pooled isolated hepatocytes (day 0) from 2-4 chimeric mice and three batches of pooled cultured hepatocytes (day 7) from 2-4 chimeric mice under each oxygen condition. A) IPA-based Canonical Pathways. B) IPA-based diseases and bio functions. Each number represents the Z-score, a statistical measure of the degree of consistency between the direction of the predicted gene-pathway relationship and the observed gene expression alterations. A Z-score >2 or <-2 was considered significant, and orange (activated) and blue (inhibited) shades indicated differences in the magnitude of values, respectively. N/A; data not available. CXCR4; C-X-C chemokine receptor type 4, IL 3; interleukin-3, IL 8; interleukin-8, IL 9; interleukin-9, ILK; integrin-linked kinase, FLT3; fms like tyrosine kinase 3.

第6項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞における細胞死および生存関連経路におよぼす影響

IPA より、細胞死および細胞生存に関連する経路を抽出した。新鮮肝細胞と比較して、20%酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞においては細胞死および生存に関連した経路の変動は認められなかった。一方、lipopolysaccharide (LPS)-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling、telomerase signaling が 40%酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞において活性化されていた (Fig. 20)。

Cell Death and Survival-related Canonical Pathways	Z Score of 40% O ₂	Z Score of 20% O ₂
LPS-stimulated MAPK Signaling	2.985	2.138 ^a
Telomerase Signaling	2.041	1.789
JAK/Stat Signaling	1.400	-0.258
Apoptosis Signaling	-1.095	-0.894
April Mediated Signaling	0.632	-0.333
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	-0.898	-1.706
PTEN Signaling	-0.686	-0.626

Figure 20. Summary of cell death and survival-related canonical pathways and diseases and bio functions.

Changes in mRNA gene clusters were compared between three batches of pooled isolated hepatocytes (day 0) from 2-4 chimeric mice and three batches of pooled cultured hepatocytes (day 7) from 2-4 chimeric mice under each oxygen condition. Each number represents the Z-score, a statistical measure of the degree of consistency between the direction of the predicted gene-pathway relationship and the observed gene expression alterations. A Z-score >2 or <-2 was considered significant, and orange (activated) shades indicated differences in the magnitude of values. ^anot significant compared to day 0. N/A; data not available. LPS; lipopolysaccharide, MAPK; mitogen-activated protein kinase, JAK; Janus kinase, STAT; signal transduction and activator of transcription, PTEN; phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10.

第7項 高酸素培養がキメラマウス肝細胞における細胞機能および維持関連経路におよぼす影響

IPA より、細胞機能および維持に関連する経路を抽出した。新鮮肝細胞と比較して、20%酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞においては signaling by Rho family GTPases、CXCR4 signaling の活性化が認められた。一方、新鮮肝細胞と比較して、40%酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞においては、signaling by Rho family GTPases、CXCR4 signaling に加えて、Rac signaling、LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR function、integrin signaling、p21-activated kinase (PAK) signaling、G beta gamma signaling が活性化していた (Fig. 21)。

実際に肝機能の指標として human albumin (hAlb) 分泌量を測定したところ、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞において、播種後 7 日目より hAlb 分泌量が有意に増加した。また、播種後 3 日目において、20%酸素条件下と比較して、40%酸素条件下における hAlb 分泌量は有意に高かった (Fig. 22)。

Cellular Function and Maintenance-related Canonical Pathways	Z Score of 40% O ₂	Z Score of 20% O ₂
Signaling by Rho Family GTPases	3.742	2.846
Rac Signaling	3.651	2.183 ^a
CXCR4 Signaling	3.000	2.043
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	2.921	1.706
Integrin Signaling	2.889	1.265
PAK Signaling	2.858	1.941
G Beta Gamma Signaling	2.121	1.000
Epithelial Adherens Junction Signaling	N/A	N/A
Remodeling of Epithelial Adherens Junctions	1.633	1.000
NAD biosynthesis II (from tryptophan)	-1.633	-0.447
Sirtuin Signaling Pathway	0.263	0.000

Figure 21. Summary of cellular function and maintenance-related canonical pathways and diseases and bio functions.

Changes in mRNA gene clusters were compared between three batches of pooled isolated hepatocytes (day 0) from 2-4 chimeric mice and three batches of pooled cultured hepatocytes (day 7) from 2-4 chimeric mice under each oxygen condition. A) IPA-based Canonical Pathways. B) IPA-based diseases and bio functions. Each number represents the Z-score, a statistical measure of the degree of consistency between the direction of the predicted gene-pathway relationship and the observed gene expression alterations. A Z-score >2 or <-2 was considered significant, and orange (activated) shades indicated differences in the magnitude of values. N/A; data not available. GTP; guanosine triphosphate, Rac; rat sarcoma (ras)-related C3 botulinum toxin substrate, CXCR4; C-X-C chemokine receptor type 4, LPS; lipopolysaccharide, IL 1; interleukin-1, RXR; retinoid X receptor, PAK; p21-activated kinase, NAD; nicotinamide adenine dinucleotide.

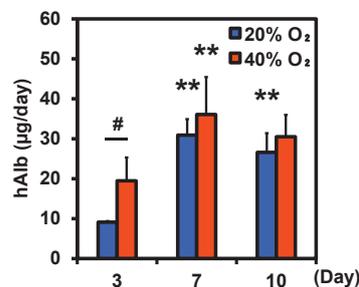


Figure 22. Fluctuations of hAlb secretion in chimeric mouse hepatocytes under each oxygen condition.

Isolated hepatocytes from three chimeric mice were cultured in a 96-microwell plate under 20% or 40% oxygen conditions. Two-way ANOVA showed a statistical difference in oxygen conditions and different culture periods. No interaction effect was detected between oxygen conditions and culture periods. Results are expressed as mean \pm S.D., (n = 3) ** $p < 0.01$ compared to day 3 of culture under each oxygen condition, # $p < 0.05$ compared to 20% oxygen conditions on the same day.

第5節 高酸素培養条件下の肝細胞近傍の酸素濃度変化

第4節では、高酸素培養がキメラマウス肝細胞の細胞応答経路に与える影響を網羅的に評価した (Fig. 13-22)。IPAの結果より、高酸素培養されたキメラマウス肝細胞において細胞ストレスおよび細胞障害応答関連経路が活性化していたことから、高酸素培養はキメラマウス肝細胞にダメージを与えている可能性が考えられた (Fig. 13)。しかしながら、20%酸素条件と比較して40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞におけるATP量は維持されていたこと (Fig. 14)、細胞成長や増殖、細胞機能や維持関連経路が40%酸素条件で活性化されていたこと (Fig. 18, 21)、肝機能の指標としてのhAlb分泌量が40%酸素条件で高かったこと (Fig. 22)、40%酸素条件では解糖系へのエネルギーシフトが回避されていたことを鑑みると (Fig. 16, 17)、40%酸素条件は肝細胞にダメージを与える条件ではなく、むしろ生体肝臓に近い環境を反映していることが推察された。そこで各酸素条件下における培養上清中溶存酸素濃度を評価することとした。

肝細胞培養上清中の溶存酸素濃度を測定した結果、培養上清中溶存酸素濃度は20%酸素条件では検出限界以下 (約0%) であるのに対して、40%酸素条件では約13%であった (Fig. 23)。

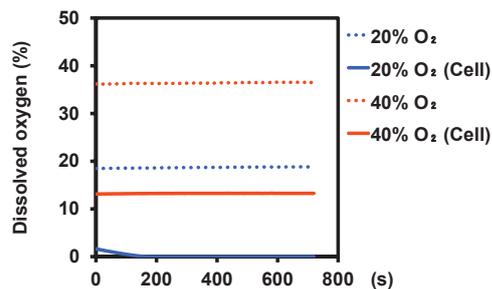


Figure 23. Dissolved oxygen concentrations in the culture supernatants under each oxygen culture condition.

Dissolved oxygen concentrations in the hepatocyte culture supernatants were measured for 720 s using a FireSting oxygen monitor at a position 1 mm above the hepatocytes cultured for 3 days under 20% or 40% oxygen conditions in a 96-microwell plate. The data were acquired after the values had stabilized. Dotted lines indicate the concentrations in the culture medium without cells, and the solid lines indicate the concentrations in the culture supernatants containing hepatocytes.

第6節 小括

ヒト肝キメラマウスは高度な脂肪肝を発症しており (Tateno *et al.*, 2011)、ヒト肝キメラマウスより単離した新鮮肝細胞においても *in vivo* の病態を反映して、脂質の蓄積が認められる (Ikeyama *et al.*, 2020)。本実験においても単離直後のキメラマウス肝細胞には *in vivo* 由来の脂質が認められた (Fig. 3, d0; Fig. 4A, d0)。Oil Red O 染色および Cholestest® TG を用いた肝細胞の脂質および肝細胞中 TG の定量により、40%酸素条件では播種後 7 日目より脂質および肝細胞中 TG が減少しており、20%酸素条件と比較して、播種後 7、10 日目において脂質および TG レベルが低いことが明らかになった (Fig. 4B, 5A)。また、播種後 7 日目より、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞の FAO 活性は増加しており、播種後 7 日目における FAO 活性は、20%酸素条件下と比較して有意に高かった (Fig. 8)。これらの結果は、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞における FAO 活性の上昇が肝細胞に蓄積された脂質の減少につながったことを示唆している。1%酸素条件下での HIF 活性化による FAO 活性の低下は、肝細胞の TG 量の増加を誘導することが報告されている (Liu *et al.*, 2014)。Microarray および IPA の結果より、20%酸素条件で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞では低酸素に関連する canonical pathway である hypoxia signaling in the cardiovascular system が活性化する傾向にあったが、40%酸素条件 7 日間で培養した肝細胞では変化が認められなかった (Fig. 13)。これらの結果より、酸素要求量の高い肝細胞にとって通常培養条件である 20%酸素条件は嫌气的条件であり、HIF を介して脂質代謝能が低下する条件であることが示唆された。実際、キメラマウス肝細胞培養上清中の溶存酸素濃度を連続的にモニタリングしたところ、20%酸素条件では検出限界以下 (約 0%) であるのに対し、40%酸素条件では約 13%であった (Fig. 23)。門脈周辺の血中酸素濃度は 10-12%、中心静脈周辺の血中酸素濃度は 3-5%であることが知られている (Godoy *et al.*, 2013; Lee-Montiel *et al.*, 2017)。また、肝臓には肝機能のゾネーションが存在し、門脈周辺において FAO が盛んに行われることが報告されている (Kietzmann, 2017)。40%酸素条件という培養環境は生体肝臓の門脈周辺環境に近く、肝臓の生理機能のゾネーションを反映して FAO 活性が増大したと考えられる。一方、20%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞においても、播種後 10 日目に肝細胞中 TG の減少および FAO 活性の増大が認められることから (Fig. 5A, 8)、20%酸素条件下でも脂質の分解はある程度起こっていることが想定される。さらに、培養液中に存在する遊離脂肪酸は限られていることから、脂質の取り込みも減少することで、キメラマウス肝細胞に蓄積された脂質が徐々に減少した結果であると考えられる。

