

	PB	APAP (mg/kg)
■	0	0
●	0	500
◆	0	800
●	100	0
▲	100	500
■	100	800

図 2. 尿から得られた 1H NMR スペクトルのスコアプロット  
 (主成分 1-2)  
 APAP および APAP 代謝物領域を除いた主成分分析

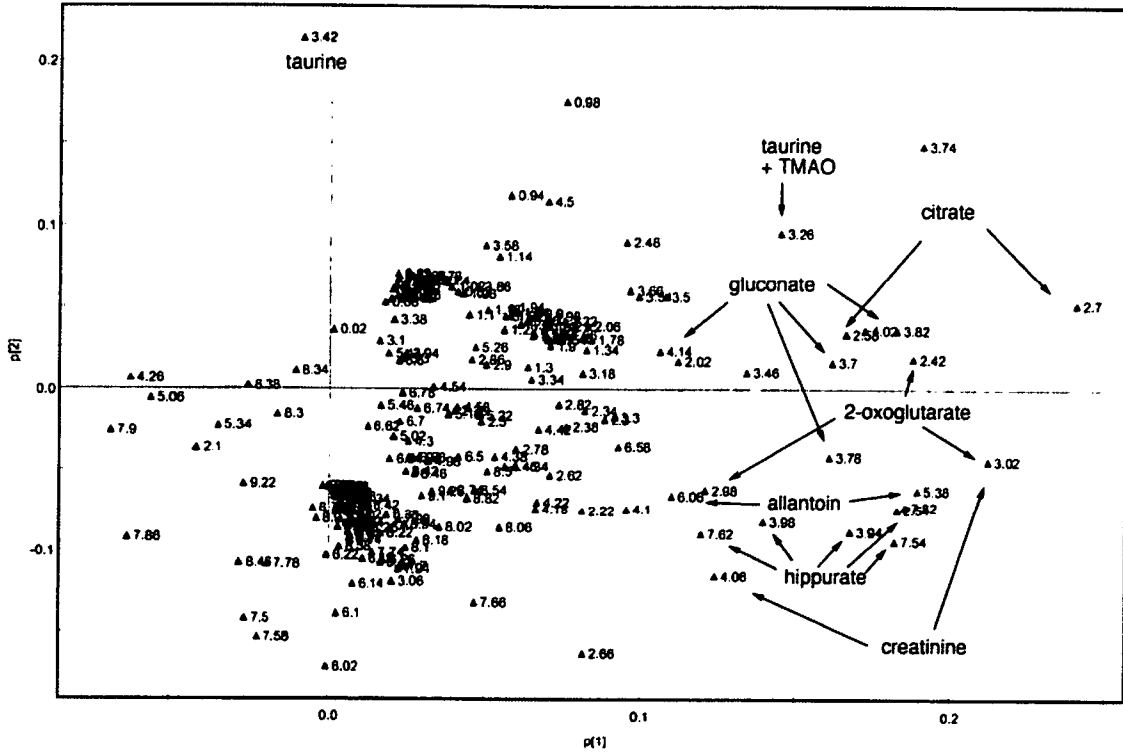


図 3. 尿から得られた  $^1\text{H}$  NMR スペクトルのローディングプロット  
 (主成分 1-2)  
 APAP および APAP 代謝物領域を除いた主成分分析

