

博士論文

非アルコール性脂肪性肝炎の病態進行における

胆汁酸動態に関する研究

平成 30 年度

東北大学大学院薬学研究科

医療薬学専攻

須賀 隆浩

略語表

ABC	ATP-binding cassette
ALT	Alanine aminotransferase
APS	Ammonium peroxodisulfate
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter
AST	Aspartate aminotransferase
ATP	Adenosine triphosphate
BAAT	Bile acid-CoA:amino acid <i>N</i> -acyltransferase
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Bovine serum albumin
BSEP	Bile salt export pump
CA	Cholic acid
CDAHFD	Choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet
CDCA	Chenodeoxycholic acid
CE	Collision energy
CXP	Collision cell exit potential
CYP	Cytochrome P450
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
DP	Declustering potential
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
E.M.	Elastica-Masson
EP	Entrance potential
ESI	Electrospray ionization
FBS	Fetal bovine serum
FXR	Farnesoid X receptor
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GCA	Glycine-conjugated cholic acid
GCDCA	Glycine-conjugated chenodeoxycholic acid
GDCA	Glycine-conjugated deoxycholic acid

GHCA	Glycine-conjugated hyocholic acid
GHDCA	Glycine-conjugated hyodeoxycholic acid
GLCA	Glycine-conjugated lithocholic acid
GMCA	Glycine-conjugated muricholic acid
GUDCA	Glycine-conjugated ursodeoxycholic acid
H.E.	Hematoxylin-eosin
HCA	Hyocholic acid
HDCA	Hyodeoxycholic acid
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	High performance liquid chromatography
HPRT	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase
IL	Interleukin
IS	Internal standard
IgG	Immunoglobulin G
KH	Krebs-Henseleit
LC	Liquid chromatography
MCA	Muricholic acid
MCD	Methionine and choline deficiency diet
MCP	Monocyte chemotactic protein
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Tandem mass spectrometry
N.D.	Not detected
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NAS	NAFLD activity score
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
NS	Not significant
NTCP	Sodium taurocholate cotransporting polypeptide
OATP	Organic anion transporting polypeptide
ODS	Octadecyl silyl
OST	Organic solute transporter
PCR	Polymerase chain reaction

PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
S.D.	Standard deviation
S.E.	Standard error
SD	Standard diet
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SLC	Solute carrier
SMA	Smooth muscle actin
SRM	Selected reaction monitoring
SULT	Sulfotransferase
TBS	Tris-buffered saline
TCA	Taurine-conjugated cholic acid
TCDCa	Taurine-conjugated chenodeoxycholic acid
TDCA	Taurine-conjugated deoxycholic acid
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine
TG	Triglyceride
TGF	Transforming growth factor
TGR5	Takeda G-protein receptor 5
THCA	Taurine-conjugated hyocholic acid
THDCA	Taurine-conjugated hyodeoxycholic acid
TLCA	Taurine-conjugated lithocholic acid
TMCA	Taurine-conjugated muricholic acid
TNF	Tumor necrosis factor
TUDCA	Taurine-conjugated ursodeoxycholic acid
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethane
UDCA	Ursodeoxycholic acid
cDNA	Complementary DNA
dNTP	Deoxynucleoside 5'-triphosphate
mRNA	Messenger RNA

目次

序論.....	1
第1章 トランスポーターを介した胆汁酸の輸送特性解析.....	9
第1節 序.....	9
第2節 OATP1B1 及び OATP1B3 を介した典型的基質の輸送に対する胆汁酸 の影響.....	13
第3節 OATP1B1 及び OATP1B3 を介した胆汁酸輸送の時間依存性.....	15
第4節 OATP1B1 及び OATP1B3 を介した胆汁酸輸送の濃度依存性.....	17
第5節 OST α/β を介した典型的基質の輸送に対する胆汁酸の影響.....	24
第6節 OST α/β を介した胆汁酸輸送の時間依存性.....	26
第7節 OST α/β を介した胆汁酸輸送の濃度依存性.....	28
第8節 考察.....	31
第9節 小括.....	42
第2章 NASH の病態進行における胆汁酸動態の解明.....	44
第1節 序.....	44
第2節 NASH モデルマウスの作製と病態評価.....	46
第3節 NASH モデルマウスにおける胆汁酸の経時的変動の定量解析.....	53
第4節 NASH モデルマウスにおける胆汁酸トランスポーターの発現変動...65	
第5節 NASH モデルマウスにおける胆汁酸代謝酵素及び核内受容体の発現 変動.....	67
第6節 肝線維化の進展に及ぼす胆汁酸の影響.....	69
第7節 考察.....	71
第8節 小括.....	83

結論.....	84
謝辞.....	86
実験の部.....	88
引用文献.....	114
発表論文.....	131

序論

非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は、明らかなアルコール摂取歴がないにもかかわらず、アルコール性肝障害に類似した病態を示す。肝臓の炎症と線維化を伴うことが多く、進行すると肝硬変や肝細胞癌に至ることがあるうえ¹⁾、ウイルス性肝炎の減少に伴う新たな肝細胞癌の発生源地としても問題視されている²⁾。本邦の肝硬変に占める NASH を誘因とする肝硬変の罹患率は 2.1%³⁾、また肝細胞癌に占める NASH を誘因とする肝細胞癌の罹患率は 2-5% と報告されている⁴⁾。NASH の有病率は世界的に 3-5% と推定され⁵⁾、近年の肥満人口の増加に伴って増加傾向にあるとも推定されている⁶⁾。しかしながら、NASH に特異的かつ効果的な治療法は未だ確立されていない。したがって、NASH の治療戦略を創出するための基盤的情報として、その病態進行メカニズムを詳細に理解することが求められている。

NASH の病態進行メカニズムに関しては two-hit theory が広く認知されてきた⁷⁾ (Fig. 1)。すなわち、first hit として肥満に伴う良性の脂肪肝が形成され、second hit として様々な要因による炎症が起こることで NASH が形成するとされている。最近では炎症が脂肪化と同時、あるいは先行する機序である multiple-parallel hits 仮説が提唱されている⁸⁾。炎症の要因として、酸化ストレスや小胞体ストレス、ミトコンドリアの機能異常、オートファジー、遊離脂肪酸などによる肝細胞障害、腸内細菌叢の変化に伴う自然免疫系賦活などが報告されており⁹⁾、これらが NASH の病態に関与している。最近、肝実質細胞だけでなく肝マクロファージであるクッパー細胞や肝星細胞などの肝非実質細胞においてもコレステロールが過剰に蓄積することにより、NASH における炎症や肝線維化が促進されることが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。肝実質細胞の小胞体膜やミトコンドリアに遊離コ

コレステロールが過剰に蓄積すると、小胞体ストレスやミトコンドリアの酸化ストレス障害が引き起こされる¹¹⁾。一方、クッパー細胞のリソソーム中にコレステロールが蓄積すると炎症反応が促進され¹³⁾、肝星細胞にコレステロールが蓄積すると toll-like receptor 4 の分解抑制によるトランスフォーミング増殖因子 (TGF)- β の感受性亢進によって肝線維化が促進される¹⁴⁾。さらに、コレステロールは結晶を形成し、パターン認識受容体である nod-like receptor protein 3 の刺激因子としてカスパーゼ-1 を活性化して、炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL)-1 β などの放出を促進することも報告されている^{15,16)}。

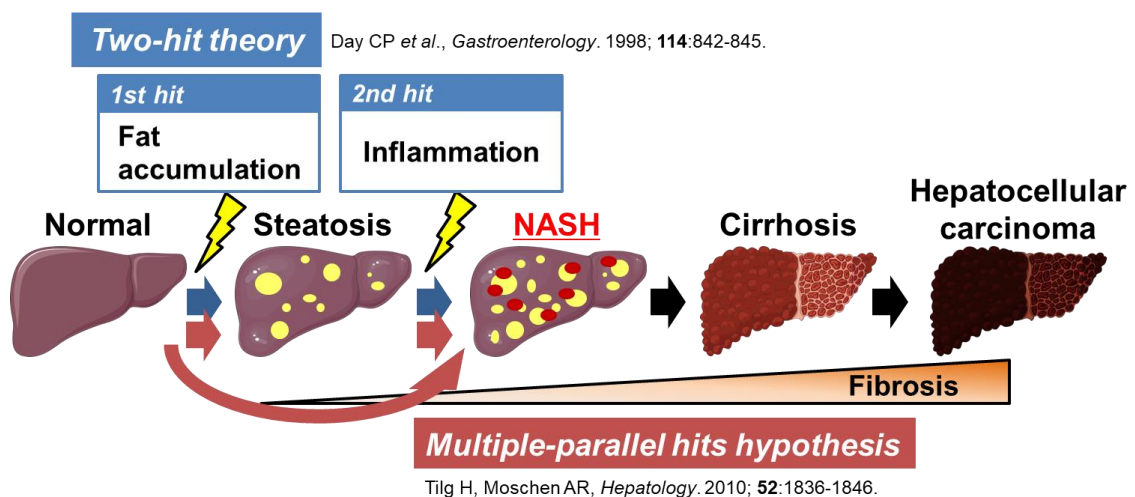


Fig. 1 The progression of NASH.

コレステロールは肝臓においてアセチル CoA より生合成され、様々な臓器でステロイドホルモンへ代謝されるほか、その 90%以上が胆汁の主要構成成分である胆汁酸へと代謝される。胆汁酸はステロイド核を有する炭素数 24 個のカルボン酸であり、両親媒性であることからレシチンとともに複合ミセルを形成し、脂質の消化吸収促進に重要な役割を果たす¹⁷⁾。胆汁酸がコレステロールから代謝される経路には、コレステロール 7 α -ヒドロキシラーゼによる 7 α 水酸化に始まる neutral pathway と、acidic pathway が知られている^{18,19)} (Fig. 2)。前者は 7 α 位の水酸化後、細胞質の酵素によって母核が変換され、さらにミトコンドリア及びペルオキシソーム中の酵素によって側鎖切断反応が進行し、一次胆汁酸であるコール酸 (CA) あるいはケノデオキシコール酸 (CDCA) に変換される。一方、後者は、側鎖の酸化的切断の後にステロイド核が変換される経路であり、一次胆汁酸の 10%程度が本経路で合成される¹⁹⁾。生じた一次胆汁酸の多くは、側鎖末端のカルボキシ基がアミノ酸抱合された後、抱合型胆汁酸として胆管内に分泌され、胆嚢に濃縮される。摂食に伴って胆嚢が収縮すると胆汁が分泌され、膵液とともに十二指腸へ分泌される。ここで、脂質の消化吸収促進に重要な役割を果たした後、腸内細菌叢においてアミノ酸の脱抱合や 7 α 位水酸基の脱離、異性化が起こり、二次胆汁酸であるデオキシコール酸 (DCA)、ウルソデオキシコール酸 (UDCA) あるいはリトコール酸 (LCA) に変換される。胆汁酸の大部分は回腸末端に至るまでに再吸収され、門脈を経て肝臓へ戻る腸肝循環をしている。以上のように、胆汁酸は生体内で多様な分子種として存在する。

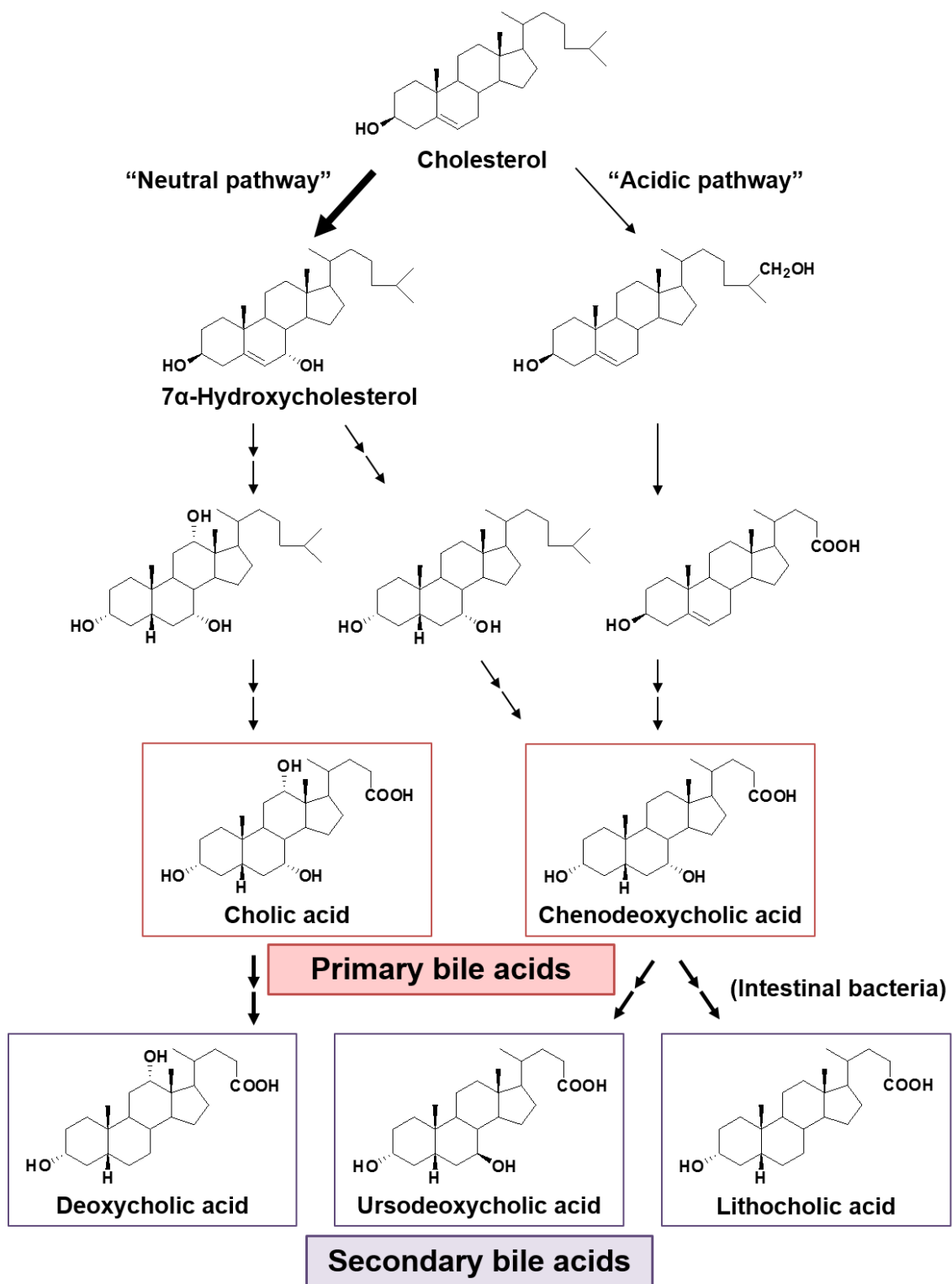


Fig. 2 Bile acid metabolic pathways from cholesterol.

一方、胆汁酸は全身に広く発現する受容体を介するシグナル伝達分子としても作用を発揮することが知られ、核内受容体のファルネソイド X 受容体 (FXR)²⁰⁻²²⁾や、細胞膜受容体の sphingosine-1-phosphate receptor 2²³⁾、Takeda G-protein receptor 5 (TGR5)^{24,25)}に結合し、脂質代謝²⁶⁾や糖代謝²⁷⁾、エネルギー代謝制御²⁸⁾に関与する。実際に、二次胆汁酸が血中グルコース及びトリグリセリド (TG) の代謝に影響を及ぼすことが報告されている²⁹⁾。最近、胆汁酸と非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD)³⁰⁾や糖尿病³¹⁾、肥満³²⁾など様々な代謝性疾患との関連が報告され、疾患時には胆汁酸組成及び濃度の変動が認められる。Lake らは NASH 患者の肝組織を用い、肝臓中の胆汁酸組成及び胆汁酸代謝の変動について報告している³³⁾。NASH 患者群では neutral pathway の代謝酵素 cytochrome P450 (CYP) 8B1 の messenger ribonucleic acid (mRNA) 発現が低下して、同経路の代謝物 CA とグリシン抱合型デオキシコール酸 (GDCA) が健常者に比べて有意に低下したが、タウロコール酸 (TCA) 及びタウリン抱合型デオキシコール酸 (TDCA) は有意に増加した。また、NASH 患者群では acidic pathway の代謝酵素 CYP7B1 の mRNA 発現が増加し、同経路の代謝物グリシン抱合型ケノデオキシコール酸 (GCDCA) が健常者に比べて有意に増加した。これらの所見より、NASH 患者では neutral pathway から acidic pathway にシフトするような代謝経路の変動が認められた。また、Puri らは NASH 患者の血漿を用い、血漿中の胆汁酸組成及び濃度の変動と NASH の重症度との関連について報告している³⁴⁾。NASH 患者群では血漿中の抱合型一次胆汁酸濃度が健常者に比べて有意に増加した一方で、総二次胆汁酸濃度は有意に低下した。また、NASH の重症度と血漿中 TCA 濃度、さらには肝線維化の重症度と血漿中グリココール酸 (GCA) 及び TCA 濃度に正の相関関係が認められた。こうした背景から、胆汁酸は NASH に密接に関与する可能性が考えられるが、NASH の病態進行における胆汁酸動

態に関する報告は少なく、十分な情報が得られていない。したがって、NASHの病態を詳細に理解するうえで、胆汁酸の動態を精密に把握することが重要であると考えた。

胆汁酸の動態は、肝臓や回腸に発現する複数のトランスポーターにより制御されている³⁵⁻³⁸⁾ (Fig. 3)。肝実質細胞の毛細胆管膜上に発現する bile salt export pump (BSEP) や adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) C2 を介して、胆汁酸は胆管内に分泌される。回腸末端では刷子縁膜上に発現する apical sodium-dependent bile acid transporter (ASBT) を介して能動的に吸収され、organic solute transporter (OST) α/β を介して門脈に排出された後、類洞を通じて肝実質細胞に到達する。肝実質細胞の類洞膜側には、細胞内取り込みトランスポーターである sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) や organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 及び OATP1B3、細胞外排出トランスポーターである ABCC3、ABCC4 及び OST α/β が発現しており、肝実質細胞における胆汁酸輸送に関与する。しかしながら、OATP1B1、OATP1B3 及び OST α/β に関する知見は一部の胆汁酸の輸送特性に限られており、胆汁酸個々の輸送特性についての詳細は明らかにされていない。

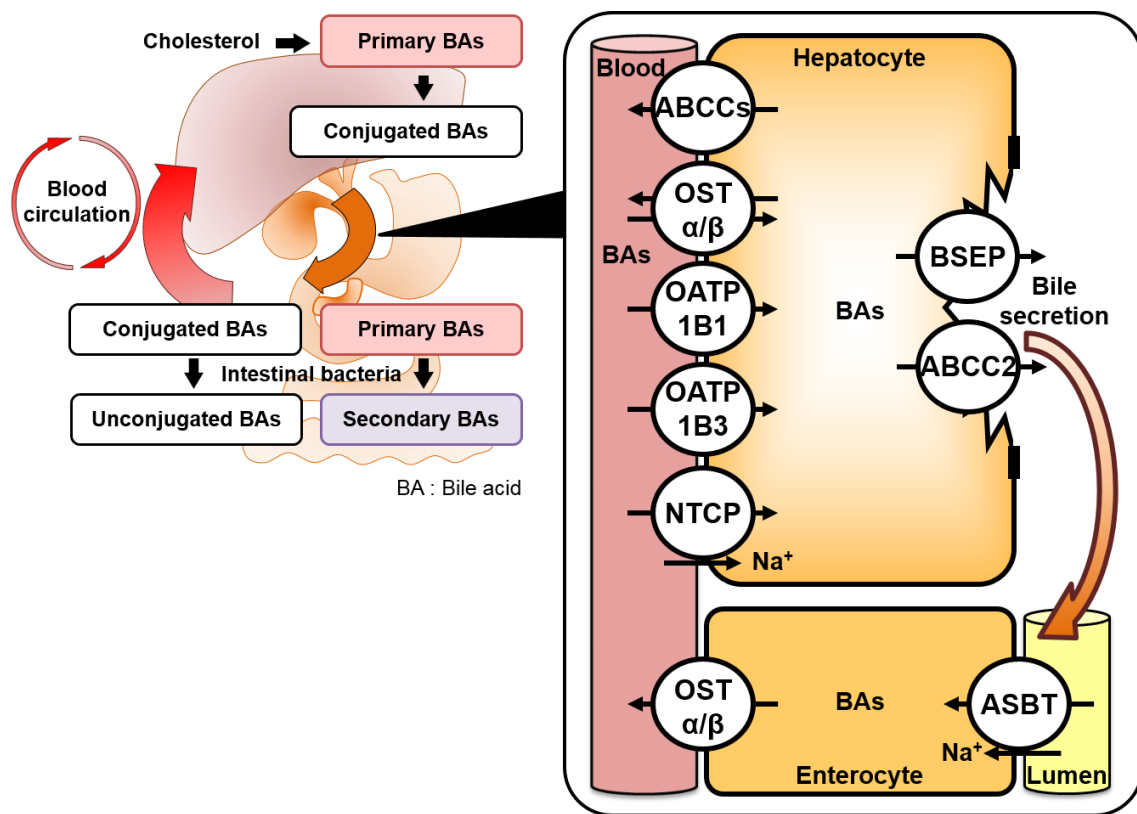


Fig. 3 Enterohepatic circulation of bile acids and bile acid transporters.

そこで本研究では、胆汁酸動態を支配する分子の一つであるトランスポーターに着目し、胆汁酸の輸送特性が十分に明らかにされていない OATP1B1、OATP1B3 及び OST α/β を介した胆汁酸の輸送特性解析により、胆汁酸動態におけるトランスポーターの重要性を示すとともに、NASH の病態進行における胆汁酸動態を明らかにすることを目的とした。第 1 章では、トランスポーター安定発現細胞株を用いて、OATP1B1、OATP1B3 及び OST α/β を介した 15 種の胆汁酸の輸送特性を評価した。第 2 章では、NASH モデルマウスを用いて、NASH の病態進行における胆汁酸の組成および濃度の経時的変動を調べた。次いで、胆汁酸動態の変動機構を明らかにするために、胆汁酸動態への影響が大きいと考えられる代謝酵素、ならびに第 1 章で着目したトランスポーターの発現変動

を調べた。さらに、肝線維化の進展に及ぼす胆汁酸の影響について、肝星細胞の活性化に着目し検討を行った。

第1章 トランスポーターを介した胆汁酸の輸送特性解析

第1節 序

トランスポーターは、細胞膜に発現し細胞内外の物質の輸送を制御する輸送タンパク質である。トランスポーターには電気化学ポテンシャルやイオン勾配を利用して働く solute carrier (SLC) ファミリーと ATP の加水分解エネルギーを利用し、排泄方向に働く ABC ファミリーが知られている。SLC ファミリーの中には両方向性に働くトランスポーターも存在し、生体内物質や薬物の細胞膜輸送を厳密に制御している。

SLC ファミリーである OATP は Na^+ 非依存的な有機アニオントランスポーターであり、胆汁酸、甲状腺ホルモン、抱合型ステロイド、エイコサノイドなどの生体内物質だけでなく、スタチンなどの様々な薬物の肝取り込みに寄与するトランスポーターとして知られている³⁹⁻⁴³⁾。OATP ファミリーの中で OATP1B1 及び OATP1B3 はともに肝臓の血管側膜に特異的に発現する 12 回膜貫通型の取り込みトランスポーターであり、胆汁酸の肝実質細胞への取り込みに重要な役割を果たすと考えられている。胆汁酸の肝取り込み機構には、NTCP を介した Na^+ 依存的な取り込みと、OATP1B1 及び OATP1B3 を介した Na^+ 非依存的な取り込みがある⁴⁴⁾。これらの肝取り込みトランスポーターは、小腸で再吸収された胆汁酸が全身循環血中に移行するための初期のステップに関与することから、循環血中の胆汁酸組成及び濃度の変動に関与する重要な分子であると考えられる。これまでに NTCP を介した胆汁酸の輸送特性に関しては詳細な解析が行われている⁴⁵⁾。一方、OATP1B1 及び OATP1B3 を介した胆汁酸の輸送特性に関する先行研究では、TCA^{40,46-50)}の輸送のほか、CA⁴⁶⁾、グリシン抱合型ウルソデオキシ

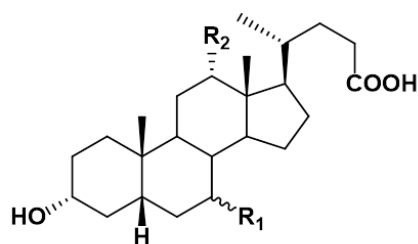
コール酸 (GUDCA) 及びタウリン抱合型ウルソデオキシコール酸 (TUDCA) ⁵¹⁾ の輸送が調べられている。しかしながら、OATP1B1 及び OATP1B3 を介した胆汁酸の輸送特性の全体像は明らかにされていない。

一方、OST α/β は、2001 年に小さなガンギエイである *Raja erinacea* より発見された ⁵²⁾ ことを契機に、これまでにヒト、マウス及びラットで相同体が単離されている ⁵³⁻⁵⁷⁾。OST α/β は、OST α と OST β の 2 つの遺伝子からなるヘテロ二量体のトランスポーターとして機能する。このうち OST α は、340 アミノ酸からなる 7 回膜貫通型の構造をとり、一方の OST β は 128 アミノ酸からなる 1 回膜貫通型の構造であり、これらが二量体を形成することで輸送活性を示す ⁵⁵⁾。ヒト OST α/β は、主に小腸、大腸、精巣、肝臓、腎臓、子宮、副腎に発現し ⁵⁶⁾、小腸においては基底膜側に発現して TCA、estrone-3-sulfate 及び prostaglandin E₂ などを輸送することが明らかになっている ⁵⁶⁾。また、小腸の管腔側に発現して胆汁酸の管腔側から細胞内への取り込みを担うトランスポーターである ASBT と、マウス Ost α/β との共発現細胞を用いた経細胞輸送系により、マウス Ost α/β が TCA の細胞外排出トランスポーターとして機能することが明らかになっている ⁵⁷⁾。このことから、OST α/β は胆汁酸動態に影響を与える一因であることが想定される。しかしながら、ヒト OST α/β が基質とする胆汁酸の報告は限られており、その機能も十分な解明がなされていない。

以上の背景から、本章では OATP1B1、OATP1B3 及び OST α/β を介した胆汁酸の輸送特性の全体像を明らかにし、胆汁酸個々の動態におけるトランスポーターの重要性を示すことを目的とした。

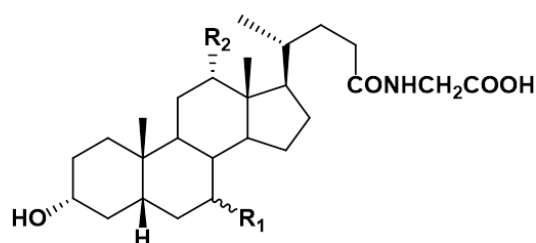
トランスポーターを介した輸送特性を評価する実験系としては、マウスやラットなどの実験動物を用いた *in vivo* 実験系と、細胞などを用いて行う *in vitro* 実験系に大別される。本研究で着目している OATP1B1、OATP1B3 及び OST α/β

は、ヒトとげっ歯類でアミノ酸配列が異なることから、トランスポーターに対する基質親和性や輸送効率が異なる可能性がある。したがって、ヒトのトランスポーターの輸送特性を評価するには、*in vivo* 実験系での検討よりも、*in vitro* 実験系による検討が有用であると考えた。そこで、本章では樹立した OATP1B1 及び OATP1B3 安定発現 human embryonic kidney (HEK) 293 細胞^{58,59)}、OST α/β 安定発現 Madin-Darby canine kidney (MDCK) II 細胞を用いて、OATP1B1、OATP1B3 及び OST α/β を介した胆汁酸の輸送特性を明らかにすることとした。対象化合物として、ヒトの生体内に主に存在する 5 種の遊離型胆汁酸ならびにそれらのグリシン及びタウリン抱合型胆汁酸の計 15 化合物を評価した (Fig. 4)。



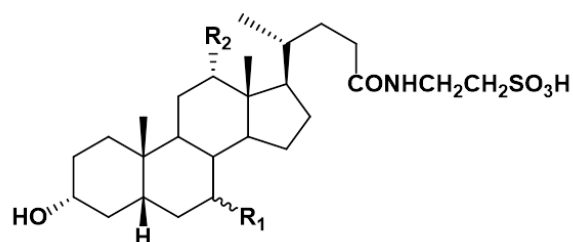
Unconjugated bile acids

Compound		R ₁	R ₂
Cholic acid	(CA)	α-OH	α-OH
Chenodeoxycholic acid	(CDCA)	α-OH	H
Deoxycholic acid	(DCA)	H	α-OH
Ursodeoxycholic acid	(UDCA)	β-OH	H
Lithocholic acid	(LCA)	H	H



Glycine-conjugated bile acids

Compound		R ₁	R ₂
Glycine-conjugated CA	(GCA)	α-OH	α-OH
Glycine-conjugated CDCA	(GCDCA)	α-OH	H
Glycine-conjugated DCA	(GDCA)	H	α-OH
Glycine-conjugated UDCA	(GUDCA)	β-OH	H
Glycine-conjugated LCA	(GLCA)	H	H



Taurine-conjugated bile acids

Compound		R ₁	R ₂
Taurine-conjugated CA	(TCA)	α-OH	α-OH
Taurine-conjugated CDCA	(TCDCA)	α-OH	H
Taurine-conjugated DCA	(TDCA)	H	α-OH
Taurine-conjugated UDCA	(TUDCA)	β-OH	H
Taurine-conjugated LCA	(TLCA)	H	H

Fig. 4 Chemical structures of human major unconjugated bile acids, glycine-conjugated bile acid, and taurine-conjugated bile acids.

第 2 節 OATP1B1 及び OATP1B3 を介した典型的基質の輸送に対する胆汁酸の影響

まず、OATP1B1 及び OATP1B3 を介した典型的基質の輸送に対する胆汁酸の影響を調べた。典型的基質としてロスバスタチンを用い、各胆汁酸濃度を 100 μ M に設定して細胞内取り込み実験を行った。その結果、OATP1B1 を介したロスバスタチンの取り込みは遊離型胆汁酸及び抱合型胆汁酸の共存により 55%以上低下し (Fig. 5A)、OATP1B3 を介した取り込みは DCA を除く胆汁酸の共存により約 35%低下した (Fig. 5B)。UDCA、LCA、GCDCA 及び GDCA の共存下では、OATP1B1 安定発現 HEK293 細胞あるいは OATP1B3 安定発現 HEK293 細胞へのロスバスタチンの取り込み量が、mock 細胞への取り込み量よりも低い値となり、見かけ上 OATP1B1 あるいは OATP1B3 を介した取り込みが負の値を示した。一方、DCA は OATP1B1 を介したロスバスタチンの取り込みを 77%低下させたが、OATP1B3 を介した取り込みをほとんど低下させなかった。以上より、検討した多くの遊離型胆汁酸及び抱合型胆汁酸は、OATP1B1 及び OATP1B3 を介したロスバスタチンの輸送を高濃度域で強く阻害することが判った。

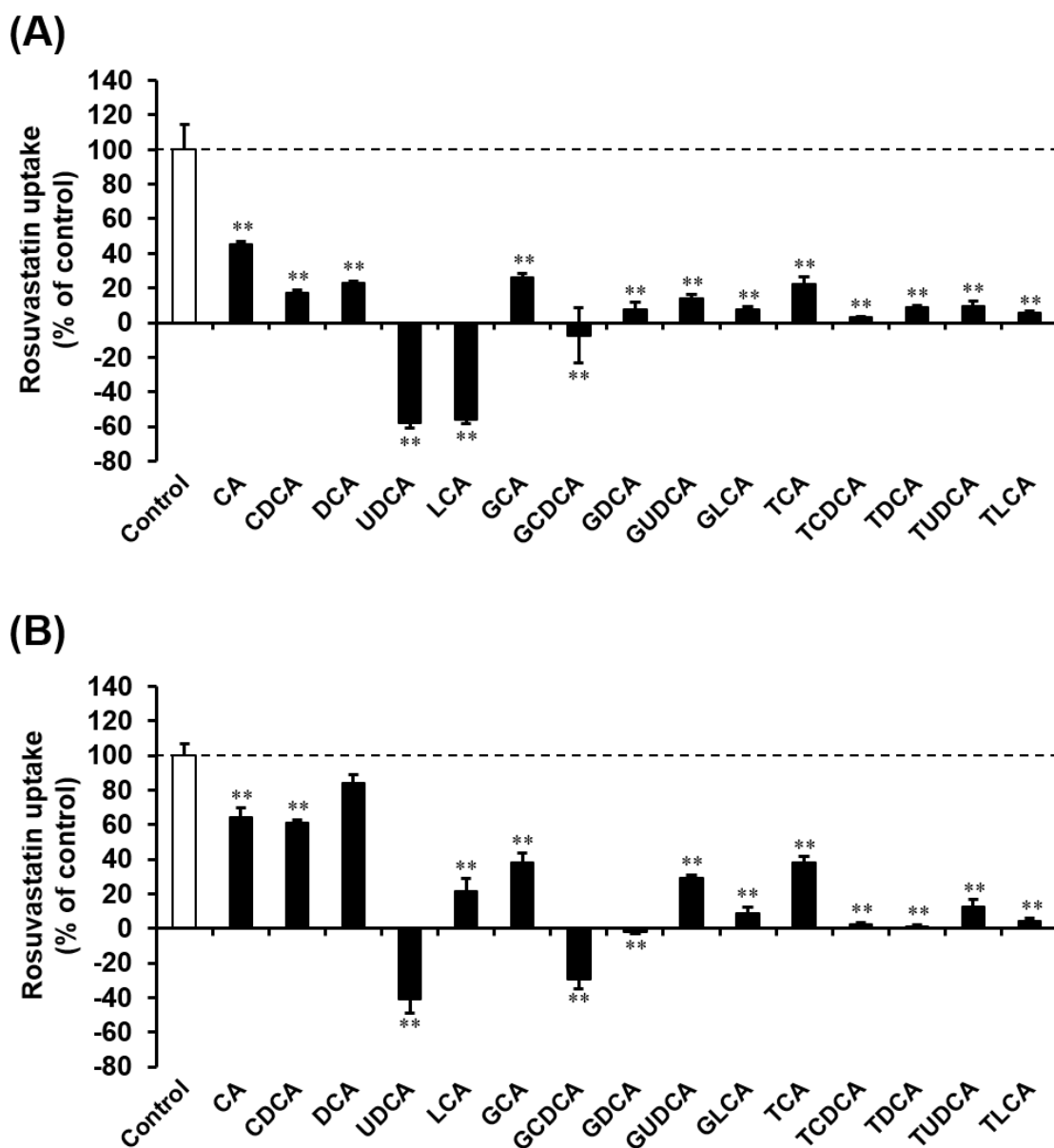


Fig. 5 Inhibition by unconjugated and conjugated bile acids of rosuvastatin uptake via OATP1B1 and OATP1B3.