IPA を用いた解析の結果、20%酸素条件下と比較して、40%酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞では脂質代謝関連の canonical pathway がより抑制されて

いたことから (Fig. 9)、肝細胞に蓄積した脂質の減少に FAO 活性化以外のメカニズムも関与している可能性が考えられた。キメラマウス肝細胞培養上清中の TG 濃度を測定したところ、20%酸素条件下と比較して 40%酸素条件下で増加傾向が認められたことから (Fig. 5B)、培養培地からの脂肪酸の取り込みの抑制、あるいは培養液への脂質の排泄の促進が関与している可能性が考えられた。CD36 は脂肪酸の取り込みに関与するスカベンジャー受容体である (Pepino *et al.*, 2014)。IPA の結果より、CD36 の発現が 40%酸素条件下で低下していることが明らかになった (Fig. 11)。HIF2 α を介して CD36 の発現と機能が増大することにより、細胞内脂質量が増加することが報告されている (Rey *et al.*, 2020)。40%酸素条件下での脂質の減少には、好氣的条件下でこれらの経路が抑制されることも関与している可能性が考えられたことから、緑色蛍光を発する長鎖脂肪酸アナログである BODIPYTM FL C₁₆ を用いて、各酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞における脂肪酸取り込み活性を評価した。予想に反して、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞における脂肪酸取り込み活性は増大した (Fig. 12)。脂肪酸は、総炭素原子数が 1-6 の short-chain fatty acids (SCFA)、7-12 の medium-chain fatty acids (MCFA)、13-21 の long-chain fatty acids (LCFA)、22 以上の very long-chain fatty acids (VLCFA) に分けられる (Erdbrügger and Fröhlich, 2020; Secor *et al.*, 2021)。CD36 は長鎖脂肪酸の取り込みに関与するスカベンジャー受容体であり (Pepino *et al.*, 2014)、今回使用した BODIPYTM FL C₁₆ は LCFA に分類されることから、CD36 の取り込みに関して一定の評価が行えていると考えられる。Fatty acid transporter protein (FATP) も LCFA の取り込みに関与していることが知られており (Dutta-Roy, 2000)、FATP も今回の BODIPYTM FL C₁₆ の取り込みに関与していると考えられる。今後、飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、SCFA、MCFA や VLCFA も含めて様々な脂肪酸を用いた取り込み活性の評価を行い、CD36 の関与を精査していく必要がある。また、キメラマウス肝細胞を高酸素培養することにより、FAO 活性の亢進を介して肝細胞内脂質が減少することが示唆されたが (Fig. 4, 5, 8)、予想に反して、oxidation of lipid、fatty acid metabolism が抑制されるという IPA 結果が得られた (Fig. 11A)。高酸素培養により蓄積された脂質が減少する真のメカニズムを解明するために、oxidation of lipid、fatty acid metabolism など、その他の脂質関連経路で発現変動する遺伝子も含めて、フィードバック制御を考慮した 7 日より早期の mRNA、タンパク質、活性レベルの評価も今後必要である。

一方、細胞ストレスおよび細胞障害応答に関与するいくつかの canonical pathway は、20%酸素条件下と比較して、40%酸素条件下で活性化していた (Fig. 13)。また、20%酸素条件下で培養されたキメラマウス肝細胞は 3 日に 1 回の培地交換で培養できたが、40%酸素条件下の肝細胞は剥離しやすく、2 日に 1 回の培地交換を必要とした (data not shown)。高酸素培養が肝細胞にダメージを与えている可能性が考えられたため、細

胞生存率の指標として細胞内 ATP 量を測定したところ、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞の細胞内 ATP 量は、20%酸素条件下で培養したものと同程度であった (Fig. 14)。また、40%酸素条件下での hAlb の分泌量は 20%酸素条件下での分泌量よりも高かった (Fig. 22)。中心静脈と比較して、門脈周辺で Alb の分泌が高いことが知られており (Lee-Montiel *et al.*, 2017)、40%酸素条件が門脈周辺付近の培養環境に近いという先程の仮説がさらに支持される結果が得られた。さらに、IPA の結果より、20%酸素条件と比較して、cellular growth, proliferation や cytokine signaling、cellular function and maintenance に関連したいくつかの canonical pathway が 40%酸素条件下で 7 日間培養した肝細胞において活性化されていた (Fig. 18, 19, 21)。これらの結果も、培地交換の影響も考慮する必要があるが、40%酸素培養が生体内の肝臓環境を反映しているという仮説を支持するものであり、40%酸素条件はキメラマウス肝細胞が障害されるほどの高酸素濃度ではないと考えられる。Nrf2 は酸化ストレス応答のマスターレギュレーターであるが (Sun *et al.*, 2018)、キメラマウス肝細胞を高酸素培養することにより NRF2-mediated oxidative stress response 経路が活性化されていた (Fig. 13)。このことから、ある程度の細胞内ストレスは生じている可能性があり、ミトコンドリア形態や数などへの影響なども今後評価し、酸素濃度とストレスとの関連について精査していく必要がある。

通常の生理的条件下では、肝細胞の ATP のほぼ全量がミトコンドリアにおいて行われる好気性呼吸により産生される。しかし、初代肝細胞は、培養液中のグルコース濃度が豊富であることに加えて酸素供給量が限られているため、通常の 20%酸素培養条件下では解糖系により ATP の大部分が産生されることが知られている (Liu *et al.*, 2014)。また、ラット初代肝細胞において、培養液中の糖資源をグルコースからガラクトースに置換して高酸素培養を行うことで、このような解糖系へのエネルギーシフトを回避することも報告している (Liu *et al.*, 2014)。IPA による解析では、20%酸素条件下で 7 日間培養したキメラマウス肝細胞においてはグルコース代謝関連の canonical pathway の活性化が観察されたが、40%酸素培養では有意な変化は認められなかった (Fig. 16)。このことから、解糖系へのエネルギーシフトが回避され、高酸素培養が生体肝臓環境を反映していることが示唆された。実際、グルコース消費量と乳酸分泌量を評価したところ、20%酸素条件下と比較して、40%酸素条件下で有意に減少していた (Fig. 17)。これらの結果を鑑みると、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞において、解糖系からミトコンドリア酸化的リン酸化へのエネルギーシフトが起こった可能性がある。酸化的リン酸化へのエネルギーシフトが生じた場合、解糖系において産生されるよりも多くの ATP が産生されるが (Epstein *et al.*, 2017)、40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞の細胞内 ATP 量は、20%酸素条件下で培養したものと同程度であった (Fig. 14)。40%酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞における FAO 活性の増大や hAlb

分泌量の増加、**cellular growth, proliferation** や **cellular function and maintenance** に関連したいくつかの **canonical pathway** の活性化を鑑みると (Fig. 8, 18, 21, 22)、肝細胞の機能が賦活化した結果、産生される ATP がすぐに消費されてしまい、見かけ上 20% 酸素条件下において産生される ATP 量と同程度となっている可能性がある。今後、キメラマウス肝細胞における酸素消費速度を測定し、ミトコンドリア酸化的リン酸化へのエネルギーシフトが生じているかを精査する必要がある。

また、20%酸素条件と比較して、40%酸素条件下で7日間培養したキメラマウス肝細胞において **amino acid metabolism** に関連する **canonical pathway** がより抑制されていた。門脈周辺領域では尿素合成が、中心静脈周辺領域ではグルタミン合成が優先的に行われることが知られており (Kietzmann, 2017)、アミノ酸代謝が生体肝臓のゾネーションを反映しているかは今後精査が必要である。

本章では、高酸素培養系はキメラマウス肝細胞にとって生体肝臓環境、特に門脈周辺領域に近い環境を形成できる系であり、キメラマウス肝細胞を高酸素培養することにより、FAO 活性の亢進を介して肝細胞に蓄積した *in vivo* 由来の脂質が減少することを明らかとした。

第3章 高酸素培養により *in vivo* 由来の脂質を減少させたキメラマウス肝細胞を用いた薬剤誘発性脂肪肝の予測評価

第1節 緒言

第2章では、高酸素培養がキメラマウス肝細胞に蓄積した脂質におよぼす影響とその調節機構の検討、さらにキメラマウス肝細胞に与える影響を網羅的に評価した (Fig. 9-23)。40%酸素条件で培養したキメラマウス肝細胞においては FAO 活性が亢進しており、それにより *in vivo* 由来の脂質が減少していることが示唆された (Fig. 4, 5, 8)。また、40%酸素条件はキメラマウス肝細胞にとってより生体肝臓に近い環境となっていることが推察された (Fig. 14, 16, 17, 18, 21, 22, 23)。