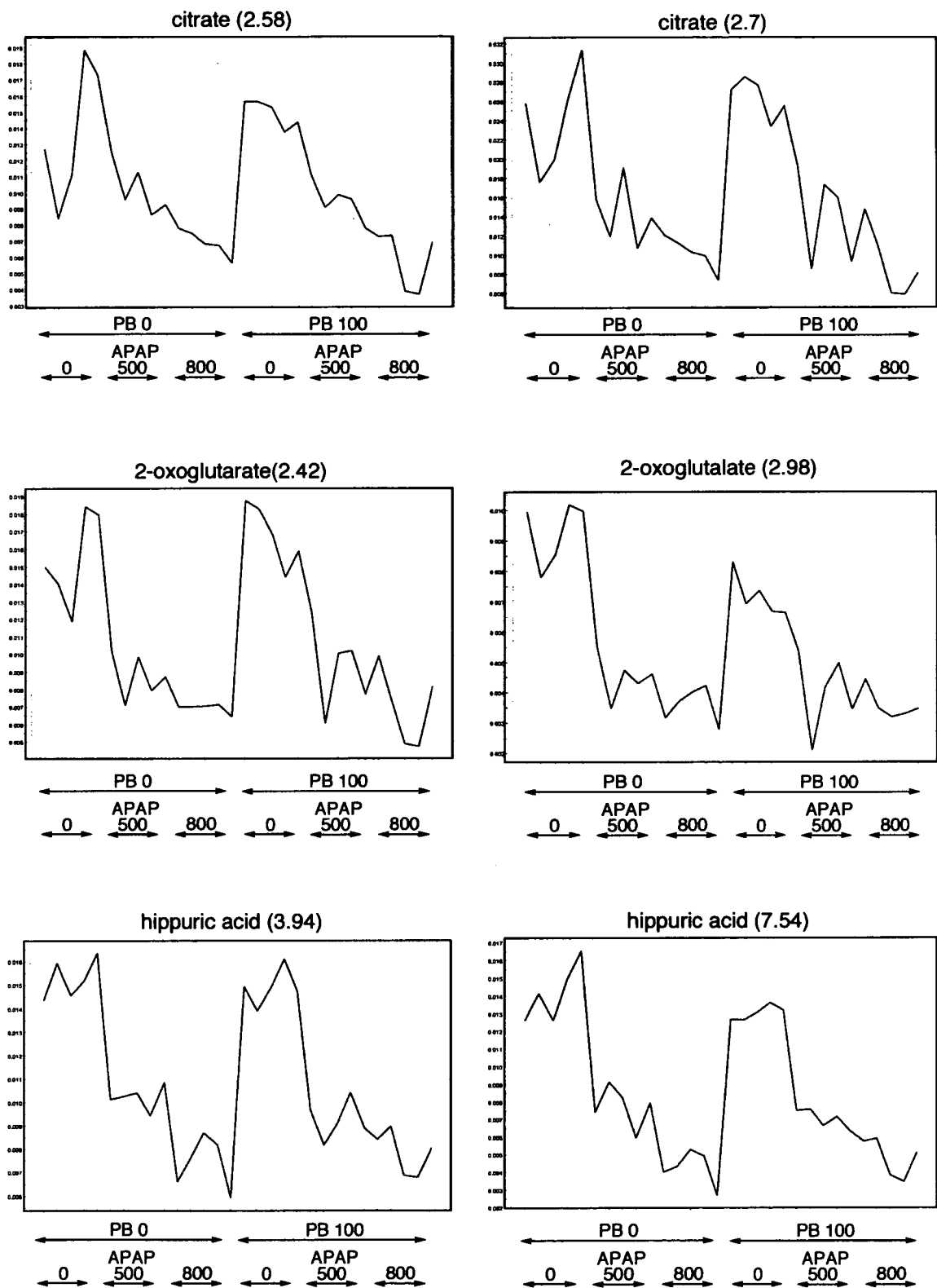


図 4-1. 主な内因性代謝物のトレンドプロット

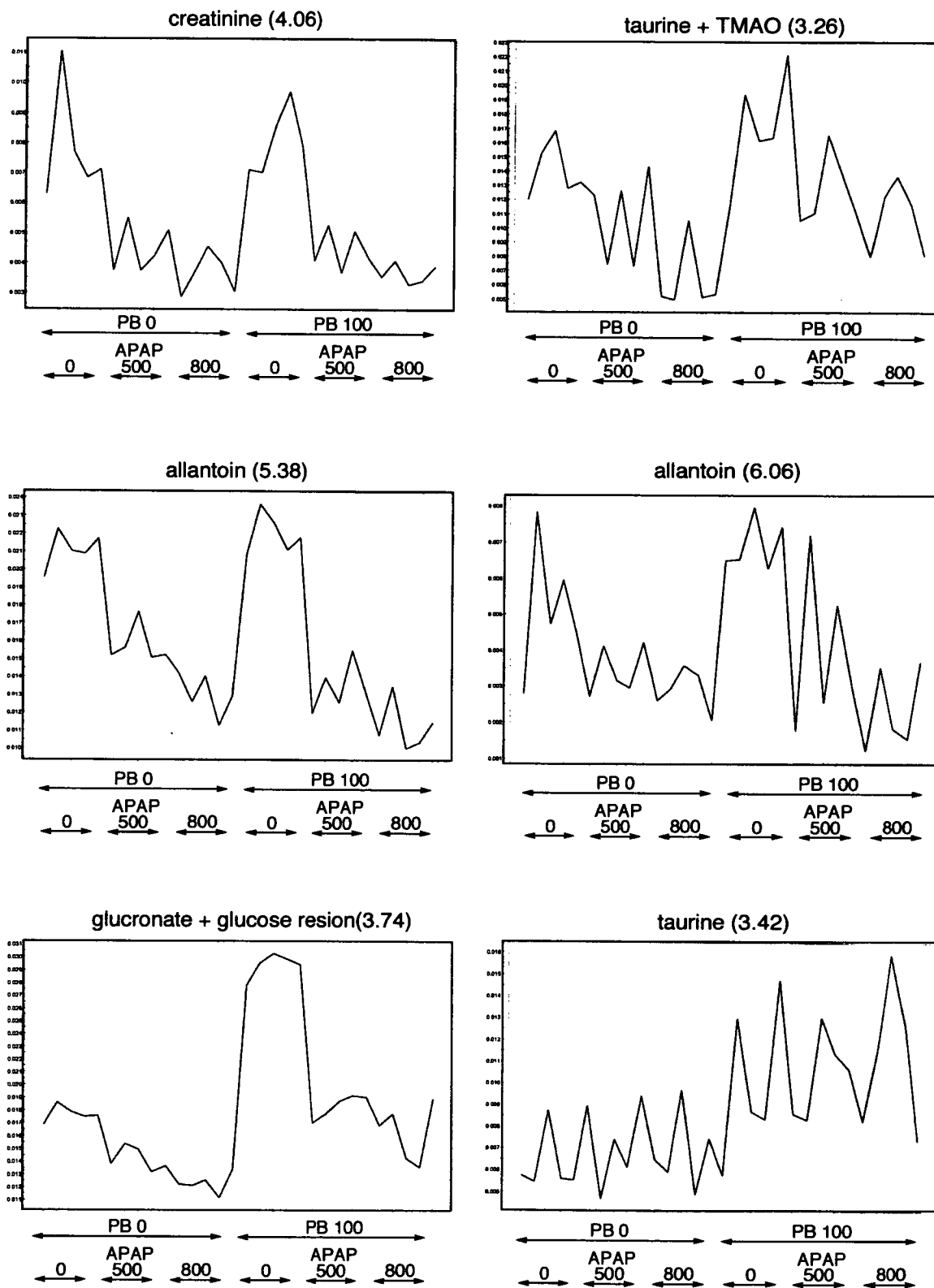
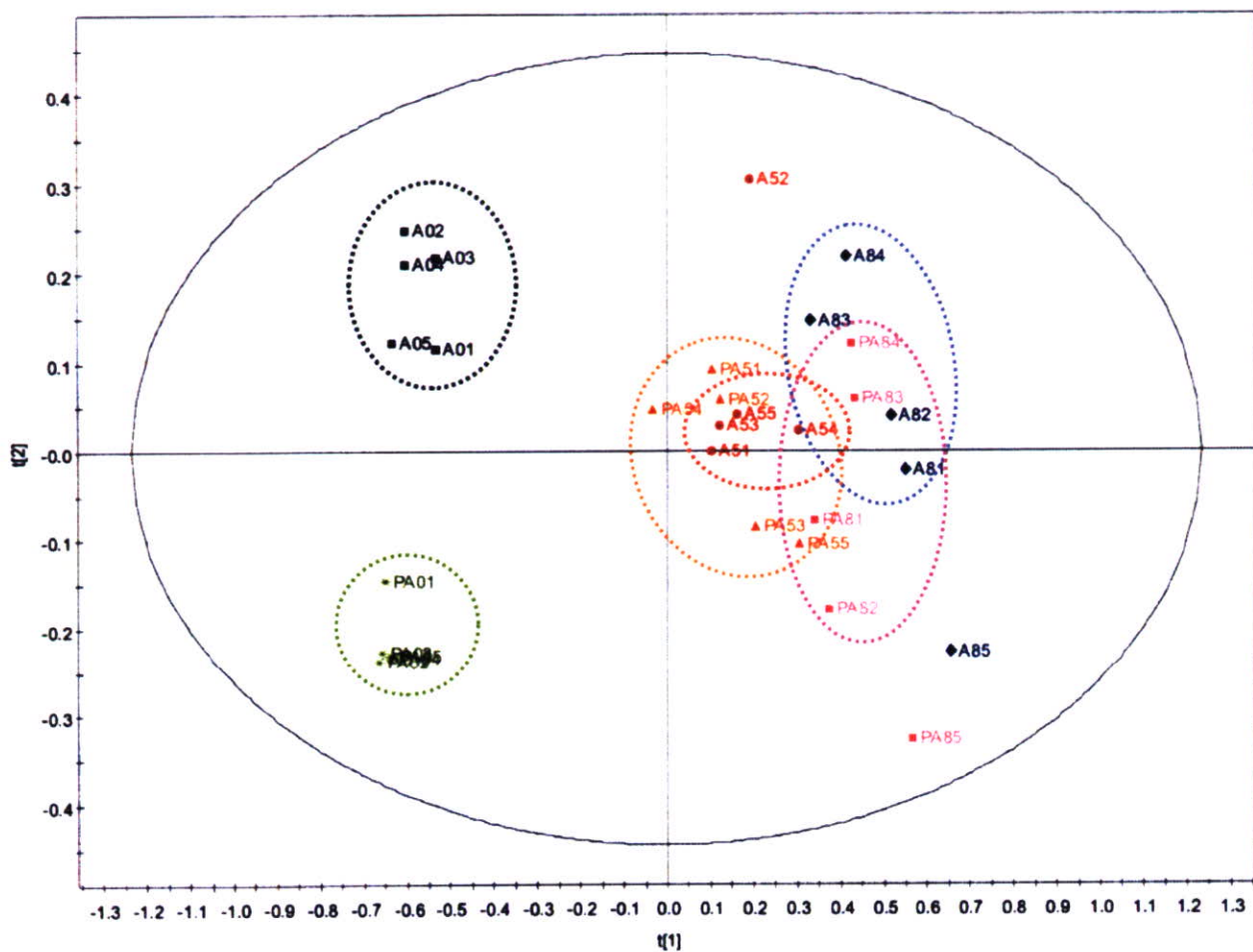