Cells were incubated with 2.5 μM rosuvastatin at 37°C for 0.5 min in the presence of 100 μM bile acids. The values for the 100% of control rosuvastatin uptake via (A) OATP1B1 and (B) OATP1B3 were 0.46 ± 0.068 and 0.37 ± 0.025 pmol/mg protein, respectively. OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake were calculated after subtraction of nonspecific uptake by mock cells. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 3). ** $p < 0.01$, significantly different from control.

第3節 OATP1B1 及び OATP1B3 を介した胆汁酸輸送の時間依存性

次に、OATP1B1 及び OATP1B3 安定発現 HEK293 細胞をそれぞれ用いて、15 種の胆汁酸の細胞内取り込み量の時間依存性を調べた。遊離型胆汁酸のうち CA、CDCA 及び DCA は、mock 細胞に比べて OATP1B1 及び OATP1B3 発現細胞において有意に取り込み量が上昇したものの、UDCA 及び LCA の有意な取り込み量の上昇は認められなかった (Fig. 6A-E)。一方、グリシン抱合型胆汁酸とタウリン抱合型胆汁酸は、いずれも OATP1B1 及び OATP1B3 発現細胞において有意な取り込み量の上昇が認められた (Fig. 6F-O)。取り込み時間 5 分で、OATP1B1 発現細胞における CA (5 μ M)、CDCA (0.1 μ M)、DCA (1 μ M)、GCA (2.5 μ M)、GCDCA (1 μ M)、GDCA (1 μ M)、GUDCA (1 μ M)、GLCA (0.2 μ M)、TCA (1 μ M)、TCDCA (0.5 μ M)、TDCA (1 μ M)、TUDCA (2.5 μ M) 及び TLCA (0.2 μ M) の取り込み量は、mock 細胞に比べてそれぞれ 2.2 倍、1.2 倍、1.4 倍、1.8 倍、4.5 倍、3.5 倍、3.9 倍、3.4 倍、2.2 倍、3.9 倍、2.6 倍、5.1 倍及び 9.2 倍であった。同様に、OATP1B3 発現細胞における取り込み量は、mock 細胞に比べてそれぞれ 2.9 倍、1.2 倍、1.5 倍、2.4 倍、8.7 倍、2.6 倍、2.9 倍、4.1 倍、2.4 倍、7.9 倍、2.8 倍、3.4 倍及び 8.4 倍であった。また、CA (5 μ M)、GCA (2.5 μ M) 及び TCA (1 μ M) では OATP1B1 及び OATP1B3 を介した取り込みが 30 秒まで、CDCA (0.1 μ M)、DCA (1 μ M)、GCDCA (1 μ M)、GDCA (1 μ M)、GUDCA (1 μ M)、GLCA (0.2 μ M)、TCDCA (0.5 μ M)、TDCA (1 μ M)、TUDCA (2.5 μ M) 及び TLCA (0.2 μ M) では 1 分まで直線的に増加した。そこで、以降の取り込み実験は、CA、GCA 及び TCA については OATP1B1 及び OATP1B3 を介する取り込みの初速度が評価可能である 30 秒で、他の胆汁酸については 1 分で行った。

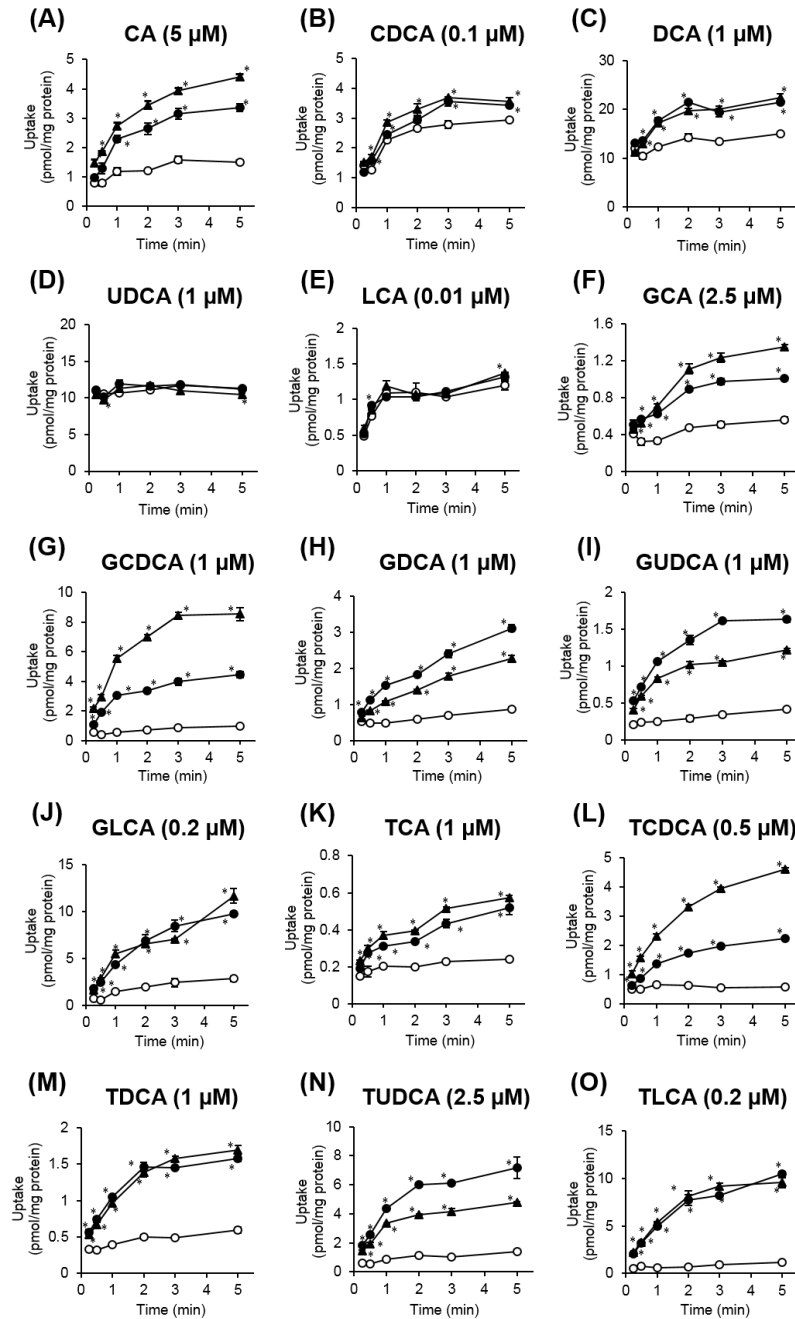


Fig. 6 Time-dependent uptake of bile acids by OATP1B1 and OATP1B3. OATP1B1-overexpressing (closed circles), OATP1B3-overexpressing (closed triangles), and vector-transfected (open circles) HEK293 cells were incubated for indicated times at 37°C. (A) CA (5 μM), (B) CDCA (0.1 μM), (C) DCA (1 μM), (D) UDCA (1 μM), (E) LCA (0.01 μM), (F) GCA (2.5 μM), (G) GCDCA (1 μM), (H) GDCA (1 μM), (I) GUDCA (1 μM), (J) GLCA (0.2 μM), (K) TCA (1 μM), (L) TCDCA (0.5 μM), (M) TDCA (1 μM), (N) TUDCA (2.5 μM), (O) TLCA (0.2 μM). Each point represents the mean ± S.E. (n = 3). **p* < 0.05, significantly different from vector-transfected cells by Student's *t*-test.

第4節 OATP1B1 及び OATP1B3 を介した胆汁酸輸送の濃度依存性

次に、OATP1B1 及び OATP1B3 に対する胆汁酸の輸送特性を明らかにするために、濃度依存性試験を行った。

OATP1B1 及び OATP1B3 を介した CA、GCA、GCDCA、GDCA、GUDCA、GLCA、TCA、TCDCA、TDCA、TUDCA 及び TLCA の取り込みは濃度依存的に増加し、高濃度域で飽和が認められた (Figs. 7 and 8)。OATP1B1 に対する CA、GCA、GCDCA、GDCA、GUDCA、GLCA、TCA、TCDCA、TDCA、TUDCA 及び TLCA の Eadie-Hofstee plot から算出した見かけのミカエリス定数 (K_m) は、それぞれ 47.1 ± 0.6 、 14.7 ± 2.7 、 9.6 ± 1.9 、 4.6 ± 0.3 、 2.6 ± 0.1 、 0.74 ± 0.05 、 10.6 ± 0.3 、 2.9 ± 0.4 、 13.6 ± 2.5 、 5.2 ± 0.4 及び $0.84 \pm 0.07 \mu\text{M}$ であった (Table 1)。OATP1B3 に対する CA、GCA、GCDCA、GDCA、GUDCA、GLCA、TCA、TCDCA、TDCA、TUDCA 及び TLCA の K_m は、それぞれ 42.2 ± 0.9 、 15.3 ± 1.5 、 2.4 ± 0.1 、 5.6 ± 0.6 、 11.1 ± 0.7 、 0.52 ± 0.04 、 9.5 ± 0.9 、 1.5 ± 0.2 、 2.4 ± 0.1 、 8.3 ± 0.6 及び $0.47 \pm 0.09 \mu\text{M}$ であった (Table 1)。OATP1B1 及び OATP1B3 の胆汁酸に対する K_m を比較したところ、ほぼ同等の傾向であったが、GCDCA と TDCA に対する K_m は OATP1B3 の方が4-6倍高く、GUDCA では OATP1B1 の方が4倍高いことが判った (Fig. 9)。抱合型胆汁酸の K_m は、両トランスポーターで同等であり (OATP1B1: 0.74-14.7 μM 、OATP1B3: 0.47-15.3 μM)、CA の K_m (OATP1B1: 47.1 μM 、OATP1B3: 42.2 μM) と比べ低値であった。

また、OATP1B1 に対する CA、GCA、GCDCA、GDCA、GUDCA、GLCA、TCA、TCDCA、TDCA、TUDCA 及び TLCA の最大取り込み速度 (V_{max}) は、それぞれ 13.3 ± 1.5 、 3.5 ± 0.9 、 17.1 ± 9.7 、 47.1 ± 0.6 、 4.9 ± 1.0 、 3.7 ± 0.8 、 15.7 ± 2.1 、 2.6 ± 0.5 、 4.3 ± 1.0 、 14.8 ± 4.6 、 10.5 ± 2.1 及び $16.3 \pm 0.8 \text{ pmol/mg protein/min}$ であった

(Table 1)。OATP1B3 に対する CA、GCA、GCDCA、GDCA、GUDCA、GLCA、TCA、TCDCA、TDCA、TUDCA 及び TLCA の V_{\max} は、それぞれ 21.8 ± 1.7 、 4.0 ± 0.7 、 10.3 ± 0.4 、 3.5 ± 0.1 、 5.2 ± 1.7 、 15.0 ± 2.4 、 3.2 ± 0.9 、 8.7 ± 0.4 、 2.8 ± 0.2 、 6.6 ± 1.9 及び 9.5 ± 0.8 pmol/mg protein/min であった (Table 1)。また、 V_{\max}/K_m を比較すると、GLCA (OATP1B1: $21.5 \mu\text{L}/\text{mg protein}/\text{min}$ 、OATP1B3: $29.1 \mu\text{L}/\text{mg protein}/\text{min}$) 及び TLCA (OATP1B1: $19.6 \mu\text{L}/\text{mg protein}/\text{min}$ 、OATP1B3: $21.5 \mu\text{L}/\text{mg protein}/\text{min}$) が両トランスポーターに対して最も高い輸送効率を示すことが明らかとなった (Table 1)。

続いて、ヒト肝臓から調製した plasma membrane fraction における OATP1B1 及び OATP1B3 の絶対量 (OATP1B1: $2.74 \text{ pmol}/\text{mg protein}$ 、OATP1B3: $1.70 \text{ pmol}/\text{mg protein}$)⁶⁰⁾ を用いて、OATP1B1/HEK293 細胞及び OATP1B1/HEK293 細胞における OATP1B1 及び OATP1B3 の絶対量 (pmol) を western blotting にて算出したところ、それぞれ $1.39 \text{ pmol OATP1B1}/\text{mg protein}$ 及び $0.289 \text{ pmol OATP1B3}/\text{mg protein}$ であった (Fig. 10A)。さらに、得られた絶対量から算出した V_{\max}/K_m ($\mu\text{L}/\text{pmol OATP}/\text{min}$) を比較すると、GLCA (OATP1B1: $30.0 \mu\text{L}/\text{pmol OATP1B1}/\text{min}$ 、OATP1B3: $8.4 \mu\text{L}/\text{pmol OATP1B3}/\text{min}$) 及び TLCA (OATP1B1: $27.3 \mu\text{L}/\text{pmol OATP1B1}/\text{min}$ 、OATP1B3: $6.2 \mu\text{L}/\text{pmol OATP1B3}/\text{min}$) が両トランスポーターに対して最も高い輸送効率を示すことが明らかとなった (Table 1)。また、CA、GCA、GCDCA、GDCA、GUDCA、GLCA、TCA、TCDCA、TDCA、TUDCA 及び TLCA の V_{\max}/K_m ($\mu\text{L}/\text{pmol OATP}/\text{min}$) は、OATP1B1 の方が OATP1B3 と比較して 1.2–15.2 倍高いことが判った (Fig. 10B)。

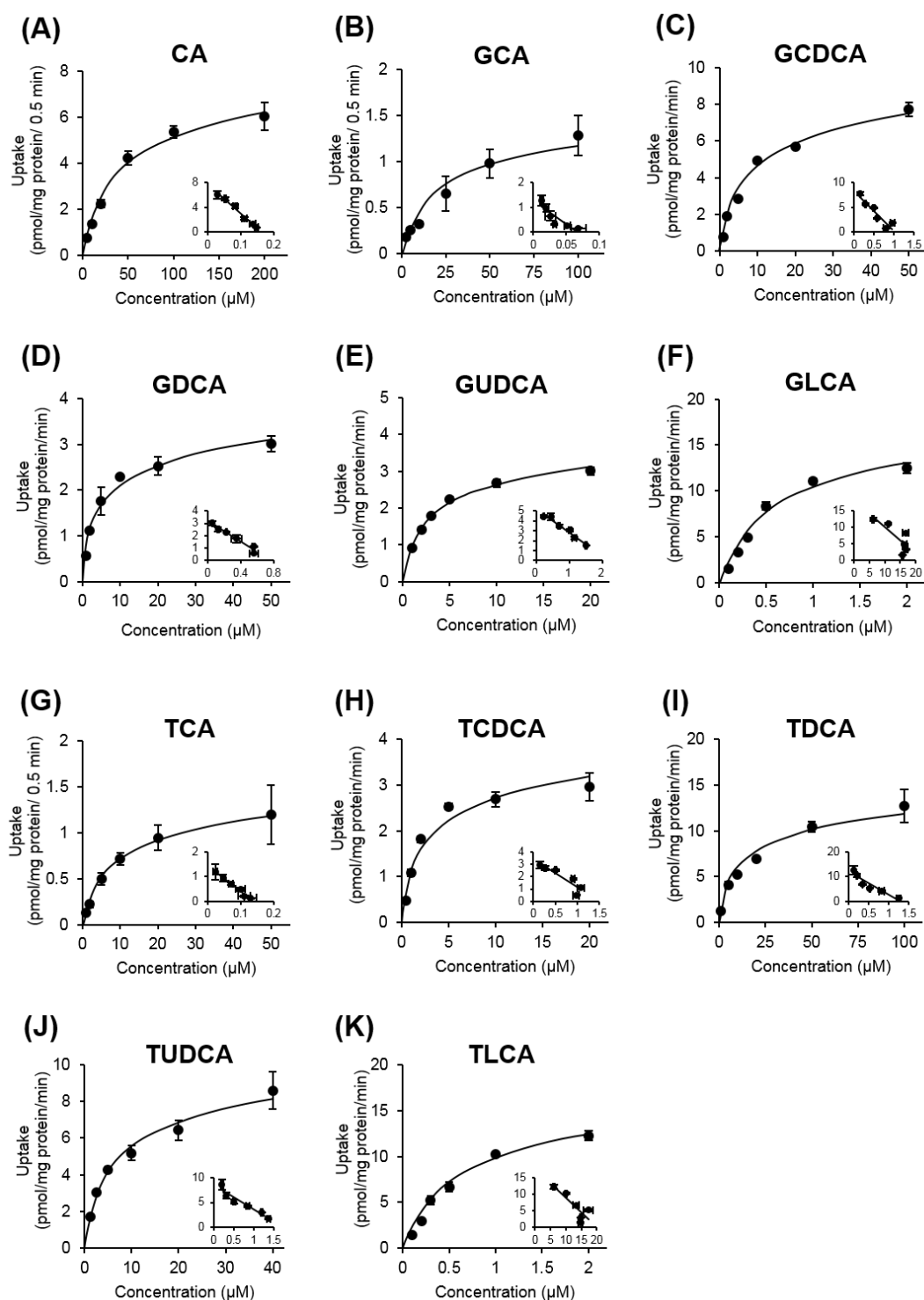


Fig. 7 Concentration-dependent uptake of bile acids by OATP1B1. OATP1B1-overexpressing HEK293 cells were incubated with bile acids at indicated concentrations at 37°C. OATP1B1-mediated uptake was calculated after subtraction of nonspecific uptake by mock cells. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3$). Inset: Eadie-Hofstee plots (X -axis, V/S ; Y -axis, V).

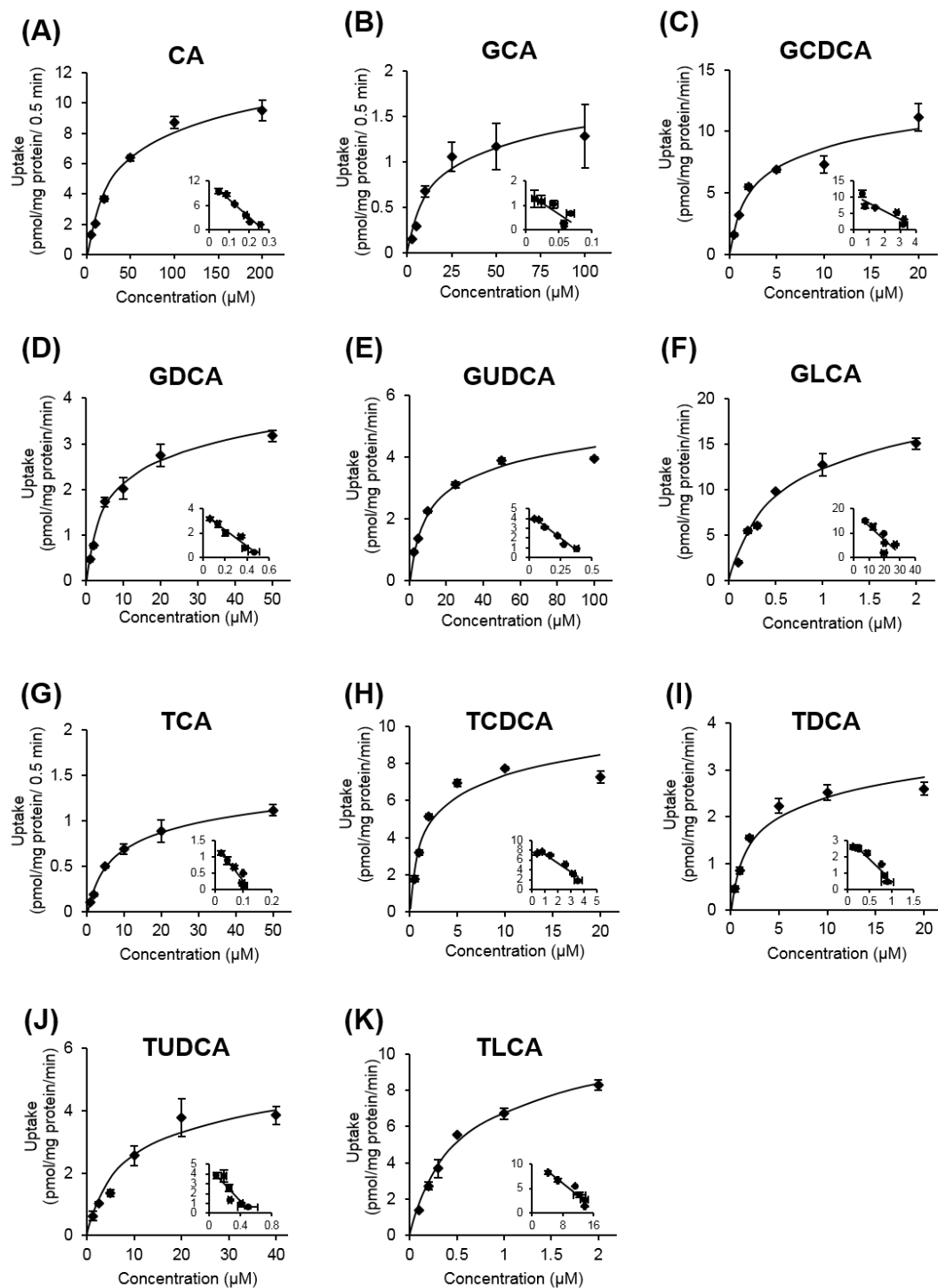


Fig. 8 Concentration-dependent uptake of bile acids by OATP1B3. OATP1B3-overexpressing HEK293 cells were incubated with bile acids at indicated concentrations at 37°C. OATP1B3-mediated uptake was calculated after subtraction of nonspecific uptake by mock cells. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3$). Inset: Eadie-Hofstee plots (X -axis, V/S ; Y -axis, V).

Table 1 Kinetic parameters of OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake of bile acids

Bile acids	OATP1B1				OATP1B3			
	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m	V_{max}/K_m	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m	V_{max}/K_m
	(μ M)	(pmol/mg protein/min)	(μ L/mg protein/min)	(μ L/pmol OATP1B1/min)	(μ M)	(pmol/mg protein/min)	(μ L/mg protein/min)	(μ L/pmol OATP1B3/min)
CA	47.1 \pm 0.6	13.3 \pm 1.5	0.28 \pm 0.03	0.39 \pm 0.04	42.2 \pm 0.9	21.8 \pm 1.7	0.52 \pm 0.03	0.15 \pm 0.01
CDCA	+	+	+	+	+	+	+	+
DCA	+	+	+	+	+	+	+	+
UDCA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
LCA	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
GCA	14.7 \pm 2.7	3.5 \pm 0.9	0.25 \pm 0.06	0.34 \pm 0.08	15.3 \pm 1.5	4.0 \pm 0.7	0.27 \pm 0.03	0.08 \pm 0.02
GCDCA	9.6 \pm 1.9	17.1 \pm 9.7	1.6 \pm 0.6	2.2 \pm 0.8	2.4 \pm 0.1	10.3 \pm 0.4	4.3 \pm 0.3	1.3 \pm 0.1
GDCA	4.6 \pm 0.3	4.9 \pm 1.0	1.0 \pm 0.1	1.4 \pm 0.2	5.6 \pm 0.6	3.5 \pm 0.1	0.63 \pm 0.06	0.18 \pm 0.02
GUDCA	2.6 \pm 0.1	3.7 \pm 0.8	1.5 \pm 0.4	2.0 \pm 0.5	11.1 \pm 0.7	5.2 \pm 1.7	0.46 \pm 0.13	0.13 \pm 0.04
GLCA	0.74 \pm 0.05	15.7 \pm 2.1	21.5 \pm 3.2	30.0 \pm 4.5	0.52 \pm 0.04	15.0 \pm 2.4	29.1 \pm 4.8	8.4 \pm 1.4
TCA	10.6 \pm 0.3	2.6 \pm 0.5	0.24 \pm 0.05	0.34 \pm 0.07	9.5 \pm 0.9	3.2 \pm 0.9	0.34 \pm 0.11	0.10 \pm 0.03
TCDCa	2.9 \pm 0.4	4.3 \pm 1.0	1.5 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2	8.7 \pm 0.4	6.1 \pm 0.5	1.8 \pm 0.2
TDCA	13.6 \pm 2.5	14.8 \pm 4.6	1.1 \pm 0.2	1.5 \pm 0.3	2.4 \pm 0.1	2.8 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1	0.33 \pm 0.02
TUDCA	5.2 \pm 0.4	10.5 \pm 2.1	2.0 \pm 0.3	2.8 \pm 0.4	8.3 \pm 0.6	6.6 \pm 1.9	0.78 \pm 0.19	0.22 \pm 0.05
TLCA	0.84 \pm 0.07	16.3 \pm 0.8	19.6 \pm 1.0	27.3 \pm 1.4	0.47 \pm 0.09	9.5 \pm 0.8	21.5 \pm 3.2	6.2 \pm 0.9

+: transported but K_m was not determined, NT: no significant transport was observed. Each data represents the mean \pm S.E. (n = 3).

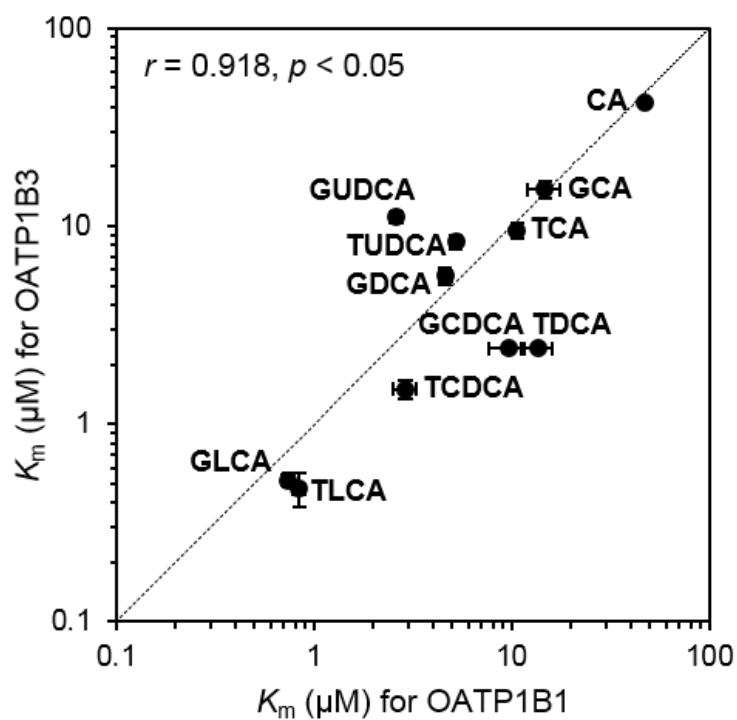


Fig. 9 Correlation in K_m values of bile acids for OATP1B1 and OATP1B3.

K_m values of bile acids for OATP1B1 are shown on the X-axis and those for OATP1B3 are shown on the Y-axis. Dotted line in the graph represents 1:1 correlation. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3$).

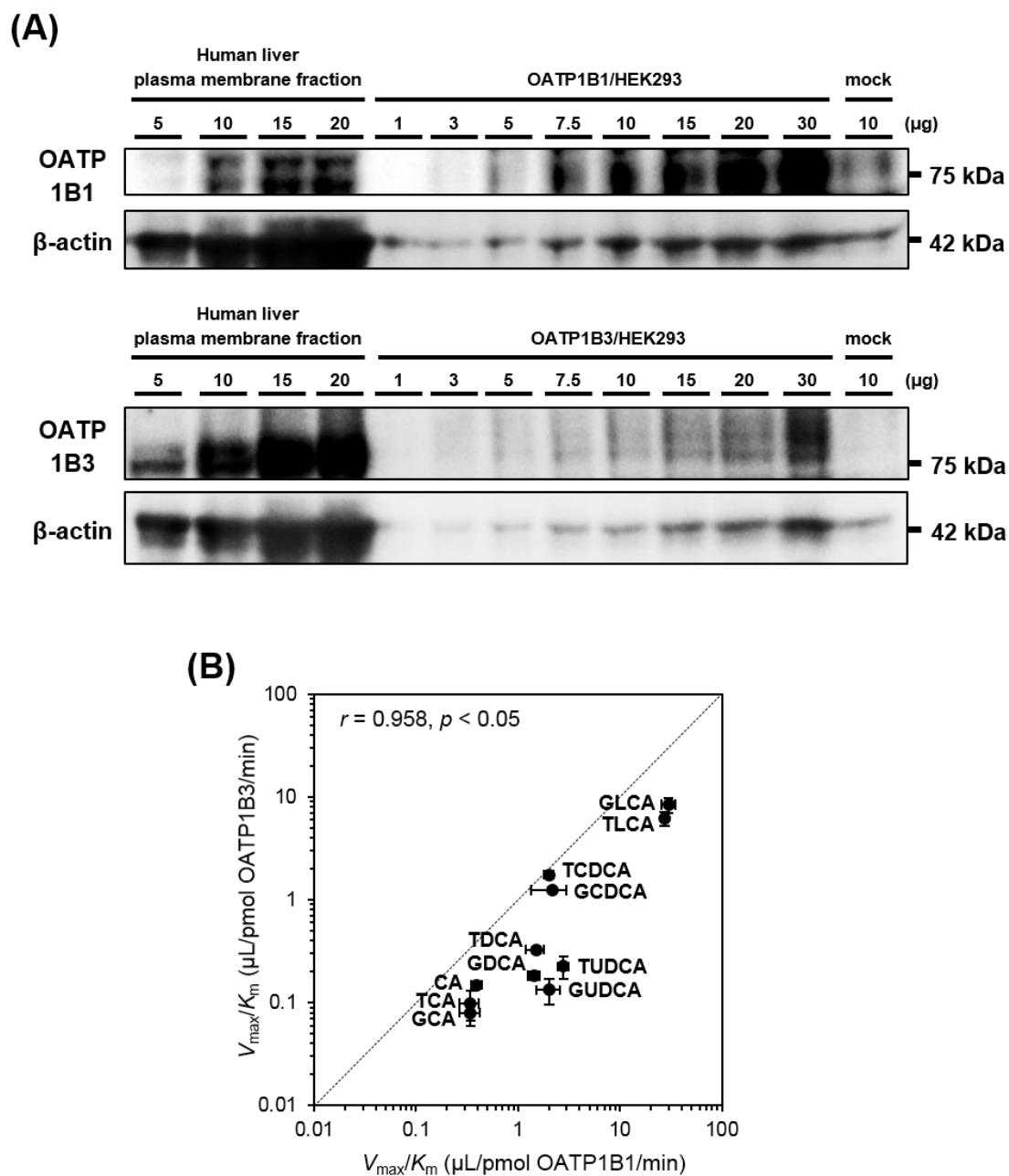


Fig. 10 Correlation in V_{max}/K_m values of bile acids for OATP1B1 and OATP1B3.

(A) Western blot analyses of OATP1B1, OATP1B3, and β -actin using human liver plasma membrane fraction, and crude membrane fraction of OATP1B1/HEK293, OATP1B3/HEK293 and mock cells. (B) V_{max}/K_m values of bile acids for OATP1B1 are shown on the X-axis and those for OATP1B3 are shown on the Y-axis. Dotted line in the graph represents 1:1 correlation. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3).

第5節 OST α/β を介した典型的基質の輸送に対する胆汁酸の影響

続いて、OST α/β を介した典型的基質の輸送に対する胆汁酸の影響を調べた。典型的基質として TCA を用い、各胆汁酸濃度を 100 μM に設定して細胞内取り込み実験を行った。その結果、グリシン抱合型及びタウリン抱合型胆汁酸の共存により、OST α/β を介した TCA の取り込みはそれぞれ 24–44% 及び 14–51% 低下した (Fig. 11)。一方で、遊離型胆汁酸のうち CDCA 及び DCA は OST α/β を介した TCA の取り込みをそれぞれ 57% 及び 52% 低下させ、CA、UDCA 及び LCA はそれぞれ 20%、17% 及び 37% 低下させた。以上より、検討した多くの遊離型胆汁酸及び抱合型胆汁酸は、OST α/β を介した TCA の輸送を高濃度条件で強く阻害することが判った。

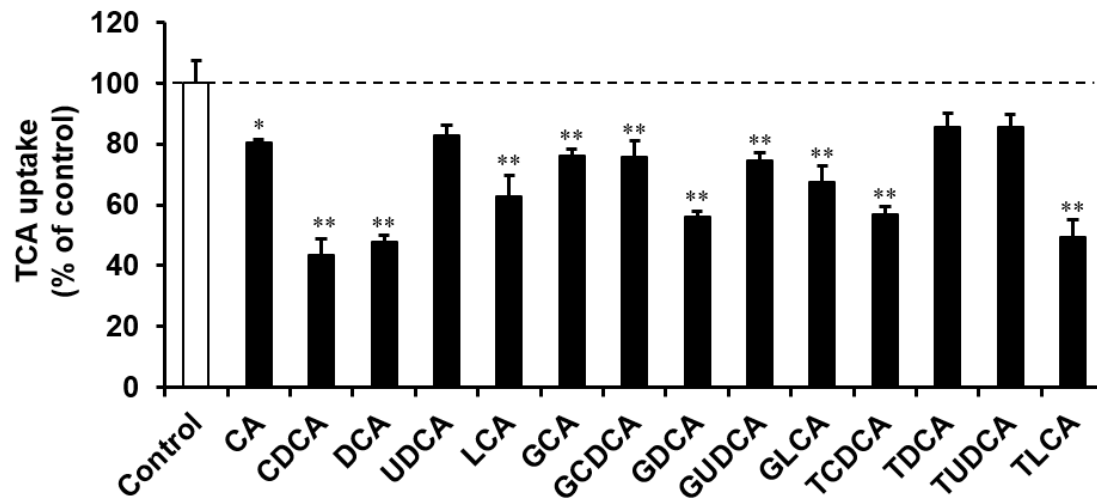


Fig. 11 Inhibition by unconjugated and conjugated bile acids of TCA uptake via OST α/β .

Cells were incubated with 10 μ M TCA at 37°C for 0.5 min in the presence of 100 μ M bile acids. The value for the 100% of control TCA uptake was 3.87 ± 0.29 pmol/mg protein. OST α/β -mediated uptake was calculated after subtraction of nonspecific uptake by mock cells. Each column represents the mean \pm S.E. (n = 3). ** $p < 0.01$, significantly different from control. * $p < 0.05$, significantly different from control.