キメラマウス肝細胞を高酸素培養することで *in vivo* 由来の脂質を減少させることに成功したことから、このキメラマウス肝細胞を用いて薬剤誘発性脂肪肝の予測評価が行えるかを検討することとした。ハンドリングのしやすさ、実験系の簡便さなども考慮して、40%酸素条件で10日間培養することにより蓄積された脂質を減少させた肝細胞を20%酸素条件へと移行させて培養を行い、検証化合物を曝露することにより薬剤誘発性脂肪肝の予測評価を行った (Fig. 24)。

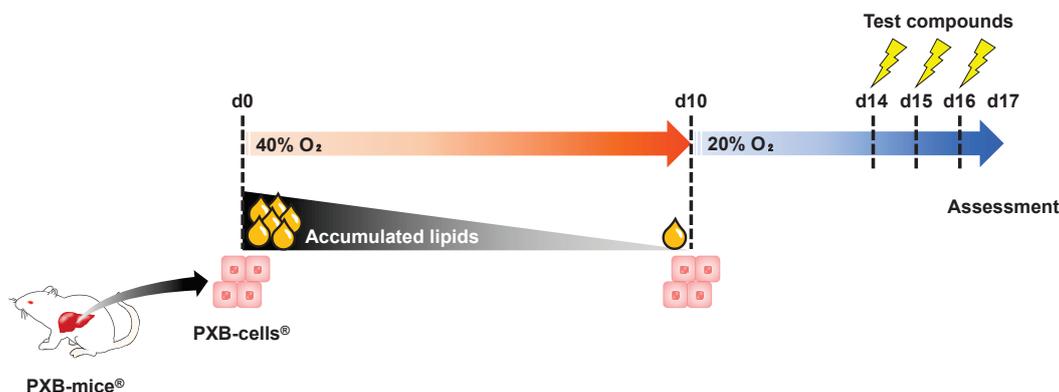


Figure 24. Study design in the chapter.

The usefulness of lipid-reduced chimeric mouse hepatocytes in the predictive evaluation of drug-induced fatty liver was investigated.

第2節 検証化合物を用いた薬剤誘発性脂肪肝の予測評価

ヒト肝キメラマウスより単離した肝細胞を 40%酸素条件下で 10 日間培養することにより *in vivo* 由来の脂質を減少させた。その後、20%酸素条件へと移行させて培養を行い、検証化合物を曝露することにより薬剤誘発性脂肪肝の予測評価を行った。Liver X receptor (LXR) の活性化は肥満および脂肪症の発症を促進する (Cave *et al.*, 2016)。Fig. 9 において、LXR の活性化に関わる経路が抑制、つまり LXR が不活化されていることも *in vivo* 由来の脂質の減少に寄与していることが示唆された。そこで、LXR アゴニストであり、脂質生成を活性化することで脂肪肝を誘発することが報告されている T0901317 を用いて (Schultz *et al.*, 2000)、肝細胞に脂質の蓄積が誘導されるかを評価した。Oleic acid および palmitic acid は、最も豊富な血漿中脂肪酸であり、総血漿中非必須脂肪酸のそれぞれ 31%と 27%を占めることが報告されている (Staiger *et al.*, 2004)。Oleic acid : palmitic acid = 1:1 とすることにより、遊離脂肪酸のヒト血漿濃度を模倣した状態で脂肪肝を *in vitro* において評価できる報告があることから (Kozyra *et al.*, 2018)、すべての群において、oleic acid : palmitic acid = 1:1 となるように調整した脂肪酸混合物を添加して評価を行った

キメラマウス肝細胞を 20%酸素条件へと移行させてから 4 日間培養した後、T0901317 を 3 日間曝露し、Oil Red O 染色および Cholestest TG®を用いた細胞内 TG 量の測定を行った。T0901317 を 3 日間曝露することにより、濃度依存的な脂肪滴の蓄積が観察された (Fig. 25)。また、T0901317 濃度依存的な TG の蓄積も認められた (Fig. 26)。

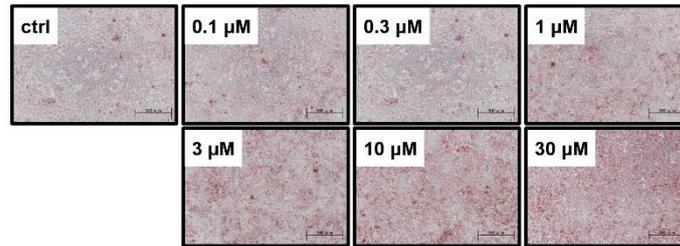


Figure 25. Effect of T0901317 on lipid accumulation in chimeric mouse hepatocytes.

Chimeric mouse hepatocytes were cultured in a 96-microwell plate under 20% oxygen conditions. T0901317 (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μM) was exposed to chimeric mice hepatocytes for 3 days. Representative Oil Red O stained images of chimeric mouse hepatocytes cultured under 20% oxygen conditions ($\times 20$ magnification).

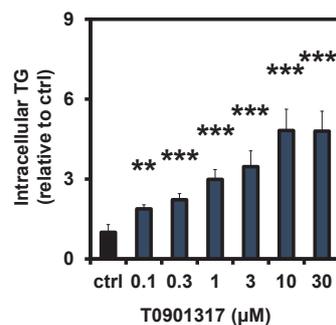


Figure 26. Effects of T0901317 on lipid accumulation in chimeric mouse hepatocytes.

Chimeric mouse hepatocytes were cultured in a 96-microwell plate under 20% oxygen conditions. T0901317 (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μM) was exposed to chimeric mice hepatocytes for 3 days. Statistical significance was analyzed using Tukey test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Results are expressed as mean \pm S.D., ($n = 3$) ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to ctrl.

第3節 小括

T0901317 は LXR アゴニストであり、LXR を介して sterol regulatory element-binding proteins 1 の転写を直接活性化し、下流の acetyl CoA carboxylase、fatty acid synthase、stearoyl CoA desaturase-1 などの脂質生成遺伝子発現を上昇させ、脂肪肝を誘導する (Schultz *et al.*, 2000)。高酸素培養することにより脂質を減少させたキメラマウス肝細胞に T0901317 を曝露したところ、T0901317 濃度依存的な脂肪滴および TG の蓄積が認められた (Fig. 25, 26)。これらの結果から、高酸素培養により蓄積された脂質を減少させたキメラマウス肝細胞は脂肪肝毒性を定性的・定量的に評価できる可能性が示唆された。

40%酸素条件での培養は、特殊なマルチガスインキュベーターや酸素濃度上昇のために可燃性ガスである酸素ポンペを設置する必要があるなど、現段階では他施設でのハンドリングや培養系の再現が容易ではないなどの課題が存在する。キメラマウス肝細胞を40%酸素条件で10日間培養することにより蓄積された脂質を減少させた肝細胞を再播種した後、20%酸素条件へと移行させて4日間培養を行ったところ(脂肪酸および化合物曝露前の段階)、20%酸素条件へと移行させても脂質は減少した状態が維持されていた (data not shown)。蓄積された脂質を減少させた状態が肝細胞凍結保存・融解を行っても維持される場合、細胞の継代や凍結保存により他施設での使用などが容易になることが想定される。また、培養容器底面の素材を変更することにより酸素透過性を向上させることのできる培養プレートも開発されており、通常培養条件でも今回の40%酸素条件と同程度の培養酸素環境を形成することも期待され、より簡便な DILI、薬剤誘発性脂肪肝の *in vitro* 予測評価系を構築できる可能性がある。

現在、脂肪肝の予測評価モデルには、HepG2、HepaRG、凍結保存した初代ヒト肝細胞が利用されている (Donato *et al.*, 2012; Kozyra *et al.*, 2018; Tolosa *et al.*, 2016)。しかしながら、HepG2 における薬物代謝酵素の発現量は極めて低いこと (Donato *et al.*, 2008)、HepaRG においても一部の代謝酵素の活性が低いことが報告されている (Kanebratt and Andersson, 2008)。初代ヒト肝細胞は DILI 評価のゴールドスタンダードとみなされているが (Sison-Young *et al.*, 2017)、従来の平面培養では、初代ヒト肝細胞は播種後数時間で急速に脱分化し、Albumin 産生や薬物代謝酵素活性などの多くの肝機能が喪失すること (den Braver-Sewradj *et al.*, 2016)、毒性発現メカニズムに代謝的活性化が関与している場合、その予測精度が著しく低下することが報告されている (Bell *et al.*, 2018)。また、ヒト凍結保存肝細胞については、凍結保存過程がミトコンドリアを損傷し、ミトコンドリア機能を抑制することも報告されており (Stéphenne *et al.*, 2007)、HepG2、HepaRG、ヒト凍結保存肝細胞による DILI の予測評価には克服す

べき課題が多数ある。PXB-cells[®]は、PXB-mice[®]から単離される新鮮肝細胞であり、様々なヒト型の薬物代謝酵素やトランスポーターを発現していることから (Katoh *et al.*, 2005; Nishimura *et al.*, 2005)、上記の課題を克服した DILI 評価系となることが期待される。高酸素培養により脂質を減少させたキメラマウス肝細胞も DILI、特に薬剤誘発性脂肪肝の予測評価に使用できる可能性があり、その有用性については、今後検証化合物数を増やすことを含めてさらなる研究が必要である。

本章では、LXR アゴニストである T0901317 を用いて、高酸素培養することにより *in vivo* 由来の脂質を減少させたキメラマウス肝細胞は薬剤誘発性脂肪肝を定性的・定量的に予測評価できる系であることが示唆された。