図 4-2. 主な内因性代謝物のトレンドプロット



PB APAP (mg/kg)

■	0	0
●	0	500
◆	0	800
■	100	0
▲	100	500
■	100	800

図 5. 尿から得られた  $^1\text{H}$  NMR スペクトルのスコアプロット(主成分 1-2)  
APAP および APAP 代謝物を含む主成分分析

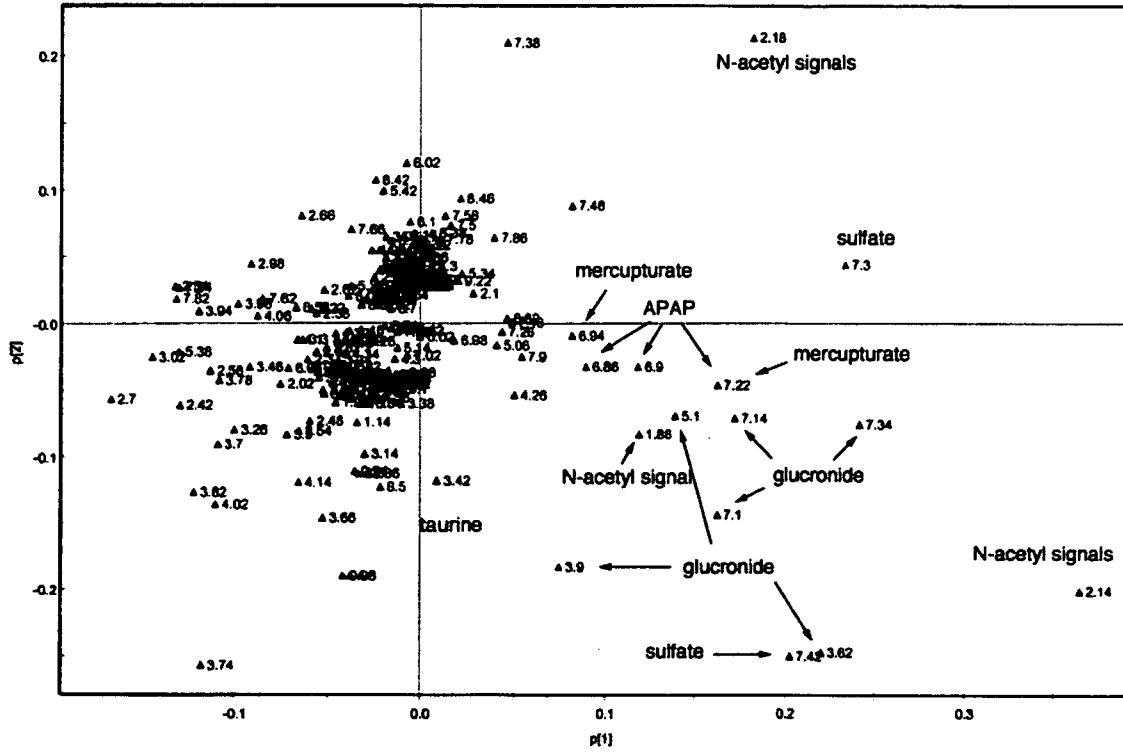


図 6. 尿から得られた  $^1\text{H}$  NMR スペクトルのスコアプロット(主成分 1-2)  
 APAP および APAP 代謝物を含む主成分分析