第6節 OST α/β を介した胆汁酸輸送の時間依存性

次に、OST α/β 安定発現 MDCKII 細胞を用いて、15 種の胆汁酸の細胞内取り込み量の時間依存性を調べた。遊離型胆汁酸のうち CA、CDCA、DCA 及び LCA は、mock 細胞に比べて OST α/β 発現細胞において有意に取り込み量が上昇したものの、UDCA の有意な取り込み量の上昇は認められなかった (Fig. 12A-E)。一方、グリシン抱合型胆汁酸とタウリン抱合型胆汁酸は、いずれも OST α/β 発現細胞において有意な取り込み量の上昇が認められた (Fig. 12F-O)。取り込み時間 10 分で、OST α/β 発現細胞における CA (5 μ M)、CDCA (0.5 μ M)、DCA (1 μ M)、LCA (0.1 μ M)、GCA (5 μ M)、GCDCA (1 μ M)、GDCA (1 μ M)、GUDCA (5 μ M)、GLCA (1 μ M)、TCA (10 μ M)、TCDCA (1 μ M)、TDCA (1 μ M)、TUDCA (5 μ M) 及び TLCA (1 μ M) の取り込み量は、mock 細胞に比べてそれぞれ 5.1 倍、1.2 倍、1.2 倍、1.7 倍、3.3 倍、3.8 倍、5.6 倍、2.1 倍、5.1 倍、4.9 倍、4.2 倍、5.0 倍、2.2 倍及び 2.3 倍であった。また、CA (5 μ M)、CDCA (0.5 μ M)、DCA (1 μ M)、LCA (0.1 μ M)、GCA (5 μ M)、GCDCA (1 μ M)、GDCA (1 μ M)、GUDCA (5 μ M)、GLCA (1 μ M)、TCA (10 μ M)、TCDCA (1 μ M)、TDCA (1 μ M)、TUDCA (5 μ M) 及び TLCA (1 μ M) では OST α/β を介した取り込みが 30 秒まで直線的に増加した。そこで、以降の取り込み実験は、OST α/β を介する取り込みの初速度が評価可能である 30 秒で行った。

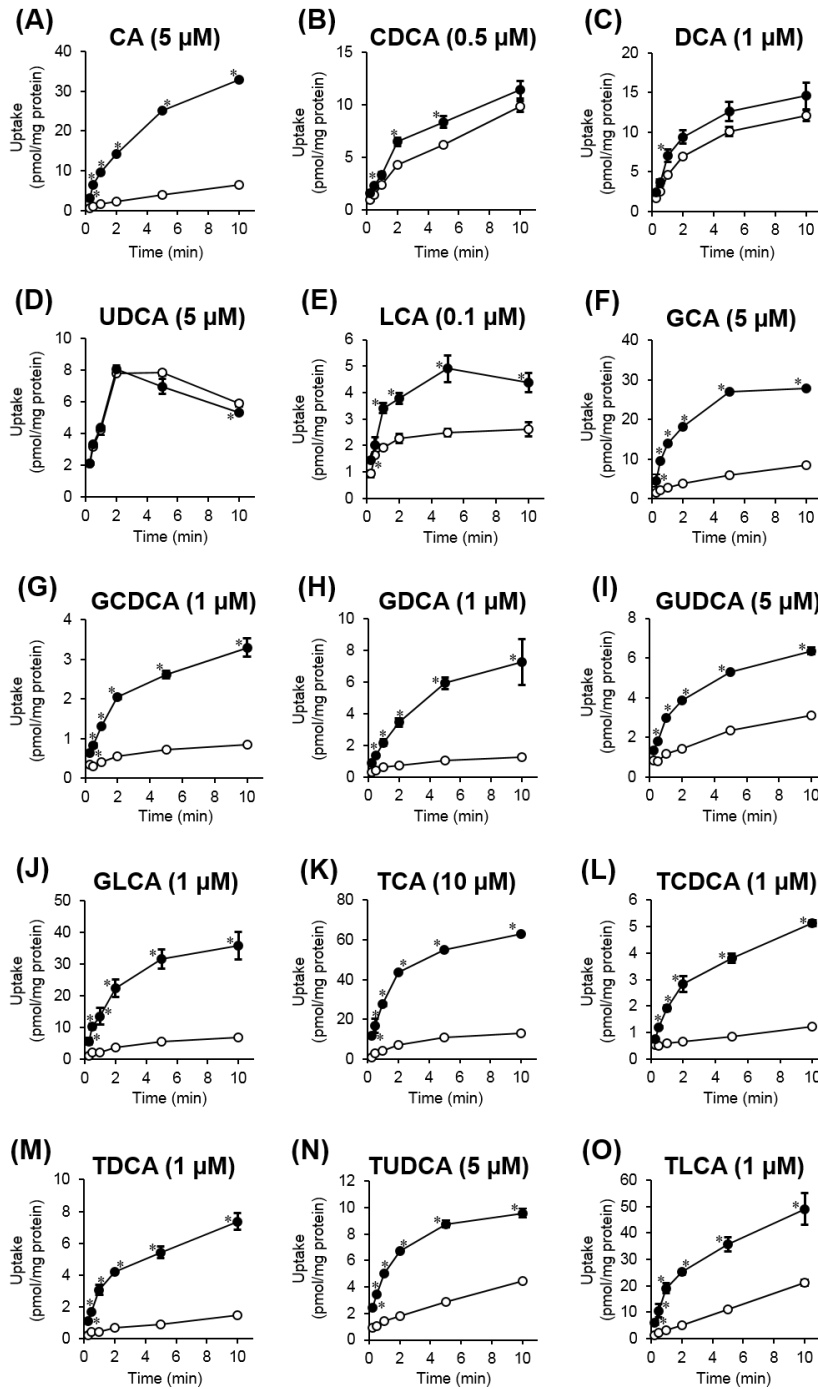


Fig. 12 Time-dependent uptake of bile acids by OST $\alpha\beta$.

OST $\alpha\beta$ /MDCKII (closed circles) and mock (open circles) cells were incubated for indicated times at 37°C. (A) CA (5 μ M), (B) CDCA (0.5 μ M), (C) DCA (1 μ M), (D) UDCA (5 μ M), (E) LCA (0.1 μ M), (F) GCA (5 μ M), (G) GCDCA (1 μ M), (H) GDCA (1 μ M), (I) GUDCA (5 μ M), (J) GLCA (1 μ M), (K) TCA (10 μ M), (L) TCDCA (1 μ M), (M) TDCA (1 μ M), (N) TUDCA (5 μ M), (O) TLCA (1 μ M). Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3). * $p < 0.05$, significantly different from control.

第7節 OST α/β を介した胆汁酸輸送の濃度依存性

次に、OST α/β に対する胆汁酸の輸送特性を明らかにするために、濃度依存性試験を行った。

OST α/β を介した CA、CDCA、DCA、GCA、GCDCA、GDCA、GUDCA、GLCA、TCA、TCDCA、TDCA、TUDCA 及び TLCA の取り込みは濃度依存的に増加した (Fig. 13)。OST α/β に対する CA、CDCA、DCA、GCA、GCDCA、GDCA、GUDCA、GLCA、TCA、TCDCA、TDCA、TUDCA 及び TLCA の Eadie-Hofstee plot から算出した見かけの K_m は、それぞれ > 400 、 23.0 ± 4.0 、 14.9 ± 1.9 、 > 1000 、 864 ± 81 、 586 ± 43 、 > 1000 、 12.8 ± 0.5 、 > 10000 、 724 ± 5 、 > 2000 、 > 2000 及び $23.9 \pm 0.3 \mu\text{M}$ であった (Table 2)。OST α/β の胆汁酸に対する K_m を比較したところ、遊離型胆汁酸の CDCA と DCA の方がそれらの抱合型胆汁酸より低値を示した。また、水酸基の結合数が少ない胆汁酸ほど K_m が低値を示す傾向にあることが判った。

また、OST α/β に対する CDCA、DCA、GCDCA、GDCA、GLCA、TCDCA 及び TLCA の V_{\max} は、それぞれ 136 ± 34 、 107 ± 17 、 1448 ± 78 、 993 ± 103 、 237 ± 34 、 1824 ± 25 及び $818 \pm 82 \text{ pmol/mg protein/0.5 min}$ であった (Table 2)。また、 V_{\max}/K_m を比較すると、GLCA ($18.7 \mu\text{L/mg protein/0.5 min}$) 及び TLCA ($33.3 \mu\text{L/mg protein/0.5 min}$) が OST α/β に対して最も高い輸送効率を示すことが明らかとなった (Table 2)。

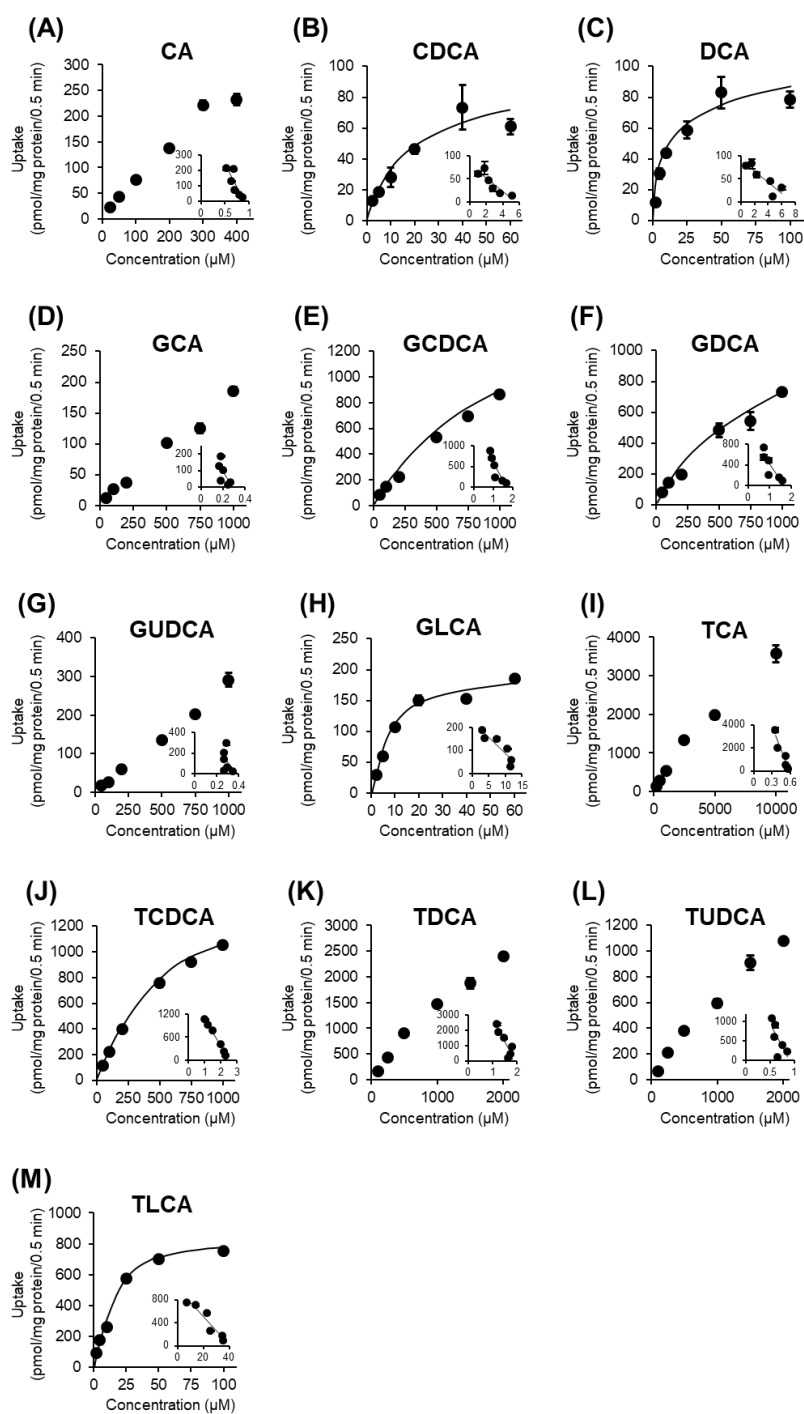


Fig. 13 Concentration-dependent uptake of bile acids by OST α/β .

OST α/β /MDCKII cells were incubated with bile acids at the indicated concentrations for 0.5 min at 37°C in the presence of (A) CA, (B) CDCA, (C) DCA, (D) GCA, (E) GCDCA, (F) GDCA, (G) GUDCA, (H) GLCA, (I) TCA, (J) TCDCA, (K) TDCA, (L) TUDCA, (M) TLCA. OST α/β -mediated uptake was calculated after subtraction of nonspecific uptake by mock cells. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 3). Inset: Eadie-Hofstee plots (X-axis, V/S; Y-axis, V).

Table 2 Kinetic parameters of OST α/β -mediated uptake of bile acids

Bile acids	K_m (μ M)	V_{max} (pmol/mg protein/0.5 min)	V_{max}/K_m (μ L/mg protein/0.5 min)
CA	> 400	+	+
CDCA	23.0 \pm 4.0	136 \pm 34	5.83 \pm 0.70
DCA	14.9 \pm 1.9	107 \pm 17	7.11 \pm 0.46
UDCA	NS	NS	NS
LCA	+	+	+
GCA	> 1000	+	+
GCDCA	864 \pm 81	1448 \pm 78	1.69 \pm 0.06
GDCA	586 \pm 43	993 \pm 103	1.70 \pm 0.14
GUDCA	> 1000	+	+
GLCA	12.8 \pm 0.5	237 \pm 34	18.7 \pm 3.3
TCA	> 10000	+	+
TCDCA	724 \pm 5	1824 \pm 25	2.52 \pm 0.03
TDCA	> 2000	+	+
TUDCA	> 2000	+	+
TLCA	23.9 \pm 0.3	818 \pm 82	33.3 \pm 4.5

+: transported but K_m was not determined, NS: no significant transport was observed. Each data represents the mean \pm S.E. (n = 3).

第 8 節 考察

本章では OATP1B1、OATP1B3 及び OST α/β を介したヒトの主要胆汁酸 15 化合物の輸送特性を明らかにした。検討した胆汁酸の中で、これらのトランスポーターの基質となるものや一方で基質とならないものがあり、また胆汁酸間で輸送特性に相違が認められたことから、個々の胆汁酸動態における各トランスポーターの寄与が異なることが示唆された。

OATP1B1 及び OATP1B3 を介した胆汁酸の輸送特性

これまでに、CA、GCA、TCA、GCDCA、TCDCA、GDCA、TDCA、GUDCA 及び TUDCA については、OATP1B1 あるいは OATP1B3 の過剰発現細胞を用いた取り込み実験による輸送の検討が行われている^{47-51,61-65)}。しかしながら、CA 及び TCA は OATP1B3 の基質とならないとする報告⁴⁶⁾もあり、議論の余地が残されていた。本研究により、グリシン抱合型及びタウリン抱合型胆汁酸と、UDCA 及び LCA を除く遊離型胆汁酸が OATP1B1 及び OATP1B3 の輸送基質であることが明らかとなった (Table 3)。相違が認められた原因として、トランスポーター発現細胞株に用いた細胞種やトランスポーターの細胞膜発現量、トランスポーターへの糖鎖修飾の影響が考えられる。実際に、 K_m を比較すると HEK293 細胞同士では OATP1B1 を介した CA の輸送で最大 4.1 倍の相違が認められたが、異なる細胞種間 (HEK293 細胞と MDCKII 細胞) では OATP1B3 を介した TCA の輸送で最大 12 倍の相違が認められた (Table 3)。

Table 3 K_m values of OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake of bile acids

Bile acids	Expression system	OATP1B1	OATP1B3	Reference
		K_m (μ M)	K_m (μ M)	
CA	HEK293	47.1 \pm 0.6	42.2 \pm 0.9	Present study 46)
	HEK293	11.4		
	Oocyte		41.8	48)
CDCA	HEK293	+	+	Present study
DCA	HEK293	+	+	Present study
UDCA	HEK293	NT	NT	Present study
LCA	HEK293	NT	NT	Present study
GCA	HEK293	14.7 \pm 2.7	15.3 \pm 1.5	Present study 48)
	Oocyte		43.4	
	Oocyte	ND	ND	64)
	Trophoblast	ND	ND	65)
GCDCA	HEK293	9.6 \pm 1.9	2.4 \pm 0.1	Present study 65)
	Trophoblast	ND	ND	
GDCA	HEK293	4.6 \pm 0.3	5.6 \pm 0.6	Present study
GUDCA	HEK293	2.6 \pm 0.1	11.1 \pm 0.7	Present study 51)
	HEK293	5.17	24.7	
GLCA	HEK293	0.74 \pm 0.05	0.52 \pm 0.04	Present study
TCA	HEK293	10.6 \pm 0.3	9.5 \pm 0.9	Present study 46)
	HEK293	10.0		
	HEK293	33.8		49)
	HEK293	8.52		61)
	HEK293	21.3		62)
	HEK293	ND	ND	63)
	Oocyte	13.6		39)
	Oocyte		5.8 \pm 1.2	47)
	Oocyte		42.2	48)
	Oocyte	ND	ND	64)
MDCKII		112	50)	
TCDCA	HEK293	2.9 \pm 0.4	1.5 \pm 0.2	Present study 48)
	Oocyte	ND	ND	
TDCA	HEK293	13.6 \pm 2.5	2.4 \pm 0.1	Present study 48)
	Oocyte	ND	ND	
TUDCA	HEK293	5.2 \pm 0.4	8.3 \pm 0.6	Present study 51)
	HEK293	7.47	15.9	
TLCA	HEK293	0.84 \pm 0.07	0.47 \pm 0.09	Present study

ND: no data, +: transported but K_m was not determined, NT: no significant transport was observed. Each data represents the mean \pm S.E. (n = 3).

OATP1B1 と OATP1B3 の胆汁酸に対する K_m を比較したところ、ほぼ同等の値を示す傾向にあった (Fig. 9)。OATP1B1 と OATP1B3 はアミノ酸レベルでの相同性が 80%程度であるために、基質親和性には検討した胆汁酸の間で大きな差異がなかったものと考えられる。一方、抱合型胆汁酸 (GCA 及び TCA) の方が遊離型胆汁酸 (CA) より低い K_m を示し、OATP1B1 と OATP1B3 の胆汁酸に対する K_m は、水酸基の結合数が少ない胆汁酸ほど低値を示した。したがって、胆汁酸の抱合基や水酸基が OATP1B1 及び OATP1B3 を介した胆汁酸の輸送特性に影響していると考えられる。また、興味深いことに、抱合型胆汁酸の K_m (OATP1B1: 0.74–14.7 μM 、OATP1B3: 0.47–15.3 μM) は、OATP1B1 及び OATP1B3 の典型的基質であるロスバスタチンの K_m (OATP1B1: 4.0–7.3 μM 、OATP1B3: 9.8 μM)⁶⁶⁾ や TCA の K_m (OATP1B1: 10.6 μM 、OATP1B3: 9.5 μM) と同程度の値を示した。したがって、血中の抱合型胆汁酸が高濃度条件となった時、OATP1B1 及び OATP1B3 を介した薬物と胆汁酸あるいは胆汁酸間の相互作用が起りうることが示唆された。

OATP1B1 及び OATP1B3 は脂溶性の高い胆汁酸に対して高い輸送効率を示した (V_{\max}/K_m : 抱合型 LCA > 抱合型 CDCA、抱合型 DCA、抱合型 UDCA > 抱合型 CA) (Table 1)。この胆汁酸間の輸送効率の相違は、胆汁酸の水酸基の結合数と関連が見られた (V_{\max}/K_m : monohydroxy bile acids > dihydroxy bile acids > trihydroxy bile acids)。胆汁酸は高濃度条件で細胞毒性作用を示し、細胞膜の損傷やミトコンドリアの酸化ストレス、小胞体媒介アポトーシスを引き起こすことが報告されている⁶⁷⁾。また、この細胞毒性作用の程度は、胆汁酸の水酸基の結合数が少ないほど大きい⁶⁸⁾ (monohydroxy bile acids > dihydroxy bile acids > trihydroxy bile acids)。さらに、水酸基の結合数が少なく脂溶性の高い胆汁酸は、肝実質細胞内で硫酸抱合⁶⁹⁾あるいはグルクロン酸抱合⁷⁰⁾を受けることで、その

細胞毒性作用が軽減される。したがって、OATP1B1 及び OATP1B3 は脂溶性の高い胆汁酸を細胞内に輸送し、その細胞毒性作用の軽減に関与している可能性が考えられた。

胆汁酸の肝取り込みにおける OATP1B1、OATP1B3 及び NTCP の役割

胆汁酸の肝取り込みを担う OATP1B1、OATP1B3 及び NTCP の胆汁酸に対する K_m を比較したところ、OATP1B1 及び OATP1B3 の GDCA 及び TDCA を除く各胆汁酸に対する K_m は、NTCP と比較してやや低値をであり、かつ広範囲の値を示した (Fig. 14)。特に OATP1B1 及び OATP1B3 の GLCA 及び TLCA に対する K_m は、NTCP と比較しておよそ 1/14–1/7 と低値を示した。この結果から、OATP1B1 及び OATP1B3 は、ともに胆汁酸に対して NTCP と同等以上の親和性があり、特に脂溶性の高い抱合型胆汁酸を優先的に輸送する可能性が考えられた。

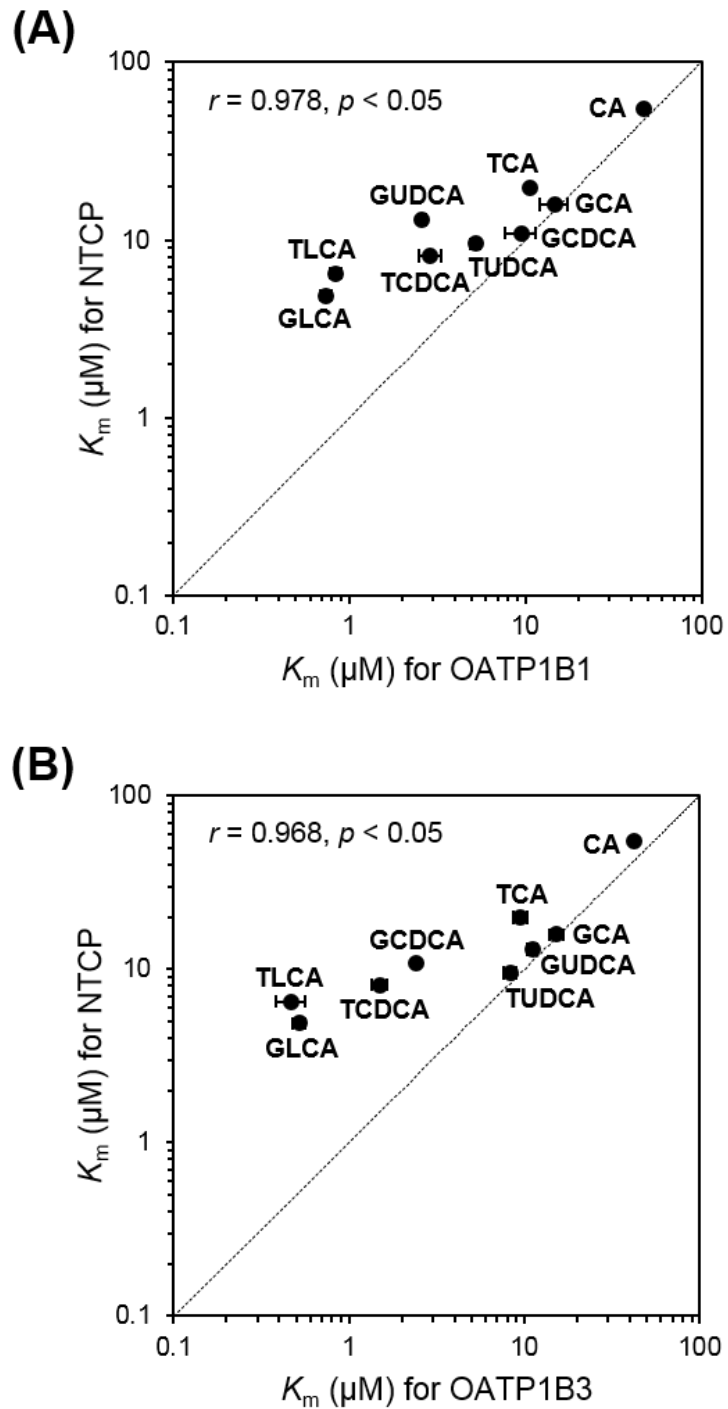


Fig. 14 Comparison of K_m values of bile acid transport for OATP1B1, OATP1B3, and NTCP.

(A) K_m values of bile acids for OATP1B1 are shown on the X-axis, and those for NTCP cited from the previous report ⁴⁵⁾ are shown on the Y-axis; (B) K_m values of bile acids for OATP1B3 are shown on the X-axis, and those for NTCP are shown on the Y-axis. Dotted line in the graphs represents 1:1 correlation. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 3$).

これまでに、ラット Ntcp は抱合型胆汁酸 (TCA) の肝取り込みの 80%以上、遊離型胆汁酸 (CA) の肝取り込みの 50%以下に寄与することが報告されている^{44,71,72)}。また、ヒト OATP1B1 及び OATP1B3 と高い相同性を有する Oatp1b2 のノックアウトマウスでは、野生型マウスと比べて、血中の遊離型胆汁酸 (CA、DCA 及び UDCA) 濃度が上昇することが報告されている⁷³⁾。こうした背景から、Na⁺非依存的な肝取り込みは、主に遊離型胆汁酸の取り込みを担う機構として認識されてきた。しかしながら、本研究の *in vitro* 実験系では、OATP1B1 及び OATP1B3 を介した CDCA 及び DCA の輸送は低濃度条件でわずかに認められたにすぎず、UDCA 及び LCA は OATP1B1 及び OATP1B3 を介した輸送が認められなかった (Fig. 6B-E)。したがって、ヒト OATP1B1 及び OATP1B3 を介した Na⁺非依存的な肝取り込みは、抱合型胆汁酸と一部の遊離型胆汁酸の輸送に関与していることが示唆された。一方、胆汁酸アナログを用いた *in vivo* でのラット肝取り込み実験により、胆汁酸アナログ濃度が肝小葉の門脈から中心静脈に向かって低下するという濃度勾配が認められることが報告されている⁷⁴⁾。この所見は、胆汁酸が中心静脈周辺よりも門脈周辺の肝実質細胞において能動的に取り込まれることを示唆している。ラット Ntcp は肝小葉の全域に発現しており⁷⁵⁾、ヒト NTCP も同様であると想定される。一方で、OATP1B1 も肝小葉の全域に発現しているのに対し、OATP1B3 は中心静脈周辺の肝実質細胞に高発現している^{47,76,77)}。さらに、ヒト肝臓の plasma membrane fraction におけるこれらのトランスポーターのタンパク質発現量は、NTCP (5.54 pmol/mg protein) > OATP1B1 (2.74 pmol/mg protein) > OATP1B3 (1.70 pmol/mg protein) の順に小さい⁶⁰⁾。これらトランスポーターの肝小葉における特異的な発現分布が特定の生理機能とどのような関連があるかは不明であるが、本研究では、抱合型胆汁酸の方が遊離型胆汁酸よりも OATP1B1 及び OATP1B3 に対して比較的高い輸送効率を示すことを明らかにし

た (Table 1)。したがって、抱合型胆汁酸は門脈周辺の肝実質細胞において NTCP だけでなく OATP1B1 を介しても取り込まれ、その下流で相対的に高濃度となった遊離型胆汁酸が中心静脈周辺の肝実質細胞において NTCP、OATP1B1 及び OATP1B3 を介して取り込まれることが示唆された。以上より、OATP1B1 及び OATP1B3 は、一部の遊離型胆汁酸とグリシン抱合型及びタウリン抱合型胆汁酸の肝取り込みを部分的に担う可能性が考えられた。さらに、OATP1B1 及び OATP1B3 の単分子あたりの胆汁酸輸送効率は、OATP1B1 の方が OATP1B3 と比較して 1.2–15.2 倍高い値を示したことから (Fig. 10B)、CA とグリシン抱合型及びタウリン抱合型胆汁酸の肝取り込みにおいて、OATP1B1 の方が OATP1B3 よりも寄与が大きいことが示唆された。

OST α/β を介した胆汁酸の輸送特性

OST α/β は回腸粘膜上皮細胞の基底膜側に発現し、胆汁酸の腸肝循環を担うことが知られている。しかしながら、実際はヒト OST α/β が基質とする胆汁酸の報告は TCA に限られている^{53,78)}。本研究により、グリシン抱合型及びタウリン抱合型胆汁酸と、UDCA と LCA を除く遊離型胆汁酸が OST α/β の輸送基質であることが明らかとなった。

OST α/β の胆汁酸に対する K_m を比較したところ、遊離型胆汁酸の CDCA と DCA の方がそれらの抱合型胆汁酸よりも低値を示し、OST α/β の胆汁酸に対する K_m は、水酸基の結合数が少ない胆汁酸ほど低値を示した (Table 2)。したがって、胆汁酸の抱合基や水酸基が OST α/β を介した胆汁酸の輸送特性に影響していると考えられる。一方、OST α/β は脂溶性の高い胆汁酸に対して高い輸送効率を示した (V_{max}/K_m : 抱合型 LCA > 抱合型 CDCA、抱合型 DCA) (Table 2)。この結果から、OST α/β は脂溶性が高く細胞毒性作用の強い胆汁酸を優先的に輸送するこ

とが示唆された。

胆汁酸の消化管吸収における OST α/β の役割

胆汁酸は回腸にて主に Na⁺依存性の ASBT を介して吸収され、回腸粘膜上皮細胞内にて ileal bile acid binding protein と結合し、OST α/β を介して門脈血中に輸送される。ヒト回腸内腔の総胆汁酸濃度は 2–10 mM であるのに対し⁷⁹⁾、ヒト門脈血中の GCA、GCDCA、GDCA、TCA、TCDCA 及び TDCA 濃度はそれぞれ 2.09、1.24、0.84、1.16、0.85 及び 0.49 μ M と報告されている⁸⁰⁾ (Table 4)。こうした背景から、回腸粘膜上皮細胞内の胆汁酸濃度は不明であるが、これらの胆汁酸は OST α/β の発現する細胞内表面付近に μ mol レベルの量で存在する可能性が考えられる。一方、ASBT は GCA、GCDCA、GDCA、TCA、TCDCA 及び TDCA に対して高親和性⁸¹⁾ (K_m はそれぞれ 11.0、0.662、1.10、4.39、 < 0.1 及び 0.497 μ M) であるのに対し (Table 4)、OST α/β は低親和性 (K_m はそれぞれ > 1000 、864、586、 > 10000 、723 及び > 2000 μ M) であった。したがって、OST α/β は、ASBT を介した輸送により回腸粘膜上皮細胞内量が制御された胆汁酸を効率的に血管側へ排出している可能性が考えられ、胆汁酸の消化管吸収の効率化に寄与することが示唆された。

胆汁酸の肝実質細胞外への排出における OST α/β の役割

通常、ヒトの肝臓における OST β の発現量は小腸や腎臓における発現量と比べて低く、マウスの肝臓においては OST α 及び OST β とともにきわめて低い^{53,78)}。しかしながら、胆汁うっ滞などの肝実質細胞内に胆汁酸が蓄積する病態では、OST α/β の発現が増加することが報告されている⁷⁸⁾。OST α/β は、胆汁酸に対して、肝実質細胞の胆汁酸排出トランスポーターである BSEP⁸²⁾ や ABCC4⁸³⁾ と比

較して低親和性であったことから (Table 4)、肝実質細胞内の胆汁酸濃度が高濃度条件となった時に血管側への胆汁酸排出を促進する役割を担うことが示唆された。

Table 4 K_m values of human transporter-mediated transport of bile acids

Bile acids	Transporter affinity							Human portal serum concentration (μM) ⁸⁰⁾
	K_m (μM)							
	OATP1B1	OATP1B3	NTCP ⁴⁵⁾	OST α/β	ASBT ⁸¹⁾	BSEP ⁸²⁾	ABCC4 ⁸³⁾	
CA	47.1	42.2	54.9	> 400	15.1	–	14.8	–
CDCA	+	+	NS	23.0	NS	–	–	–
DCA	+	+	–	14.9	NS	–	–	–
UDCA	NS	NS	1.55	NS	NS	–	–	–
LCA	NS	NS	NS	+	NS	–	–	–
GCA	14.7	15.3	15.8	> 1000	11.0	21.7	25.8	2.09
GCDCA	9.6	2.4	10.9	864	0.662	7.5	5.9	1.24
GDCA	4.6	5.6	–	586	1.10	–	6.7	0.84
GUDCA	2.6	11.1	13.0	> 1000	11.5	–	12.5	–
GLCA	0.74	0.52	4.87	12.8	< 0.1	–	–	–
TCA	10.6	9.5	19.8	> 10000	4.39	6.2	7.7	1.16
TCDC	2.9	1.5	8.12	724	< 0.1	6.6	3.6	0.85
TDCA	13.6	2.4	–	> 2000	0.497	–	–	0.49
TUDCA	5.2	8.3	9.53	> 2000	10.3	–	7.8	–
TLCA	0.84	0.47	6.50	23.9	8.43	–	–	–

NS indicates not substrate due to high passive permeability or possibly not a substrate. +: transported but K_m was not determined.