第4章 総括

DILI は医薬品の開発中止や市場撤退の要因となる主要な副作用である (Hornberg *et al.*, 2014)。薬剤誘発性脂肪肝は DILI の 1 種であり、DILI 症例の約 30%が脂肪肝を発症していることが報告されており (Kleiner *et al.*, 2014; Miele *et al.*, 2017)、DILI や薬剤誘発性脂肪肝を事前に予測することは重要である。しかしながら、実験動物とヒトにおける種差が原因となり、DILI を前臨床段階において正確に予測することは困難である (Albrecht *et al.*, 2019)。そこで本研究では、肝臓がヒト化されたヒト肝キメラマウスである PXB-mice[®]およびその単離肝細胞である PXB-cells[®]に着目した。しかしながら、PXB-mice[®]および PXB-cells[®]には脂質の蓄積が認められ (Tateno *et al.*, 2011; Ikeyama *et al.*, 2020)、この脂質が DILI、特に薬剤誘発性脂肪肝の定性的・定量的な予測性を低下させることが懸念された。近年、一般的な培養酸素条件である 20%酸素条件では酸素消費速度の速いラット肝細胞の酸素要求性を満たせていないこと (Sakai *et al.*, 2012)、1%酸素条件下で培養された HepG2 においては脂質代謝能が低下することが報告された (Liu *et al.*, 2014)。20%酸素条件は酸素要求性の高い肝細胞にとって嫌気的環境であり、嫌気的環境下での培養が肝細胞における脂質代謝能を低下させていることが推察された。これらの背景から、高酸素条件下でキメラマウス肝細胞を培養することにより蓄積した脂質が減少する可能性を考えた。そこで本研究では、高酸素培養が肝細胞に蓄積した脂質におよぼす影響とその調節機構、薬剤誘発性脂肪肝評価系としての高酸素培養系の有用性を検討した。

第 2 章では、高酸素培養系がキメラマウス肝細胞におよぼす影響を網羅的に評価した。キメラマウス肝細胞を高酸素培養することにより、FAO 活性の亢進を介して *in vivo* 由来の脂質が減少することを明らかとした。これは、酸素要求性の高い肝細胞にとって、通常培養条件が嫌気的環境であり、それにより脂質代謝能が低下していることが原因と考えられる。また、通常培養条件と比較して、高酸素培養系は生体肝臓環境、特に門脈周辺領域に近い環境を形成できる系であることが示唆された。通常培養条件で培養された腎上皮細胞において、酸素供給/酸素要求の割合が約 0.5~0.7 であり、細胞近傍の酸素分圧が 0 mmHg であることが報告されており (Metzen *et al.*, 1995)、肝細胞以外にも、細胞種によっては通常培養条件環境は嫌気的環境である可能性がある。細胞種ごとに固有の酸素消費速度と培養環境における酸素濃度とのバランスを考慮し、研究用途にあわせてこれまでの通常培養系と使いわけをしていく必要がある。

第 3 章では、LXR アゴニストである T0901317 を用いて、高酸素培養することにより *in vivo* 由来の脂質を減少させたキメラマウス肝細胞は薬剤誘発性脂肪肝を定性的・定量的に予測評価できる系であることを明らかとした。今後、検証化合物を増やして、

DILI や薬剤誘発性脂肪肝を精度よく予測評価できるハイスループット系であることを実証していきたい。

本研究で検討を重ねた、*in vivo* 由来の脂質の減少を目的としたキメラマウス肝細胞高酸素培養系は、現在脂肪肝の予測評価モデルとして用いられる HepG2、HepaRG、凍結保存した初代ヒト肝細胞に存在する懸念点を克服できる系として有用であることが期待される。しかしながら、ハンドリングが容易ではない点などの課題も存在しており、今後改善していく必要がある。また、*in vivo* においては hGH の投与により PXB-mice[®]の脂肪肝は改善され、PXB-cells[®]の *in vitro* 3次元培養においては hGH の曝露により脂質代謝関連遺伝子の変動が認められることが報告されている (Tateno *et al.*, 2011)。しかしながら、*in vitro* 平面培養においては hGH の曝露による蓄積された脂質の改善は認められておらず (data not shown)、このような PXB-cells[®]における GH への応答性の差や培養酸素条件により培地交換頻度の差が生じる原因も今後検討していく必要がある。

本研究をまとめると、今後さらなる改良は必要であるが、高酸素培養により脂質を減少させたキメラマウス肝細胞も DILI や薬剤誘発性脂肪肝の評価に使用できる可能性があり、安全性の高い医薬品の創出に貢献できることが期待される。また、脂肪肝患者由来の肝細胞において、高酸素培養による脂質の低下が確認されれば、本研究で示唆されたメカニズムに着目した脂肪肝の新規治療法の開発につながる可能性がある。

実験の部

I. 試薬

I-1. キメラマウス肝細胞の単離および培養

Human hepatocyte: BioIVT LLC

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM): Sigma-Aldrich Co. LLC

Fetal bovine serum (FBS): Biological industries Ltd

Corning® BioCoat® Collagen I 24-well Black/Clear Flat Bottom TC-treated microplates: Corning Inc.

Corning® BioCoat® Collagen I 96-well Black/Clear Flat Bottom TC-treated microplates: Corning Inc.

Trypan blue: NACALAI TESQUE, INC.

Dimethyl sulfoxide (DMSO): Sigma-Aldrich Co. LLC

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES): Thermo Fisher Scientific Inc.

NaHCO₃: FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.

L-proline: MP biomedical, LLC

Insulin: Sigma-Aldrich Co. LLC

Dexamethasone: Sigma-Aldrich Co. LLC

Epidermal growth factor: Sigma-Aldrich Co. LLC

L-ascorbic acid 2-phosphate: FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.

Penicillin-Streptomycin Solution (×100): FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.

I-2. Oil Red O 染色および抽出

Phosphate-buffered saline (PBS): TAKARA BIO INC.または NACALAI TESQUE, INC.

10% Formalin Neutral Buffer Solution: FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.

Formaldehyde: KANTO CHEMICAL CO., INC

Isopropanol: FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.

Oil Red O solution: Muto Kagaku Co., Ltd.

I-3. TG の測定

Cholestest® TG: Sekisui Medical Co., Ltd.

I-4. FAO 活性の測定

DMEM: Sigma-Aldrich Co. LLC

FAOBlue: Funakoshi Co., Ltd.

PBS: TAKARA BIO INC.

DMSO: Sigma-Aldrich Co. LLC

I-5. BODIPYTM FL C₁₆ 取り込み活性の測定

BODIPYTM FL C₁₆: Thermo Fisher Scientific Inc.

DMEM: Sigma-Aldrich Co. LLC

DMSO: FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.

PBS: TAKARA BIO INC.

I-6. Microarray

Direct-zolTM RNA MicroPrep: Zymo Research Corp.

Agilent RNA 6000 Nano Kit: Agilent Technologies, Inc.

Agilent Human Sure Print G3 Human GE V3 8 × 60 K mRNA microarray chip:

Agilent Technologies, Inc.

I-7. 細胞生存率の測定

CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability assay: Promega Corp.

I-8. 肝細胞培養上清中グルコース濃度の測定

Glucose Assay Kit-WST: DOJINDO LABORATORIES

PBS: TAKARA BIO INC.

I-9. 肝細胞培養上清中乳酸濃度の測定

Lactate Assay Kit-WST: DOJINDO LABORATORIES

I-10. hAlb 濃度の測定

LZ Test 'Eiken' U-ALB: Eiken Chemical Co., Ltd.

I-11. 脂質毒性試験

DMEM: Sigma-Aldrich Co. LLC

Corning® BioCoat® Collagen I 96-well Black/Clear Flat Bottom TC-treated microplates: Corning Inc.

DMSO: Sigma-Aldrich Co. LLC または FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.

HEPES: Termo Fisher Scientific Inc.

NaHCO₃: FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.

L-proline: MP biomedical, LLC

Insulin: Sigma-Aldrich Co. LLC

Dexamethasone: Sigma-Aldrich Co. LLC

Epidermal growth factor: Sigma-Aldrich Co. LLC

L-ascorbic acid 2-phosphate: FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.

Penicillin-Streptomycin Solution (×100): FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp.

T0901317: Sigma-Aldrich Co. LLC

Sodium oleate: Sigma-Aldrich Co. LLC

Palmitic acid: Sigma-Aldrich Co. LLC

Bovine Serum Albumin (Fatty acid free): Sigma-Aldrich Co. LLC

II. 機器および解析ソフトウェア

II-1. 細胞培養

- ・ 20%酸素条件培養

MCO-170AICUVD-PJ: PHC Corp.

MCO-170AIC-PJ: PHC Corp.

- ・ 40%酸素条件培養

MCO-5MUV-PJ: PHC Corp.

II-2. 顕微鏡観察

ECLIPSE Ti2: Nikon Corp.

OLYMPUS IX70: Evident Corp.

II-3. 吸光度および蛍光、発光測定

SpectraMax i3x: Molecular Devices, LLC

Multiscan™ GO: Thermo Fisher Scientific Inc.

II-4. Micriarray および IPA

Qiagen IPA® technology: QIAGEN N. V.

GeneSpring 14.9.1 software: Agilent Technologies, Inc.

II-5. hAlb 濃度測定

JEOL BM6050 autoanalyzer: JEOL Ltd.

II-6. 肝細胞培養上清中酸素濃度の測定

FireSting oxygen monitor: BAS Inc.

II-7. 統計処理

BellCurve for Excel 2.14: Social Survey Research Information Co., Ltd.
Microsoft EXCEL: Microsoft Corp.