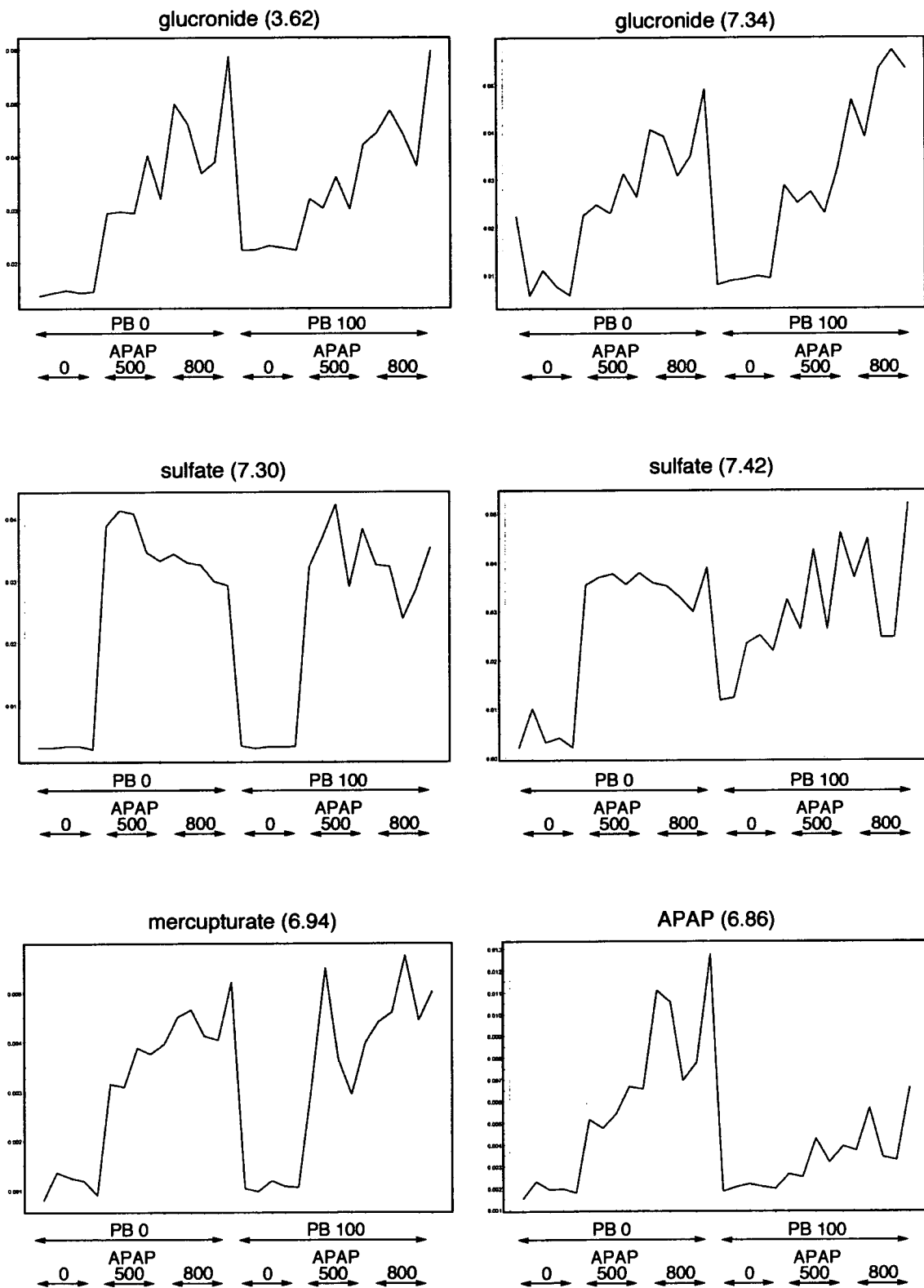


図 7. APAP および APAP 抱合体のトレンドプロット

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究事業）  
分担研究報告書

トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合を指向した肝障害の防御因子の解析

分担研究者 宮田昌明 東北大学大学院薬学研究科 助教

**研究要旨** トキシコゲノミクスとメタボロミクスの融合による毒性発現機序及びその防御の機序の解析手法を確立することを最終目的として胆汁鬱滞型の肝障害を誘発する lithocholic acid (LCA)の毒性発現及びその防御の機序の解明をマウスを用いて試みた。LCA は遅延性の肝障害を誘発することより経時的な変化や毒性を軽減させる薬物、pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile (PCN) 併用の影響から多面的に網羅的遺伝子発現解析や脂質レベルの解析を行った結果、毒性発現やその防御に生体内の脂質代謝の変動それに起因する胆汁酸の胆汁排泄レベルの変動が密接に関連する可能性を見いだした。そこで本研究では脂質代謝を変動させ、胆汁酸の胆汁排泄を変化させると考えられる soyasapogenol 誘導体の 22 $\beta$ -methoxyolean-12-ene-3 $\beta$ , 24(4 $\beta$ )-diol (ME3738)と probucol を LCA と併用して肝障害の防御の機序を解析した。LCA (0.5%)に ME3738 (0.15%)あるいは probucol (0.5%)を併用することで肝内胆汁酸レベル、血清中 ALT, ALP 活性は顕著に低下した。ME3738 および probucol は薬物代謝酵素 Cyp3a や Sult2a を誘導しなかった。ME3738 は単独あるいは LCA との併用において肝臓のコレステロール排泄トランスポーター Abcg5/8 の発現を増加させ胆汁中コレステロール排泄を亢進させた。胆汁中へのコレステロール排泄と胆汁酸排泄の間に良好な相関が認められた。一方 probucol は単独あるいは LCA との併用において血清中のリン脂質を低下させるとともに胆汁中へのリン脂質、胆汁酸の排泄を亢進させた。以上の結果より胆汁中へのコレステロールやリン脂質の排泄を亢進させることにより、LCA 誘発肝障害を防御できることが示唆され、これらの機序が胆汁鬱滞型の肝障害の治療に応用出来る可能性が示された。



研究協力者

山添 康 東北大学大学院薬学研究科  
教授

### A. 研究目的

近年医薬品の安全性評価等の解析のためマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析の手法が導入されている。この解析により多くの発現情報が得られるが、必ずしも、その中から有益な情報を抽出し、毒性の機序解明や毒性マーカーの検索に結びついていない。これらの原因として解析手法の問題や細胞内機能の変化が必ずしも mRNA レベルに反映されない点が考えられる。そこで実際の機能を反映している内在性代謝物の網羅的解析（メタボノミクス）を組み合わせた総合的な解析手法の開発が必要とされる。本研究ではこれらの解析手法の初期段階の試みとして内在性代謝物（脂質、糖、アミノ酸、核酸）の代謝や輸送に関連する遺伝子に注目し、網羅的遺伝子発現解析の結果から予測される変化を生体内代謝物の変動で説明出来るか検証する。次に抽出された内在性代謝物の変動をより具体的な遺伝子発現変動で説明出来るかどうか RT-PCR 法により解析された遺伝子発現変動から検証する。これらのステップを繰り返すことにより実際の毒性と関連した生体内機能変化に対応した毒性マーカーや障害の防御因子の同定を行う

手法の開発を目的とした。

モデル化合物として遅延性の胆汁鬱滞型肝障害を誘発する lithocholic acid (LCA)を用い解析した。LCA は生体内で生成される 2 次胆汁酸で、肝胆道系に局在する肝指向性の生体内物質である。疎水性が強く細胞毒性が認められている。雌性マウスで感受性が高く、肝実質細胞の障害の指標となる AST や ALT 活性が上昇した後、胆道系の障害の指標となる ALP 活性が上昇する。これらの毒性発現機序については未知の部分が多い。LCA 誘発肝障害の防御の機序としては LCA 代謝酵素の CYP3A や hydroxysteroid sulfotransferase (SULT2A)による代謝亢進が知られている。