本研究における限界

本研究では OATP1B1 及び OATP1B3 安定発現 HEK293 細胞、OST α/β 安定発現 MDCKII 細胞を用いて、OATP1B1、OATP1B3 及び OST α/β を介した胆汁酸の輸送特性を調べたが、生体内でのトランスポーターの輸送活性を必ずしも反映していない。そのため、*in vitro* 実験系で得られた知見を活用するには次の 2 点を考慮する必要がある。

1) 胆汁酸の肝取り込みにおける OATP1B1 及び OATP1B3 の寄与率

胆汁酸の肝取り込みにおける各トランスポーターの寄与率は不明である。今後、ヒトの初代培養肝細胞などを用いて NTCP を介した Na⁺依存的な取り込みと、OATP1B1 及び OATP1B3 など介した Na⁺非依存的な取り込みの肝取り込みにおける寄与を個々の胆汁酸について調べる必要があると考えられる。また、ヒトの胆汁酸動態におけるトランスポーターの重要性を示すには、*in vivo* 動態解析やトランスポーターのノックアウト動物を用いた検討により、トランスポーターを介した各種胆汁酸輸送の寄与を明らかにする必要がある。

2) トランスポーターの輸送活性に影響する要因

本研究で得られた K_m 及び V_{max} というパラメーターは、基質親和性や輸送効率の指標として活用することができるが、生体内でのトランスポーターの輸送活性を必ずしも反映していない。トランスポーターの輸送活性に影響する要因として、本研究で明らかにした基質親和性や輸送効率だけでなく、タンパク質発現量、細胞膜局在、駆動力、基質のタンパク結合率 (非結合型分率) や受動拡散速度などについても考慮する必要があると考えられる。

第9節 小括

本章ではトランスポーター安定発現細胞株を用いた輸送実験により、OATP1B1、OATP1B3 及び OST α/β を介した胆汁酸 15 化合物の輸送特性を評価した。

まず、OATP1B1 及び OATP1B3 安定発現 HEK293 細胞を用いて、胆汁酸の細胞内取り込み量の時間依存性を調べた。その結果、遊離型胆汁酸のうち CA、CDCA 及び DCA は、OATP1B1 及び OATP1B3 を介した有意な取り込みが認められたものの、UDCA 及び LCA の有意な取り込みは認められなかった。一方、グリシン抱合型胆汁酸とタウリン抱合型胆汁酸は、いずれも OATP1B1 及び OATP1B3 を介した有意な取り込みが認められた。次に濃度依存性試験を行い、速度論的パラメーターを算出することで、グリシン抱合型胆汁酸及びタウリン抱合型胆汁酸は OATP1B1 及び OATP1B3 の良好な基質であり、遊離型胆汁酸に比べて高親和性を示すことを明らかにした。

次に、OST α/β 安定発現 MDCKII 細胞を用いて、胆汁酸の細胞内取り込み量の時間依存性を調べた。その結果、遊離型胆汁酸のうち CA、CDCA、DCA 及び LCA は、OST α/β を介した有意な取り込みが認められたものの、UDCA の有意な取り込みは認められなかった。一方、グリシン抱合型胆汁酸とタウリン抱合型胆汁酸は、いずれも OST α/β を介した有意な取り込みが認められた。次に濃度依存性試験を行い、速度論的パラメーターを算出することで、OST α/β が胆汁酸に低親和性を示す傾向にあったが、なかでも脂溶性の高い胆汁酸には比較的高親和性を示すことを明らかにした。

以上より、OATP1B1、OATP1B3 及び OST α/β を介した遊離型胆汁酸及び抱合型胆汁酸の輸送特性を評価し、検討した胆汁酸の間で輸送特性に多様性がある

ことを明らかにした。本知見は、胆汁酸個々の動態におけるトランスポーターの重要性を示唆するものであり、基質間の相互作用を考察するうえで有用であると考えられる。

第2章 NASHの病態進行における胆汁酸動態の解明

第1節 序

序論で述べたように、NASHの治療戦略を創出するための基盤的情報として、その病態進行メカニズムを詳細に理解することは重要な課題である。NASHは単純性脂肪肝と比較して予後不良であることや⁸⁴⁾、肝線維化の有無がNAFLDの予後規定因子であることが報告されている⁸⁵⁾。したがって、NASHの治療戦略を創出するうえで着目すべきは、炎症と肝線維化である。これまでにNASH病態時における一部の胆汁酸の変動やトランスポーターの発現変動が報告されている^{33,86)}。しかしながら、脂肪肝から肝線維化を伴うNASHにまで至る病態進行時の経時的な胆汁酸の変動はほとんど明らかにされていない。こうした背景から、本研究では、NASHの病態進行メカニズムを詳細に理解するために、炎症と肝線維化を呈するモデルを用いて胆汁酸動態との関連を明らかにすることとした。

NASHモデル動物はこれまでに遺伝子改変や薬物毒性によるもの、食餌誘発性のモデルなど様々報告されている⁸⁷⁾。例えば、摂食抑制作用をもつホルモンであるレプチンを欠損したobese (ob/ob)マウスやその受容体を欠損したdiabetes (db/db)マウスでは、過食に伴う肥満、インスリン抵抗性、そして脂肪肝を誘発することができるが⁸⁸⁾、レプチンシグナルは肝線維化に重要な役割を担うため、線維化を伴うNASHにまで進展しない⁸⁹⁾。一方で、肝臓からの超低密度リポタンパク質の分泌に必要なメチオニン及びコリンを欠乏させた飼料(MCD)を使用したモデルは、NASHモデルとして広く用いられている。本モデルは表現型が著明なるい瘦となる栄養障害モデルであり、インスリン抵抗性を

伴わないものの⁹⁰⁾、比較的短期間で線維化を伴う NASH に進展する。メチオニン
を完全欠乏させるのではなく、減量に留めたメチオニン減量コリン欠乏高脂
肪食 (CDAHFD) を使用したモデルは、MCD の問題点である体重減少を抑える
ことができる⁹¹⁾。NASH 患者は肥満を呈することが多いことから、CDAHFD 給
餌により線維化を伴う NASH を誘発させたモデルが本研究に適すると考えた。

以上の背景から、本章では肝線維化の進展を経時的に認めるモデルマウスを
用いて、NASH の病態進行と胆汁酸動態との関連を明らかにすることを目的と
した。

第2節 NASH モデルマウスの作製と病態評価

まず、NASH の病態進行に伴い肝線維化を認めるモデルを作製するため、Matsumoto らの方法⁹¹⁾に基づき、C57BL/6J 雄性マウスに CDAHFD を 3、6、9、12 及び 15 週間自由摂食させた後、犠死を行った (Fig. 15A)。体重はコントロール群に比べて、CDAHFD 給餌群において給餌 1 週目より有意に低下したが、その後は増加傾向にあった (Fig. 15B)。エネルギー換算した摂食量は両群間で有意な差はなかった (Fig. 15C)。体重あたりの肝臓重量はコントロール群に比べて、CDAHFD 給餌群において有意に増加した (Fig. 15D)。肝臓の TG 及び総コレステロール量は CDAHFD 給餌群において給餌 6 週目をピークに有意に増加していたが、給餌 9 週目以降は徐々に減少し、給餌 15 週目にはコントロール群と同程度となった (Fig. 16A, B)。血液学的検査では、血漿中の aspartate aminotransferase (AST) 及び alanine aminotransferase (ALT) が CDAHFD 給餌群において給餌 6 週目をピークに有意に増加し、給餌 9 週目以降は徐々に減少していたが、給餌 15 週目までコントロール群に比べて有意に増加していた (Fig. 16C, D)。肝臓における病理組織学的検査では、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色の結果、CDAHFD 給餌群において小～大滴性の脂肪変性が観察され、肝小葉内には小型類円型の炎症細胞 (リンパ球) が集簇する炎症巣が多数認められた (Fig. 17A)。また、障害された肝細胞の所見である風船様変性 (hepatocyte ballooning) も著明に見られた。NAFLD/NASH の病理診断基準である NAFLD activity score (NAS)⁹²⁾ は、給餌 3 週目よりコントロール群では 0 点であったのに対し、CDAHFD 給餌群では 5 点以上であり (Fig. 17B)、NASH と診断し得る結果であった。また、エラスチカ・マッソン (E.M.) 染色の結果、CDAHFD 給餌群において門脈域を中心に線維像が認められた (Fig. 17A)。さらに、NAS と同様に既報⁹²⁾に従い肝線

維化の程度をスコア化したところ、コントロール群では0点であったのに対し、CDAHFD 給餌群では給餌3及び6週目においてそれぞれ0.67、2.0点であり、給餌15週目では2.17点であった (Fig. 17B)。

次に、肝臓における炎症関連遺伝子の発現を調べたところ、CDAHFD 給餌群において tumor necrosis factor (Tnf)- α の発現がコントロール群に比べて有意に増加していたが、Il-1 β の発現は給餌12-15週目にかけて有意に低下し、Il-6 の発現は給餌3-6週目にかけて有意に低下していた (Fig. 18A-C)。また、マクロファージマーカーである F4/80 及び CD11c の発現は CDAHFD 給餌群において有意に増加し、マクロファージの走化作用を有する monocyte chemotactic protein (Mcp)-1 の発現も有意に増加していた (Fig. 18D-F)。続いて、肝臓における線維化関連遺伝子の発現を調べたところ、CDAHFD 給餌群において肝線維化のマーカーである matrix metalloproteinase (Mmp)-2、tissue inhibitor of metalloproteinase (Timp)-1、Tgf- β 1 及び Collagen1 α 1 の発現が有意に増加していた (Fig. 19A-D)。さらに、筋線維芽細胞のマーカーである α -smooth muscle actin (SMA) のタンパク質発現量を調べたところ、コントロール群と比べて発現の増加が認められた (Fig. 19E)。

以上より、C57BL/6J 雄性マウスに対する CDAHFD の給餌により、早期の NASH 誘発と肝線維化の経時的な進展を認める NASH モデルマウスを作製した。

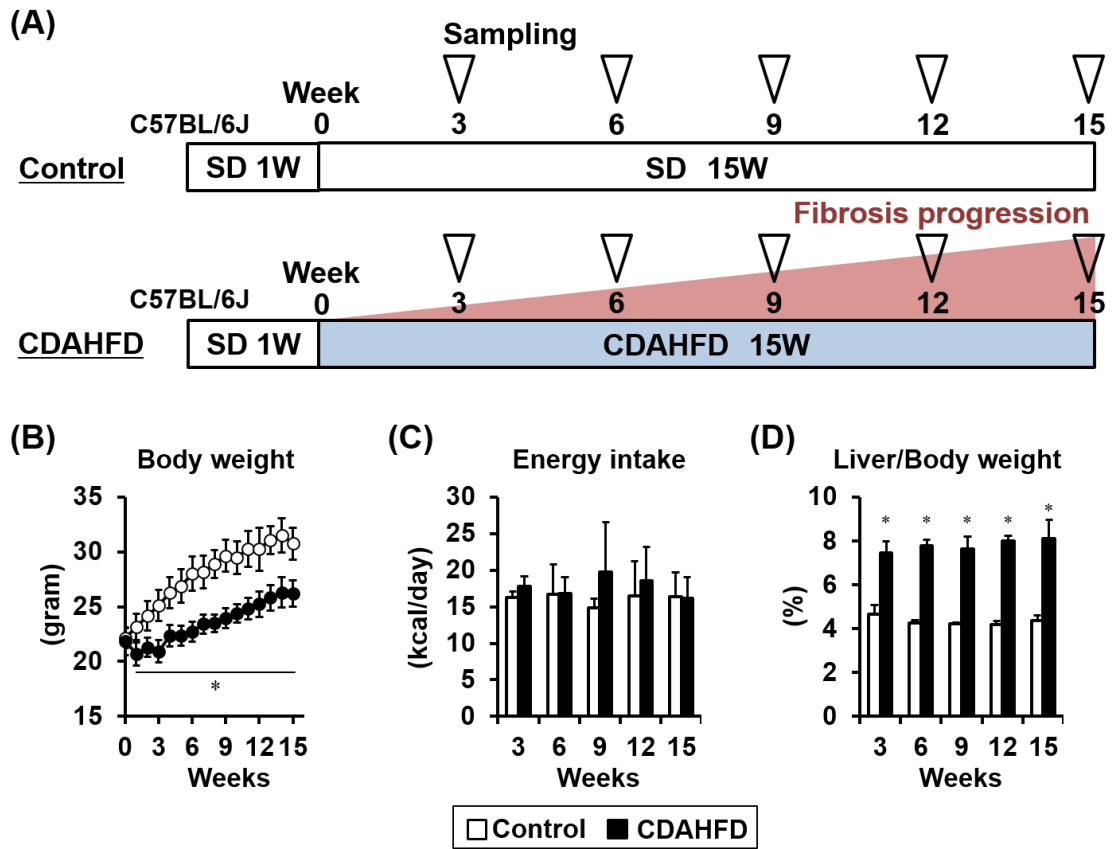


Fig. 15 Body characteristics changed by feeding of CDAHFD.

(A) Experimental protocol. (B) Body weight, (C) energy intake, and (D) liver/body weight were measured at 3, 6, 9, 12, and 15 weeks after feeding CDAHFD. Data are shown as mean \pm S.D. (Control, $n = 6$; CDAHFD, $n = 6$). * $p < 0.05$, significantly different from control.

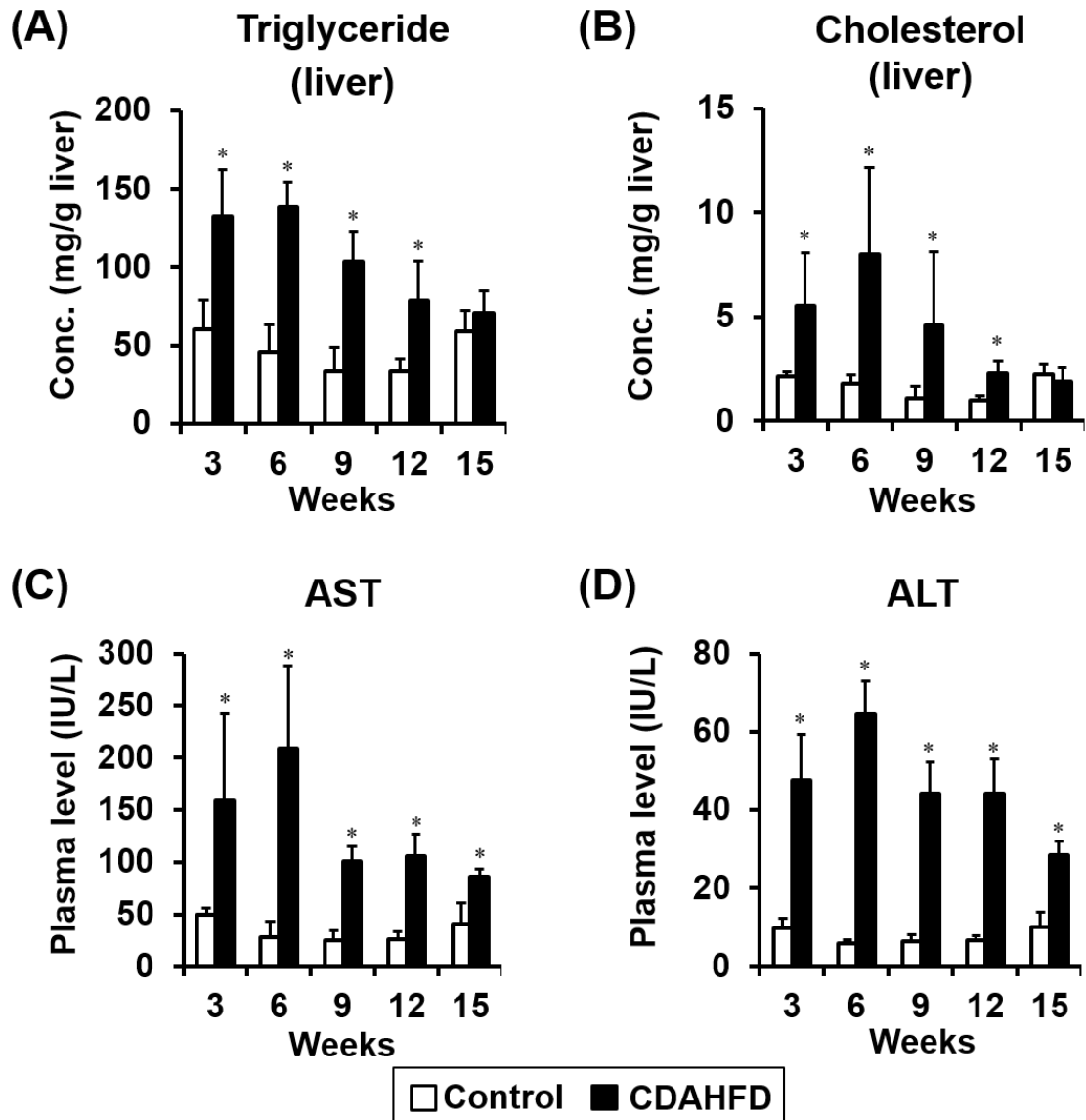


Fig. 16 Liver triglyceride and cholesterol and plasma markers for liver injury changed by feeding of CDAHFD.

The total triglyceride and cholesterol in the liver tissue, and plasma level of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were measured. Data are shown as mean \pm S.D. (Control, n = 6; CDAHFD, n = 6). * $p < 0.05$, significantly different from control.

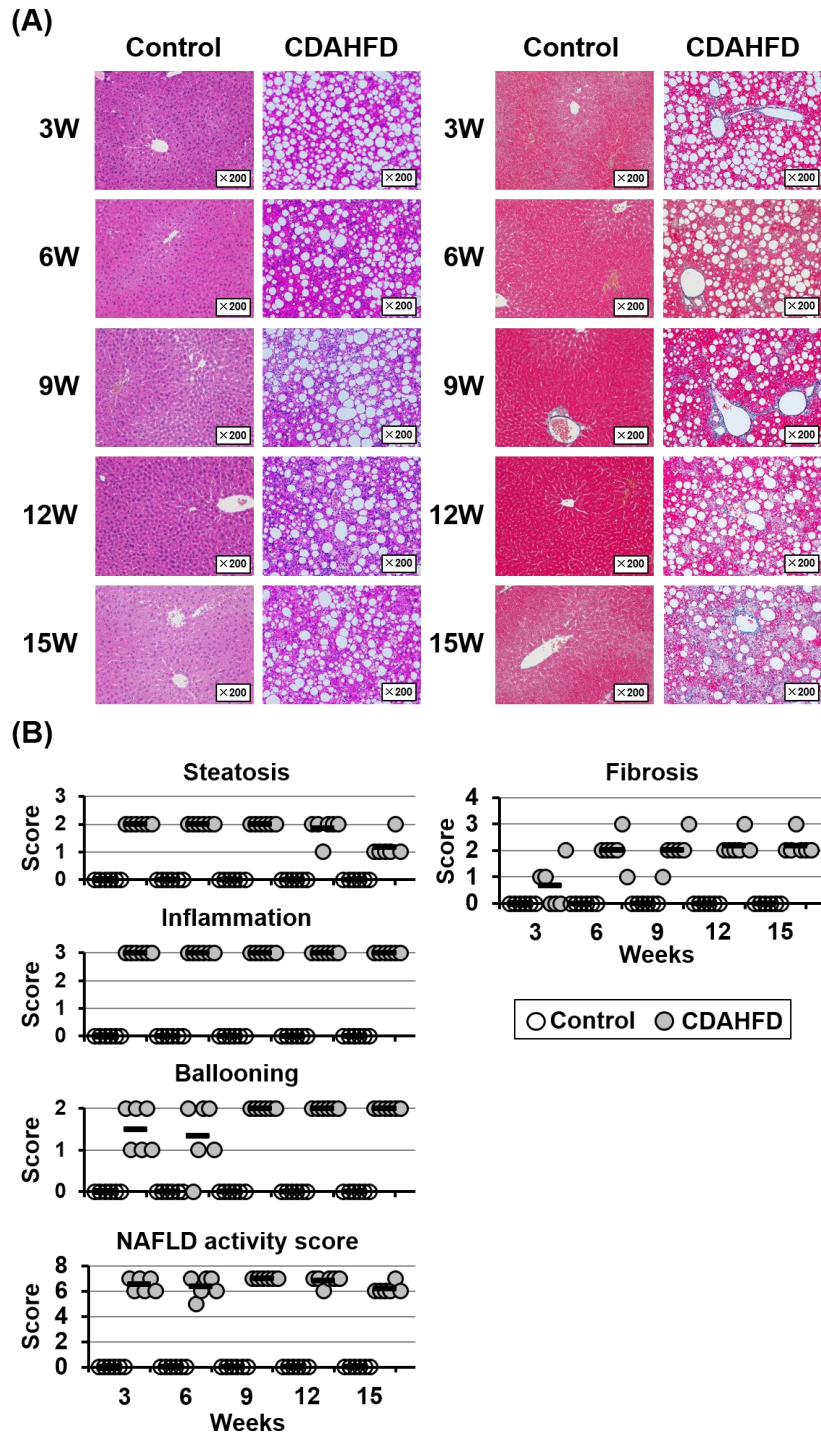


Fig. 17 Development of NASH-associated fibrosis promoted by CDAHFD.

(A) The representative H.E.- (left) and E.M.-stained (right) histology images of the liver in each group are shown (200 × magnification). (B) Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and fibrosis score. Degree of steatosis, inflammation, and hepatocyte ballooning are scored and the sum of scores is used to diagnose NASH (≥ 5 points is taken as NASH). (Control, n = 6; CDAHFD, n = 6).

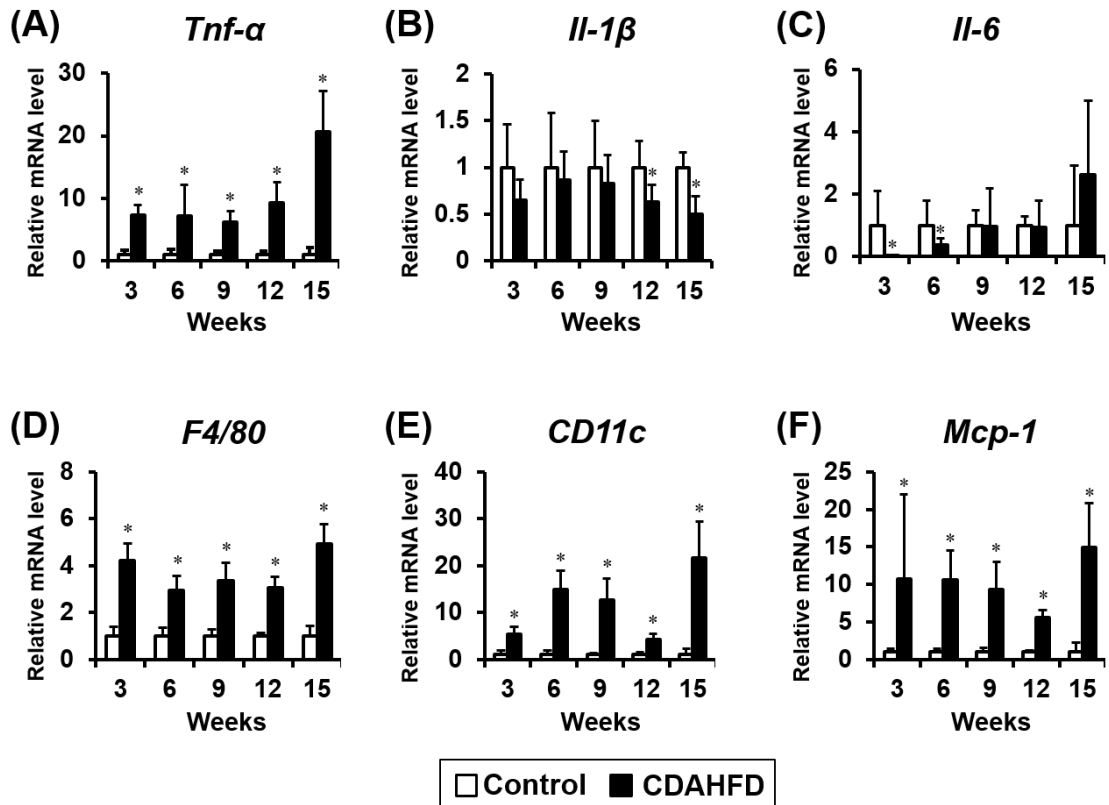


Fig. 18 The alteration in inflammation by feeding of CDAHFD.

The mRNA levels of *Tnf-α* (A), *Il-1β* (B), *Il-6* (C), *F4/80* (D), *CD11c* (E), and *Mcp-1* (F) in the liver tissue were measured. The PCR products were normalized to amplified β -actin. Data are shown as mean \pm S.D. (Control, n = 4–6; CDAHFD, n = 4–6). * $p < 0.05$, significantly different from control.

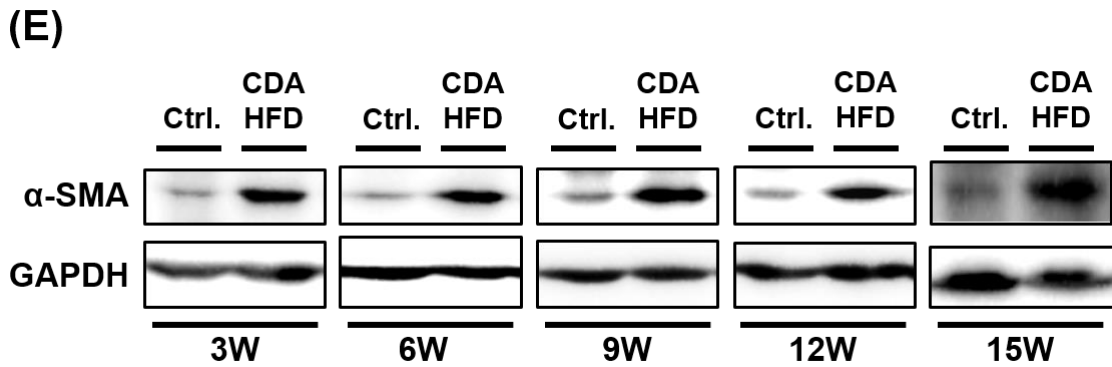
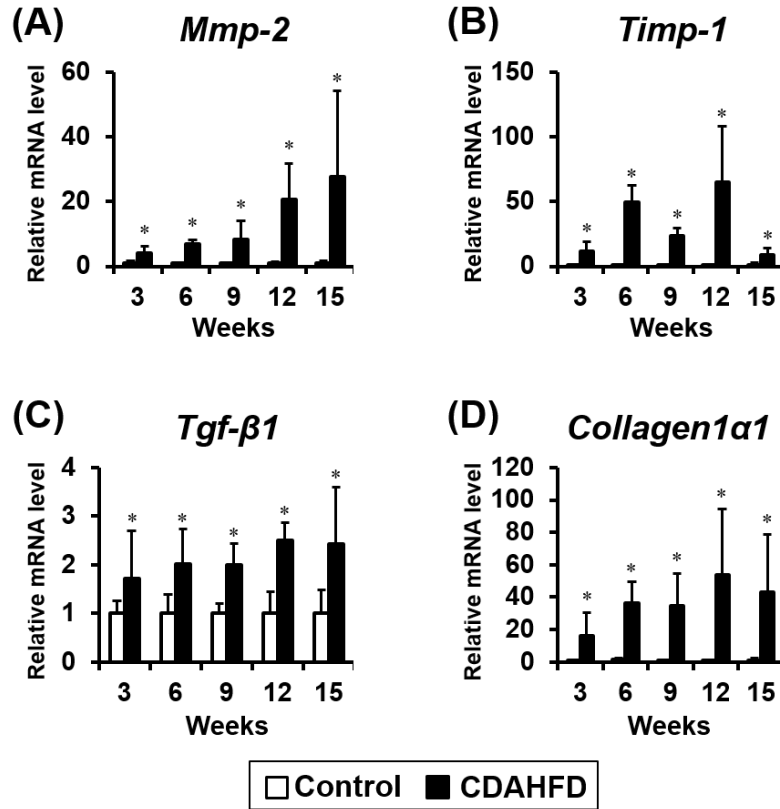


Fig. 19 The alteration in fibrosis by feeding of CDAHFD.

The mRNA levels of *Mmp-2* (A), *Timp-1* (B), *Tgf-β1* (C), and *Collagen1α1* (D) in the liver tissue were measured. The PCR products were normalized to amplified β -actin. Data are shown as mean \pm S.D. (Control, n = 4–6; CDAHFD, n = 4–6). * $p < 0.05$, significantly different from control. (E) Western blot analyses of α -SMA and GAPDH using liver homogenate lysates.

第3節 NASH モデルマウスにおける胆汁酸の経時的変動の定量解析

続いて、作製した NASH モデルマウスにおける胆汁酸動態の変動を調べるために、肝臓中、胆汁中及び末梢血中の総胆汁酸量を測定した。肝臓中の総胆汁酸量は CDAHFD 給餌3週目で有意に増加していたものの、給餌6週目以降はコントロール群と比べて有意な差を認めなかった (Fig. 20A)。胆汁中の総胆汁酸濃度は CDAHFD 給餌9週目で有意に低下していた (Fig. 20B)。一方、末梢血中の総胆汁酸濃度は CDAHFD 給餌3-6週目にかけて経時的に増加し、給餌9週目以降は徐々に減少したもののコントロール群と比べて有意に増加していた (Fig. 20C)。したがって、NASH の病態進行と胆汁酸動態の変動に関連があることが示唆された。

そこで、胆汁酸組成及び濃度の変動について、胆汁酸47化合物を対象として液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) 法により詳細に解析した。肝臓中では、CDAHFD 給餌3週目にげっ歯類の一次胆汁酸である β ミュリコール酸 (MCA) とそのタウリン抱合体である T β MCA、T ω MCA のほか、CDCA 及び硫酸抱合型 GCA の濃度が有意に増加していた (Table 5)。一方で、CA、ヒオコール酸 (HCA) 及び二次胆汁酸である DCA、LCA、ヒオデオキシコール酸 (HDCA) 及び TDCA の濃度は低下していた。また、肝臓中の硫酸抱合型 TCA の濃度は CDAHFD 給餌3週目では有意に増加していたものの、給餌6週目以降はコントロール群と比べて低下していた。胆汁中では、CDAHFD 給餌9週目にグリシン抱合型胆汁酸 (GCA、G β MCA、GHCA、GCDCA 及び GUDCA) 及び T β MCA の濃度がコントロール群と比べて有意に増加していた (Table 6)。しかしながら、遊離型胆汁酸 (α MCA、 ω MCA、HCA、HDCA、CDCA、DCA 及び UDCA)、グリシン抱合型胆汁酸 (GHDCA 及び GDCA)、タウリン抱合型胆汁酸 (TCA、

T α MCA、T ω MCA、THCA、THDCA、TCDCA、TDCA、TUDCA 及び TLCA)、硫酸抱合型胆汁酸 (GCA 3-sulfate、TCA 3-sulfate 及び TDCA 3-sulfate) 及びグルクロン酸抱合型 UDCA の濃度は CDAHFD 給餌 9 週目で有意に低下していた。胆汁中 CA 濃度は CDAHFD 給餌 3 週目で有意に増加していたものの、給餌 6 週目以降は有意に低下していた。胆汁中 β MCA 及び GHCA 濃度は CDAHFD 給餌 9 週目で有意に増加していたものの、給餌 15 週目では有意に低下していた。反対に、胆汁中 TCDCA 及び TUDCA 濃度は CDAHFD 給餌 9 週目で有意に低下していたものの、給餌 15 週目では有意に増加していた。さらに、末梢血中では、CDAHFD 給餌 6 週目で、親水性の遊離型胆汁酸 (CA、 α MCA、 β MCA、 ω MCA、HCA、CDCA 及び UDCA)、グリシン抱合型胆汁酸 (GCA、G β MCA、GCDCA 及び GUDCA)、タウリン抱合型胆汁酸 (TCA、T α MCA、T β MCA、T ω MCA、THCA、TCDCA 及び TUDCA) 及び硫酸抱合型胆汁酸 (TCA 3-sulfate 及び TDCA 3-sulfate) の濃度がコントロール群と比べて有意に増加していた (Table 7)。反対に、末梢血中 HDCA、DCA、LCA、THDCA 及び TDCA の濃度は CDAHFD 給餌 6 週目で有意に低下していた。

以上の結果から、NASH では胆汁中よりも末梢血中への胆汁酸排出を促進する機構が働いている可能性が考えられた。

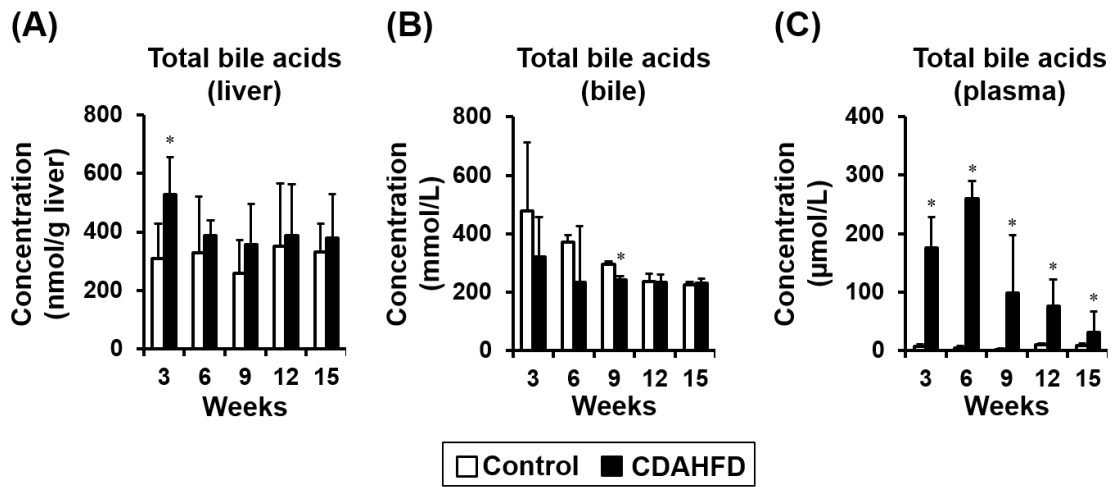


Fig. 20 Total bile acid concentration in the liver, bile, and plasma.

Data are shown as mean \pm S.D. (Control, n = 4–6; CDAHFD, n = 4–6). * $p < 0.05$, significantly different from control.