III. 実験方法

III-1. ヒト肝細胞の単離

ヒト肝細胞 (1-year-old, boy, Caucasian, BioIVT LLC) を cDNA-uPA/SCID マウス (cDNA-uPA wild+/SCID) に移植し、肝臓をヒト化したキメラマウス (PXB-mice[®]) を作成した (Yamasaki *et al.*, 2020)。PXB-mice[®]の血中 hAlb 濃度は、LX 試薬 Eiken Alb II (Eiken Chemical Co., Ltd.) を用いて免疫比濁法により測定した。血中 hAlb 濃度が 10 mg/mL 以上 (推定置換率: 90%以上) の雄性キメラマウス (15-22 週齢) より、2 段階コラゲナーゼ灌流法を用いて、新鮮ヒト肝細胞 (PXB-cells[®]) を単離した (Yamasaki *et al.*, 2020)。動物実験プロトコルは、フェニックスバイオ株式会社の動物実験委員会の承認を得たものである。すべての実験手順は、動物実験の適正化に関するガイドライン (2006 年 6 月 1 日 ; 日本学術会議) に準拠して株式会社フェニックスバイオにて実施した。

III-2. 細胞培養

DMEM (10% FBS) に懸濁した単離肝細胞を、24-well または 96-well microplates にそれぞれ 4.0×10^5 、 7.12×10^4 cells/well の細胞密度で播種した。細胞数および生存率はトリパンブルーにより評価した。播種したヒト肝細胞は、20%酸素 (5% CO₂, 95% atmosphere) または 40%酸素 (5% CO₂, 55% N₂) 条件下で 37 °C、24 時間培養した。播種から 1 日後、培地を以下に示す dHCGM へと変更し、各酸素条件下で肝細胞を 10 日間培養した。細胞の状態に応じて、20%酸素条件下培養では 2~4 日、40%酸素条件下培養では 1-2 日おきに交換した。脂質毒性試験時以外の細胞培養はすべてフェニックスバイオ研究施設内にて行った。

dHCGM

Components	Final conc.
DMEM	
FBS	10%
DMSO	2%
HEPES	20 mM
NaHCO ₃	44 mM
L-proline	15 µg/mL
Insulin	0.25 µg/mL
Dexamethasone	50 nM

Epidermal growth factor	5 ng/mL
L-Ascorbic acid 2-phosphate	0.1 mM
Penicillin-Streptomycin Solution (×100)	1%

III-3-1. Oil Red O 染色

24-well または 96-well microplates に播種し、各酸素条件下で培養した肝細胞、あるいは 96-well microplates に再播種後 4 日目より 3 日間化合物を曝露した肝細胞を評価に用いた。

- 1) 各酸素条件下で培養、あるいは化合物を曝露したキメラマウス肝細胞を PBS で 2 回洗浄。
- 2) 10%ホルマリン (100 μ L/96-well, 500 μ L/24-well) で 15 分間固定。
- 3) 肝細胞を再び PBS で 2 回洗浄。
- 4) 60%イソプロパノール (100 μ L/96-well, 500 μ L/24-well) を添加し、37°C、1 分間静置して溶媒を置換。
- 5) 60%イソプロパノールを除去後、60% Oil Red O 染色液 (100 μ L/96-well, 400 μ L/24-well) を添加し、37°C、15 分間静置して染色。
- 6) Distilled water (DW) あるいは PBS で 2 回洗浄後、PBS (100 μ L/well) を添加。
- 7) ECLIPSE Ti2 あるいは OLYMPUS IX70 を用いて顕微鏡観察。

60% Oil Red O 染色液

Components	Final conc.
Oil Red O Stain Stock Solution	60%
DW	40%

*0.25-0.45 μ m filtration したものを使用。

III-3-2. Oil Red O 色素の抽出および定量

キメラマウス肝細胞を 24-well microplates に播種し、各酸素条件下で培養した肝細胞を評価に用いた。

- 1) 顕微鏡観察後、PBS を除去し、100%イソプロパノールを添加。
- 2) 室温、700 rpm で 15 分間振とうを行い、Oil Red O 色素を抽出。
- 3) 抽出液を 96-well microplates へ移行。
- 4) SpectraMax i3x を用いて吸光度 (490 nm) を測定。

III-4-1. 肝細胞中 TG 量の測定

24-well microplates に播種し、各酸素条件下で培養した肝細胞、あるいは 96-well microplates に再播種後 4 日目より 3 日間化合物を曝露した肝細胞を評価に用いた。Cholestest® TG (Sekisui Medical Co., Ltd.) を用いて、メーカーのプロトコルを参考に肝細胞中 TG 量を測定した。

- 1) 各酸素条件下で培養、あるいは化合物を曝露したキメラマウス肝細胞を PBS で 2 回洗浄。
- 2) Cholestest® TG ①液 (80 μ L/96-well, 200 μ L/24-well) を添加し、プレートインキュベーターを用いて、37°C、500 rpm で 10 分間振とう。
- 3) 細胞を剥離させ、細胞懸濁液を 500 μ L チューブに回収。
- 4) 回収した細胞懸濁液を 4°C、10,000 \times g で 10 分間遠心。
- 5) 96-well microplates に遠心上清 (15 μ L) および Cholestest® TG ①液 (68 μ L) を添加し、プレートインキュベーターを用いて、37°C、500 rpm で 10 分間振とう。
- 6) Cholestest® TG ②液 (25 μ L) を添加し、プレートインキュベーターを用いて、37°C、500 rpm で 10 分間振とう。
- 7) SpectraMax i3x あるいは Multiscan™ GO を用いて吸光度 (550nm および 800 nm) を測定。

*コレステスト®N キャリブレーターを DW で段階希釈して作製した検量線を用いて細胞中脂質量を算出。

III-4-2. 肝細胞培養上清中 TG 量の測定

キメラマウス肝細胞を 24-well microplates に播種し、各酸素条件下で培養した肝細胞の培養上清を評価に用いた。Cholestest® TG を用いて、メーカーのプロトコルを参考に肝細胞培養上清中 TG 量を測定した。

- 1) 96-well microplates に肝細胞培養上清 (15 μ L) および Cholestest® TG ①液 (68 μ L) を添加し、プレートインキュベーターを用いて、37°C、500 rpm で 10 分間振とう。
- 2) Cholestest® TG ②液 (25 μ L) を添加し、プレートインキュベーターを用いて、37°C、500 rpm で 10 分間振とう。
- 3) SpectraMax i3x を用いて吸光度 (550nm および 800 nm) を測定。

*コレステスト®N キャリブレーターを DW で段階希釈して作製した検量線を用いて肝細胞培養上清中脂質量を算出。

III-4-1. AICAR を用いた FAO 活性測定系の構築

キメラマウス肝細胞を 96-well microplates に播種し、20%酸素条件下で 3 日間培養した肝細胞を評価に用いた。FAO を蛍光で評価することができる FAOBlue を用いて FAO 活性を測定した (Uchinomiya *et al.*, 2020)。また、FAO 活性化剤として汎用される AICAR を陽性コントロールとした (Smith *et al.*, 2005)。

- 1) 20%酸素条件下で 3 日間培養したキメラマウス肝細胞を DMEM で 2 回洗浄。
- 2) 0、30、100、300、1000 μM AICAR (FBS-free dHCGM に DMSO 最終濃度が 2% となるように希釈) をキメラマウス肝細胞に曝露し、20%酸素条件下で 3 時間インキュベーション。
- 3) 肝細胞を再び DMEM で 2 回洗浄。
- 4) 10 μM FAOBlue (FBS-free dHCGM に DMSO 最終濃度が 2%となるように希釈) をキメラマウス肝細胞に曝露し、20%酸素条件下で 30 分間インキュベーション。
- 5) PBS で 1 回洗浄後、PBS (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) を添加。
- 6) SpectraMax i3x を用いて蛍光 (excitation, 405 nm; emission, 460 nm)を測定。

III-4-2. FAO 活性の測定

キメラマウス肝細胞を 96-well microplates に播種し、各酸素条件下で培養した肝細胞を評価に用いた。FAO を蛍光で評価することができる FAOBlue を用いて FAO 活性を測定した (Uchinomiya *et al.*, 2020)。

- 1) 各酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞を DMEM で 2 回洗浄。
- 2) 10 μM FAOBlue (FBS-free dHCGM に DMSO 最終濃度が 2%となるように希釈) をキメラマウス肝細胞に曝露し、20%酸素条件下で 30 分間インキュベーション。
- 3) PBS で 1 回洗浄後、PBS (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) を添加。
- 4) SpectraMax i3x を用いて蛍光 (excitation, 405 nm; emission, 460 nm)を測定。

III-5. BODIPYTM FL C₁₆ 取り込み活性の測定

キメラマウス肝細胞を 96-well microplates に播種し、各酸素条件下で培養した肝細胞を評価に用いた。

- 1) 各酸素条件下で培養したキメラマウス肝細胞を DMEM で 2 回洗浄。
- 2) 0.1 μM BODIPYTM FL C₁₆ (FBS-free dHCGM に DMSO 最終濃度が 2%となるように希釈) をキメラマウス肝細胞に曝露し、各酸素条件下で 30 分間インキュベーション。
- 3) Ice-cold PBS で 2 回洗浄後、PBS (100 $\mu\text{L}/\text{well}$) を添加。
- 4) SpectraMax i3x を用いて蛍光 (excitation, 485 nm; emission, 528 nm)を測定。

III-6. Microarray

キメラマウスより単離した新鮮肝細胞（d0、サスペンション、20%酸素条件）および各酸素条件下で7日間培養した肝細胞を評価に用いた。

- 1) Direct-zol™ RNA MicroPrep を用いて Total RNA を単離。
- 2) Agilent RNA 6000 Nano Kit を用いて Agilent 2100 Bioanalyzer により Total RNA を評価。
- 3) Total RNA (100 ng/sample) を標識し、Agilent Human Sure Print G3 Human GE V3 8 × 60 K mRNA microarray chip にハイブリダイズ。
- 4) GeneSpring 14.9.1 software を用いて、以前に報告したプロトコルにしたがって、データを正規化し、解析 (Tateno *et al.*, 2011)。

III-7. IPA

Microarray で得られた 発現変動遺伝子 (Differentially expressed gene: DEG) データセットを Qiagen IPA® technology (QIAGEN N. V.)を用いて解析した。