本研究では前年度までの LCA/ pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile (PCN) 併用での網羅的遺伝子発現解析により導き出された肝障害の関連要素である脂質代謝に注目して、脂質代謝を変動させることが考えられる 22 $\beta$ -methoxyolean-12-ene-3 $\beta$ , 24(4 $\beta$ )-diol (ME3738)あるいは probucol を LCA と併用させて解析し、肝障害の防御機序を明らかにするとともに毒性マーカー、障害の防御因子となりうる遺伝子を抽出する手法の開発を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. 試薬

ME3738 は、明治製菓株式会社にて合成

した。Probucol、LCA は Sigma-Aldrich より購入した。

## 2. 動物と薬物処理

9 週齢の C57BL/6N 雌性マウスに、0.15(w/w) % ME3738、0.75 % LCA、0.75 % LCA+0.05 % ME3738 または 0.75%LCA+0.15% ME3738 を含有させた粉末飼料 (CE-2) を 6 日間自由に摂取させた。なお、control 群には CE-2 を 6 日間自由に摂取させた。また、水はすべての群において自由に摂取させた。Probucol 併用実験は 8~9 週齢の雌性マウスを用い、各群に対し 0.5% probucol、0.5% LCA ならびに 0.5% LCA と 0.5% probucol を混ぜた粉末飼料 (CE-2) を 9 日間自由に摂取させた。無処置群には CE-2 を自由に摂取させた。また、水は全ての群において自由に摂取させた。

## 3. 肝臓、血清、胆汁の採取

エーテル麻酔下で開腹し血液を下大静脈より採取し、肝臓を単離後、遺伝子発現解析のため肝臓の一部を RNAlater (Ambion) 中に保存した。胆汁はエーテル麻酔下で胆管カニューレーションを施し、5分間の平衡化後、胆汁を30分間採取した。

## 4. 肝障害マーカー、脂質の測定

AST、ALT 活性はトランスアミナーゼ

CII-テストワコー (和光純薬)を用いて ALP 活性測定はアルカリ性ホスファターゼ CII-テストワコー (和光純薬)を用いて測定した。総胆汁酸量は総胆汁酸-テストワコー (和光純薬)を用い、リン脂質、遊離脂肪酸、トリグリセリドはそれぞれリン脂質 C-テストワコー、NEFA C-テストワコー、トリグリセリド E-テストワコー (和光純薬)を用いた。

## 5. 胆汁酸組成の分析

胆汁酸組成は、HPLC カラムにて分離した溶出液を NAD<sup>+</sup>と混和し、3 $\alpha$ -ヒドロキシステロイド脱水素酵素カラムを通過する際に生じる反応生成物 (nicotineamide-adenine dinucleotide reduced form, NADH)を蛍光検出器にて検出した。

## 6. 遺伝子発現解析

マウス肝臓から RNA を調製し Ready-To-Go により cDNA を合成した。この cDNA と特異的プライマーにより RT-PCR 反応を実施してその反応物のバンド強度を定量した。

## C. 研究成果

### 1. ME3837 併用による LCA 誘発肝障害の変動

C57BL/6N 雌性マウスに、control、0.15(w/w)% ME3738、0.75% LCA、0.75% LCA+0.05% ME3738 及び 0.75% LCA+0.15%

ME3738 を 6 日間混餌投与した後の血漿中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 及びアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定した。その結果、control 群及び ME3738 群の AST 活性は、共に約 30 IU/L であったが、LCA 群では約 1000 IU/L に上昇した。これに対し、LCA+0.05% ME3738 及び LCA+0.15% ME3738 群では、それぞれ約 610 及び 520 IU/L と LCA 群に比べ、低値を示した (Fig. 1A)。Control 群及び ME3738 群の ALT 活性は、共に約 10 IU/L であったが、LCA 群では約 640 IU/L に上昇した。これに対し、LCA+0.05% ME3738 及び LCA+0.15% ME3738 群では、それぞれ約 420 及び 400 IU/L と LCA 群に比べ、低値を示した (Fig. 1B)。ALP 活性についても同様に、control 群及び ME3738 群の ALT 活性は、それぞれ約 100 及び 80 IU/L であったが、LCA 群では約 350 IU/L に上昇した。これに対し、LCA+0.05% ME3738 及び LCA+0.15% ME3738 群では、それぞれ約 190 及び 170 IU/L と LCA 群に比べ、低値を示した (Fig. 1C)。本結果から、ME3738 は LCA 誘発肝障害を防御することが明らかとなった。

## 2. ME3738 投与による胆汁酸組成及び胆汁酸排泄関連遺伝子の変化

肝内胆汁酸濃度は control 群及び ME3738 群では、共に約 0.10  $\mu\text{g/g}$  liver

であった。一方、LCA 群で約 1.24  $\mu\text{g/g}$  liver に上昇した。これに対し、LCA+0.05% ME3738 及び LCA+0.15% ME3738 群では、それぞれ約 0.87 及び 0.71  $\mu\text{g/g}$  liver と LCA 群に比べ、低値を示した (Fig. 2A)。肝内胆汁酸濃度と血漿中 ALT 活性の相関性をプロットした結果、 $r^2=0.757$  の良好な正の相関が認められた (Fig. 2B)。続いて、肝内胆汁酸組成の分析を行った。Control 群と ME3738 群間では taurocholic acid (TCA) が主胆汁酸であり、胆汁酸組成における顕著な差は認められなかった。一方、LCA 群においては、血漿中及び肝内 TCA、taurochenodeoxycholic acid (TCDC) 及び tauroolithocholic acid (TLCA) 濃度が上昇した。これに対し、LCA+ME3738 群では LCA 群に比べ、今回測定したすべての胆汁酸の濃度で低値を示した (data not shown)。また、LCA 群及び LCA+ME3738 群間で肝内胆汁酸組成の顕著な差は認められなかった。

次に胆汁中への胆汁酸の排泄に注目し胆汁中への胆汁酸排泄量を測定した。Control 群と ME3738 群間において、胆汁中胆汁酸排泄量及びその組成に顕著な差は認められなかった (Fig. 3, Table 1)。また、LCA 群に比べ、LCA+ME3738 群で胆汁中胆汁酸排泄量の有意な増加が認められた (Fig. 3)。その中でも TCA、TCDC 及び TLCA の胆汁中排泄が高値を示した (Table 1)。LCA 群に比べ、