Table 5 Individual bile acid concentration in the liver

Bile acids	Liver concentration (nmol/g)									
	3W		6W		9W		12W		15W	
	Control	CDAHFD	Control	CDAHFD	Control	CDAHFD	Control	CDAHFD	Control	CDAHFD
CA	33.4 ± 12.0	17.4 ± 4.8*	29.2 ± 14.6	14.9 ± 3.8	47.1 ± 17.8	29.4 ± 13.1	66.1 ± 33.0	18.9 ± 7.2*	97.9 ± 29.7	24.4 ± 11.2*
αMCA	8.80 ± 3.07	8.04 ± 2.78	8.84 ± 7.03	4.26 ± 0.991	7.71 ± 4.85	4.72 ± 2.26	7.07 ± 2.87	4.72 ± 2.15	8.09 ± 2.00	5.39 ± 2.10
βMCA	68.7 ± 37.2	201 ± 43*	66.9 ± 33.6	174.7 ± 26.6*	49.0 ± 19.2	135 ± 42*	57.3 ± 31.5	144 ± 60*	63.9 ± 17.0	154 ± 66*
ωMCA	43.1 ± 20.1	17.1 ± 4.2*	38.1 ± 14.9	17.2 ± 4.2*	37.0 ± 8.0	27.3 ± 3.1*	41.4 ± 9.4	19.6 ± 2.5*	44.0 ± 15.8	12.4 ± 7.7*
HCA	0.125 ± 0.086	0.0264 ± 0.0115*	0.0617 ± 0.0265	0.0574 ± 0.0558	0.0950 ± 0.0488	0.0691 ± 0.0177	0.0955 ± 0.0110	0.0386 ± 0.0120*	0.128 ± 0.067	0.0528 ± 0.0163*
HDCA	1.58 ± 0.98	0.0995 ± 0.0642*	2.28 ± 2.33	0.0203 ± 0.0210	0.939 ± 0.415	0.0313 ± 0.0139*	1.24 ± 0.66	0.0294 ± 0.0111*	1.23 ± 0.906	0.0329 ± 0.0186*
CDCA	1.84 ± 0.601	3.76 ± 1.13*	1.36 ± 1.09	1.13 ± 0.242	1.82 ± 1.17	2.08 ± 0.889	1.36 ± 0.381	1.60 ± 0.58	0.899 ± 0.123	1.71 ± 0.50*
DCA	3.98 ± 1.65	0.163 ± 0.103*	3.34 ± 2.11	0.0718 ± 0.0487*	3.29 ± 1.12	0.203 ± 0.100*	3.45 ± 1.75	0.0739 ± 0.0117*	4.02 ± 2.48	0.0534 ± 0.0243*
UDCA	1.63 ± 0.77	1.56 ± 0.58	1.82 ± 1.41	1.24 ± 0.28	1.67 ± 0.44	1.61 ± 0.90	1.56 ± 0.61	1.92 ± 0.80	1.63 ± 0.44	1.46 ± 0.67
LCA	0.202 ± 0.084	0.0601 ± 0.0246*	0.0756 ± 0.0324	–	0.126 ± 0.067	0.0275 ± 0.0072*	0.0720 ± 0.0255	0.0156 ± 0.0041*	0.0333 ± 0.0148	–
GCA	0.413 ± 0.182	0.842 ± 0.418	0.376 ± 0.334	0.700 ± 0.094	0.346 ± 0.180	0.932 ± 0.516*	0.568 ± 0.429	0.788 ± 0.428	0.461 ± 0.156	0.666 ± 0.234
GαMCA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GβMCA	–	0.0433 ± 0.0092	0.0286 ± 0.0244	0.0504 ± 0.0071	0.0126 ± 0.0091	0.0534 ± 0.0253*	0.0199 ± 0.0121	0.0867 ± 0.0375*	0.0300 ± 0.0102	0.0526 ± 0.0145*
GHCA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GHCA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GHCA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GCDCA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GDCA	–	–	–	0.0366 ± 0.0316	0.0223 ± 0.0127	–	0.0338 ± 0.0213	–	–	0.0204 ± 0.0178
GUDCA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

GLCA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
TCA	126 ± 45	204 ± 66	146 ± 84	147 ± 20	94.1 ± 53.6	147 ± 65	152 ± 112	179 ± 86	91.5 ± 40.4	159 ± 48*	
TαMCA	–	5.31 ± 3.98	–	0.829 ± 0.517	–	–	–	–	–	–	
TβMCA	1.20 ± 0.74	25.1 ± 16.8*	2.67 ± 1.75	8.89 ± 6.79	1.09 ± 0.54	1.52 ± 0.62	1.03 ± 0.34	4.52 ± 3.61	1.23 ± 0.61	6.15 ± 5.59	
TωMCA	4.48 ± 3.46	37.0 ± 10.2*	3.12 ± 4.90	12.5 ± 6.2*	1.21 ± 0.67	3.80 ± 1.99*	1.61 ± 0.65	7.55 ± 4.16*	2.06 ± 1.70	10.6 ± 9.4	
THCA	–	0.0204 ± 0.0242	0.0127 ± 0.0108	0.0109 ± 0.0113	0.0212 ± 0.0156	0.0179 ± 0.0068	0.0187 ± 0.0093	0.0194 ± 0.0130	0.0180 ± 0.0135	0.0232 ± 0.0159	
THDCA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
TCDCa	–	0.611 ± 0.261	0.120 ± 0.188	0.410 ± 0.202	–	–	–	0.330 ± 0.251	–	0.232 ± 0.159	
TDCA	11.9 ± 3.5	2.07 ± 1.23*	22.7 ± 21.2	0.899 ± 0.318*	11.3 ± 4.3	1.31 ± 0.54*	13.0 ± 6.7	1.19 ± 0.37*	11.6 ± 6.5	0.782 ± 0.401*	
TUDCA	–	0.447 ± 0.263	0.0575 ± 0.0907	0.295 ± 0.178	0.00929 ± 0.00720	0.0517 ± 0.0486	0.00586 ± 0.00576	0.388 ± 0.283*	–	0.315 ± 0.155	
TLCA	–	0.00916 ± 0.00443	0.0476 ± 0.0738	–	–	–	0.0114 ± 0.0065	0.0130 ± 0.0058	–	0.0102 ± 0.0058	
CDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
DCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
LCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
GCA 3-sulfate	0.0176 ± 0.0110	0.0449 ± 0.0092*	0.0280 ± 0.0119	0.0219 ± 0.0102	0.0299 ± 0.0099	0.0354 ± 0.0095	0.0373 ± 0.0109	0.0484 ± 0.0194	0.0362 ± 0.0188	0.0493 ± 0.0137	
GCDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
GDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
GUDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
GLCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
TCA 3-sulfate	1.45 ± 0.37	3.30 ± 0.53*	2.61 ± 1.07	1.30 ± 0.64*	2.22 ± 0.42	1.64 ± 0.56	2.50 ± 0.72	2.07 ± 0.96	2.38 ± 0.64	2.30 ± 1.38	
TCDCa 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	
TDCA 3-sulfate	0.0244 ± 0.0184	0.0471 ± 0.0152	0.0312 ± 0.0218	0.00980 ± 0.00654	0.0478 ± 0.0190	0.0333 ± 0.0105	0.0310 ± 0.0086	0.0435 ± 0.0194	0.0365 ± 0.0142	0.0866 ± 0.0578	
TUDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	

TLCA 3-sulfate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CA 3-glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDCA 3-glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DCA 3-glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UDCA 3-glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LCA 3-glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Each data represents the mean \pm S.D. (Control, n = 4-6; CDAHFD, n = 4-6). -: not quantified. * $p < 0.05$, significantly different from control.

Table 6 Individual bile acid concentration in bile

Bile acids	Bile concentration (μmol/L)									
	3W		6W		9W		12W		15W	
	Control	CDAHFD	Control	CDAHFD	Control	CDAHFD	Control	CDAHFD	Control	CDAHFD
CA	216 ± 78	585 ± 286*	2156 ± 807	512 ± 311*	3175 ± 60	1176 ± 119*	1863 ± 61	823 ± 24*	2429 ± 113	248 ± 10*
αMCA	56.1 ± 25.3	92.2 ± 59.4	424 ± 174	54.2 ± 49.1	370 ± 17	72.8 ± 5.5*	153 ± 13	54.5 ± 5.1*	266 ± 16	31.2 ± 1.6*
βMCA	455 ± 252	589 ± 271	1058 ± 125	815 ± 580	1001 ± 47	1092 ± 67*	592 ± 59	962 ± 123*	1090 ± 60	435 ± 19*
ωMCA	232 ± 84	408 ± 233	870 ± 378	203 ± 147*	1032 ± 50	264 ± 20*	663 ± 68	196 ± 26*	1119 ± 62	106 ± 3.8*
HCA	0.238 ± 0.188	0.762 ± 0.502	2.50 ± 1.50	1.55 ± 2.17	3.76 ± 0.24	1.17 ± 0.24*	1.52 ± 0.17	0.650 ± 0.080*	3.32 ± 0.18	0.267 ± 0.047*
HDCA	1.03 ± 1.62	0.770 ± 0.771	6.69 ± 3.15	–	3.52 ± 0.15	0.0240 ± 0.0102*	2.38 ± 0.24	0.0233 ± 0.0160*	2.88 ± 0.14	–
CDCA	0.304 ± 0.158	0.388 ± 0.177	1.53 ± 0.40	0.313 ± 0.242*	1.52 ± 0.47	0.312 ± 0.050*	0.563 ± 0.070	0.387 ± 0.077*	0.927 ± 0.053	0.267 ± 0.017*
DCA	1.25 ± 1.21	1.91 ± 1.68	7.09 ± 2.98	0.265 ± 0.139*	2.38 ± 0.088	0.395 ± 0.087*	1.69 ± 0.18	0.438 ± 0.054*	2.80 ± 0.18	0.423 ± 0.025*
UDCA	0.422 ± 0.308	1.03 ± 0.72	2.95 ± 0.32	0.743 ± 0.727*	3.90 ± 0.72	0.258 ± 0.041*	1.43 ± 0.15	0.515 ± 0.075*	2.96 ± 0.097	0.258 ± 0.019*
LCA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GCA	309 ± 98	310 ± 158	347 ± 105	268 ± 209	327 ± 13	563 ± 72*	300 ± 23	497 ± 54*	262 ± 12	284 ± 6*
GαMCA	8.48 ± 3.50	12.3 ± 3.2	16.2 ± 5.2	8.39 ± 5.22	22.3 ± 1.8	21.9 ± 2.8	15.4 ± 1.8	17.8 ± 2.3	12.6 ± 1.4	12.4 ± 1.2
GβMCA	110 ± 65	110 ± 86	69.1 ± 16.3	195 ± 134	62.7 ± 2.9	304 ± 53*	63.7 ± 5.1	265 ± 34*	52.2 ± 3.3	147 ± 4*
GHCA	0.122 ± 0.045	0.160 ± 0.047	0.134 ± 0.087	0.194 ± 0.152	0.285 ± 0.033	0.455 ± 0.077*	0.242 ± 0.030	0.240 ± 0.047	0.273 ± 0.047	0.155 ± 0.024*
GHDCa	0.762 ± 0.857	0.472 ± 0.493	1.95 ± 1.01	0.0700 ± 0.0724*	1.10 ± 0.13	–	1.03 ± 0.10	–	0.858 ± 0.158	–
GCDCA	1.03 ± 0.34	1.62 ± 0.62	2.29 ± 0.60	1.61 ± 1.16	2.49 ± 0.20	3.24 ± 0.25*	1.68 ± 0.25	2.77 ± 0.38*	1.21 ± 0.18	1.86 ± 0.17*
GDCA	4.53 ± 4.72	3.84 ± 4.20	15.7 ± 5.9	0.400 ± 0.235*	11.0 ± 0.4	0.582 ± 0.115*	8.49 ± 1.01	0.568 ± 0.111*	6.82 ± 0.45	0.225 ± 0.016*
GUDCA	1.79 ± 0.85	1.87 ± 1.29	1.10 ± 0.31	2.78 ± 1.81	1.74 ± 0.23	6.38 ± 0.82*	1.77 ± 0.23	5.87 ± 0.60*	1.20 ± 0.13	3.35 ± 0.17*
GLCA	–	–	–	–	–	–	0.0800 ± 0.0153	0.0767 ± 0.0236	0.0800 ± 0.0369	0.0733 ± 0.0125

TCA	39176 ± 10474	28215 ± 13826	56920 ± 18371	23198 ± 19716	31840 ± 1090	20320 ± 642*	25911 ± 2629	19182 ± 1774*	23929 ± 1733	17922 ± 1227*
TαMCA	24968 ± 8468	19435 ± 7315	30264 ± 8071	9164 ± 7352*	39021 ± 2520	15859 ± 2878*	27302 ± 2937	12456 ± 2254*	20156 ± 606	13440 ± 1186*
TβMCA	397524 ± 256245	223060 ± 168361	150870 ± 14130	277910 ± 220744	108315 ± 2896	152736 ± 6338*	87626 ± 8391	157223 ± 14966*	86918 ± 5177	158955 ± 11406*
TωMCA	93362 ± 14892	67775 ± 33405	83124 ± 25261	38704 ± 33821	96869 ± 4889	47316 ± 3105*	82794 ± 8361	39834 ± 4339*	81246 ± 3280	36613 ± 1253*
THCA	–	–	–	–	75.0 ± 6.1	34.3 ± 4.7*	48.9 ± 5.5	24.1 ± 2.7*	54.6 ± 3.0	21.8 ± 0.7*
THDCA	940 ± 1089	688 ± 1061	1594 ± 997	21.7 ± 25.1*	1130 ± 103	24.7 ± 2.4*	1036 ± 115	22.5 ± 2.8*	836 ± 44	23.8 ± 1.0*
TCDCA	1525 ± 587	1008 ± 328	1558 ± 639	564 ± 484*	2275 ± 126	1283 ± 73*	1566 ± 164	1310 ± 147*	971 ± 55	1436 ± 69*
TDCA	3160 ± 1945	2568 ± 1999	7886 ± 4065	147 ± 90*	6467 ± 303	490 ± 28*	4793 ± 450	445 ± 61*	4332 ± 183	334 ± 12*
TUDCA	3896 ± 2656	3134 ± 1764	2056 ± 467	1466 ± 1406	1802 ± 143	1518 ± 97*	1358 ± 157	1547 ± 174	1052 ± 60	1313 ± 50*
TLCA	21.5 ± 20.5	16.5 ± 12.2	48.3 ± 20.3	–	36.0 ± 1.1	2.80 ± 0.57*	27.0 ± 2.7	2.42 ± 0.73*	21.9 ± 1.0	2.57 ± 0.20*
CDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
DCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
LCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GCA 3-sulfate	8.77 ± 3.53	8.08 ± 3.75	8.40 ± 2.42	4.01 ± 3.97	10.6 ± 0.5	7.91 ± 1.05*	11.8 ± 1.0	12.9 ± 1.1	11.0 ± 0.5	12.7 ± 0.5*
GCDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GUDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GLCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
TCA 3-sulfate	627 ± 195	566 ± 180	817 ± 170	159 ± 158*	696 ± 22	238 ± 23*	577 ± 53	323 ± 35*	489 ± 18	488 ± 10
TCDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
TDCA 3-sulfate	9.73 ± 2.89	6.35 ± 1.68	8.71 ± 1.51	1.81 ± 1.80*	12.5 ± 0.4	7.66 ± 0.16*	9.57 ± 0.42	9.51 ± 0.53	8.39 ± 0.23	15.2 ± 0.4*
TUDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
TLCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

CA 3-glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CDCA 3-glucuronide	0.912 ± 0.293	0.956 ± 0.182	1.36 ± 0.17	-	-	-	-	-	-	-
DCA 3-glucuronide	0.496 ± 0.304	0.350 ± 0.173	0.948 ± 0.188	0.218 ± 0.038*	-	-	-	-	-	-
UDCA 3-glucuronide	0.780 ± 0.461	0.668 ± 0.447	3.61 ± 1.57	0.298 ± 0.089*	2.98 ± 0.17	1.16 ± 0.07*	2.43 ± 0.17	1.12 ± 0.06*	2.62 ± 0.17	1.17 ± 0.05*
LCA 3-glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Each data represents the mean ± S.D. (Control, n = 4-6; CDAHFD, n = 4-6). -: not quantified. * $p < 0.05$, significantly different from control.

Table 7 Individual bile acid concentration in plasma

Bile acids	Plasma concentration (μmol/L)									
	3W		6W		9W		12W		15W	
	Control	CDAHFD	Control	CDAHFD	Control	CDAHFD	Control	CDAHFD	Control	CDAHFD
CA	284 ± 188	1252 ± 322*	628 ± 564	5271 ± 942*	477 ± 347	5133 ± 3530*	970 ± 825	2473 ± 1112*	1345 ± 963	1412 ± 613
αMCA	18.2 ± 16.9	57.9 ± 25.6*	37.1 ± 29.4	210 ± 75*	33.2 ± 20.0	221 ± 136*	60.4 ± 53.8	136 ± 58*	88.3 ± 59.6	97.5 ± 38.0
βMCA	348 ± 277	2724 ± 611*	506 ± 271	9186 ± 1813*	343 ± 174	8519 ± 5909*	687 ± 534	4610 ± 2601*	1383 ± 1253	3271 ± 1332*
ωMCA	521 ± 386	1017 ± 277*	734 ± 559	2347 ± 845*	635 ± 283	1506 ± 630*	1053 ± 718	842 ± 483	1421 ± 1196	843 ± 473
HCA	2.18 ± 0.90	2.70 ± 0.51	3.18 ± 2.06	14.8 ± 7.8*	3.14 ± 0.39	8.35 ± 3.45*	3.23 ± 2.29	3.63 ± 2.17	4.25 ± 3.48	2.44 ± 1.46
HDCA	25.3 ± 19.4	8.50 ± 1.29	54.4 ± 18.4	9.83 ± 2.04*	24.2 ± 11.1	4.83 ± 2.05*	51.1 ± 38.4	3.73 ± 2.39*	44.0 ± 18.1	2.68 ± 1.10*
CDCA	14.4 ± 8.1	23.4 ± 7.3	24.2 ± 9.4	80.5 ± 24.3*	18.1 ± 16.3	65.9 ± 33.8*	18.3 ± 15.7	45.6 ± 22.0*	21.5 ± 20.9	37.0 ± 17.4
DCA	281 ± 98	208 ± 66	865 ± 396	348 ± 34*	501 ± 153	375 ± 136	603 ± 106	332 ± 232*	757 ± 207	252 ± 228*
UDCA	35.9 ± 19.2	30.1 ± 8.2	58.7 ± 20.0	181 ± 65*	47.8 ± 17.8	128 ± 63*	61.1 ± 21.1	102 ± 48	98.1 ± 83.9	154 ± 190
LCA	16.3 ± 2.4	9.77 ± 1.26*	22.7 ± 8.8	10.3 ± 2.0*	15.1 ± 7.7	8.22 ± 2.50	17.1 ± 4.5	9.45 ± 4.48*	13.6 ± 2.9	6.40 ± 1.50*
GCA	12.7 ± 6.0	134 ± 77*	10.9 ± 7.9	360 ± 55*	12.6 ± 8.1	294 ± 171*	16.5 ± 5.3	215 ± 96*	26.8 ± 10.2	109 ± 53*
GαMCA	–	–	–	–	–	12.6 ± 6.2	–	6.82 ± 1.28	–	9.18 ± 2.97
GβMCA	5.52 ± 0.88	57.1 ± 25.9*	4.78 ± 0.68	217 ± 17*	–	149 ± 90	–	75.7 ± 35.8	–	78.1 ± 83.1
GHCA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GHDCA	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GCDCA	–	3.72 ± 0.26	–	5.30 ± 0.72	–	2.73 ± 1.24	–	2.00 ± 0.79	–	1.77 ± 1.26
GDCA	2.78 ± 1.05	2.65 ± 0.38	3.63 ± 1.30	2.67 ± 0.51	1.13 ± 0.47	1.52 ± 0.67	1.78 ± 0.88	1.13 ± 0.46	1.62 ± 1.05	1.03 ± 0.59
GUDCA	–	5.32 ± 0.45	–	6.67 ± 0.57	–	1.75 ± 1.14	–	1.58 ± 1.13	–	1.32 ± 1.04
GLCA	2.55 ± 0.08	2.50 ± 0.09	2.53 ± 0.12	2.48 ± 0.10	–	–	–	–	–	–

TCA	1238 ± 977	17387 ± 5638*	541 ± 385	28261 ± 3527*	627 ± 486	20469 ± 11448*	768 ± 334	14656 ± 6466*	1580 ± 659	9004 ± 4323*
TαMCA	536 ± 260	5538 ± 2166*	296 ± 233	7272 ± 635*	138 ± 190	3934 ± 2855*	126 ± 39.5	1882 ± 322*	265 ± 155	2385 ± 1992*
TβMCA	1706 ± 914	116830 ± 41266*	750 ± 443	205068 ± 30088*	290 ± 245	115928 ± 70696*	340 ± 105	68434 ± 32889*	969 ± 554	44682 ± 23466*
TωMCA	3065 ± 1352	21991 ± 3561*	2028 ± 1412	34999 ± 5042*	867 ± 398	17016 ± 5194*	1163 ± 324	10091 ± 4760*	1971 ± 1090	7318 ± 3640*
THCA	–	2.83 ± 1.94	–	24.7 ± 11.2	–	11.3 ± 4.2	–	5.38 ± 2.82	–	11.6 ± 20.7
THDCA	70.9 ± 72.0	23.5 ± 8.8	45.1 ± 27.4	17.9 ± 5.6*	18.5 ± 10.2	12.6 ± 7.0	29.9 ± 8.4	8.58 ± 4.59*	46.8 ± 50.1	4.88 ± 2.03
TCDCA	35.4 ± 14.5	424 ± 106*	27.6 ± 16.8	607 ± 85*	18.5 ± 17.4	384 ± 189*	24.0 ± 9.2	337 ± 145*	48.2 ± 18.1	261 ± 88*
TDCA	350 ± 262	270 ± 95	300 ± 170	180 ± 38*	133 ± 59	187 ± 128	171 ± 54	168 ± 77	318 ± 255	109 ± 60
TUDCA	23.9 ± 4.8	196 ± 85*	16.5 ± 4.8	500 ± 53*	12.4 ± 3.0	297 ± 133*	12.6 ± 3.1	292 ± 63*	16.7 ± 3.6	243 ± 119*
TLCA	–	–	–	–	0.800 ± 0.777	1.75 ± 1.24	1.10 ± 0.33	1.53 ± 0.56	1.48 ± 0.96	0.980 ± 0.455
CDCA 3-sulfate	3.50 ± 0.96	3.32 ± 0.75	2.85 ± 0.87	3.28 ± 0.48	–	–	–	–	–	–
DCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
LCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GCDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GUDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
GLCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
TCA 3-sulfate	6.95 ± 4.31	150 ± 37*	4.12 ± 1.83	72.4 ± 28.3*	2.12 ± 1.18	48.5 ± 12.4*	4.52 ± 3.82	84.0 ± 31.9*	4.35 ± 1.32	61.9 ± 40.3*
TCDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
TDCA 3-sulfate	0.750 ± 0.105	10.1 ± 1.7*	–	2.75 ± 0.75*	–	3.15 ± 0.67	1.25 ± 0.18	4.97 ± 1.56*	1.20 ± 0.17	4.84 ± 1.22*
TUDCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
TLCA 3-sulfate	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

CA 3-glucuronide	14.6 ± 7.7	-	-	14.1 ± 12.5	-	-	-	-	-	-
CDCA 3-glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DCA 3-glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UDCA 3-glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LCA 3-glucuronide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Each data represents the mean ± S.D. (Control, n = 4-6; CDAHFD, n = 4-6). -: not quantified. * $p < 0.05$, significantly different from control.

第4節 NASH モデルマウスにおける胆汁酸トランスポーターの発現変動

NASH の病態進行に伴う胆汁酸変動の要因を明らかにするために、肝臓及び回腸に発現し胆汁酸の腸肝循環を担うトランスポーターの発現を経時的に調べた。その結果、CDAHFD 給餌によりトランスポーターの発現変動が認められ (Fig. 21A)、肝臓の Ost β は CDAHFD 給餌 3-6 週目にかけて早期に発現が増加し、その後はコントロール群と比べて有意な差を認めなかった (Fig. 21B)。また、血管側への胆汁酸排出を担う Abcc4 は CDAHFD 給餌 15 週目で発現が有意に増加していたが (Fig. 21C)、Abcc3 の発現は CDAHFD 給餌 3 週目から有意に低下していた (Fig. 21D)。一方で、CDAHFD 給餌 3 週目の早期より、細胞内取り込みを担う Ntcp 及び Oatp1b2 の発現が有意に低下し (Fig. 21E, F)、回腸の Asbt の発現は CDAHFD 給餌 3-6 週目にかけて有意に低下していた (Fig. 21G)。また、胆管への胆汁酸排出を担う Bsep 及び Abcc2 の発現も有意に低下していた (Fig. 21H, I)。以上の結果から、NASH モデルマウスにおいて胆汁酸動態が変動した要因として、肝臓及び回腸に発現するトランスポーターの発現変動が関与している可能性が考えられた。

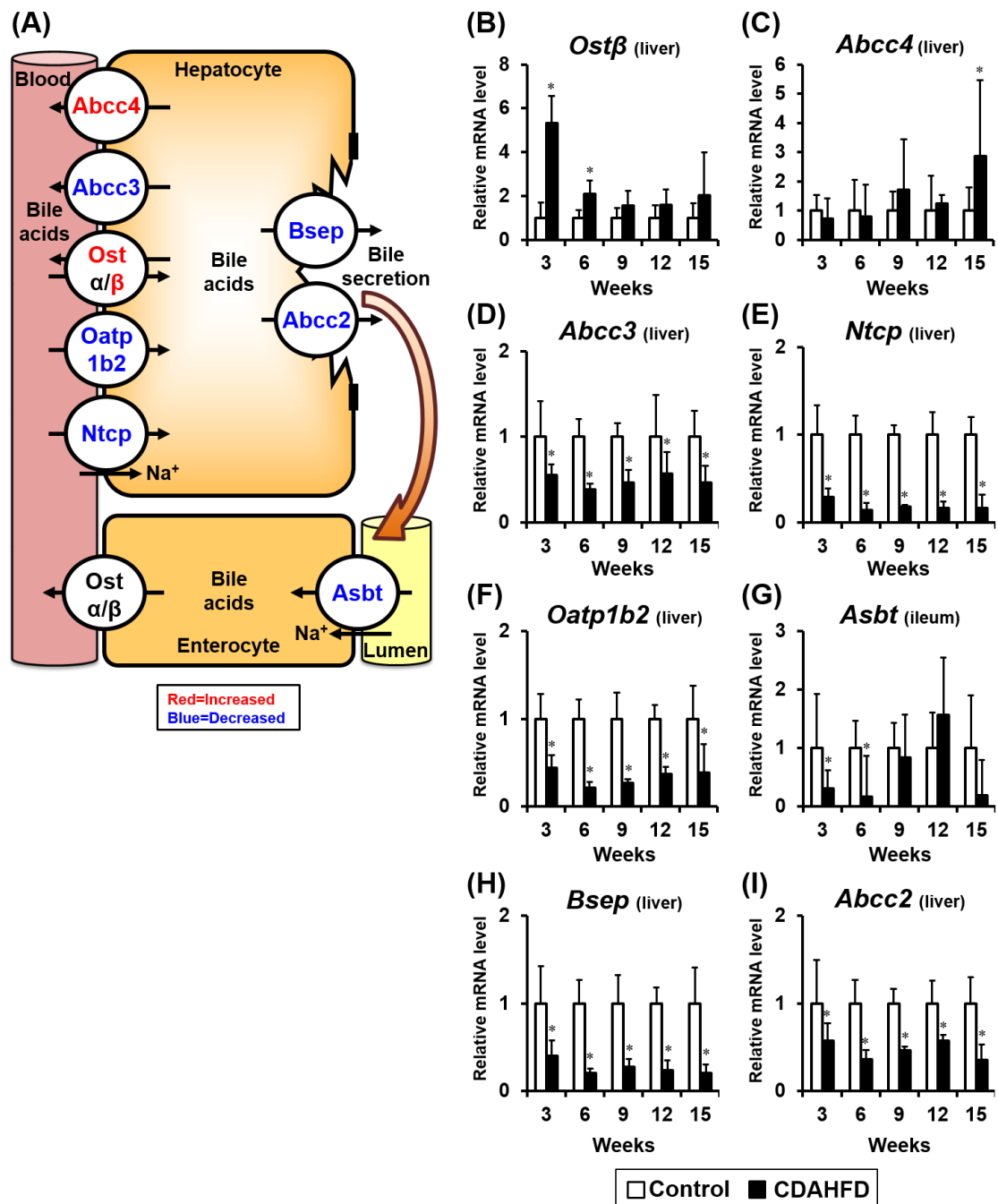


Fig. 21 The alteration in bile acid transporters by feeding of CDAHFD.

(A) Transporters related to bile acid secretion/reabsorption into/from the plasma and bile duct are shown. The mRNA levels of *Ostβ* (B), *Abcc4* (C), *Abcc3* (D), *Ntcp* (E), *Oatp1b2* (F), *Asbt* (G), *Bsep* (H), and *Abcc2* (I) in the liver or ileum were analyzed. The PCR products were normalized to amplified β -actin. Data are shown as mean \pm S.D. (Control, n = 4–6; CDAHFD, n = 4–6). * $p < 0.05$, significantly different from control.

第 5 節 NASH モデルマウスにおける胆汁酸代謝酵素及び核内受容体の発現変動

次に、肝臓に発現する胆汁酸代謝酵素の発現を経時的に調べた。その結果、CDAHFD 給餌により胆汁酸代謝酵素の発現変動が認められ (Fig. 22A)、CDAHFD 給餌 3 週目より、胆汁酸の生合成の律速酵素である Cyp7a1 の発現がコントロール群と比べて有意に低下していた (Fig. 22B)。また、その他の胆汁酸生合成酵素 Cyp27a1、Cyp8b1、Akr1d1 及び Hsd3b7 の発現も有意に低下していた (Fig. 22C-F)。胆汁酸のアミノ酸抱合酵素である bile acid-CoA:amino acid *N*-acyltransferase (Baat) の発現は、CDAHFD 給餌 3 週目より有意に低下していた一方で、硫酸抱合酵素である sulfotransferase (Sult) 2a1 の発現は CDAHFD 給餌 12 週目まで有意に増加していた (Fig. 22G, H)。さらに、Cyp7a1 の発現を負に制御する核内受容体 Fxr の発現を調べたところ、CDAHFD 給餌 3 週目よりコントロール群と比べて有意に低下していた (Fig. 22I)。以上の結果から、NASH の肝臓では、コレステロールから胆汁酸への生合成が低下するとともに、胆汁酸の硫酸抱合を促進する機構が働いていることが示唆された。

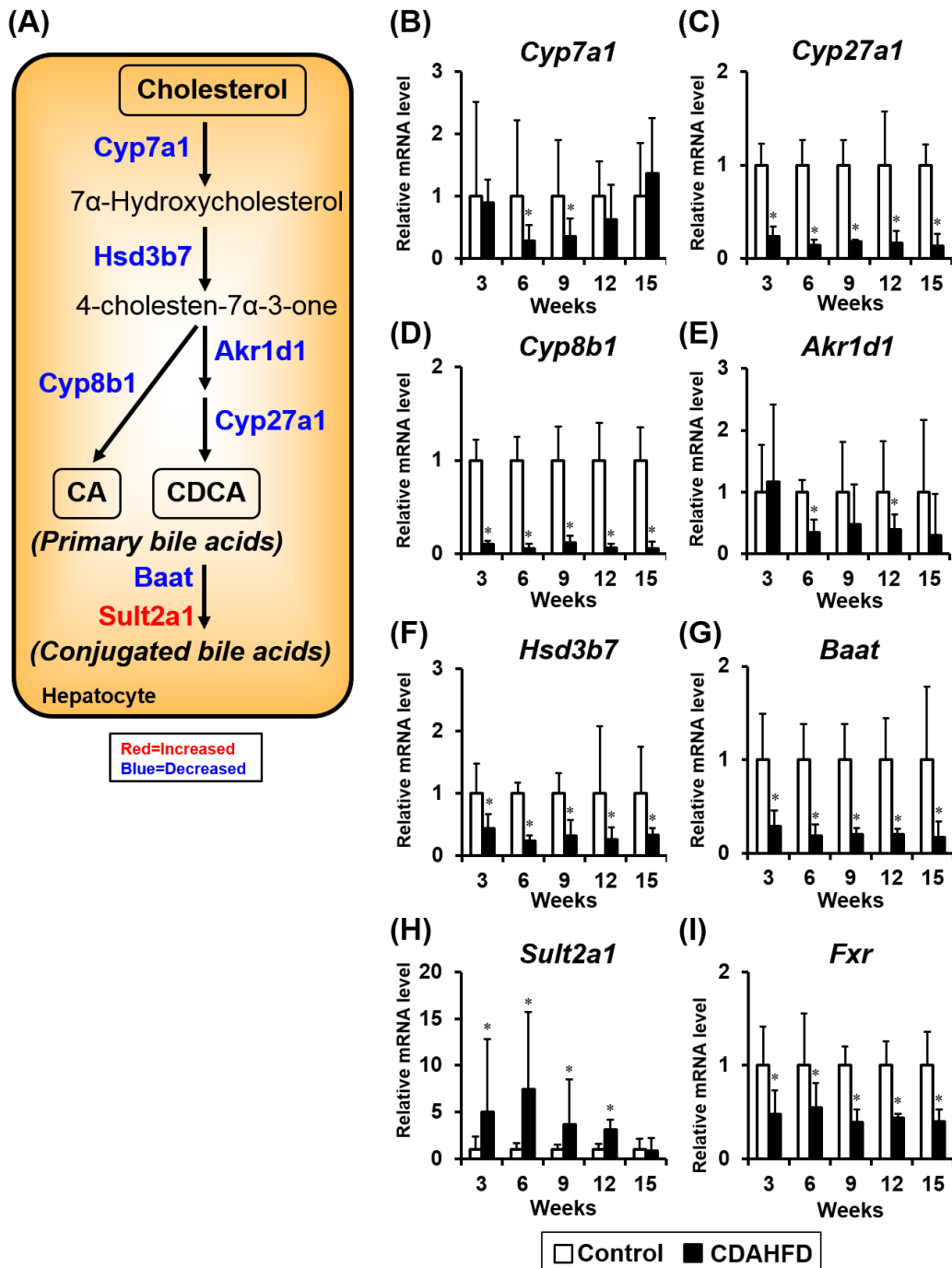


Fig. 22 The alteration in bile acid metabolizing enzymes and farnesoid X receptor by feeding of CDAHFD.

(A) Pathways of bile acid synthesis from cholesterol and metabolizing enzymes are shown. The mRNA levels of *Cyp7a1* (B), *Cyp27a1* (C), *Cyp8b1* (D), *Akr1d1* (E), *Hsd3b7* (F), *Baat* (G), *Sult2a1* (H), and *Fxr* (I) in the liver were analyzed. The PCR products were normalized to amplified β -actin. Data are shown as mean \pm S.D. (Control, n = 4–6; CDAHFD, n = 4–6). * $p < 0.05$, significantly different from control.