III-8. ATP

キメラマウス肝細胞を 96-well microplates に播種し、各酸素条件下で培養した肝細胞を評価に用いた。播種後 3、7、10 日目に CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability assay (Promega Corp.) を用いて、メーカーのプロトコルを参考に ATP 量を測定した。

- 1) 培養上清を捨て、dHCGM (100 µL/well) を添加。
- 2) 室温で 30 分静置。
- 3) CellTiter-Glo Reagent (100 µL/well) を添加。
- 4) 室温、700 rpm で 2 分間振とう。
- 5) 発光シグナルを安定化させるため、室温で 10 分間インキュベーション。
- 6) SpectraMax i3x を用いて化学発光を測定 (Integration time: 1 sec/well)。

III-9. 肝細胞培養上清中グルコース濃度の測定

キメラマウス肝細胞を 96-well microplates に播種し、各酸素条件下で培養した肝細胞を評価に用いた。培地中グルコース濃度は、播種後 7 日目に Glucose Assay Kit-WST (DOJINDO LABORATORIES) を用いて、メーカーのプロトコルにしたがって肝細胞培養上清中グルコース濃度を測定した。

- 1) 96-well microplates に肝細胞培養上清 (DW で 30 倍希釈、50 µL/well) および

Working solution (50 μ L/well) を添加。

2) プレートインキュベーターを用いて、37°Cで 30 分間インキュベーション。

3) SpectraMax i3x を用いて吸光度 (450 nm) を測定。

*10 mmol/L Glucose standard を DW で段階希釈して作製した検量線を用いて肝細胞培養上清中グルコース量を算出。

III-10. 肝細胞培養上清中乳酸濃度の測定

キメラマウス肝細胞を 96-well microplates に播種し、各酸素条件下で培養した肝細胞を評価に用いた。培地中グルコース濃度は、播種後 7 日目に Lactate Assay Kit-WST (DOJINDO LABORATORIES) を用いて、メーカーのプロトコルにしたがって肝細胞培養上清中乳酸濃度を測定した。

1) 96-well microplates に肝細胞培養上清 (DW で 10 倍希釈、20 μ L/well) および Working solution (80 μ L/well) を添加。

2) プレートインキュベーターを用いて、37°Cで 30 分間インキュベーション。

3) SpectraMax i3x を用いて吸光度 (450 nm) を測定。

*10 mmol/L Lactate standard を DW で段階希釈して作製した検量線を用いて肝細胞培養上清中乳酸量を算出。

III-11. hAlb 濃度の測定

播種後 3、7、10 日目の肝細胞培養上清中の hAlb 濃度を BM6050 オートアナライザーにより、LZ 試薬 'Eiken' U-ALB を用いた免疫比濁法で測定した。

III-12. 肝細胞培養上清中酸素濃度の測定

キメラマウス肝細胞を 96-well microplates に播種し、各酸素条件下で 3 日間培養した肝細胞を評価に用いた。FireSting oxygen monitor を用いて、肝細胞より 1mm 上の位置で培養上清中の溶存酸素濃度を 720 秒間連続測定した。測定器のプロープを取り付けてインキュベーターに戻し、値が安定した後にデータを取得した。

III-13-1. 脂質毒性試験用肝細胞の培養

株式会社フェニックスバイオにてキメラマウス肝細胞を 96-well microplates に播種し、40%酸素条件下で 10 日間培養した (実験方法 : III-1, 2)。培養 10 日目に細胞を剥離、再播種した肝細胞を以下に示す dHCGM (0.5% DMSO) を用いて、以下に示す試験

スケジュールにしたがって広島大学 大学院医系科学研究科 生体機能分子動態学研究室にて培養・脂質毒性試験を行った。

dHCGM (0.5% DMSO)

Components	Final conc.
DMEM	
FBS	10%
DMSO	0.5%
HEPES	20 mM
NaHCO ₃	44 mM
L-proline	15 µg/mL
Insulin	0.25 µg/mL
Dexamethasone	50 nM
Epidermal growth factor	5 ng/mL
L-Ascorbic acid 2-phosphate	0.1 mM
Penicillin-Streptomycin Solution (×100)	1%

試験スケジュール

Day (culture periods)	at PhoenixBio Co., Ltd.		at Hiroshima Univ.			
	Schedule	Oxygen conditions	Schedule	Day (exposure periods)		
0	Cell seeding	40% O ₂				
1	Medium change (dHCGM-2% DMSO)					
2						
3	Medium change (dHCGM-2% DMSO)					
4						
5	Medium change (dHCGM-2% DMSO)					
6						
7	Medium change (dHCGM-2% DMSO)					
8	Medium change (dHCGM-2% DMSO)					
9						
10	Cell detachment (40% O ₂) → Re-seeding (20% O ₂)	20% O ₂				
11	Medium change (dHCGM-0.5% DMSO)					
12	Shipping					
13					Culture	
14					Exposure	0
15					Exposure	1
16					Exposure	2
17					Assay	3

III-13-2. 脂肪酸 (fatty acid; FA) 溶液の調製

- 1) 100 mM FA (50 mM oleic acid : 50 mM palmitic acid = 1:1) となるように各脂肪酸を DMSO にて溶解し、混合。

- 2) 11.1% Bovine Serum Albumin (FA free) in HCGM-FBS (-)-DMSO (-) と 1:9 (v/v) で混合 (10 mM FA/10% BSA in HCGM/10% DMSO)。

III-13-3 化合物曝露

再播種後 4 日目より、以下に示す化合物含有培地を用いた培地交換を 1 日 1 回、3 日間行った。評価化合物には、LXR アゴニストであり、脂質生成を活性化させる T0901317 を用いた (Schultz *et al.*, 2000)。

dHCGM (ctrl)

Components	Final conc.
dHCGM-FBS (-)-DMSO (-)	
10 mM FA	100 μ M
DMSO	0.5%

*10 mM FA/10% BSA in HCGM/10% DMSO 中の DMSO も含めて最終濃度が 0.5% となるように DMSO を添加。

dHCGM (T0901317 含有)

Components	Final conc.
dHCGM-FBS (-)-DMSO (-)	
T0901317	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 μ M
10 mM FA	100 μ M
DMSO	0.5%

*10 mM FA/10% BSA in HCGM/10% DMSO 中の DMSO も含めて終濃度が 0.5% となるように DMSO を添加。

III-14. 統計処理

Microarray については、ANOVA unpaired T-test および Benjamini-Hochberg false discovery rate を用いて、fold change が 2 倍以上の DEG を同定し、統計的有意性を $p < 0.05$ とした。また、IPA については、Z-score の絶対値が 2.0 より大きく、かつ-Log p value > 1.3 の場合、シグナル伝達経路が有意に変動したとみなした。Microarray および IPA 以外のすべての結果は、mean \pm standard deviation (S.D., $n=3$, independent experiments) で表記した。統計的有意性は BellCurve for Excel 2.14 (Social Survey Research Information Co., Ltd.) を用いた Tukey test、two-way analysis of variance

(ANOVA)-Tukey 法あるいは Microsoft EXCEL を用いた Student's t-test により判定し、統計的有意性は $p < 0.05$ とした。以下に各 Figure に対する統計処理情報を示す。

- Student's t-test: Figure 17.
- Tukey test: Figure 26.
- two-way ANOVA-Tukey: Figure 4, 8, 12, 14.

引用文献の部

Albrecht W, Kappenberg F, Brecklinghaus T, Stoeber R, Marchan R, Zhang M, Ebbert K, Kirschner H, Grinberg M, Leist M, Moritz W, Cadenas C, Ghallab A, Reinders J, Vartak N, van Thriel C, Golka K, Tolosa L, Castell JV, Damm G, Seehofer D, Lampen A, Braeuning A, Buhrke T, Behr AC, Oberemm A, Gu X, Kittana N, van de Water B, Kreiling R, Fayyaz S, van Aerts L, Smedsrød B, Ellinger-Ziegelbauer H, Steger-Hartmann T, Gundert-Remy U, Zeigerer A, Ullrich A, Runge D, Lee SML, Schiergens TS, Kuepfer L, Aguayo-Orozco A, Sachinidis A, Edlund K, Gardner I, Rahnenführer J, Hengstler JG. (2019). Prediction of human drug-induced liver injury (DILI) in relation to oral doses and blood concentrations, *Arch Toxicol*, 93(6), 1609-1637.

Bell, C. C., Dankers, A. C. A., Lauschke, V. M., Sison-Young, R., Jenkins, R., Rowe, C., Goldring, C. E., Park, K., Regan, S. L., Walker, T., Schofield, C., Baze, A., Foster, A. J., Williams, D. P., van de Ven, A. W. M., Jacobs, F., Houdt, J. V., Lähteenmäki, T., Snoeys, J., Juhila, S., Richert, L., Ingelman-Sundberg, M. (2018). Comparison of Hepatic 2D Sandwich Cultures and 3D Spheroids for Long-term Toxicity Applications: A Multicenter Study. *Toxicol Sci*, 162(2), 655–666.

Benet, M., Moya, M., Donato, M. T., Lahoz, A., Hervás, D., Guzmán, C., Gómez-Lechón, M. J., Castell, J. V., & Jover, R. (2014). A simple transcriptomic signature able to predict drug-induced hepatic steatosis. *Arch Toxicol*, 88(4), 967–982.

Carey, J.J., Delaney, M.F. T-Scores and Z-Scores. (2010). *Clinic Rev Bone Miner Metab*. 8, 113–121.

Cave, M. C., Clair, H. B., Hardesty, J. E., Falkner, K. C., Feng, W., Clark, B. J., Sidey, J., Shi, H., Aqel, B. A., McClain, C. J., & Prough, R. A. (2016). Nuclear receptors and nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta*, 1859(9), 1083–1099.