LCA+ME3738 群で胆汁中胆汁酸排泄量が高値を示したことから、次に胆汁中への胆汁酸排泄に關与するトランスポーターである bile salt export pump (Bsep, Abcb11)、multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2, Abcc2) 及びコントロールとして、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) の mRNA レベルを測定した。その結果、Bsep 及び Mrp2 の mRNA レベルは、control 群と ME3738 群では顕著な差は見られなかったが、LCA 群で低下した (Fig. 4A)。また、LCA 群に比べ LCA+ME3738 群で、Bsep の mRNA レベルは高値を示した。しかし、そのレベルは control 群とほぼ同程度であった。そこで、抗マウス Bsep 抗血清を用いたウエスタンブロット解析により、肝 Bsep のタンパク量を測定した。その結果、mRNA の結果と同様に control 群と ME3738 群間で顕著な差は認められず、LCA 群で有意な低下が認められた (Fig. 4B)。これに対し、LCA 群に比べ、LCA+ME3738 群では高値を示したが、control 群とほぼ同程度であった。

### 3. ME3738 投与による脂質関連遺伝子の変動

Wild-type マウスに ME3738 を投与したときの胆汁酸、リン脂質及びコレステロールの体内動態に關与する代表的な酵素及びトランスポーターの mRNA レベル

の変動を検討した。Bsep、Mrp2、コレステロールの胆汁からの排泄に關与するトランスポーターである Abcg5/8、コレステロールから胆汁酸生成過程での律速酵素である Cyp7a1、胆汁中へのリン脂質の排泄に關与するトランスポーターである multidrug resistance protein2 (Mdr2, Abcb4)、脂肪酸合成に關与する fatty acid synthase (Fas)、triglyceride の合成や脂質合成に關与する転写因子 sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP1c) 及び脂質のホメオスタシスに關与する核内受容体である liver X receptor  $\alpha$  (LXR $\alpha$ ) の mRNA レベルを測定した。その結果、control 群に比べ、ME3738 群で Abcg5/8 の mRNA レベルの有意な上昇が認められた (Fig. 5)。

### 4. ME3738 投与による肝 Abcg5/8 と胆汁中コレステロール排泄量の変化

LCA 誘発肝障害モデルに ME3738 を投与したときの肝臓より膜画分を調製し、肝 Abcg8 のタンパク量を測定した。肝 Abcg8 のタンパク量の測定は、抗ヒト ABCG8 ポリクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析により行った。ME3738 群は、control 群に比べ、Abcg8 タンパク量の有意な増加が認められた。また、LCA 群では control 群に比べ有意に低下し、LCA+ME3738 群では LCA 群に比べ有意な上昇が認められた (Fig. 6)。

胆汁流量は、胆汁酸濃度依存的及び胆汁酸濃度非依存的な部分から成り、胆汁酸濃度非依存的な胆汁流量を測定するためのマーカーとして胆汁中へのグルタチオン排泄量を用いられている。そこで、ME3738 を Wild-type マウスに投与したときの胆汁流量、胆汁中胆汁酸、リン脂質、コレステロール及びグルタチオン排泄量を測定した。その結果、control 群と ME3738 群間で胆汁流量、胆汁中胆汁酸、リン脂質、グルタチオン排泄量の顕著な差は認められなかった。しかし、ME3738 投与群では control 群に比べ、胆汁中へのコレステロールの排泄量の増加が認められた (Table 2)。ME3738 を投与したとき、肝 Abcg8 の mRNA レベル、タンパク量の上昇及び胆汁中へのコレステロール排泄の上昇が認められたため、LCA 誘発肝障害モデルにおいても、ME3738 を併用投与すると胆汁中へのコレステロールの排泄が上昇するか検討した。その結果、LCA 群で control 群に比べ、胆汁中へのコレステロール排泄量が低下傾向を示し、LCA+ME3738 群では、LCA 群に比べ有意な上昇が認められた (Fig. 7)。

#### 5. ME3738 投与による胆汁中へのコレステロールと胆汁酸排泄量の関係

LCA 誘発肝障害モデルにおいて、LCA 群に比べ ME3738 併用群で、胆汁中への胆汁酸及びコレステロールの排泄の有

意な上昇が認められたことから、胆汁中へのコレステロールと胆汁酸の排泄量の相関性を検討した。横軸に個別別の胆汁中へのコレステロール排泄量、縦軸に個別別の胆汁中への胆汁酸排泄量をプロットすると、LCA 誘発肝障害モデルで  $r^2=0.840$  の良好な正の相関性が認められた (Fig. 8)。また、胆汁中へのコレステロールとリン脂質の排泄量の相関性を検討した結果、LCA 誘発肝障害モデルで、 $r^2=0.877$  の良好な正の相関性が認められた。

#### 6. Probucol 併用による LCA 誘発肝障害と肝内胆汁酸レベル

LCA 投与による肝障害発現に対し、probucol を同時投与した際の影響を検討するため、採取した血清の肝障害マーカーである ALT と ALP 活性を測定した。その結果、LCA 単独群では ALT・ALP 活性共に、無処置群と比べて、それぞれ約 43.8 倍 ( $526.9 \pm 277.3$  IU/L)、約 4.4 倍 ( $312.7 \pm 76.9$  IU/L) と、有意な上昇が認められた。一方、probucol 併用群では無処置群と比べ ALT ならびに ALP 活性に有意な差異は認められなかった (Fig. 9)。Probucol 併用群では、肝障害マーカーの有意な増加が認められなかった。これより、probucol 併用により肝内胆汁酸濃度の変化をもたらしている可能性が考えられる。そこで、肝ホモジネートからの抽出液を用いて、肝内

3a-OH胆汁酸濃度を測定した。その結果、LCA群では無処置群の約52倍(2755 ± 1250 nmol/g liver)と顕著な増加が認められた。一方、probucol併用群では197.1 ± 89.9 nmol/g liverであり、無処置群との差は認められなかった。