第 6 節 肝線維化の進展に及ぼす胆汁酸の影響

前節までの NASH モデルマウスを用いた検討により、肝実質細胞内における親水性の遊離型胆汁酸や抱合型胆汁酸の血管側への排出を促進するような胆汁酸動態の変動が認められた。血管側へ排出された胆汁酸は、類洞に到達する過程で、肝実質細胞と血管内皮細胞との間にあるディッセ腔を通過する。ディッセ腔は肝線維化の形成の場であることから、血管側へ排出された胆汁酸が肝線維化の進展に関与している可能性が考えられる。そこで、胆汁酸が肝線維化に及ぼす影響を調べるため、ディッセ腔に存在して肝線維化の進展に中心的な役割を担う肝星細胞に着目し、その活性化について検討を行った。不死化ヒト肝星細胞株 TWNT-1 細胞を用いて、各種胆汁酸を 100 μM の濃度で細胞に添加し、24 時間培養後の $\alpha\text{-SMA}$ 発現の変動を調べたところ、CDCA、DCA、GCA、GCDCA 及び GDCA の添加により、 $\alpha\text{-SMA}$ の mRNA 発現が有意に増加した (Fig. 23)。したがって、遊離型胆汁酸及びグリシン抱合型胆汁酸が肝星細胞の活性化に関与する可能性が考えられた。

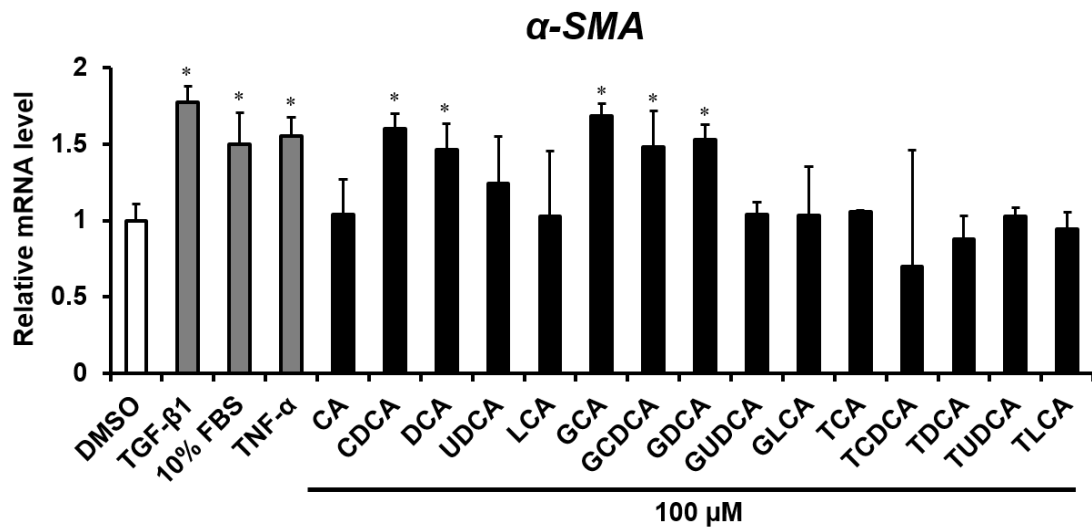


Fig. 23 Effects of bile acids on α -SMA expression of TWNT-1 cells.

TWNT-1 cells were cultured for 24 hours in FBS-free medium and then incubated in the same medium with bile acids (100 μ M) for 24 hours. In this experiment, all cells received the same amount of DMSO. TGF- β 1 (10 ng/mL), 10% FBS, and TNF- α (100 ng/mL) were used as a positive control. The α -SMA mRNA levels were normalized to those of *HPRT*. Data are shown as mean \pm S.D. (n = 3). * $p < 0.05$, significantly different from negative control (DMSO group).

第7節 考察

本章では CDAHFD 給餌により作製した NASH モデルマウスを用いて、胆汁酸の経時的な挙動変化を明らかにした。胆汁酸動態の変動と肝線維化の進展との関連が認められ、一部の胆汁酸が肝星細胞の活性化に関与したことから、胆汁酸動態の変動が NASH の病態進行に関与することが示唆された。

NASH の病態進行における胆汁酸動態の変動

NASH モデルマウスの肝臓において、胆汁酸組成の変動が認められた (Fig. 20A, Table 1)。肝実質細胞への胆汁酸の蓄積に関連する細胞毒性は、多くの肝疾患において重大な問題である⁹³⁻⁹⁶。NASH における胆汁酸による細胞毒性の詳細な分子メカニズムは明らかにされていないが、酸化ストレスや抗酸化応答が NASH の病態進行に関与することが報告されている⁹⁷。脂溶性の高い胆汁酸が細胞に蓄積すると、アポトーシスやネクローシスが直接的に活性化される⁹⁴。また、胆汁酸の脂溶性および細胞毒性作用の程度は、LCA > DCA > CDCA > CA > UDCA の順序で報告されている⁹⁴。本研究では NASH モデルマウスの肝臓において、脂溶性の高い胆汁酸 (DCA、LCA、HDCA 及び TDCA) の濃度が有意に低下していることを見出した。したがって、NASH の病態進行に伴い、胆汁酸の細胞毒性作用を軽減させるような肝実質細胞の自己防衛機構が働いていることが示唆された。

NASH モデルマウスの肝臓において、胆汁酸生合成酵素 (Cyp7a1、Cyp27a1、Cyp8b1、Akr1d1 及び Hsd3b7) の発現低下が認められた (Fig. 22B-F)。胆汁酸生合成酵素の発現低下は、ヒト NASH の肝臓においても同様に認められている³³。一方、NASH モデルマウスの肝臓において、Baat の発現は低下していたが、Sult2a1

の発現は増加していた (Fig. 22G, H)。硫酸抱合は胆汁酸の水溶性を高めることで、それらの消化管吸収を低下させるとともに、胆汁酸の尿中排泄を促進することが報告されている⁶⁹⁾。硫酸抱合型胆汁酸は、硫酸抱合を受けていない胆汁酸と比較して細胞毒性作用が低い⁶⁹⁾。したがって、NASHにおいて硫酸抱合は胆汁酸の細胞毒性作用を軽減させる重要な機構であることが示唆された。

NASHモデルマウスの肝臓において、Ntcp、Oatp1b2、Abcc3、Bsep及びAbcc2の発現がいずれも低下していた一方で、Ost β 及びAbcc4の発現は増加していた (Fig. 21)。これまでに、MCDの8週間の給餌により作製したNASHモデルマウスの肝臓においては、Ntcp及びOatp1b2の発現が低下していた一方で、Abcc4及びOst β の発現が増加し、Abcc2及びBsepの発現はコントロール群と比べて有意な差がなかったことが報告されている⁹⁸⁾。細胞内取り込みを担うトランスポーターの発現低下ならびに血管側への排出を担うトランスポーターの増加は、胆汁酸の肝実質細胞内への蓄積を抑制するための機構であることを示唆している。しかしながら、NASHモデルマウスの肝臓におけるAbcc3の発現は有意に低下しており (Fig. 21D)、同様に、MCDの6週間の給餌により作成したNASHモデルマウスでは、Abcc3のmRNA及びタンパク質の発現が低下したことが報告されている⁹⁹⁾。反対に、NASH患者の肝臓ではABCC3のmRNA及びタンパク質の発現が有意に増加していた^{100, 101)}。ABCC3は有機アニオンを肝実質細胞から血管側へと輸送し、特にグルクロン酸抱合体と、少ない程度ではあるものの硫酸抱合体を優先的に輸送する¹⁰²⁾。本研究で作製したNASHモデルマウスでは、末梢血中の硫酸抱合型胆汁酸の濃度はコントロール群と比べて有意に増加したが、グルクロン酸抱合型胆汁酸は定量下限以下であった (Table 7)。したがって、CDAHFD給餌により作製したNASHモデルマウスでは、ABCC3を介したグルクロン酸抱合型胆汁酸の輸送は促進されていないことが示唆された。

一方、胆管への排出を担うトランスポーターについては、これまでに NASH 患者において NAFLD の進行に伴い BSEP のタンパク質発現が有意に低下しており⁸⁶⁾、ABCC2 のタンパク質発現は NAFLD の進行に伴い増加したものの、その mRNA 発現は不変であったことが報告されている¹⁰¹⁾。Bsep 及び Abcc2 を共発現した細胞株を用いる *in vitro* 実験の結果から、Bsep は一価の胆汁酸 (グリシン抱合型及びタウリン抱合型胆汁酸) を輸送するのに対し、Abcc2 は二価の胆汁酸 (硫酸抱合あるいはグルクロン酸抱合を受けたグリシン抱合型及びタウリン抱合型胆汁酸) を輸送する^{103, 104)}。したがって、CDAHFD 給餌により作製した NASH モデルマウスにおける Bsep 及び Abcc2 の発現低下は、NASH の病態進行に促進的に働いていることが示唆された。

これまで、NASH の病態進行におけるトランスポーターの経時的変動と胆汁酸個々の動態についての詳細は明らかにされていなかった。そこで、本研究では NASH モデルマウスの胆汁中及び末梢血中の胆汁酸を定量したところ、胆汁中の胆汁酸 (α MCA、 ω MCA、HCA、HDCA、CDCA、DCA、UDCA、GHDCA、GDCA、TCA、T α MCA、T ω MCA、THCA、THDCA、TCDCA、TDCA、TUDCA、TLCA、GCA 3-sulfate、TCA 3-sulfate、TDCA 3-sulfate 及び UDCA 3-glucuronide) の濃度が給餌 9 週目でコントロール群と比べて有意に減少していた一方で、末梢血中の親水性の遊離型胆汁酸 (CA、 α MCA、 β MCA、 ω MCA、HCA、CDCA 及び UDCA) 及び抱合型胆汁酸 (TCA、T α MCA、T β MCA、T ω MCA、THCA、TCDCA、TUDCA、TCA 3-sulfates 及び TDCA 3-sulfates) の濃度は給餌 6 週目で有意に増加していた (Tables 6 and 7)。一方で、NASH モデルマウスの肝臓中の総胆汁酸量は、給餌 3 週目で有意に増加していたものの、給餌 6 週目以降は減少し、コントロール群と比べて有意な差を認めなかった (Fig. 20A)。肝実質細胞の胆汁酸排出トランスポーターとして、胆管側に発現する BSEP 及び ABCC2、血管側に発現す

る OST α/β 、ABCC3、ABCC4 及び OATP3A1¹⁰⁵⁾が報告されている。正常肝では、OST α/β 、ABCC3、ABCC4 及び OATP3A1 の発現は低く、胆汁酸の大部分が BSEP や ABCC2 を介して効率的に胆管に排出される。そのため、通常、血管側への胆汁酸排出はわずかであり、末梢血中の胆汁酸は微量に維持されている。しかしながら、NASH では、抱合型胆汁酸に対して高親和性を示す BSEP の発現が低下することにより胆管への胆汁酸排出が抑制される一方で、低親和性を示す OST の発現が増加することにより血管側への胆汁酸排出が促進することが考えられた。特に、NASH の病態進行における胆汁酸動態の経時的な解析により、Ost β の発現が肝線維化進展の早期（給餌3週目）に増加することを見出したことは新しい知見であり、NASH モデルマウスでは Ost β の発現増加により胆汁酸排出が促進され、CDAHFD 給餌 3–6 週目にかけて肝臓の総胆汁酸量が減少した可能性が考えられた。以上より、NASH では肝実質細胞から胆汁中よりもむしろ末梢血中への胆汁酸排出が促進していることが示唆された (Fig. 24)。

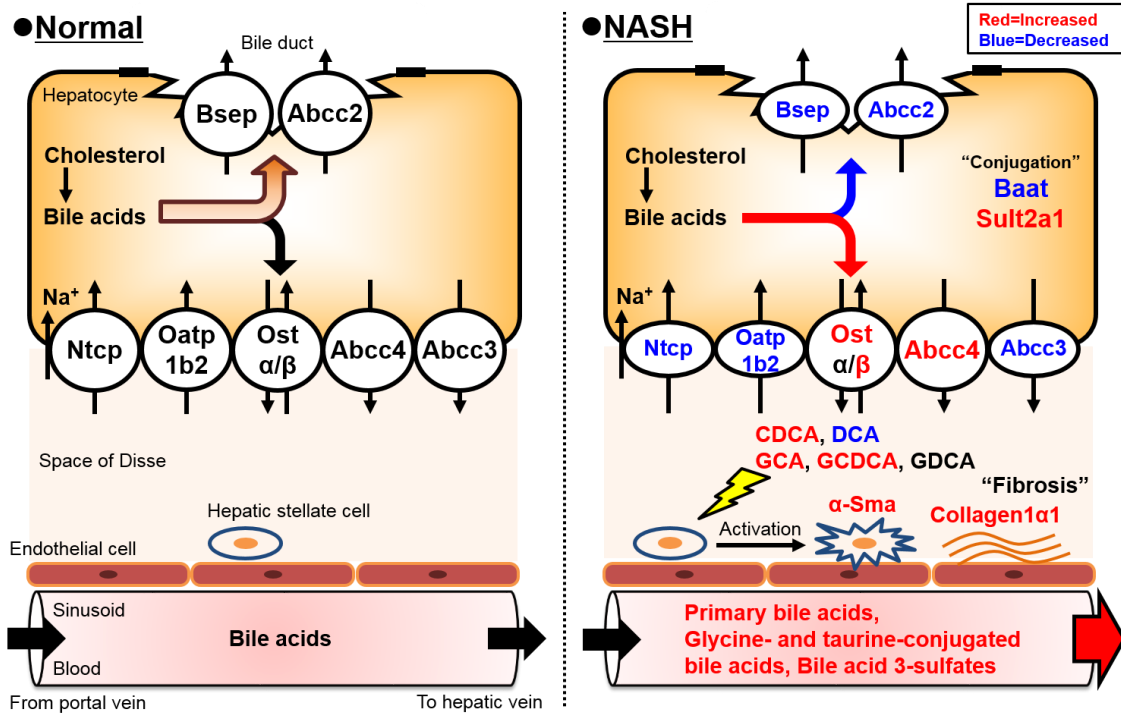


Fig. 24 Altered bile acid composition and disposition in a mouse model of NASH.

胆汁酸トランスポーター及び胆汁酸代謝酵素の発現は核内受容体 FXR が制御していることが報告されている¹⁰⁶⁾。FXR は胆汁酸をリガンドとし、レチノイド X 受容体とのヘテロ二量体を形成して転写因子として作用する。肝実質細胞内に蓄積した胆汁酸が FXR と結合することにより、取り込みトランスポーターである NTCP やマウス Oatp1b2 のヒトオーソログである OATP1B1 及び OATP1B3 の発現が低下し、胆汁酸の肝取り込みが抑制するとともに、排出トランスポーターである OST α/β や BSEP の発現が増加して胆汁酸の細胞外排出を促進する。さらに、CYP7A1 の発現が低下して、胆汁酸の生合成が低下する。本研究で用いた NASH モデルマウスの肝臓 Fxr の mRNA 発現を調べたところ、給餌 3 週目よりコントロール群と比べて有意な低下が認められた (Fig. 22I)。以上より、NASH では、胆汁酸トランスポーター及び胆汁酸代謝酵素の発現変動に FXR の発現変動が関与し、肝実質細胞を保護するような機構が働いていることが示唆された。一方で、NASH モデルマウスの肝臓における Bsep 及び Abcc2 の発現低下は、Fxr 以外の核内受容体が関与している可能性が考えられ、今後そのメカニズムを詳細に調べる必要がある。

本研究で用いた NASH モデルマウスでは、CDAHFD 給餌 6 週目で肝線維化のスコアがほぼ最大に達し (Fig. 17B)、血漿中 ALT 及び AST は給餌 6 週目をピークに徐々に減少した (Fig. 16C, D)。一方、末梢血中の総胆汁酸濃度も給餌 6 週目をピークに徐々に減少した (Fig. 20C)。序論で述べたように、胆汁酸は脂質の消化吸収促進作用だけでなく、シグナル伝達分子としても作用を発揮することが知られ、肝臓や回腸だけでなく全身に広く発現する FXR や TGR5 などの受容体に結合し、脂質代謝や糖代謝、エネルギー代謝制御に関与する。TGR5 が活性化されると脂肪肝が改善し、肝線維化が抑制され、血漿中 ALT 及び AST が低下する²⁵⁾。したがって、CDAHFD 給餌により作製した NASH モデルマウスでは、

全身循環血中で増加した胆汁酸が TGR5 を活性化して、NASH の病態進行を抑制するように機能していることが示唆された。

肝線維化に及ぼす胆汁酸の影響

肝線維化は、ウイルス性肝炎、アルコール性肝障害、自己免疫や NASH など、種々の要因に対する生体防御の結果として生じる病態である。肝硬変、さらには高頻度に合併する肝細胞癌の発生を抑止するうえで、肝線維化に対する治療法の開発は重要な研究課題である。

肝内で線維を合成する主な細胞は肝星細胞と考えられている。肝星細胞は、肝実質細胞と血管内皮細胞との間にあるディッセ腔に存在し、類洞内血流の調節やビタミン A の貯蔵を担っている¹⁰⁷⁾。炎症や酸化ストレス、胆汁うっ滞などが進行すると、転写因子 nuclear factor- κ B が酸化的に活性化され、TGF- β 1 シグナル伝達が活性化することで、肝星細胞が活性化する。静止型から活性化型となった肝星細胞は筋線維芽細胞へと分化し、 α -SMA の発現を増加させ、コラーゲン等の細胞外マトリックスを過剰に産生する¹⁰⁸⁾。本研究で用いた TWNT-1 細胞は、ヒト肝臓の上皮性血管内皮腫から確立した LI90 という肝星細胞株に¹⁰⁹⁾、human telomerase reverse transcriptase を導入し不死化した細胞である¹¹⁰⁾。LI90 と同様に、TWNT-1 細胞は肝星細胞に特徴的なマーカーとされる α -SMA や Collagen1 α 1 を発現している。これまでにヒト肝星細胞株 LX-2 細胞を用いた検討では、二次胆汁酸である DCA と LCA が 500 μ M の濃度で 48 時間培養した条件で α -SMA の発現を増加させることが報告されている¹¹¹⁾。また、同細胞株を用いた別の報告¹¹²⁾では、TCA が 50–100 μ M の濃度で 48 時間培養した条件で α -SMA や Collagen1 α 1 の発現を濃度依存的に増加させることが示されている。本研究では、CDCA、DCA、GCA、GCDCA 及び GDCA が、100 μ M の濃度で 24

時間培養した条件で TWNT-1 細胞の α -SMA 発現を有意に増加させることを見出した (Fig. 23)。これらの胆汁酸の中でも、肝線維化のスコアがほぼ最大に達した CDAHFD 給餌 6 週目で末梢血中の濃度が増加した CDCA、GCA 及び GCDCA が肝星細胞の活性化を介して、NASH の病態進行に参与していることが示唆された (Fig. 24)。今後、各種胆汁酸が肝線維化にどの程度寄与するかを詳細に解析する必要がある。

胆汁酸動態の調節が NASH の新たな治療戦略となり得る可能性

本研究により、肝実質細胞から血管側へ排出された一部の胆汁酸が、肝非実質細胞である肝星細胞の活性化に参与していることが明らかとなった。この成果は、肝実質細胞が胆汁酸による障害から自身を保護するために機能するにもかかわらず、一方で肝星細胞が胆汁酸の影響を受けることで、肝臓全体で見れば結果的に線維化を伴う NASH の病態進行が促進される可能性があることを示唆している。したがって、肝実質細胞から排出された胆汁酸による肝星細胞への影響を回避するような胆汁酸動態の調節を行うことで、NASH の新たな治療可能性を見出すことができると考えられる。こうした胆汁酸動態の調節を達成するために、以下に示すような[1] 胆汁酸の胆管への排出を促進する、[2] 胆汁酸の組成を変化させる戦略が考えられる。

[1]. 胆汁酸の胆管への排出を促進する

NASH モデルマウスでは血管側の胆汁酸排出トランスポーターである Ost β や Abcc4 の発現が増加していた一方で、胆管側の胆汁酸排出トランスポーターである Bsep や Abcc2 の発現が低下していた (Fig. 21B, C, H, I)。したがって、NASH において BSEP や ABCC2 の発現低下を回復し、胆管への胆汁酸排出を促進することができれば、肝障害の予防だけでなく、胆汁酸による肝

星細胞への影響の回避に貢献するものと考えられる。これまでにトランスポーターを標的とした胆汁うっ滞症の治療戦略の例として、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型における **BSEP** の肝毛細胆管側膜発現量の増加が挙げられ、尿素サイクル異常症の治療薬である 4-phenylbutyrate を用いた薬物治療の可能性が示されている¹¹³⁾。4-Phenylbutyrate は細胞膜に発現する **BSEP** のユビキチン化を抑制するとともに、**BSEP** の細胞膜からの内在化を阻害することで、**BSEP** の肝毛細胆管側膜発現量の増加作用を示す。今後、胆管側の胆汁酸排出トランスポーターを標的とした胆汁酸動態を調節する戦略により、**NASH** の病態進行を抑制できる可能性が考えられる。

[2]. 胆汁酸の組成を変化させる

本研究により、胆汁酸の中でも肝星細胞の活性化に関与するものや一方で関与しないものがあることが判った (Fig. 23)。したがって、生体内の胆汁酸の組成を変化させ、肝星細胞の活性化に関与する胆汁酸量を低下させることで、肝線維化を抑制できる可能性が考えられる。胆汁酸の組成を変化させる方法として、腸内細菌叢を変化させることや、胆汁酸の再吸収を抑制することが考えられる。

二次胆汁酸である **DCA**、**UDCA** 及び **LCA** は腸内細菌叢により一次胆汁酸から代謝される。本章で作製した **NASH** モデルマウスにおいても、胆汁酸組成及び濃度が変動した要因として、肝臓において胆汁酸動態を支配するトランスポーター及び代謝酵素の発現変動の他に、腸内細菌叢が変化したことによる可能性が挙げられる。**DCA** は肝星細胞からの細胞老化因子の産出を誘導することにより、肝細胞癌を誘発することが報告されている¹¹⁴⁾。一方、高脂肪食誘導 **NASH**-肝細胞癌マウスモデルを用いた検討¹¹⁵⁾では、抗生物質の投与により **NASH** 及び肝細胞癌の病態が改善しており、その要因の一つには

腸内細菌叢が変化して一次、二次胆汁酸の組成に変化が生じたことが考えられている。本研究では、二次胆汁酸の DCA だけでなく一次胆汁酸の CDCA が、高濃度条件ではあるものの、肝星細胞の活性化に関与することを見出した (Fig. 23)。したがって、CA から DCA に代謝する腸内細菌 *Clostridium* を減少させ、CDCA を UDCA に代謝する腸内細菌を増加させることで、これらの胆汁酸量を低下させることができると考えられる。

一方、胆汁酸の再吸収を抑制する方法として、高コレステロール血症の治療薬として用いられる陰イオン交換樹脂のコレスチラミンやコレスチミドの投与がある。陰イオン交換樹脂は、腸内で胆汁酸を吸着し糞便への排泄を促進することで、外因性コレステロール吸収を抑制するだけでなく、肝臓内コレステロールから一次胆汁酸である CA への代謝を促進する。また、慢性便秘症治療薬として用いられるエロビキシバットは ASBT を直接阻害することで、胆汁酸の再吸収を抑制する。本章で作製した NASH モデルマウスにおいて、肝線維化の進展に伴い肝臓内コレステロール量の増加が認められた (Fig. 16B)。したがって、これらの薬剤を用いることにより炎症や肝線維化の要因である遊離コレステロールの肝臓内蓄積を抑制し、NASH の病態進行を抑制できる可能性が考えられる。

以上に挙げた戦略の他に、FXR を標的とした NASH の治療戦略が挙げられる。これまでに CDCA の FXR アゴニスト活性を高めたオベチコール酸 (INT-747) を用いた原発性胆汁性胆管炎¹¹⁶⁾や NASH¹¹⁷⁾に対する臨床試験が行われている。特に NASH に対する臨床試験においては、オベチコール酸投与群で NAS と fibrosis stage が有意に低下していた。したがって、早期の肝線維化を伴う NASH に対して、FXR の活性化が有効な治療戦略であると考えられる。

本研究における限界

本研究ではCDAHFD 給餌により作製したNASHモデルマウスを用いて胆汁酸動態を調べたが、本モデルはヒトのNASHの病態を必ずしも反映していない。そのため、本研究で得られた知見を活用するには次の3点を考慮する必要がある。

1) ヒトとマウスの種差

代謝性疾患の研究において、マウスは最も頻用されるモデル動物である。しかしながら、マウスの胆汁酸組成はヒトと異なることが知られている。例えば、腸肝循環内に存在する総胆汁酸量に占めるグリシン抱合型胆汁酸とタウリン抱合型胆汁酸の比は、ヒトでは2対1であるのに対し、マウスでは1対100と大きく異なる。そのうえ、マウスの肝は、ヒトでは最終産物であるCDCAの6 β 位を水酸化してCDCAを細胞障害性のない親水性のMCAに変換する酵素Cyp2c70¹¹⁸⁾を有し、また、DCAの7 α 位を脱水酸化してCAに変換する酵素も有する。げっ歯類に特有のT β MCAはFXRのアンタゴニストとして作用し、NAFLDの進展抑制に関与することから¹¹⁹⁾、胆汁酸組成の種差がNASHの病態進行に影響することが考えられる。今後、ヒト化マウスを用いることが種差を補正する一つの解決策として挙げられる。

2) NASHモデルの選択

本研究で用いたモデルは、表現型が軽い瘦となる栄養障害モデルであり、インスリン抵抗性を伴わない。今後、複数のNASHモデルを用いて胆汁酸動態の変動が再現されるかを調べる必要がある。

3) CDAHFDの給餌期間

CDAHFDを36週間給餌させると肝線維化を伴うNASHを経て肝細胞癌に至り、さらに60週間まで給餌させると肝臓以外の臓器でも発がんが認めら

れることが報告されている¹²⁰⁾。本研究では炎症と肝線維化の進展に着目したため 15 週間までの給餌期間を設定したが、NASH の病態進行と胆汁酸動態との関連をより詳細に調べるためには、長期的な給餌期間を設定して検討を行う必要がある。

第8節 小括

本章では NASH モデルマウスを用いて、NASH の病態進行と胆汁酸動態との関連を経時的に調べた。その結果、NASH の病態進行に伴い、末梢血中における親水性の遊離型胆汁酸や抱合型胆汁酸の濃度が増加し、一方で、これらの胆汁中濃度が低下していた。次に、肝臓または回腸において胆汁酸動態を支配するトランスポーター及び代謝酵素の発現変動を調べたところ、NASH モデルマウスにおいて Ntcp、Oatp1b2、Bsep、Abcc2 及び Cyp7a1 の発現がいずれも低下し、一方で肝臓 Ost β 及び Abcc4 の発現が増加していることが判った。さらに、TWNT-1 細胞を用いた検討により、遊離型胆汁酸及びグリシン抱合型胆汁酸が、肝星細胞の活性化の指標となる α -SMA の発現を増加させることを明らかにした。

以上より、NASH の病態進行に伴い胆汁酸動態が変動することを明らかにし、肝臓に発現するトランスポーター及び代謝酵素が NASH の病態進行における胆汁酸動態の変動因子として機能していることが示唆された。さらに、肝実質細胞から血管側へ排出された一部の胆汁酸が、肝星細胞の活性化を介して肝線維化の進展に関与することが示唆された。本知見は、ヒトとマウスの種差など考慮すべき点はあるものの、NASH の病態進行における胆汁酸動態の変動因子としてトランスポーターの重要性を提示するだけでなく、NASH の病態を改善する新たな戦略として胆汁酸動態の調節が標的となる可能性を提示するものである。今後、胆汁酸動態の調節を標的とした NASH の治療戦略を創出するには、胆汁酸動態の変動による NASH 病態進行への寄与をより詳細に明らかにする必要があると考えられる。

結論

本論文では、NASH の病態進行における胆汁酸動態に関する研究を行い、以下の結論を得た。

第 1 章では、胆汁酸動態を支配する分子の一つと考えられるトランスポーターに着目し、これまでに詳細な検討が行われていなかった OATP1B1、OATP1B3 及び OST α/β を介した 15 種の胆汁酸の輸送特性を調べた。本研究によって、OATP1B1 及び OATP1B3 の新たな輸送基質として、GCDCA、GDCA、GLCA、TCDCa、TDCA 及び TLCA を見出した。また、グリシン抱合型胆汁酸及びタウリン抱合型胆汁酸は OATP1B1 及び OATP1B3 の良好な基質であり、遊離型胆汁酸に比べ高親和性を示すことを明らかにした。一方、OST α/β の新たな輸送基質として GCDCA、GDCA、GUDCA、GLCA、TCDCa、TDCA、TUDCA 及び TLCA を見出した。また、OST α/β は、胆汁酸を細胞外に排出するトランスポーターの中でも、胆汁酸に低親和性を示す傾向にあったが、なかでも脂溶性の高い胆汁酸には比較的高親和性を示すことを明らかにした。

第 2 章では、NASH の病態進行と胆汁酸動態との関連を明らかにするために、NASH モデルマウスを用いた検討を行った。CDAHFD の給餌により、早期の NASH 誘発と肝線維化の経時的な進展が認められ、炎症及び線維化関連遺伝子の発現増加を確認できた。作製した NASH モデルマウスでは、給餌 3 週目より末梢血中における親水性の遊離型胆汁酸やグリシン抱合型及びタウリン抱合型胆汁酸の濃度が増加した一方で、それらの胆汁中濃度は低下した。続いて、胆汁酸の質的及び量的変動が認められた要因を明らかにするために、肝臓及び回腸に発現するトランスポーターの mRNA を調べたところ、NASH モデルにおいて Ntcp、Oatp1b2、Abcc2、Bsep 及び Asbt は発現が低下し、肝臓 Ost β は発現が

早期に増加した。さらに、肝臓に発現する胆汁酸代謝酵素の mRNA を調べたところ、NASH モデルマウスにおいて胆汁酸の生合成の律速酵素である Cyp7a1をはじめ、各種生合成酵素の発現が有意に低下していた。また、遊離型胆汁酸を抱合する酵素のうち、アミノ酸抱合酵素 Baat の発現は有意に低下していた一方で、硫酸抱合酵素 Sult2a1 の発現は有意に増加していた。以上の検討から、NASH モデルマウスにおいて、肝実質細胞内胆汁酸の血管側への排出を促進するような胆汁酸動態の変動が認められることを明らかにした。そこで次に、血管側へ排出された胆汁酸が肝線維化に及ぼす影響を調べるため、肝線維化に中心的な役割を担う肝星細胞の活性化に着目して検討を行った。その結果、CDCA、DCA、GCA、GCDCA 及び GDCA の添加により、肝星細胞の活性化の指標となる α -SMA の mRNA 発現が有意に増加することを明らかにした。

以上の研究結果から、肝線維化の進展に伴い、肝臓において胆汁酸動態を支配するトランスポーターと代謝酵素の経時的な発現変動が生じ、親水性の遊離型胆汁酸や抱合型胆汁酸の血管側への細胞外排出が促進されることが考えられた。さらに、血管側へ排出された胆汁酸が、肝星細胞の活性化を介して肝線維化の進展に関与していることが示唆された。今後、胆汁酸動態の変動による NASH の病態進行への寄与をより詳細に明らかにすることで、NASH の治療戦略の創出が期待される。

謝辞

本研究において、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科 病態分子薬学分野 教授 眞野成康 先生に謹んで感謝申し上げます。

本論文の審査にあたり、有益な御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科 衛生化学分野 教授 松沢厚 先生、ならびに同生活習慣病治療薬学分野 准教授 平塚真弘 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始多大なる御指導と御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科 病態分子薬学分野 准教授 山口浩明 先生に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、活発に議論してくださり貴重な御指導と御助言を賜りました東北大学病院薬剤部 准教授 小原拓 先生、同講師 菊地正史 先生、同助教 小倉次郎 先生、同助教 前川正充 先生、同助手 金光祥臣 先生、ならびに同助手 佐藤紀宏 先生 (現：テキサス工科大学) に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行に際して、多大なる御協力と御配慮をいただきました東北大学大学院薬学研究科 病態分子薬学分野、ならびに東北大学病院薬剤部の皆様に御礼申し上げます。

最後に、長年にわたり多大なる援助と激励をくださいました家族に心より感謝いたします。

2019年3月

須賀 隆浩

実験の部

試薬

CA、CDCA 及び TLCA は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。DCA 及び LCA は Wako (Osaka, Japan) から購入した。TCA、UDCA、GUDCA 及び TUDCA はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) から購入した。その他の胆汁酸標品 (HCA、HDCA、 α MCA、 β MCA、 ω MCA、GCA、GCDCA、GDCA、GLCA、GHCA、GHDCA、G α MCA、G β MCA、THCA、THDCA、T α MCA、T β MCA、T ω MCA、TCDCa、TDCA、CDCA 3-sulfate、DCA 3-sulfate、LCA 3-sulfate、GCA 3-sulfate、GCDCA 3-sulfate、GDCA 3-sulfate、GUDCA 3-sulfate、GLCA 3-sulfate、TCA 3-sulfate、TCDCa 3-sulfate、TDCA 3-sulfate、TUDCA 3-sulfate、TLCA 3-sulfate、CA 3-glucuronide、CDCA 3-glucuronide、DCA 3-glucuronide、UDCA 3-glucuronide、LCA 3-glucuronide、3,7,12- 18 O]CA、3,7- 18 O]GCA、3,7- 18 O, 2 H]GCDCA、3- 18 O, 2 H]GLCA、3,12- 18 O, 2 H]TDCA、3- 18 O, 2 H]TLCA 及び 7- 18 O, 2 H]CDCA 3-sulfate) は当研究室で有機化学合成したものをを用いた。ギ酸 (高速液体クロマトグラフィー用)、メタノール (試薬 1 級)、酢酸アンモニウム (試薬特級) 及びアンモニア水 (試薬特級) は Wako から購入した。メタノールは蒸留してから用い、水はオルガノ株式会社 (Tokyo, Japan) の PURELAB Ultra Genetic にて精製した超純水を用いた。アセトニトリル (高速液体クロマトグラフィー用) は関東化学株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。ヒト肝臓は Sekisui XenoTech, LLC (Kansas City, KS) から購入した。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に用いたプライマーはユーロフィンジェノミクス株式会社 (Tokyo, Japan) に合成を依頼した。

装置

イオン化部として、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) プローブを装着した三連四重極型質量分析計 API 5000 (AB SCIEX, Framingham, MA) に高速液体クロマトグラフとして Nexera シリーズ (Shimadzu, Kyoto, Japan) を接続した装置を使用した。波形解析及び内部標準法による定量計算は Analyst 1.4.1 (AB SCIEX) により行った。また、ESI プローブを装着した三連四重極型質量分析計 Agilent 6460 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) に高速液体クロマトグラフとして Agilent 1290 シリーズ (Agilent Technologies) を接続し、第 1 章で使用した。波形解析及び内部標準法による定量計算は MassHunter Workstation software (Agilent Technologies) により行った。第 2 章では、ESI プローブを装着した三連四重極リニアイオントラップ質量分析計 QTRAP 6500 (AB SCIEX) に、高速液体クロマトグラフとして Nexera シリーズ (Shimadzu) を接続し、使用した。波形解析及び内部標準法による定量計算は Analyst 1.6.2 (AB SCIEX) により行った。