Choudhry H, Harris AL. (2018). Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell Metab*, 27(2), 281-298.

den Braver-Sewradj, S. P., den Braver, M. W., Vermeulen, N. P., Commandeur, J. N., Richert, L., & Vos, J. C. (2016). Inter-donor variability of phase I/phase II metabolism of three reference drugs in cryopreserved primary human hepatocytes in suspension and monolayer. *Toxicol In Vitro*, 33, 71–79.

Donato, M. T., Lahoz, A., Castell, J. V., & Gómez-Lechón, M. J. (2008). Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Curr Drug Metab*, 9(1), 1–11.

Donato MT, Tolosa L, Jiménez N, Castell JV, Gómez-Lechón MJ. (2012). High-content imaging technology for the evaluation of drug-induced steatosis using a multiparametric cell-based assay. *J Biomol Screen*, 17(3), 394-400.

Dutta-Roy A. K. (2000). Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins. *Cell Mol Life Sci*, 57(10), 1360–1372.

Epstein, T., Gatenby, R. A., & Brown, J. S. (2017). The Warburg effect as an adaptation of cancer cells to rapid fluctuations in energy demand. *PLoS one*, 12(9), e0185085.

Erdbrügger, P., Fröhlich, F. (2020). The role of very long chain fatty acids in yeast physiology and human diseases. *Biol Chem*, 402(1), 25–38.

Estes, C., Anstee, Q. M., Arias-Loste, M. T., Bantel, H., Bellentani, S., Caballeria, J., Colombo, M., Craxi, A., Crespo, J., Day, C. P., Eguchi, Y., Geier, A., Kondili, L. A., Kroy, D. C., Lazarus, J. V., Loomba, R., Manns, M. P., Marchesini, G., Nakajima, A., Negro, F., ... Razavi, H. (2018). Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. *J Hepatol*, 69(4), 896–904.

Farrell, G. C., Larter, C. Z. (2006). Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*, 43(2 Suppl 1), S99–S112.

Fromenty, B., Pessayre, D. (1995). Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther*, 67(1), 101–154.

Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, Bode JG, Bolleyn J, Borner C, Böttger J, Braeuning A, Budinsky RA, Burkhardt B, Cameron NR, Camussi G, Cho CS, Choi YJ, Craig Rowlands J, Dahmen U, Damm G, Dirsch O, Donato MT, Dong J, Dooley S, Drasdo D, Eakins R, Ferreira KS, Fonsato V,

Fraczek J, Gebhardt R, Gibson A, Glanemann M, Goldring CE, Gómez-Lechón MJ, Groothuis GM, Gustavsson L, Guyot C, Hallifax D, Hammad S, Hayward A, Häussinger D, Hellerbrand C, Hewitt P, Hoehme S, Holzhütter HG, Houston JB, Hrach J, Ito K, Jaeschke H, Keitel V, Kelm JM, Kevin Park B, Kordes C, Kullak-Ublick GA, LeCluyse EL, Lu P, Luebke-Wheeler J, Lutz A, Maltman DJ, Matz-Soja M, McMullen P, Merfort I, Messner S, Meyer C, Mwinyi J, Naisbitt DJ, Nussler AK, Olinga P, Pampaloni F, Pi J, Pluta L, Przyborski SA, Ramachandran A, Rogiers V, Rowe C, Schelcher C, Schmich K, Schwarz M, Singh B, Stelzer EH, Stieger B, Stöber R, Sugiyama Y, Tetta C, Thasler WE, Vanhaecke T, Vinken M, Weiss TS, Widera A, Woods CG, Xu JJ, Yarborough KM, Hengstler JG. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*, 87(8), 1315-1530.

Hata, K., Sayaka, T., Takahashi, M., Sasaki, A., Umekawa, Y., Miyashita, K., Ogura, K., Toshima, G., Maeda, M., Takahashi, J., & Kakuni, M. (2020). Lipoprotein profile and lipid metabolism of PXB-cells®, human primary hepatocytes from liver-humanized mice: proposal of novel in vitro system for screening anti-lipidemic drugs. *Biomed Res*, 41(1), 33–42.

Hornberg JJ, Laursen M, Brenden N, Persson M, Thouggaard AV, Toft DB, Mow T. (2014). Exploratory toxicology as an integrated part of drug discovery. Part I: Why and how. *Drug Discov Today*, 19(8), 1131-1136.

Ikeyama Y, Sato T, Takemura A, Sekine S, Ito K. (2020). Successful energy shift from glycolysis to mitochondrial oxidative phosphorylation in freshly isolated hepatocytes from humanized mice liver. *Toxicol In Vitro*, 65, 104785.

Joshi-Barve, S., Kirpich, I., Cave, M. C., Marsano, L. S., & McClain, C. J. (2015). Alcoholic, Nonalcoholic, and Toxicant-Associated Steatohepatitis: Mechanistic Similarities and Differences. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 1(4), 356–367.

Kakuni, M., Morita, M., Matsuo, K., Katoh, Y., Nakajima, M., Tateno, C., & Yokoi, T. (2012). Chimeric mice with a humanized liver as an animal model of troglitazone-induced liver injury. *Toxicol Lett*, 214(1), 9–18.

Kanebratt, K. P., Andersson, T. B. (2008). Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos*, 36(7), 1444–1452.

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

Kietzmann T. (2017). Metabolic zonation of the liver: The oxygen gradient revisited. *Redox Biol*, 11, 622–630.

Kisoh, K., Sugahara, G., Ogawa, Y., Furukawa, S., Ishida, Y., Okanoue, T., Kohara, M., & Tateno, C. (2021). Estimating Drug Efficacy with a Diet-Induced NASH Model in Chimeric Mice with Humanized Livers. *Biomedicines*, 9(11), 1647.

Klaunig, J. E., Li, X., & Wang, Z. (2018). Role of xenobiotics in the induction and progression of fatty liver disease. *Toxicol Res*, 7(4), 664–680.

Kleiner DE, Chalasani NP, Lee WM, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, Hayashi PH, Davern TJ, Navarro V, Reddy R, Talwalkar JA, Stolz A, Gu J, Barnhart H, Hoofnagle JH; Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN). (2014). Hepatic histological findings in suspected drug-induced liver injury: systematic evaluation and clinical associations. *Hepatology*, 59(2), 661-670.

Kozyra, M., Johansson, I., Nordling, Å., Ullah, S., Lauschke, V. M., Ingelman-Sundberg, M. (2018). Human hepatic 3D spheroids as a model for steatosis and insulin resistance. *Sci Rep*, 8(1), 14297.

Kristiansen, M. N. B., Veidal, S. S., Christoffersen, C., Jelsing, J., & Rigbolt, K. T. G. (2019). Molecular Characterization of Microvesicular and Macrovesicular Steatosis Shows Widespread Differences in Metabolic Pathways. *Lipids*, 54(1), 109–115.

Krämer, A., Green, J., Pollard, J., Jr, & Tugendreich, S. (2014). Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics*, 30(4), 523–530.

Laouressergues, E., Staels, B., Valeille, K., Majd, Z., Hum, D. W., Duriez, P., & Cussac, D. (2010). Antipsychotic drug action on SREBPs-related lipogenesis and

cholesterogenesis in primary rat hepatocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 381(5), 427–439.

Lee-Montiel, F. T., George, S. M., Gough, A. H., Sharma, A. D., Wu, J., DeBiasio, R., Verneti, L. A., & Taylor, D. L. (2017). Control of oxygen tension recapitulates zone-specific functions in human liver microphysiology systems. *Exp Biol Med*, 242(16), 1617–1632.

Lettéron, P., Sutton, A., Mansouri, A., Fromenty, B., & Pessayre, D. (2003). Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology*, 38(1), 133–140.

Liu C, Sekine S, Ito K. (2016). Assessment of mitochondrial dysfunction-related, drug-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 302, 23-30.

Liu Y, Ma Z, Zhao C, Wang Y, Wu G, Xiao J, McClain CJ, Li X, Feng W. (2014). HIF-1 α and HIF-2 α are critically involved in hypoxia-induced lipid accumulation in hepatocytes through reducing PGC-1 α -mediated fatty acid β -oxidation. *Toxicol Lett*, 226(2), 117-123.

Metzen, E., Wolff, M., Fandrey, J., & Jelkmann, W. (1995). Pericellular PO₂ and O₂ consumption in monolayer cell cultures. *Respir Physiol*, 100(2), 101–106.

Miele, L., Liguori, A., Marrone, G., Biolato, M., Araneo, C., Vaccaro, F. G., Gasbarrini, A., & Grieco, A. (2017). Fatty liver and drugs: the two sides of the same coin. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 21(1 Suppl), 86–94.

Nishimura, M., Yoshitsugu, H., Yokoi, T., Tateno, C., Kataoka, M., Horie, T., Yoshizato, K., & Naito, S. (2005). Evaluation of mRNA expression of human drug-metabolizing enzymes and transporters in chimeric mouse with humanized liver. *Xenobiotica*, 35(9), 877–890.

Ohtsuki S, Kawakami H, Inoue T, Nakamura K, Tateno C, Katsukura Y, Obuchi W, Uchida Y, Kamiie J, Horie T, 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.

Pepino, M. Y., Kuda, O., Samovski, D., & Abumrad, N. A. (2014). Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism. *Annu Rev Nutr*, 34, 281–303.

Pirmoazen, A. M., Khurana, A., El Kaffas, A., & Kamaya, A. (2020). Quantitative ultrasound approaches for diagnosis and monitoring hepatic steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Theranostics*, 10(9), 4277–4289.

Raymond, J., Segrè, D. (2006). The effect of oxygen on biochemical networks and the evolution of complex life. *Science*, 311(5768), 1764–1767.

Rey E, Meléndez-Rodríguez F, Marañón P, Gil-Valle M, Carrasco AG, Torres-Capelli M, Chávez S, Del Pozo-Maroto E, Rodríguez de Cía J, Aragonés J, García-Monzón C, González-Rodríguez Á. (2020). Hypoxia-inducible factor 2α drives hepatosteatosis through the fatty acid translocase CD36. *Liver Int*, 40(10), 2553-2567.