## 7. Probucol 併用による脂質レベルの変動

Probucol 処置ならびに LCA 処置による、血清中の脂質濃度の変化を検討した。その結果、トリグリセリド (TG)、リン脂質 (PL)、総コレステロール (T-Chol) ならびにコレステロールエステル (CE) 濃度は、無処置群に比 probucol 群で有意な減少が認められた。PL は無処置群に比べ、LCA 群で有意な増加が認められた。さらに、LCA 群に比べ probucol 併用群では、TG に差は認められなかったが、PL、T-Chol ならびに CE が有意に減少していた。また、T-Chol 中の CE の比率を求めたところ、無処置群に比べ probucol 群ならびに LCA 群で有意に減少していた (Table 3)。Probucol 処置ならびに LCA 処置による、肝臓中の脂質濃度の変化を検討した。その結果、TG、PL、CE ならびに CE/T-Chol は各群に差が認められなかった。T-Chol は、LCA 群に比べ probucol 併用群で有意な増加が認められた (Table 4)。

Probucol 処置ならびに LCA 処置による、胆汁中の脂質排泄量の変化を検討し

た。その結果、トリグリセリド排泄量は各群で差が認められなかった。リン脂質排泄量は、無処置群に比べ probucol 群で有意に増加していた。また、無処置群に比べ LCA 群で有意に減少していたが、probucol 併用により有意に増加が認められた。総コレステロール排泄量は、無処置群ならびに LCA 群に比べ、probucol 併用群で有意に増加していた (Table 5)。

## D. 考察

前年度までの LCA 誘発肝障害における網羅的遺伝子発現解析の結果から LCA 誘発肝障害の機序あるいはその防御の機序と脂質代謝変動との関連が示唆されていた。肝内脂質レベルや脂質胆汁排泄速度が障害の認められる LCA 群で有意に減少し、PCN 併用により障害が軽減すると、これらのレベルが回復したことより上記の網羅的遺伝子発現解析からの仮説は支持された。さらにこの LCA 誘発肝障害の防御機序、防御因子を同定するために、脂質動態を変動させることが予想される ME3738 と probucol を LCA と併用して解析した。ME3738 と probucol 併用はともに LCA 誘発肝障害を軽減させ、同時に肝内胆汁酸のレベルを低下させた。ME3738 は胆汁へのコレステロール排泄に関わるトランスポーターの Abcg5/8 の発現を亢進することで、胆汁へのコレステロール排泄を亢進させ、結果的に胆汁酸排泄の低下を防ぐことに

より肝内胆汁酸レベルの上昇を防いで、障害を軽減している可能性が示された。一方、probuco1 においては、リン脂質の胆汁排泄を亢進することにより、胆道系での疎水性胆汁酸の細胞障害性を軽減する、あるいは胆汁酸排泄を促進することで LCA 誘発肝障害を軽減する可能性が示された。これらの結果は胆汁鬱滞時での胆汁生成、胆汁酸排泄促進には、リン脂質やコレステロールの排泄を亢進させることが重要であることを示唆する。PCN と LCA 併用の場合においても薬物代謝酵素の誘導だけでなく、肝内脂質 (triglyceride、リン脂質) 合成を亢進することで胆汁酸排泄を維持し、肝障害を軽減することが前年度の研究からも示唆されている。PCN, ME3738 および probuco1 によりリン脂質やコレステロールの胆汁排泄亢進が LCA 誘発肝障害の防御に関与する可能性が示された。

#### E. 結論

新規高感度安全性予測系の構築を目指し、まずその前段階の肝障害の機序あるいは防御の機序の解明、毒性マーカーの検索のため、網羅的遺伝子発現解析等のデータと内在性代謝物の変動を結び付ける解析手法の開発を試みた。網羅的遺伝子発現解析に加え、肝臓の内在性代謝物 (脂質) レベルの変動データより LCA 誘発肝障害と胆汁排泄される脂質の代謝異常との関連を考えた。これらの仮説

を証明するために脂質動態を変動させることが考えられる、ME3738 と probuco1 を LCA と併用して解析を行い、胆汁へ排泄される脂質であるコレステロールやリン脂質の排泄を亢進させる機序が肝障害を軽減させる可能性を示した。網羅的遺伝子発現解析のデータより推測された防御機序を二つの化学物質により検証することに成功した。今後はさらに非侵襲試料を用いたメタボロミクス解析を組み込むことにより毒性マーカー等の検索に発展させていく必要が有る。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表.

##### 1. 論文発表

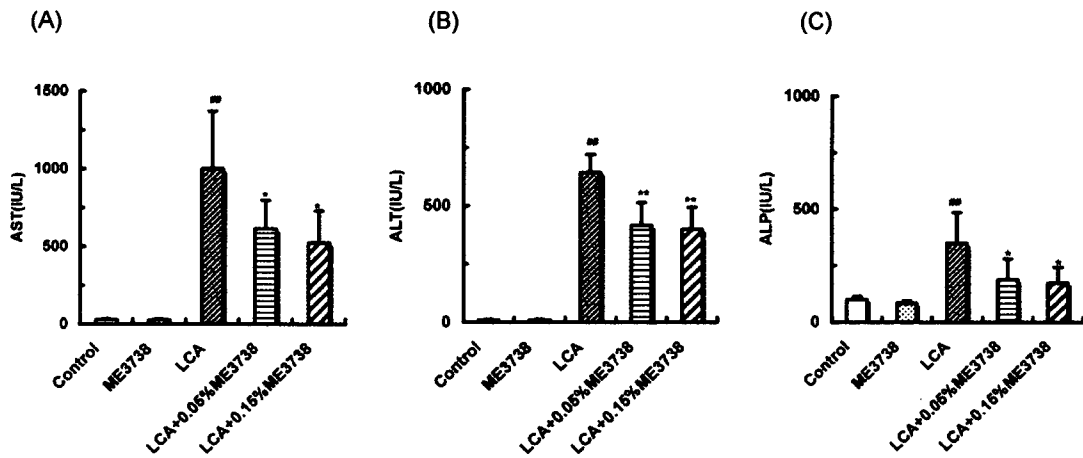
- 1) M. Nomoto, M. Miyata, M Shimada, K. Yoshinari, F. J Gonzalez, S. Shibasaki, T. Kurosawa, Y. Shindo, Y. Yamazoe ME3738 protects against lithocholic acid-induced hepatotoxicity, associated with enhancement in biliary bile acid and cholesterol output. *Eur. J. Pharmacol.* 574, 192-200 (2007)