第 1 章 付属実験

細胞培養

OATP1B1 及び OATP1B3 安定発現させたヒト胎児腎由来株化細胞 HEK293 細胞 (OATP1B1/HEK293 細胞および OATP1B3/HEK293 細胞) はすでに樹立されたものを使用した^{58,59}。コントロールとして、pcDNA3.1 (+) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を導入した HEK293 細胞 (mock 細胞) を使用した。OATP1B1/HEK293、OATP1B3/HEK293 細胞および mock 細胞は、非働化した 10% fetal bovine serum

(FBS) および 0.5 mg/mL G418 を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (ナカライテスク) を用いて継代培養した。細胞の培養は 37°C、5% CO₂-95% air インキュベーター内で行った。

OST α 及び OST β を安定発現させたイヌ腎臓尿細管上皮細胞由来株化細胞 MDCKII 細胞 (OST $\alpha\beta$ /MDCKII 細胞) は当研究室ですでに樹立されたものを使用した。コントロールとして、pIRES2-EGFP (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) を導入した MDCKII 細胞 (mock 細胞) を使用した。OST $\alpha\beta$ /MDCKII 細胞および mock 細胞は、非働化した 10% FBS および 0.5 mg/mL G418 を含む DMEM を用いて継代培養した。細胞の培養は 37°C、5% CO₂-95% air インキュベーター内で行った。

標準溶液の調製

ロスバスタチンを精秤後、ジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解して 1 mmol/L の標準原液を調製した。標準原液を一定量採り、水で希釈して 10、20、50、100、200 及び 500 nmol/L の標準溶液を調製した。

各胆汁酸の標準化合物を精秤後、DMSO で溶解して標準原液を調製した。標準原液の濃度は、次の通りとした。CA (80 mmol/L)、CDCA (40 mmol/L)、DCA (40 mmol/L)、UDCA (40 mmol/L)、LCA (40 mmol/L)、GCA (200 mmol/L)、GCDCA (200 mmol/L)、GDCA (200 mmol/L)、GUDCA (200 mmol/L)、GLCA (40 mmol/L)、TCA (2,000 mmol/L)、TCDCA (200 mmol/L)、TDCA (400 mmol/L)、TUDCA (400 mmol/L)、TLCA (40 mmol/L)。標準原液を一定量採り、さらに DMSO で希釈して 0.5、1、2、5、10、20、50、100、200、500、1,000 及び 2,000 nmol/L の標準溶液を調製した。

IS 溶液の調製

プラバスタチンを精秤後、水で溶解して 1 mmol/L の標準原液を調製した。これをさらにメタノール/水 (1:1, v/v) で希釈して 0.5 $\mu\text{mol/L}$ のロスバスタチン定量用の内部標準物質 (IS) 溶液とした。

安定同位元素標識した各化合物を精秤後、エタノール/水 (1:1, v/v) で溶解して 100 $\mu\text{g/mL}$ の標準原液を調製した。これをさらにメタノール/水 (1:1, v/v) で希釈して 1 nmol/L の胆汁酸定量用の IS 溶液とした。

検量線試料の調製

各濃度のロスバスタチンの標準溶液を一定量採り、IS 溶液 200 μL を添加して、0.5、1、2.5、5、10 及び 25 nmol/L の検量線試料を調製した。各試料を遠心エバポレーターにて溶媒留去し、残渣をメタノール/水 (1:1, v/v) 20 μL で再溶解したものを 2 μL 注入して、検量線を作製した。

各濃度の胆汁酸の標準溶液を一定量採り、IS 溶液 200 μL を添加して、0.05、0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10、25、50 及び 100 nmol/L の検量線試料を調製した。各試料を遠心エバポレーターにて溶媒留去し、残渣をメタノール/水 (1:1, v/v) 50 μL で再溶解したものを 10 μL 注入して、検量線を作製した。

取り込み実験及び定量用サンプルの調製

Poly-L-lysine コーティングした 24-well plates に OATP1B1/HEK293 細胞、OATP1B3/HEK293 細胞および mock 細胞を 2.0×10^5 cells/well で播種し、72 時間生育させた。OST $\alpha\beta$ /MDCKII 細胞および mock 細胞については 24-well plates に 1.0×10^5 cells/well で播種し、96 時間生育させた。取り込み実験 24 時間前には 10% FBS を含む DMEM で培地交換を行った。細胞を 37°C に温めた Krebs-Henseleit

(KH) buffer (118 mM NaCl、5.0 mM D-Glucose、4.83 mM KCl、0.96 mM KH₂PO₄、23.8 mM NaHCO₃、1.20 mM MgSO₄、1.53 mM CaCl₂、12.5 mM HEPES、pH 7.4) で1回洗浄後、37°Cに温めた KH buffer を0.2 mL 加え10 min プレインキュベートした。KH buffer を除去した後、薬液0.2 mL を加え、37°C で規定時間インキュベートした。薬液を除き、氷冷した KH buffer 1 mL で3回洗浄し、乾燥後、ISを含むメタノール/水 (1:1, v/v) 200 μ L を加えて細胞を掻き取り回収した。アセトニトリル 200 μ L を加えて10秒間激しく攪拌し、遠心分離 (15,000 \times g、5 min、4°C) 後、得られた上清を遠心エバポレーターにて溶媒留去し、メタノール/水 (1:1, v/v) で再溶解したものをサンプルとした。また、氷冷した KH buffer で2回洗浄し、乾燥後、0.5 mmol/L NaOH を加えて溶解させたものをタンパク定量用サンプルとした。タンパク質濃度は bovine serum albumin (BSA) を標準試料とした Bradford 法を用いて定量した。Bradford 法には Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を使い、マイクロプレートリーダー Infinite[®] M200 PRO (TECAN, Kanagawa, Japan) にて 595 nm の吸光度を測定した。

細胞内に取り込まれたロスバスタチンの定量 (LC/MS/MS)

HPLC およびタンデム質量分析は、以下の条件及び Table 8 に示した条件で実施した。クロマトグラム上のピーク面積をデータ解析ソフトにより算出し、ロスバスタチンと IS のプラバスタチンの面積比を用いる内部標準法により定量した。

<HPLC condition>

System: Nexera (Shimadzu)

Analytical column: Inertsil ODS-3 (2.1 mm I.D. × 150 mm, 5 μm, GL sciences, Tokyo, Japan)

Guard column: Inertsil ODS-3 (1.5 mm I.D. × 10 mm, 5 μm, GL sciences)

Column oven temperature: 40°C

Mobile phase: acetonitrile/5 mmol/L ammonium acetate/formate (45:55:0.1, v/v/v)

Flow rate: 0.3 mL/min

Injection volume: 2 μL

<MS/MS condition>

System: API5000 (AB SCIEX)

Ionization mode: ESI-positive

Curtain gas: 15 psi

Collision gas: 9 psi

Ionspray voltage: 3500 V

Ion source temperature: 500°C

Ion source gas 1: 40 psi

Ion source gas 2: 70 psi

Table 8 Analysis of selected reaction monitoring (SRM) parameters for rosuvastatin and pravastatin

Analytes	SRM transition	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)	EP (V)
Rosuvastatin	<i>m/z</i> 482 → 258	211	47	16	4
Pravastatin (IS)	<i>m/z</i> 447 → 327	136	29	26	2

細胞内に取り込まれた胆汁酸の定量 (LC/MS/MS)

HPLC およびタンデム質量分析は、以下の条件及び Table 9 に示した条件で実施した。クロマトグラム上のピーク面積をデータ解析ソフトにより算出し、各化合物と各 IS の面積比を用いる内部標準法により定量した。

<HPLC condition>

System: Agilent 1290 (Agilent Technologies)

Analytical column: Inertsil ODS-3 (2.1 mm I.D. × 150 mm, 5 µm, GL sciences)

Guard column: Inertsil ODS-3 (1.5 mm I.D. × 10 mm, 5 µm, GL sciences)

Column oven temperature: 40°C

Mobile phase: methanol/20 mmol/L ammonium acetate (pH 6.8) (75:25, v/v)

Flow rate: 0.3 mL/min

Injection volume: 10 µL

<MS/MS condition>

System: Agilent 6460 (Agilent Technologies)

Ionization mode: ESI-negative

Gas temperature: 350°C

Gas flow: 12 L/min

Nebulizer gas: 60 psi

Sheath gas temperature: 400°C

Sheath gas flow: 12 L/min

Capillary voltage: -5000 V

Nozzle voltage: 500 V

Table 9 Analysis of SRM parameters and internal standards for bile acids

Analytes	SRM transition	Fragmentor voltage (V)	CE (eV)	IS
CA	<i>m/z</i> 407 → 407	230	0	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
CDCA	<i>m/z</i> 391 → 391	210	0	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCDCA
DCA	<i>m/z</i> 391 → 391	200	0	3-[¹⁸ O, ² H]GLCA
UDCA	<i>m/z</i> 391 → 391	230	0	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
LCA	<i>m/z</i> 375 → 375	190	0	3-[¹⁸ O, ² H]GLCA
GCA	<i>m/z</i> 464 → 74	210	45	3, 7-[¹⁸ O]GCA
GCDCA	<i>m/z</i> 448 → 74	200	40	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCDCA
GDCA	<i>m/z</i> 448 → 74	200	40	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCDCA
GUDCA	<i>m/z</i> 448 → 74	200	40	3, 7-[¹⁸ O]GCA
GLCA	<i>m/z</i> 432 → 74	190	40	3-[¹⁸ O, ² H]GLCA
TCA	<i>m/z</i> 514 → 80	300	95	3, 7-[¹⁸ O]GCA
TCDC	<i>m/z</i> 498 → 80	290	90	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
TDCA	<i>m/z</i> 498 → 80	290	75	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
TUDCA	<i>m/z</i> 498 → 80	290	75	3, 7-[¹⁸ O]GCA
TLCA	<i>m/z</i> 482 → 80	280	75	3-[¹⁸ O, ² H]TLCA
3, 7, 12-[¹⁸ O]CA	<i>m/z</i> 413 → 413	230	0	—
3, 7-[¹⁸ O]GCA	<i>m/z</i> 470 → 74	210	45	—
3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCDCA	<i>m/z</i> 454 → 74	200	40	—
3-[¹⁸ O, ² H]GLCA	<i>m/z</i> 435 → 74	190	40	—
3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA	<i>m/z</i> 504 → 80	290	75	—
3-[¹⁸ O, ² H]TLCA	<i>m/z</i> 485 → 80	280	75	—

阻害実験

阻害物質非存在下におけるトランスポーターを介した典型的基質の取り込みを 100%とし、uptake (% of control) を算出した。

トランスポーターによる胆汁酸輸送の速度論的パラメーターの算出

トランスポーターを介した取り込み量は、トランスポーター発現細胞株への取り込み量から mock 細胞へのトランスポーター非特異的取り込み量を差し引くことで算出した。トランスポーターを介した胆汁酸取り込みの濃度依存性を調べ、以下のミカエリス・メンテン式にフィッティングした。

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

v は取り込み速度 (pmol/mg protein/min) であり、 S は基質濃度 (μM) である。見かけの K_m 及び V_{\max} は Eadie-Hofstee plot によって算出した。

Western blot analysis

- ・ヒト肝臓からの plasma membrane fraction の調製

ヒト肝臓 (HHPL.NT Lot No. H1310) 約 100 mg を 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 及び HaltTM protease and phosphatase inhibitor cocktail, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) free (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を含む氷冷した phosphate-buffered saline (PBS) 1 mL 中でホモジナイズした後、Bioruptor UCD-300 (Cosmo Bio, Tokyo, Japan) を用いて 5 min 超音波処理を行った。遠心分離 (10,800 × g , 20 min, 4°C) を行い、その上清を遠心分離 (100,000 × g , 60 min, 4°C) した。上清を除去し、沈殿を PBS 3 mL で再懸濁した後、遠心分離 (100,000 × g , 60 min, 4°C) した。上清を除去し、沈殿を氷冷した TS buffer (20 mM Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Tris)-HCl, 250 mM sucrose, 5.4 mM EDTA, pH 7.4) 150 μL で再懸濁した後、38% (w/v) sucrose 2.85 mL 上への密度勾配遠心分離 (100,000 × g , 30 min, 4°C) した。得られた turbid layer を回収して、TS buffer 3 mL に再懸濁した後、遠心分離 (100,000 × g , 30 min, 4°C) した。上清を除去し、沈殿を buffer 50 μL で再懸濁したものを plasma membrane fraction を含む

サンプルとした。タンパク質濃度は BSA を標準試料とした bicinchoninic acid (BCA) 法を用いて定量した。BCA 法には Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、マイクロプレートリーダー Infinite[®] M200 PRO (TECAN) にて 562 nm の吸光度を測定した。

・ HEK293 細胞からの crude membrane fraction の調製

100 mm シャーレの培地を吸引除去し、OATP1B1/HEK293 細胞、OATP1B3/HEK293 細胞および mock 細胞を氷冷した PBS 5 mL で 2 回洗浄した後、氷冷した hypotonic buffer (0.5 mM sodium phosphate、0.1 mM EDTA、1 mM PMSF、pH 7.4) 3 mL で細胞を遠沈管に回収して、4°C で 90 min 振盪した。遠心分離 (100,000 × g、40 min、4°C) した後、上清を除去し、沈殿を氷冷した homogenize buffer (50 mM Tris-HCl、250 mM sucrose、pH 7.4) 2 mL でホモジナイズした。遠心分離 (500 × g、10 min、4°C) した後、得られた上清を遠心分離 (100,000 × g、40 min、4°C) した。上清を除去し、沈殿を RIPA buffer 200 μL で再懸濁したものを crude membrane fraction を含むサンプルとした。タンパク質濃度は先に述べた BCA 法を用いて定量した。

・ SDS-PAGE および western blotting

サンプル (1–30 μg/lane) を loading buffer (62.5 mM Tris-HCl、1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、2.5% 2-mercaptoethanol、10% glycerol、0.005% bromophenol blue) 中で 5 min 反応させ、変性させた。Stacking gel (4.3% polyacrylamide、125 mM Tris-HCl、0.1% SDS and 0.1% ammonium peroxydisulfate (APS)、N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)) と running gel (8% polyacrylamide、250 mM Tris-HCl、0.1% SDS、0.1% APS、TEMED) を用いて電気泳動し、各タン

パク質を分離した。泳動用緩衝液には running buffer (25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS) を用いた。続いて、ポリアクリルアミドゲルから polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (BIO-RAD) へのタンパク質の転写を行った。転写は transfer buffer (25 mM Tris、192 mM glycine、10% MeOH) に浸したろ紙にポリアクリルアミドゲルおよび PVDF メンブレンをはさみ、4°C で 20 V の電圧を一晩かけて行った。転写後、メンブレンを blocking buffer (0.1% Tween 20 and 1% BSA in tris-buffered saline (TBS)) 中で 1 時間振盪した。一次抗体は diluent buffer (OATP1B1 and β -actin: blocking buffer、OATP1B3: Can Get Signal[®] Solution 1 (TOYOBO, Osaka, Japan)) で抗体価に応じて希釈した抗体液 (Table 10) 2 mL とメンブレンを密封し、4°C で 5 時間反応させた。メンブレンを wash buffer (0.1% Tween 20 in TBS) で 10 min、3 回洗浄し、diluent buffer (OATP1B1 and β -actin: blocking buffer、OATP1B3: Can Get Signal[®] Solution 2 (TOYOBO)) で 2,000 倍希釈した二次抗体液 (OATP1B1 and β -actin: horseradish peroxidase-conjugated affinitypure goat anti-mouse IgG+IgM (H+L) (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA)、OATP1B3: horseradish peroxidase-conjugated mouse anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)) 2 mL とメンブレンを密封し、室温で 1 時間反応させた。その後メンブレンを wash buffer で 10 min、3 回洗浄し、Clarity[®] Western ECL Substrate (BIO-RAD) を用いて 5 min 反応させ、ChemiDoc[®] MP Imaging System (BIO-RAD) で露光と検出を行った。ヒト肝臓から調製した plasma membrane fraction 5、10 及び 15 μ g の発光強度を Image J を用いて算出し、OATP1B1/HEK293 細胞及び OATP1B3/HEK293 細胞における OATP1B1 及び OATP1B3 の発現量を検量線と既報⁶⁰⁾の plasma membrane fraction における各発現量から換算した。

Table 10 Diluent ratio of antibodies using western blot analysis

Antibody	Diluent ratio
mouse anti-OATP2 monoclonal antibody [ESL] (Abcam, Cambridge, UK)	1/250
rabbit anti-SLCO1B3 polyclonal antibody - C-terminal (Abcam)	1/50
mouse anti- β -actin monoclonal antibody (Proteintech, Tokyo, Japan)	1/4,000

統計解析

実験結果は全て平均 \pm 標準誤差 (mean \pm standard error (S.E.)) で示した。また、2 群間の有意差の検定は Student's *t*-test により行った。コントロール群と阻害物質群間における有意差の検定は、統計解析ソフト JMP Pro 12 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて one-way ANOVA の後、Dunnett test により行った。統計学的有意水準は * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ とした。

第 2 章 付属実験

細胞および動物

ヒト肝星細胞由来不死化細胞株 TWNT-1 細胞は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan) より分譲された。TWNT-1 細胞は、非働化した 10% FBS、100 IU/mL penicillin-100 μ g/mL streptomycin を含む DMEM を用いて継代培養した。細胞の培養は 37°C、5% CO₂-95% air インキュベーター内で行った。

C57BL/6J マウス (5 週齢、雄性) は日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) より購入し、1 週間の馴化期間を経たものを実験に供した。飼育は、室温 23 \pm 3°C、相対湿度 50 \pm 10% の specific pathogen free バリア飼育室 (照明時間 8–20

時、換気回数 10–15 回/時) で行った。動物実験は、東北大学動物実験専門員会に承認された動物実験計画書 (受付番号 2017MdA-249) に準拠し、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」を遵守して実施した。

NASH モデルマウスの作製

NASH モデルマウスの作製は、Matsumoto らの方法⁹⁾に基づいて行った。すなわち、NASH の病態を再現するため、コリン欠乏メチオニン減量 (0.1%メチオニン添加) 高脂肪飼料 (A06071302, Research Diets, New Brunswick, NJ) を 3、6、9、12 及び 15 週間自由摂食させた。コントロールとして通常食 (standard diet, Labo MR stock, Nosan, Kanagawa, Japan) を用いた。水は新鮮水道水を自由摂食させた。

体重測定および摂餌量測定

各個体の体重は 1 週間ごとに測定した。24 時間の摂餌量 (エネルギー量に換算) は犠死直前に 7 日間計測した。

サンプルの採取

飼育開始 3、6、9、12 及び 15 週で犠死を行った。12–16 時間絶食後のマウスにイソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」を吸入麻酔し、麻酔下でマウスを固定した後、開腹して各サンプルを採取した。胆汁は胆嚢より採取した。採血は腹大静脈および門脈より行い、採取した血液は直ちに微量の EDTA-2Na と混和し、遠心分離 (3,000 × g、20 min、4°C) 後、上清を血漿サンプルとして用いた。全肝臓組織および回腸は摘出した後、生理食塩水で洗浄した。肝臓は重量を測定した後に細切したものを、回腸は粘膜部をセラムチューブに収集し、液体窒素で急速冷凍した。各サンプルは測定まで -80°C で長期保存した。

肝臓組織切片の顕微鏡観察

肝臓組織の一部を 10% 中性緩衝ホルマリン液 (pH7.4) に漬けて固定し、パラフィン包埋後に薄切りすることで組織切片を作製した。組織切片を H.E.染色または E.M.染色し、顕微鏡観察を行った。NASH の重症度は、Kleiner らによって提唱された組織学的診断基準である NAS に準拠して、以下の通りに分類した⁹²⁾。すなわち、NAS は (1) steatosis (脂肪化の程度:脂肪滴を含む肝細胞) を 0 (<5%)、1 (5-33%)、2 (33-66%)、3 (> 66%) 点に、(2) inflammation (小葉内炎症) を 0 (病巣なし)、1 (200 倍の視野で 2 ヶ所以下の病巣)、2 (200 倍の視野で 2-4 ヶ所の病巣)、3 (200 倍の視野で 4 ヶ所以上の病巣) 点に、(3) hepatocytes ballooning (肝細胞の風船様変性:障害された肝細胞を表す) を 0 (なし)、1 (少数)、2 (多数) 点に分類し、合計で 5 点以上を NASH と診断した。なお、(2) 小葉内炎症における炎症の病巣数は、主に小型炎症細胞 (リンパ球) の集簇として捉えられる炎症巣の単位視野あたりの数で判定した。また、肝線維化の重症度についても、Kleiner らの報告⁹²⁾に従い分類した。なお、肝組織切片の作製、H.E.染色および E.M.染色は東北大学医学系研究科病理診断プラットフォームに委託し、重症度の分類は 1 名の病理専門医の指導のもと行った。

血漿中 AST 及び ALT 活性の測定

マウス腹大動脈より採取した血漿中 AST 及び ALT 活性の測定はトランスアミナーゼ CII-テスト キット (Wako) を用いて行った。血漿 1.3 μL に基質酵素液 (AST または ALT) 33.3 μL を加え、37°C で 5 min 反応させた。続いて、発色試薬 33.3 μL を加え、振盪後、37°C で 20 min 反応させた。さらに、反応停止液 133.3 μL を加え、室温で 5 min 振盪後、555 nm の吸光度を測定した。

肝臓からの総脂質抽出とコレステロール及びTGの測定

肝臓からの総脂質抽出は Folch 法¹²¹⁾を用いて行った。すなわち、重量を測定した肝臓組織切片をホモジナイズし、メタノール/クロロホルム (1:2, v/v) 混合液 1 mL を加えて 10 秒間激しく攪拌した後、4°C で 1 晩静置した。続いて、0.8% KCl 200 µL を加えて 10 秒間激しく攪拌した後、遠心分離 (15,000 × g、20 min、4°C) した。下層 500 µL を新しい 1.5 mL チューブに移し、遠心エバポレーターで溶媒留去した後、10% TritonX-100 を含む 2-プロパノール 200 µL に再溶解させ、測定に付した。肝臓中コレステロール及びTGの測定は、それぞれコレステロール E-テストワコー (Wako) 及びラボアッセイ トリグリセライド (Wako) を用いて行った。サンプル 2 µL に発色試薬 300 µL を加え、37°C で 5 min 反応させ、600 nm の吸光度を測定した。

胆汁酸の標準溶液の調製

各胆汁酸の標準化合物を精秤後、エタノール/水 (1:1, v/v) で溶解して 100–300 µg/mL の標準原液を調製した。各標準原液を一定量採り、さらにエタノール/水 (1:1, v/v) で希釈して 1、3、10、30、100、300、1,000 及び 3,000 nmol/L の標準混合溶液を調製した。

IS 溶液の調製

安定同位元素標識した各化合物を精秤後、エタノール/水 (1:1, v/v) で溶解して 100 µg/mL の標準原液を調製した。各標準原液を一定量採り、さらにエタノール/水 (1:1, v/v) で希釈して 2 µmol/L の IS 混合溶液とした。

検量線試料の調製

各濃度の胆汁酸の標準混合溶液を一定量採り、IS 混合溶液 5 μL を添加して、1、3、10、30、100、300、1,000 及び 3,000 nmol/L の検量線試料を調製した。各試料を遠心エバポレーターにて溶媒留去し、残渣をメタノール/水 (1:1, v/v) 50 μL で再溶解したものを 10 μL 注入して、検量線を作製した。

マウス各サンプルの前処理

肝臓を精秤後、水 200 μL を加え、Bioruptor UCD-300 (Cosmo Bio) を用いて 5 min 超音波処理を行った。得られた肝臓ホモジナイズ (水で 100 倍希釈及び希釈なし) 100 μL に IS 混合溶液 5 μL を添加した後、メタノール/アセトニトリル (1:1, v/v) 1 mL を加えて 10 秒間激しく攪拌した。遠心分離 (15,000 $\times g$ 、10 min、4°C) 後、得られた上清を遠心エバポレーターにて溶媒留去し、メタノール/水 (1:1, v/v) で再溶解したものをサンプルとした。

胆汁 (水で 100 倍及び 100,000 倍希釈) は 50 μL 、血漿 (水で 50 倍希釈及び希釈なし) は 50 μL に IS 混合溶液 5 μL を添加した後、先に述べた方法により前処理を行ない、サンプルとした。

サンプル中胆汁酸の定量 (LC/MS/MS)

HPLC およびタンデム質量分析は、以下の条件及び Table 11 に示した条件で実施した。クロマトグラム上のピーク面積をデータ解析ソフトにより算出し、各化合物と各 IS の面積比を用いる内部標準法により定量した。

<HPLC condition>

System: Nexera (Shimadzu)

Analytical column: YMC-Triart C18 (2.1 mm I.D. × 150 mm, 1.9 μm, YMC, Kyoto, Japan)

Guard column: YMC-Triart C18 (2.1 mm I.D. × 5 mm, 1.9 μm, YMC)

Column oven temperature: 40°C

Mobile phase:

A: 20 mmol/L ammonium formate in water (pH 8.0)

B: 20 mmol/L ammonium formate in methanol/acetonitrile (50:50, v/v)

Gradient elution: 0-10 min, 40% B; 10-23 min, 40-80% B; 23-28 min, 80% B

Flow rate: 0.3 mL/min

Injection volume: 10 μL

<MS/MS condition>

System: QTRAP 6500 (AB SCIEX)

Ionization mode: ESI-negative

Curtain gas: 20 psi

Collision gas: 12 psi

Ionspray voltage: -4500 V

Ion source temperature: 300°C

Ion source gas 1: 60 psi

Ion source gas 2: 60 psi

Table 11 Analysis of SRM parameters and internal standards for bile acids

Analytes	SRM transition	DP (V)	CE (eV)	CXP (V)	EP (V)	IS
CA	m/z 453 \rightarrow 407	30	25	15	6	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
α MCA	m/z 453 \rightarrow 407	30	25	15	6	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
β MCA	m/z 453 \rightarrow 407	30	25	15	6	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
ω MCA	m/z 453 \rightarrow 407	30	25	15	6	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
HCA	m/z 453 \rightarrow 407	30	25	15	6	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
HDCA	m/z 437 \rightarrow 391	25	25	15	6	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
CDCA	m/z 437 \rightarrow 391	25	25	15	6	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
DCA	m/z 437 \rightarrow 391	25	25	15	6	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
UDCA	m/z 437 \rightarrow 391	25	25	15	6	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
LCA	m/z 421 \rightarrow 375	25	20	15	6	3, 7, 12-[¹⁸ O]CA
GCA	m/z 464 \rightarrow 74	120	80	10	6	3, 7-[¹⁸ O]GCA
G α MCA	m/z 464 \rightarrow 74	120	80	10	6	3, 7-[¹⁸ O]GCA
G β MCA	m/z 464 \rightarrow 74	120	80	10	6	3, 7-[¹⁸ O]GCA
GHCA	m/z 464 \rightarrow 74	120	80	10	6	3, 7-[¹⁸ O]GCA
GHDCA	m/z 448 \rightarrow 74	120	80	10	6	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCDCA
GCDCA	m/z 448 \rightarrow 74	120	80	10	6	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCDCA
GDCA	m/z 448 \rightarrow 74	120	80	10	6	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCDCA
GUDCA	m/z 448 \rightarrow 74	120	80	10	6	3, 7-[¹⁸ O, ² H]GCDCA
GLCA	m/z 432 \rightarrow 74	120	80	10	6	3-[¹⁸ O, ² H]GLCA
TCA	m/z 514 \rightarrow 80	100	150	11	8	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
T α MCA	m/z 514 \rightarrow 80	100	150	11	8	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
T β MCA	m/z 514 \rightarrow 80	100	150	11	8	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
T ω MCA	m/z 514 \rightarrow 80	100	150	11	8	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
THCA	m/z 514 \rightarrow 80	100	150	11	8	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
THDCA	m/z 498 \rightarrow 80	100	130	11	8	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
TCDC	m/z 498 \rightarrow 80	100	130	11	8	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
TDCA	m/z 498 \rightarrow 80	100	130	11	8	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
TUDCA	m/z 498 \rightarrow 80	100	130	11	8	3, 12-[¹⁸ O, ² H]TDCA
TLCA	m/z 482 \rightarrow 80	100	130	11	8	3-[¹⁸ O, ² H]TLCA
CDCA 3-sulfate	m/z 471 \rightarrow 97	45	110	15	6	7-[¹⁸ O, ² H]CDCA 3-sulfate

DCA 3-sulfate	m/z 471 → 97	45	110	15	6	7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate
LCA 3-sulfate	m/z 455 → 97	120	110	11	6	7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate
GCA 3-sulfate	m/z 544 → 464	80	46	21	10	7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate
GCDCA 3-sulfate	m/z 528 → 448	10	44	21	6	7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate
GDCA 3-sulfate	m/z 528 → 448	10	44	21	6	7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate
GUDCA 3-sulfate	m/z 528 → 448	10	44	21	6	7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate
GLCA 3-sulfate	m/z 512 → 432	5	44	5	8	7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate
TCA 3-sulfate	m/z 296 → 496	70	32	11	6	7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate
TCDCa 3-sulfate	m/z 289 → 480	70	32	11	6	7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate
TDCA 3-sulfate	m/z 289 → 480	70	32	11	6	7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate
TUDCA 3-sulfate	m/z 289 → 480	70	32	11	6	7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate
TLCA 3-sulfate	m/z 280 → 464	20	32	13	8	7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate
CA 3-glucuronide	m/z 583 → 583	60	30	13	10	3, 7, 12- ^{18}O]CA
CDCA 3-glucuronide	m/z 567 → 567	60	30	13	10	3, 7, 12- ^{18}O]CA
DCA 3-glucuronide	m/z 567 → 567	60	30	13	10	3, 7, 12- ^{18}O]CA
UDCA 3-glucuronide	m/z 567 → 567	60	30	13	10	3, 7, 12- ^{18}O]CA
LCA 3-glucuronide	m/z 551 → 375	16	57	18	10	3, 7, 12- ^{18}O]CA
3, 7, 12- ^{18}O]CA	m/z 459 → 413	30	25	15	6	—
3, 7- ^{18}O]GCA	m/z 470 → 74	120	80	10	6	—
3, 7- ^{18}O , ^2H]GCDCA	m/z 454 → 74	120	80	10	6	—
3- ^{18}O , ^2H]GLCA	m/z 435 → 74	120	80	10	6	—
3, 12- ^{18}O , ^2H]TDCA	m/z 504 → 80	100	130	11	8	—
3- ^{18}O , ^2H]TLCA	m/z 485 → 80	100	130	11	8	—
7- ^{18}O , ^2H]CDCA 3-sulfate	m/z 474 → 97	45	110	15	6	—

qPCR

・マウス臓器からの total RNA 抽出

マウスから摘出した肝臓および回腸粘膜部を TaKaRa BioMasherII Standard (Takara, Shiga, Japan) でホモジナイズし、TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 1 mL に溶解させた。クロロホルム 0.2 mL を加えて、15 秒間激しく混和した。室温で 10 min 静置し、遠心分離 (12,000 × g、15 min、4°C) した。上清に 2-プロパノール 0.5 mL を加えて、20 回転倒混和した。

室温で 10 min 静置し、遠心分離 (12,000 × g、10 min、4°C) した。沈殿に 75% エタノール 1 mL を加えて、遠心分離 (7,500 × g、10 min、4°C) した。沈殿した total RNA を乾燥後、ribonuclease (RNase) free water に溶解させた。Total RNA の濃度は Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

・ TWNT-1 細胞からの total RNA 抽出

TWNT-1 細胞は 5.0×10^5 cells/mL 懸濁液を調製後、I 型コラーゲンコーティング 6-well plates (IWAKI, Shizuoka, Japan) に 2 mL/well ずつ播種し、FBS 無添加の 100 IU/mL penicillin-100 µg/mL streptomycin を含む DMEM を用いて 24 時間培養を行った。胆汁酸溶液を添加する 2 時間前に FBS 無添加の DMEM で培地交換を行った。培養液を除去した後、培養液に溶解させた胆汁酸溶液 (100 µM) を 2 mL 添加し、24 時間培養を行った。陽性対照群には、培養液に溶解させた TGF-β1 溶液 (10 ng/mL) 及び TNF-α 溶液 (100 ng/mL)、あるいは 10% FBS を含む培養液を用いた。細胞の培養は 37°C、5% CO₂-95% air インキュベーター内で行った。胆汁酸溶液を除去した後、氷冷した PBS 1 mL で 1 回洗浄し、TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostics) 0.5 mL に溶解させた。以下、先に述べた方法により行った。

・ DNase 処理

Deoxyribonuclease (DNase) 処理は、RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Tokyo, Japan) を用いて行った。Table 12 に示したように反応液を調製し、37°C で 30 min 反応させた後、RQ1 DNase Stop Solution (Promega) 2 µL を加え、65°C で 10 min 反応させた。

Table 12 Composition of reaction solution for DNase treatment

Component	Volume/Reaction
RNase free water	variable
RQ1 DNase 10× Reaction Buffer	2 μ L
RQ1 RNase-Free DNase	1 μ L/ μ g RNA
Template RNA	1–5 μ g
Total volume	20 μ L

・ 逆転写反応

逆転写反応は、ReverTra Ace[®] (TOYOBO) を用いて行った。Table 13 に示したように反応液を調製し、30°C で 10 min、42°C で 60 min、99°C で 5 min の条件で順次反応させた。なお、逆転写反応には PCR Thermal Cycler Dice[®] *Touch* (Takara) を使用した。

Table 13 Composition of reaction solution for reverse transcription

Component	Volume/Reaction
RNase free water	variable
RT buffer	4 μ L
Random primer (25 pmol/ μ L)	2 μ L
dNTP mix (10 mM each)	1 μ L
RNase inhibitor	0.5 μ L
ReverTra Ace	1 μ L
Template RNA	variable
Total volume	20 μ L

・ PCR

PCR には KAPA SYBR[®] Fast qPCR Kit (Nippon Genetics, Tokyo, Japan)を用いた。臓器および細胞の mRNA から調製した complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) を用い、Table 14 のように反応液を調製した。反応温度条件は、95°C で 3 min 処理後、95°C で 15 秒、60°C で 30 秒、72°C で 1 min のサイクルを 40 サイクル行った。反応および検出には、ABI StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用した。各遺伝子の mRNA 発現量は、 β -actin をリファレンス遺伝子として用いて比較 Ct 法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) により算出した。なお、用いた primer の塩基配列を Table 15 に示した。

Table 14 Composition of reaction solution for qPCR

Component	Volume/Reaction
RNase free water	2.4 μ L
Master mix	5 μ L
Forward primer (20 pmol/ μ L)	0.2 μ L
Reverse primer (20 pmol/ μ L)	0.2 μ L
ROX High	0.2 μ L
Template cDNA (5 ng/ μ L)	2 μ L
Total volume	10 μ L