Rinella, M. E., Sanyal, A. J. (2016). Management of NAFLD: a stage-based approach. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13(4), 196–205.

Rives, C., Fougerat, A., Ellero-Simatos, S., Loiseau, N., Guillou, H., Gamet-Payrastre, L., & Wahli, W. (2020). Oxidative Stress in NAFLD: Role of Nutrients and Food Contaminants. *Biomolecules*, 10(12), 1702.

Rocco, A., Compare, D., Angrisani, D., Sanduzzi Zamparelli, M., & Nardone, G. (2014). Alcoholic disease: liver and beyond. *World J Gastroenterol*, 20(40), 14652–14659.

Sakai Y, Nishikawa M, Evenou F, Hamon M, Huang H, Montagne KP, Kojima N, Fujii T, Niino T. (2012). Engineering of implantable liver tissues. *Methods Mol Biol*, 826. 189-216.

Sato K, Sanoh S, Ishida Y, Tateno C, Ohta S, Kotake Y. (2022). Assessment of metabolic activation of felbamate in chimeric mice with humanized liver in

combination with in vitro metabolic assays. *J Toxicol Sci*, 47(7), 277-288.

Schultz, J. R., Tu, H., Luk, A., Repa, J. J., Medina, J. C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D. J., Lustig, K. D., & Shan, B. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*, 14(22), 2831–2838.

Secor, J. D., Fligor, S. C., Tsikis, S. T., Yu, L. J., & Puder, M. (2021). Free Fatty Acid Receptors as Mediators and Therapeutic Targets in Liver Disease. *Front Physiol*, 12, 656441.

Sison-Young, R. L., Lauschke, V. M., Johann, E., Alexandre, E., Antherieu, S., Aerts, H., Gerets, H. H. J., Labbe, G., Hoët, D., Dorau, M., Schofield, C. A., Lovatt, C. A., Holder, J. C., Stahl, S. H., Richert, L., Kitteringham, N. R., Jones, R. P., Elmasry, M., Weaver, R. J., Hewitt, P. G., ... Park, B. K. (2017). A multicenter assessment of single-cell models aligned to standard measures of cell health for prediction of acute hepatotoxicity. *Arch Toxicol*, 91(3), 1385–1400.

Smith AC, Bruce CR, Dyck DJ. (2005). AMP kinase activation with AICAR further increases fatty acid oxidation and blunts triacylglycerol hydrolysis in contracting rat soleus muscle. *J Physiol*, 565 (Pt 2), 547-553.

Staiger, H., Staiger, K., Stefan, N., Wahl, H. G., Machicao, F., Kellerer, M., & Häring, H. U. (2004). Palmitate-induced interleukin-6 expression in human coronary artery endothelial cells. *Diabetes*, 53(12), 3209–3216.

Stevens KM. (1965). Oxygen requirements for liver cells in vitro. *Nature*, 206(980), 199.

Stéphenne, X., Najimi, M., Ngoc, D. K., Smets, F., Hue, L., Guigas, B., & Sokal, E. M. (2007). Cryopreservation of human hepatocytes alters the mitochondrial respiratory chain complex 1. *Cell Transplant*, 16(4), 409–419.

Sun, J., Fu, J., Li, L., Chen, C., Wang, H., Hou, Y., Xu, Y., & Pi, J. (2018). Nrf2 in alcoholic liver disease. *Toxicol Appl Pharmacol*, 357, 62–69.

Tateno C, Kataoka M, Utoh R, Tachibana A, Itamoto T, Asahara T, Miya F, Tsunoda

T, Yoshizato K. (2011). Growth hormone-dependent pathogenesis of human hepatic steatosis in a novel mouse model bearing a human hepatocyte-repopulated liver. *Endocrinology*, 152(4), 1479-1491.

Tateno C, Kawase Y, Tobita Y, Hamamura S, Ohshita H, Yokomichi H, Sanada H, Kakuni M, Shiota A, Kojima Y, Ishida Y, Shitara H, Wada NA, Tateishi H, Sudoh M, Nagatsuka S, Jishage K, Kohara M. (2015). Generation of Novel Chimeric Mice with Humanized Livers by Using Hemizygous cDNA-uPA/SCID Mice. *PLoS One*, 10(11), e0142145.

Tateno C, Kojima Y. (2020). Characterization and applications of chimeric mice with humanized livers for preclinical drug development. *Lab Anim Res*, 36, 2.

Tolosa L, Gómez-Lechón MJ, Jiménez N, Hervás D, Jover R, Donato MT. (2016). Advantageous use of HepaRG cells for the screening and mechanistic study of drug-induced steatosis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 302,1-9.

Uchinomiya S, Matsunaga N, Kamoda K, Kawagoe R, Tsuruta A, Ohdo S, Ojida A. (2020). Fluorescence detection of metabolic activity of the fatty acid beta oxidation pathway in living cells. *Chem Commun*, 56(20), 3023-3026.

Wagner BA, Venkataraman S, Buettner GR. (2011). The rate of oxygen utilization by cells. *Free Radic Biol Med*, 51(3), 700-712.

Yamasaki C, Ishida Y, Yanagi A, Yoshizane Y, Kojima Y, Ogawa Y, Kageyama Y, Iwasaki Y, Ishida S, Chayama K, Tateno C. (2020). Culture density contributes to hepatic functions of fresh human hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized livers: Novel, long-term, functional two-dimensional in vitro tool for developing new drugs. *PLoS One*, 15(9), e0237809.

Yamazaki H, Suemizu H, Mitsui M, Shimizu M, Guengerich FP. (2016). Combining Chimeric Mice with Humanized Liver, Mass Spectrometry, and Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling in Toxicology. *Chem Res Toxicol*, 29(12), 1903-1911.

Younossi, Z. M., Koenig, A. B., Abdelatif, D., Fazel, Y., Henry, L., & Wymer, M. (2016). Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of

prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 64(1), 73–84.

本論文に関連した学会発表

日本薬学会第 142 年会

2022 年 3 月 25 日（金）～28 日（月）（27 日発表） 愛知（オンライン開催）

ポスター発表（27P1-pm1-10S）

ヒト肝細胞キメラマウス由来肝細胞を用いた薬剤誘発性脂肪肝の評価検討

Evaluation and investigation for drug-induced hepatic steatosis using hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized liver

○大月 佑也¹、佐能 正剛^{1,2}、掛田 雄基¹、高岡 尚輝^{1,2}、太田 茂^{1,2}、山尾 美香留³、森岡 晶^{1,3}、立野 知世³、古武 弥一郎¹

*学生優秀発表賞 受賞

第 16 回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム

2022 年 10 月 29 日（土）～30 日（日）（29 日発表） 和歌山

ポスター発表（P-15）

高酸素培養が肝細胞に蓄積した脂質におよぼす影響とその調節機構の検討

Investigation of the effect of hyperoxic culture on lipids accumulated in hepatocytes and its regulatory mechanism

○大月 佑也¹、佐能 正剛^{1,2}、山尾 美香留³、小島 夕葉³、山崎 ちひろ³、古武 弥一郎¹、立野 知世^{2,3}

日本薬学会第 143 年会

2023 年 3 月 25 日（土）～28 日（火）（26 日発表） 北海道

口頭発表（26F2-am04S）

ヒト肝キメラマウス由来肝細胞を用いた薬剤誘発性脂肪肝評価のための高酸素培養系の構築

Establishment of hyperoxic culture system for evaluation of drug-induced hepatic steatosis using hepatocytes isolated from chimeric mice with humanized liver

○大月 佑也¹、佐能 正剛^{1,2}、山尾 美香留³、小島 夕葉³、古武 弥一郎¹、立野 知世^{2,3}

基礎となる原著論文

Ohtsuki, Y., Sanoh, S., Yamao, M., Kojima, Y., Kotake, Y., & Tateno, C. (2023). Establishment of hyperoxic cell culture system for predicting drug-induced liver injury: reducing accumulated lipids in hepatocytes derived from chimeric mice with humanized liver. *J. Toxicol. Sci.*, 48(2), 99–108.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なるご助言を頂きました 広島大学 大学院医歯薬保健学研究科 古武 弥一郎 教授に謹んで感謝申し上げます。

そして、本研究を進めるにあたり、数々の貴重な御助言ならびに御指導を頂きました、和歌山県立医科大学薬学部 佐能 正剛 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際して、幅広い見地・経験からの御指導、御鞭撻を賜りました 広島大学 大学院医歯薬保健学研究院 太田 茂 名誉教授 (現 和歌山県立医科大学薬学部 教授)に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、格別のご高配を賜りました 広島大学 大学院医系科学研究科 小澤 孝一郎 教授、広島大学 統合生命科学研究科 山崎 岳 教授に厚く感謝申し上げます。

本研究において、審査およびご助言を賜りました広島大学 大学院医系科学研究科 森岡 徳光 教授、野村 渉 教授、高橋 陵宇 准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に際して、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、山尾 美香留 博士、小島 夕葉 博士、山崎 ちひろ 博士、稲松 睦美 博士ならびに株式会社フェニックスバイオの皆様心より感謝申し上げます。

FireSting 酸素モニターの使用に際してご協力を賜りました 東京大学 大学院工学系研究科 酒井康行 教授に深く感謝申し上げます。

学生生活を送るにあたり、経済面でご支援を賜りました 帝人奨学会、日本薬学会、科学技術振興機構 に感謝申し上げます。

そして、研究室生活、学生生活を充実したものにさせていただきました 広島大学 生体機能分子動態学研究室の諸先輩方、同級生、後輩の皆さまに心より感謝申し上げます。

最後に、このような勉強する環境を与え、常に支えてくれた家族に深い敬意と感謝を示し、心より感謝致します。