Table 15 Sequences of primers for qPCR

Name	Accession number	Sequences	Product size (bp)
Tnf- α	NM_013693	Forward 5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'	103
		Reverse 5'-AGGGTCTGGCCATAGAACT-3'	
Il-1 β	NM_008361	Forward 5'-TGGAGAGTGTGGATCCCAAGCAAT-3'	180
		Reverse 5'-TGTCCTGACCACTGTTGTTTCCCA-3'	
Il-6	NM_031168	Forward 5'-TGATGCACTGCAGAAAACA-3'	109
		Reverse 5'-ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC-3'	

F4/80	NM_010130	Forward	5'-TCAAATGGATCCAGAAGGCTCCCA-3'	120
		Reverse	5'-TGCACCTGCTTGGCATTGCTGTATC-3'	
CD11c	NM_021334	Forward	5'-CTGGATAGCCTTTCTTCTGCTG-3'	113
		Reverse	5'-GCACACTGTGTCCGAACTCA-3'	
Mcp-1	NM_011333	Forward	5'-TCACCTGCTGCTACTCATTACCA-3'	98
		Reverse	5'-TACAGCTTCTTTGGGACACCTGCT-3'	
Mmp-2	NM_008610	Forward	5'-GCTCTGTCCTCCTCTGTAGTTA-3'	104
		Reverse	5'-GGTACAGTCAGCACCTTTCTT-3'	
Timp-1	NM_011593	Forward	5'-TGGGAAATGCCCGCAGATATC-3'	76
		Reverse	5'-TGGGACTTGTGGGCATATCC-3'	
Tgf- β 1	NM_011577	Forward	5'-GGAGAGCCCTGGATAACCAAC-3'	94
		Reverse	5'-CAACCCAGGTCCTTCCTAAA-3'	
Collagen1 α 1	NM_007742	Forward	5'-AGACCTGTGTGTTCCCTACT-3'	113
		Reverse	5'-GAATCCATCGGTCATGCTCTC-3'	
Ost β	NM_178933	Forward	5'-AGAGAAAGCTGCAGCCAATG-3'	110
		Reverse	5'-CCAGGACCAGGATGGAATAA-3'	
Abcc4	NM_001033336	Forward	5'-AGCTTCAACGGTACTGGGATA-3'	205
		Reverse	5'-TCGTCCGGGGTCATACTTCTC-3'	
Abcc3	NM_029600	Forward	5'-AGAGCTGGGCTCCAAGTTCT-3'	153
		Reverse	5'-TGGTGTCTCAGGTAACAGGTAGCA-3'	
Ntcp	NM_011387	Forward	5'-AGGGGGACATGAACCTCAG-3'	107
		Reverse	5'-TCCGTCGTAGATTCCTTTGC-3'	
Oatp1b2	NM_020495	Forward	5'-ACCAAACCTCAGCATCCAAGC-3'	103
		Reverse	5'-TAGCTGAATGAGAGGGCTGC-3'	
Asbt	NM_011388	Forward	5'-TGGGTTTCTTCTGGCTAGACT-3'	81
		Reverse	5'-TGTTCTGCATTCCAGTTTCAA-3'	
Bsep	NM_021022	Forward	5'-CCAGAACATGACAAACGGAA-3'	100
		Reverse	5'-AAGGACAGCCACACCAACTC-3'	
Abcc2	NM_013806	Forward	5'-TCCAGGACCAAGAGATTTGC-3'	107
		Reverse	5'-TCTGTGAGTGCAAGAGACAGGT-3'	
Cyp7a1	NM_007824	Forward	5'-GGGAATGCCATTTACTTGA-3'	107
		Reverse	5'-GTCCGGATATTCAAGGATGC-3'	
Cyp27a1	NM_024264	Forward	5'-CTATGTGCTGCACTTGCCC-3'	107
		Reverse	5'-GGGCACTAGCCAGATTCACA-3'	
Cyp8b1	NM_010012	Forward	5'-TCCTCAGGGTGGTACAGGAG-3'	96

		Reverse	5'-GATAGGGGAAGAGAGCCACC-3'	
Akr1d1	NM_145364	Forward	5'-ATCGTCATTGTCGCACATAG-3'	176
		Reverse	5'-GGAATGACAACCTATCCCTCG-3'	
Hsd3b7	NM_133943	Forward	5'-ACCTGCACCTGAGTTCTTGG-3'	213
		Reverse	5'-CAATCACATTCTGTGTGCC-3'	
Baat	NM_007519	Forward	5'-GCCCCACCAAATCCACATAAA-3'	81
		Reverse	5'-GGCTATCCAAGGGAGGACTGA-3'	
Sult2a1	NM_001111296	Forward	5'-GGAAGGACCACGACTCATAAC-3'	158
		Reverse	5'-GATTCTTCACAAGGTTTGTGTACC-3'	
Fxr	NM_009108	Forward	5'-GGGCTCCGAATCCTCTTAGA-3'	71
		Reverse	5'-TGGTCCTCAAATAAGATCCTTGG-3'	
Collagen1 α 1	NM_007742	Forward	5'-AGACCTGTGTGTTCCCTACT-3'	113
		Reverse	5'-GAATCCATCGGTCATGCTCTC-3'	
β -actin	NM_007393	Forward	5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'	138
		Reverse	5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3'	
α -SMA	NM_001613	Forward	5'-CAGGGCTGTTTTCCCATCCA-3'	108
		Reverse	5'-CCTCTTTTGCTCTGTGCTTCGT-3'	
HPRT	NM_000194	Forward	5'-GCGTCGTGATTAGCGATGATGAAC-3'	157
		Reverse	5'-CCTCCCATCTCCTTCATGACATCT-3'	

Western blot analysis

・マウス肝臓からのタンパク質抽出

マウス肝臓を 1 mM PMSF を含む RIPA buffer 250 μ L 中でホモジナイズした。氷上で 5 min インキュベートした後、Bioruptor UCD-300 (Cosmo Bio) を用いて 5 min 超音波処理を行った。遠心分離 (15,000 \times g、15 min、4°C) 後、得られた上清をサンプルとした。タンパク質濃度は BSA を標準試料とする BCA 法を用いて定量した。BCA 法には Pierce[®] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、マイクロプレートリーダー Infinite[®] M200 PRO (TECAN) にて 562 nm の吸光度を測定した。

・ SDS-PAGE および western blotting

サンプル (30 µg/lane) を loading buffer (62.5 mM Tris-HCl、1% SDS、2.5% 2-mercaptoethanol、10% glycerol、0.005% bromophenol blue) 中で 5 min 反応させ、変性させた。Stacking gel (4.3% polyacrylamide、125 mM Tris-HCl、0.1% SDS and 0.1% APS、TEMED) と running gel (12% polyacrylamide、250 mM Tris-HCl、0.1% SDS、0.1% APS、TEMED) を用いて電気泳動し、各タンパク質を分離した。泳動用緩衝液には running buffer (25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS) を用いた。続いて、ポリアクリルアミドゲルから PVDF メンブレン (BIO-RAD) へのタンパク質の転写を行った。転写は transfer buffer (25 mM Tris、192 mM glycine、10% MeOH) に浸したろ紙にポリアクリルアミドゲルおよび PVDF メンブレンをはさみ、4°C で 20 V の電圧を一晩かけて行った。転写後、メンブレンを blocking buffer (0.1% Tween 20 and 3% skim milk in TBS) 中で 3 時間振盪した。一次抗体は diluent buffer (0.1% Tween 20 and 3% skim milk in TBS) で抗体価に応じて希釈した抗体液 (Table 16) 1 mL とメンブレンを密封し、4°C で 3 時間反応させた。メンブレンを wash buffer (0.1% Tween 20 in TBS) で 10 min、3 回洗浄し、diluent buffer で 2,000 倍希釈した horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) または horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG+IgM (H+L) (Jackson Immunoresearch Laboratories) 1 mL とメンブレンを密封し、室温で 1 時間反応させた。その後メンブレンを wash buffer で 10 min、3 回洗浄し、Clarity[®] Western ECL Substrate (BIO-RAD) を用いて 5 min 反応させ、ChemiDoc[®] MP Imaging System (BIO-RAD) で露光と検出を行った。

Table 16 Diluent ratio of antibodies using western blot analysis

Antibody	Diluent ratio
α -Sma (Proteintech)	1/1,000
mouse anti-gapdh monoclonal antibody (Proteintech)	1/4,000

統計解析

実験結果は全て平均 \pm 標準偏差 (mean \pm standard deviation (S.D.)) で示した。また、2 群間の有意差の検定は Student's *t*-test により行った。コントロール群と胆汁酸添加群間における有意差の検定は、統計解析ソフト JMP Pro 12 (SAS Institute) を用いて one-way ANOVA の後、Dunnett test により行った。統計学的有意水準は * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ とした。

引用文献

- 1) Diehl AM, Day C: Cause, Pathogenesis, and Treatment of Nonalcoholic Steatohepatitis. *N Engl J Med.* 2017; **377**:2063-2072.
- 2) Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA: Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology.* 2010; **51**: 1820-1832.
- 3) Michitaka K, Nishiguchi S, Aoyagi Y, Hiasa Y, Tokumoto Y, Onji M; Japan Etiology of Liver Cirrhosis Study Group: Etiology of liver cirrhosis in Japan: a nationwide survey. *J Gastroenterol.* 2010; **45**:86-94.
- 4) Tokushige K, Hashimoto E, Horie Y, Taniai M, Higuchi S: Hepatocellular carcinoma in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease, alcoholic liver disease, and chronic liver disease of unknown etiology: report of the nationwide survey. *J Gastroenterol.* 2011; **46**:1230-1237.
- 5) Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, Harrison SA: Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology.* 2011; **140**:124-131.
- 6) Vernon G, Baranova A, Younossi ZM: Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011; **34**:274-285.
- 7) Day CP, James OF: Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998; **114**:842-845.
- 8) Tilg H, Moschen AR: Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver

- disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010; **52**:1836-1846.
- 9) Amir M, Czaja MJ: Autophagy in nonalcoholic steatohepatitis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011; **5**:159-166.
 - 10) Van Rooyen DM, Larter CZ, Haigh WG, Yeh MM, Ioannou G, Kuver R, Lee SP, Teoh NC, Farrell GC: Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology*. 2011; **141**:1393-1403.
 - 11) Musso G, Gambino R, Cassader M: Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog Lipid Res*. 2013; **52**:175-191.
 - 12) Ichimura M, Kawase M, Masuzumi M, Sakaki M, Nagata Y, Tanaka K, Suruga K, Tamaru S, Kato S, Tsuneyama K, Omagari K: High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats. *Hepatol Res*. 2015; **45**:458-469.
 - 13) Bieghs V, Verheyen F, van Gorp PJ, Hendriks T, Wouters K, Lütjohann D, Gijbels MJ, Febbraio M, Binder CJ, Hofker MH, Shiri-Sverdlov R: Internalization of modified lipids by CD36 and SR-A leads to hepatic inflammation and lysosomal cholesterol storage in Kupffer cells. *PLoS One*. 2012; **7**:e34378.
 - 14) Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Kurihara C, Irie R, Yokoyama H, Shimamura K, Usui S, Ebinuma H, Saito H, Watanabe C, Komoto S, Kawaguchi A, Nagao S, Sugiyama K, Hokari R, Kanai T, Miura S, Hibi T: Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology*. 2014; **59**:154-169.
 - 15) Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela

- GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E: NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010; **464**:1357-1361.
- 16) Ioannou GN, Haigh WG, Thorning D, Savard C: Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis. *J Lipid Res*. 2013; **54**:1326-1334.
- 17) de Aguiar Vallim TQ, Tarling EJ, Edwards PA: Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metab*. 2013; **17**:657-669.
- 18) Russell DW, Setchell KD: Bile acid biosynthesis. *Biochemistry*. 1992; **31**:4737-4749.
- 19) Chiang JY: Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol*. 2004; **40**:539-551.
- 20) Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B: Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*. 1999; **284**:1362-1365.
- 21) Parks DJ, Blanchard SG, Bledsoe RK, Chandra G, Consler TG, Kliewer SA, Stimmel JB, Willson TM, Zavacki AM, Moore DD, Lehmann JM. Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. *Science*. 1999; **284**:1365-1368.
- 22) Wang H, Chen J, Hollister K, Sowers LC, Forman BM: Endogenous bile acids are ligands for the nuclear receptor FXR/BAR. *Mol Cell*. 1999; **3**:543-553.
- 23) Studer E, Zhou X, Zhao R, Wang Y, Takabe K, Nagahashi M, Pandak WM, Dent P, Spiegel S, Shi R, Xu W, Liu X, Bohdan P, Zhang L, Zhou H, Hylemon PB: Conjugated bile acids activate the sphingosine-1-phosphate receptor 2 in primary

- rodent hepatocytes. *Hepatology*. 2012; **55**:267-276.
- 24) Kawamata Y, Fujii R, Hosoya M, Harada M, Yoshida H, Miwa M, Fukusumi S, Habata Y, Itoh T, Shintani Y, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M: A G protein-coupled receptor responsive to bile acids. *J Biol Chem*. 2003; **278**:9435-9440.
 - 25) Maruyama T, Miyamoto Y, Nakamura T, Tamai Y, Okada H, Sugiyama E, Nakamura T, Itadani H, Tanaka K: Identification of membrane-type receptor for bile acids (M-BAR). *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; **298**:714-719.
 - 26) Jiao Y, Lu Y, Li XY: Farnesoid X receptor: a master regulator of hepatic triglyceride and glucose homeostasis. *Acta Pharmacol Sin*. 2015; **36**:44-50.
 - 27) Thomas C, Gioiello A, Noriega L, Strehle A, Oury J, Rizzo G, Macchiarulo A, Yamamoto H, Matakı C, Pruzanski M, Pellicciari R, Auwerx J, Schoonjans K: TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab*. 2009; **10**:167-177.
 - 28) Watanabe M, Houten SM, Matakı C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J: Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*. 2006; **439**:484-489.
 - 29) Kuno T, Hirayama-Kurogi M, Ito S, Ohtsuki S: Reduction in hepatic secondary bile acids caused by short-term antibiotic-induced dysbiosis decreases mouse serum glucose and triglyceride levels. *Sci Rep*. 2018; **8**:1253.
 - 30) Chow MD, Lee YH, Guo GL: The role of bile acids in nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med*. 2017; **56**:34-44.
 - 31) Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B: Bile Acid Control of

- Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2017; **152**:1679-1694.
- 32) Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B: Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*. 2009; **89**:147-191.
- 33) Lake AD, Novak P, Shipkova P, Aranibar N, Robertson D, Reily MD, Lu Z, Lehman-McKeeman LD, Cherrington NJ: Decreased hepatotoxic bile acid composition and altered synthesis in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013; **268**:132-140.
- 34) Puri P, Daita K, Joyce A, Mirshahi F, Santhekadur PK, Cazanave S, Luketic VA, Siddiqui MS, Boyett S, Min HK, Kumar DP, Kohli R, Zhou H, Hylemon PB, Contos MJ, Idowu M, Sanyal AJ: The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology*. 2018; **67**:534-548.
- 35) Kullak-Ublick GA, Stieger B, Meier PJ: Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease. *Gastroenterology*. 2004; **126**:322-342.
- 36) Dawson PA, Lan T, Rao A: Bile acid transporters. *J Lipid Res*. 2009; **50**:2340-2357.
- 37) Meier PJ, Stieger B: *Annu Rev Physiol*. 2002; **64**:635-661.
- 38) St-Pierre MV, Kullak-Ublick GA, Hagenbuch B, Meier PJ: Transport of bile acids in hepatic and non-hepatic tissues. *J Exp Biol*. 2001; **204**:1673-1686.
- 39) Abe T, Kakyo M, Tokui T, Nakagomi R, Nishio T, Nakai D, Nomura H, Unno M, Suzuki M, Naitoh T, Matsuno S, Yawo H: Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J Biol Chem*. 1999; **274**:17159-17163.

- 40) Abe T, Suzuki T, Unno M, Tokui T, Ito S: Thyroid hormone transporters: recent advances. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; **13**:215-220.
- 41) König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D: A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; **278**:G156-164.
- 42) Hagenbuch B, Gui C: Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica.* 2008; **38**:778-801.
- 43) Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ: Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev.* 2011; **63**:157-181.
- 44) Kullak-Ublick GA, Stieger B, Hagenbuch B, Meier PJ: Hepatic transport of bile salts. *Semin Liver Dis.* 2000; **20**:273-292.
- 45) Dong Z, Ekins S, Polli JE: A substrate pharmacophore for the human sodium taurocholate co-transporting polypeptide. *Int J Pharm.* 2015; **478**:88-95.
- 46) Cui Y, König J, Leier I, Buchholz U, Keppler D: Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6. *J Biol Chem.* 2001; **276**:9626-9630.
- 47) Abe T, Unno M, Onogawa T, Tokui T, Kondo TN, Nakagomi R, Adachi H, Fujiwara K, Okabe M, Suzuki T, Nunoki K, Sato E, Kakyo M, Nishio T, Sugita J, Asano N, Tanemoto M, Seki M, Date F, Ono K, Kondo Y, Shiiba K, Suzuki M, Ohtani H, Shimosegawa T, Iinuma K, Nagura H, Ito S, Matsuno S: LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology.* 2001; **120**:1689-1699.
- 48) Briz O, Romero MR, Martinez-Becerra P, Macias RI, Perez MJ, Jimenez F, San

- Martin FG, Marin JJ: OATP8/1B3-mediated cotransport of bile acids and glutathione: an export pathway for organic anions from hepatocytes? *J Biol Chem.* 2006; **281**:30326-30335.
- 49) Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, Kirchgessner TG: A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem.* 1999; **274**:37161-37168.
- 50) Letschert K, Keppler D, König J: Mutations in the SLCO1B3 gene affecting the substrate specificity of the hepatocellular uptake transporter OATP1B3 (OATP8). *Pharmacogenetics.* 2004; **14**:441-452.
- 51) Maeda K, Kambara M, Tian Y, Hofmann AF, Sugiyama Y: Uptake of ursodeoxycholate and its conjugates by human hepatocytes: role of Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 (OATP-C), and oatp1B3 (OATP8). *Mol Pharm.* 2006; **3**:70-77.
- 52) Wang W, Seward DJ, Li L, Boyer JL, Ballatori N: Expression cloning of two genes that together mediate organic solute and steroid transport in the liver of a marine vertebrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; **98**:9431-9436.
- 53) Ballatori N, Christian WV, Lee JY, Dawson PA, Soroka CJ, Boyer JL, Madejczyk MS, Li N: OSTalpha-OSTbeta: a major basolateral bile acid and steroid transporter in human intestinal, renal, and biliary epithelia. *Hepatology.* 2005; **42**:1270-1279.
- 54) Gerk PM, Vore M: The ileocyte basolateral organic solute transporter

- (OSTalpha-OSTbeta) complex: finding the missing link in enterohepatic circulation. *Mol Interv.* 2005; **5**:8-10.
- 55) Ballatori N: Biology of a novel organic solute and steroid transporter, OSTalpha-OSTbeta. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005; **230**:689-698.
- 56) Seward DJ, Koh AS, Boyer JL, Ballatori N: Functional complementation between a novel mammalian polygenic transport complex and an evolutionarily ancient organic solute transporter, OSTalpha-OSTbeta. *J Biol Chem.* 2003; **278**:27473-27482.
- 57) Dawson PA, Hubbert M, Haywood J, Craddock AL, Zerangue N, Christian WV, Ballatori N: The heteromeric organic solute transporter alpha-beta, Ostalpha-Ostbeta, is an ileal basolateral bile acid transporter. *J Biol Chem.* 2005; **280**:6960-6968.
- 58) Yamaguchi H, Kobayashi M, Okada M, Takeuchi T, Unno M, Abe T, Goto J, Hishinuma T, Mano N: Rapid screening of antineoplastic candidates for the human organic anion transporter OATP1B3 substrates using fluorescent probes. *Cancer Lett.* 2008; **260**:163-169.
- 59) Yamaguchi H, Takeuchi T, Okada M, Kobayashi M, Unno M, Abe T, Goto J, Hishinuma T, Shimada M, Mano N: Screening of antibiotics that interact with organic anion-transporting polypeptides 1B1 and 1B3 using fluorescent probes. *Biol Pharm Bull.* 2011; **34**:389-395.
- 60) Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Ishiguro N, Kishimoto W, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T, Terasaki T: 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.* 2012; **40**:83-92.

- 61) Hong W, Wu Z, Fang Z, Huang J, Huang H, Hong M: Amino Acid Residues in the Putative Transmembrane Domain 11 of Human Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 Dictate Transporter Substrate Binding, Stability, and Trafficking. *Mol Pharm.* 2015; **12**:4270-4276.
- 62) Huang J, Li N, Hong W, Zhan K, Yu X, Huang H, Hong M: Conserved tryptophan residues within putative transmembrane domain 6 affect transport function of organic anion transporting polypeptide 1B1. *Mol Pharmacol.* 2013; **84**:521-527.
- 63) König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D: A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000; **278**:G156-164.
- 64) Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, Landmann L, Huber R, Pizzagalli F, Fattinger K, Meier PJ, Hagenbuch B: Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology.* 2001; **120**:525-533.
- 65) Yan Z, Li E, He L, Wang J, Zhu X, Wang H, Wang Z: Role of OATP1B3 in the transport of bile acids assessed using first-trimester trophoblasts. *J Obstet Gynaecol Res.* 2015; **41**:392-401.
- 66) Ho RH, Tirona RG, Leake BF, Glaeser H, Lee W, Lemke CJ, Wang Y, Kim RB: Drug and bile acid transporters in rosuvastatin hepatic uptake: function, expression, and pharmacogenetics. *Gastroenterology.* 2006; **130**:1793-1806.
- 67) Maillette de Buy Wenniger L, Beuers U: Bile salts and cholestasis. *Dig Liver Dis.* 2010; **42**:409-418.

- 68) Song P, Zhang Y, Klaassen CD: Dose-response of five bile acids on serum and liver bile Acid concentrations and hepatotoxicity in mice. *Toxicol Sci.* 2011; **123**:359-367.
- 69) Alnouti Y: Bile Acid sulfation: a pathway of bile acid elimination and detoxification. *Toxicol Sci.* 2009; **108**:225-246.
- 70) Barbier O, Trottier J, Kaeding J, Caron P, Verreault M: Lipid-activated transcription factors control bile acid glucuronidation. *Mol Cell Biochem.* 2009; **326**:3-8.
- 71) Kouzuki H, Suzuki H, Ito K, Ohashi R, Sugiyama Y: Contribution of sodium taurocholate co-transporting polypeptide to the uptake of its possible substrates into rat hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; **286**:1043-1050.
- 72) Yamazaki M, Suzuki H, Hanano M, Sugiyama Y: Different relationships between cellular ATP and hepatic uptake among taurocholate, cholate, and organic anions. *Am J Physiol.* 1993; **264**:G693-701.
- 73) Csanaky IL, Lu H, Zhang Y, Ogura K, Choudhuri S, Klaassen CD: Organic anion-transporting polypeptide 1b2 (Oatp1b2) is important for the hepatic uptake of unconjugated bile acids: Studies in Oatp1b2-null mice. *Hepatology.* 2011; **53**:272-281.
- 74) Jones AL, Hradek GT, Renston RH, Wong KY, Karlaganis G, Paumgartner G: Autoradiographic evidence for hepatic lobular concentration gradient of bile acid derivative. *Am J Physiol.* 1980; **238**:G233-237.
- 75) Ananthanarayanan M, Ng OC, Boyer JL, Suchy FJ: Characterization of cloned rat liver Na⁺-bile acid cotransporter using peptide and fusion protein antibodies. *Am J Physiol.* 1994; **267**:G637-643.

- 76) Hagenbuch B, Gui C: Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica*. 2008; **38**:778-801.
- 77) König J, Cui Y, Nies AT, Keppler D: Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J Biol Chem*. 2000; **275**:23161-23168.
- 78) Malinen MM, Ali I, Bezençon J, Beaudoin JJ, Brouwer KLR: Organic solute transporter OST α/β is overexpressed in nonalcoholic steatohepatitis and modulated by drugs associated with liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2018; **314**:G597-G609.
- 79) Northfield TC, McColl I: Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine. *Gut*. 1973; **14**:513-518.
- 80) Linnet K, Andersen JR, Hesselfeldt P: Concentrations of glycine- and taurine-conjugated bile acids in portal and systemic venous serum in man. *Scand J Gastroenterol*. 1984; **19**:575-578.
- 81) Balakrishnan A, Wring SA, Polli JE: Interaction of native bile acids with human apical sodium-dependent bile acid transporter (hASBT): influence of steroidal hydroxylation pattern and C-24 conjugation. *Pharm Res*. 2006; **23**:1451-1459.
- 82) Hayashi H, Takada T, Suzuki H, Onuki R, Hofmann AF, Sugiyama Y: Transport by vesicles of glycine- and taurine-conjugated bile salts and tauroolithocholate 3-sulfate: a comparison of human BSEP with rat Bsep. *Biochim Biophys Acta*. 2005; **1738**:54-62.
- 83) Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF, Keppler D: Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced

- glutathione. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; **290**:G640-649.
- 84) Rafiq N, Bai C, Fang Y, Srishord M, McCullough A, Gramlich T, Younossi ZM: Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009; **7**:234-238.
- 85) Angulo P, Kleiner DE, Dam-Larsen S, Adams LA, Bjornsson ES, Charatcharoenwitthaya P, Mills PR, Keach JC, Lafferty HD, Stahler A, Haflidadottir S, Bendtsen F: Liver Fibrosis, but No Other Histologic Features, Is Associated With Long-term Outcomes of Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015; **149**:389-397.
- 86) Okushin K, Tsutsumi T, Enooku K, Fujinaga H, Kado A, Shibahara J, Fukayama M, Moriya K, Yotsuyanagi H, Koike K: The intrahepatic expression levels of bile acid transporters are inversely correlated with the histological progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2016; **51**:808-818.
- 87) Chen K, Ma J, Jia X, Ai W, Ma Z, Pan Q: Advancing the understanding of NAFLD to hepatocellular carcinoma development: From experimental models to humans. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2018; **1871**:117-125.
- 88) Bray GA, York DA: Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol Rev*. 1979; **59**:719-809.
- 89) Leclercq IA, Farrell GC, Schriemer R, Robertson GR: Leptin is essential for the hepatic fibrogenic response to chronic liver injury. *J Hepatol*. 2002; **37**:206-213.
- 90) Rinella ME, Green RM: The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol*. 2004; **40**:47-51.
- 91) Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga T, Tanaka C, Ito T, Katsume A, Sudoh M: An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in

- non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol*. 2013; **94**:93-103.
- 92) Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ: Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network: Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005; **41**:1313-1321.
- 93) Crosignani A, Del Puppo M, Longo M, De Fabiani E, Caruso D, Zuin M, Podda M, Javitt NB, Kienle MG: Changes in classic and alternative pathways of bile acid synthesis in chronic liver disease. *Clin Chim Acta*. 2007; **382**:82-88.
- 94) Perez MJ, Briz O: Bile-acid-induced cell injury and protection. *World J Gastroenterol*. 2009; **15**:1677-1689.
- 95) Trottier J, Białek A, Caron P, Straka RJ, Milkiewicz P, Barbier O: Profiling circulating and urinary bile acids in patients with biliary obstruction before and after biliary stenting. *PLoS One*. 2011; **6**:e22094.
- 96) Trottier J, Białek A, Caron P, Straka RJ, Heathcote J, Milkiewicz P, Barbier O: Metabolomic profiling of 17 bile acids in serum from patients with primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis: a pilot study. *Dig Liver Dis*. 2012; **44**:303-310.
- 97) Hardwick RN, Fisher CD, Canet MJ, Lake AD, Cherrington NJ: Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos*. 2010; **38**:2293-2301.
- 98) Tanaka N, Matsubara T, Krausz KW, Patterson AD, Gonzalez FJ: Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2012; **56**:118-129.

- 99) Clarke JD, Hardwick RN, Lake AD, Lickteig AJ, Goedken MJ, Klaassen CD, Cherrington NJ: Synergistic interaction between genetics and disease on pravastatin disposition. *J Hepatol.* 2014; **61**:139-147.
- 100) Canet MJ, Merrell MD, Hardwick RN, Bataille AM, Champion SN, Ferreira DW, Xanthakos SA, Manautou JE, A-Kader HH, Erickson RP, Cherrington NJ: Altered regulation of hepatic efflux transporters disrupts acetaminophen disposition in pediatric nonalcoholic steatohepatitis. *Drug Metab Dispos.* 2015; **43**:829-835.
- 101) Hardwick RN, Fisher CD, Canet MJ, Scheffer GL, Cherrington NJ: Variations in ATP-binding cassette transporter regulation during the progression of human nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos.* 2011; **39**:2395-2402.
- 102) Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, Sugiyama Y: ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). *J Biol Chem.* 2000; **275**:2905-2910.
- 103) Akita H, Suzuki H, Ito K, Kinoshita S, Sato N, Takikawa H, Sugiyama Y: Characterization of bile acid transport mediated by multidrug resistance associated protein 2 and bile salt export pump. *Biochim Biophys Acta.* 2001; **1511**:7-16.
- 104) Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA, Meier PJ: Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology.* 2000; **118**:422-430.
- 105) Pan Q, Zhang X, Zhang L, Cheng Y, Zhao N, Li F, Zhou X, Chen S, Li J, Xu S, Huang D, Chen Y, Li L, Wang H, Chen W, Cai SY, Boyer JL, Chai J: Solute carrier organic anion transporter family member 3A1 is a bile acid efflux transporter in cholestasis. *Gastroenterology.* 2018; **155**:1578-1592.

- 106) Modica S, Moschetta A: Nuclear bile acid receptor FXR as pharmacological target: are we there yet? *FEBS Lett.* 2006; **580**:5492-5499.
- 107) Senoo H: Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc.* 2004; **37**:3-15.
- 108) Moreira RK: Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Arch Pathol Lab Med.* 2007; **131**:1728-1734.
- 109) Murakami K, Abe T, Miyazawa M, Yamaguchi M, Masuda T, Matsuura T, Nagamori S, Takeuchi K, Abe K, Kyogoku M: Establishment of a new human cell line, LI90, exhibiting characteristics of hepatic Ito (fat-storing) cells. *Lab Invest.* 1995; **72**:731-739.
- 110) Watanabe T, Shibata N, Westerman KA, Okitsu T, Allain JE, Sakaguchi M, Totsugawa T, Maruyama M, Matsumura T, Noguchi H, Yamamoto S, Hikida M, Ohmori A, Reth M, Weber A, Tanaka N, Leboulch P, Kobayashi N: Establishment of immortalized human hepatic stellate scavenger cells to develop bioartificial livers. *Transplantation.* 2003; **75**:1873-1880.
- 111) Saga K, Iwashita Y, Hidano S, Aso Y, Isaka K, Kido Y, Tada K, Takayama H, Masuda T, Hirashita T, Endo Y, Ohta M, Kobayashi T, Inomata M: Secondary Unconjugated Bile Acids Induce Hepatic Stellate Cell Activation. *Int J Mol Sci.* 2018; **19**:3043.
- 112) Liu Z, Zhang Z, Huang M, Sun X, Liu B, Guo Q, Chang Q, Duan Z: Taurocholic acid is an active promoting factor, not just a biomarker of progression of liver cirrhosis: evidence from a human metabolomic study and in vitro experiments. *BMC Gastroenterol.* 2018; **18**:112.
- 113) Naoi S, Hayashi H, Inoue T, Tanikawa K, Igarashi K, Nagasaka H, Kage M,

- Takikawa H, Sugiyama Y, Inui A, Nagai T, Kusuhara H: Improved liver function and relieved pruritus after 4-phenylbutyrate therapy in a patient with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. *J Pediatr.* 2014; **164**:1219-1227.
- 114) Yoshimoto S, Loo TM, Atarashi K, Kanda H, Sato S, Oyadomari S, Iwakura Y, Oshima K, Morita H, Hattori M, Honda K, Ishikawa Y, Hara E, Ohtani N: Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature.* 2013; **499**:97-101.
- 115) Yamada S, Takashina Y, Watanabe M, Nagamine R, Saito Y, Kamada N, Saito H: Bile acid metabolism regulated by the gut microbiota promotes non-alcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular carcinoma in mice. *Oncotarget.* 2018; **9**:9925-9939.
- 116) Neuschwander-Tetri BA: Targeting the FXR nuclear receptor to treat liver disease. *Gastroenterology.* 2015; **148**:704-706.
- 117) Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, Chalasani N, Dasarathy S, Diehl AM, Hameed B, Kowdley KV, McCullough A, Terrault N, Clark JM, Tonascia J, Brunt EM, Kleiner DE, Doo E; NASH Clinical Research Network: Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2015; **385**:956-965.
- 118) Takahashi S, Fukami T, Masuo Y, Brocker CN, Xie C, Krausz KW, Wolf CR, Henderson CJ, Gonzalez FJ: Cyp2c70 is responsible for the species difference in bile acid metabolism between mice and humans. *J Lipid Res.* 2016; **57**:2130-2137.
- 119) Jiang C, Xie C, Li F, Zhang L, Nichols RG, Krausz KW, Cai J, Qi Y, Fang ZZ, Takahashi S, Tanaka N, Desai D, Amin SG, Albert I, Patterson AD, Gonzalez FJ:

Intestinal farnesoid X receptor signaling promotes nonalcoholic fatty liver disease.

J Clin Invest. 2015; **125**:386-402.

- 120) Ikawa-Yoshida A, Matsuo S, Kato A, Ohmori Y, Higashida A, Kaneko E, Matsumoto M: Hepatocellular carcinoma in a mouse model fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet. *Int J Exp Pathol.* 2017; **98**:221-233.
- 121) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; **226**:497-509.

発表論文リスト

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Takahiro Suga, Hiroaki Yamaguchi, Toshihiro Sato, Masamitsu Maekawa, Junichi Goto, and Nariyasu Mano,
Preference of conjugated bile acids over unconjugated bile acids as substrates for OATP1B1 and OATP1B3,
PLOS ONE **12** (1), e0169719, 2017.
2. Takahiro Suga, Hiroaki Yamaguchi, Jiro Ogura, and Nariyasu Mano,
Characterization of conjugated and unconjugated bile acid transport via human organic solute transporter α/β ,
Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, in press.
3. Takahiro Suga, Hiroaki Yamaguchi, Jiro Ogura, Saori Shoji, Masamitsu Maekawa, and Nariyasu Mano,
Altered bile acid composition and disposition in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis,
in submitting.