##### 2. 学会発表

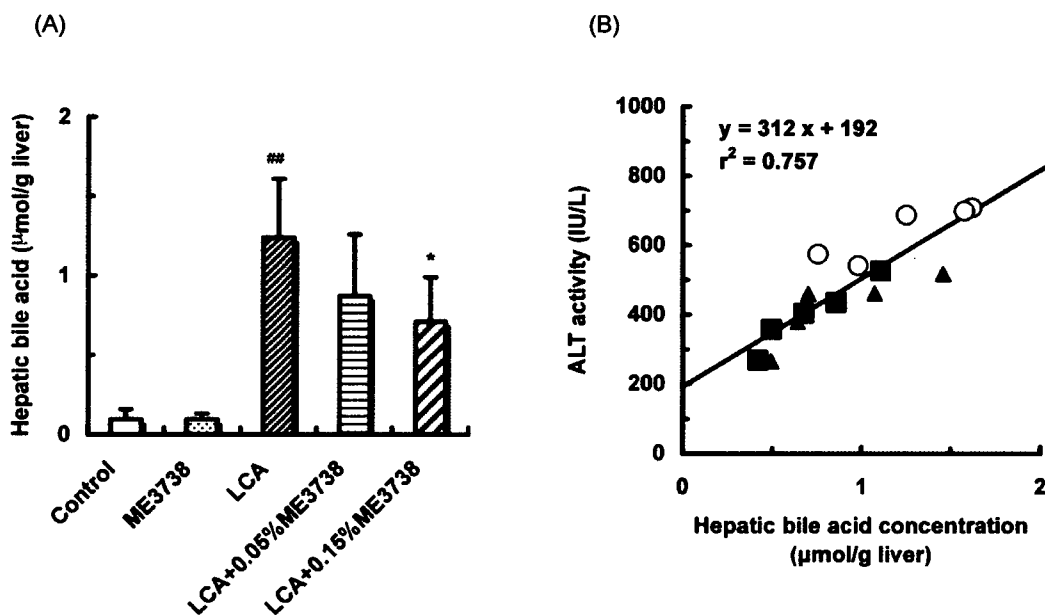
- 1) 宮田昌明、野本真博、松田良樹、小原有弘、横川伸也、二宮真一、山添康 網羅的遺伝子発現解析からのコール酸誘発肝障害 第34回日本トキシコロジー学会学術年会、2007. 東京
- 2) 高松 裕樹、松田 良樹、宮田 昌明、山添 康 アンピシリンの併用はコール酸による肝毒性を増強する 第34回日本トキシコロジー学会学術年会、2007. 東京

- 3) 野本眞博、宮田昌明、黒沢 亨、山添 康 コール酸誘発肝障害モデルにおけるME3738の有効性-酸化ストレスの防御因子と胆汁中コレステロール及び胆汁酸排泄促進 第34回日本トキシコロジー学会学術年会、2007. 東京
- 4) M. Miyata, Y Matsuda, M. Nomoto, F. J. Gonzalez, Y. Yamazoe Cholesterol feeding prevents hepatic accumulation of bile acid in cholic acid-fed FXR-null mice: FXR-independent suppression of intestinal bile acid absorption 4<sup>th</sup> World Conference on Drug Absorption, Transport and Delivery, 2007 Kanazawa.
- 5) M. Miyata, Y. Matsuda, M. Nomoto<sup>1</sup>, F. J. Gonzalez and Y. Yamazoe Cholesterol feeding prevents hepatic accumulation of bile acids in cholic acid-fed *Fxr*-null mice: FXR-independent suppression of intestinal bile acid absorption 8<sup>th</sup> ISSX meeting, 2007. Sendai
- 6) W. Hori, M. Miyata, and Y. Yamazoe Hepatic bile acid sulfation rate-limits the excretion of secondary bile acid in the body 8<sup>th</sup> ISSX meeting, 2007. Sendai
- 7) M. Nomoto, M. Miyata, T. Kurosawa and Y. Yamazoe ME3738 mediated enhancement of biliary cholesterol excretion at high hepatic bile acid levels stimulates biliary bile acid excretion without altering liver Bsep protein levels 8<sup>th</sup> ISSX meeting, 2007. Sendai
- 8) 宮田昌明、松田良樹、高松裕樹、佐藤望未、山添 康 コレステロール併用は胆汁酸摂取 *Fxr* 欠損マウスの肝内胆汁酸の蓄積を妨げる-FXR に依存しない回腸胆汁酸再吸収の抑制 第29回胆汁酸研究会, 2007, つくば

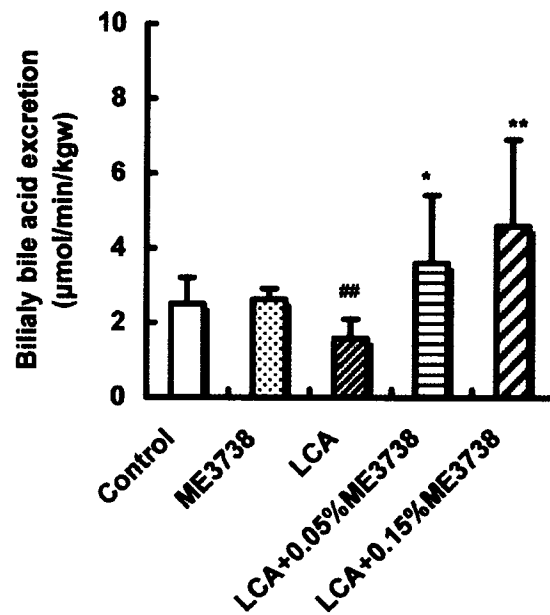




**Fig.1 Plasma AST (A), ALT (B) and ALP (C) activities.** Plasma were obtained from C57BL/6N mice fed a control, 0.15% ME3738, 0.75% LCA, LCA+0.05% ME3738 or LCA+0.15% ME3738 diet for 6 days. Plasma diagnosis parameters were measured by enzyme-colorimetric method. Data are shown as the mean + S.D. (n=5) ## Significantly different from control group (P<0.01), \*, \*\* Significantly different from LCA group (P<0.05, P<0.01, respectively)



**Fig. 2 Hepatic bile acid concentration (A) and correlation between hepatic bile acid concentration and plasma ALT activity (B).** (A) Hepatic bile acid concentration was measured by enzyme-colorimetric method. Data are shown as the mean + S.D. (n=5). #, ## Significantly different from control group (P<0.05, P<0.01, respectively), \*, \*\* Significantly different from LCA group (P<0.05, P<0.01, respectively) (B) Liver homogenate was prepared from C57BL/6N mice fed a 0.75% LCA (open circle), LCA+0.05% ME3738 (closed triangle) or LCA+0.15% ME3738 (closed square) diet for 6 days.

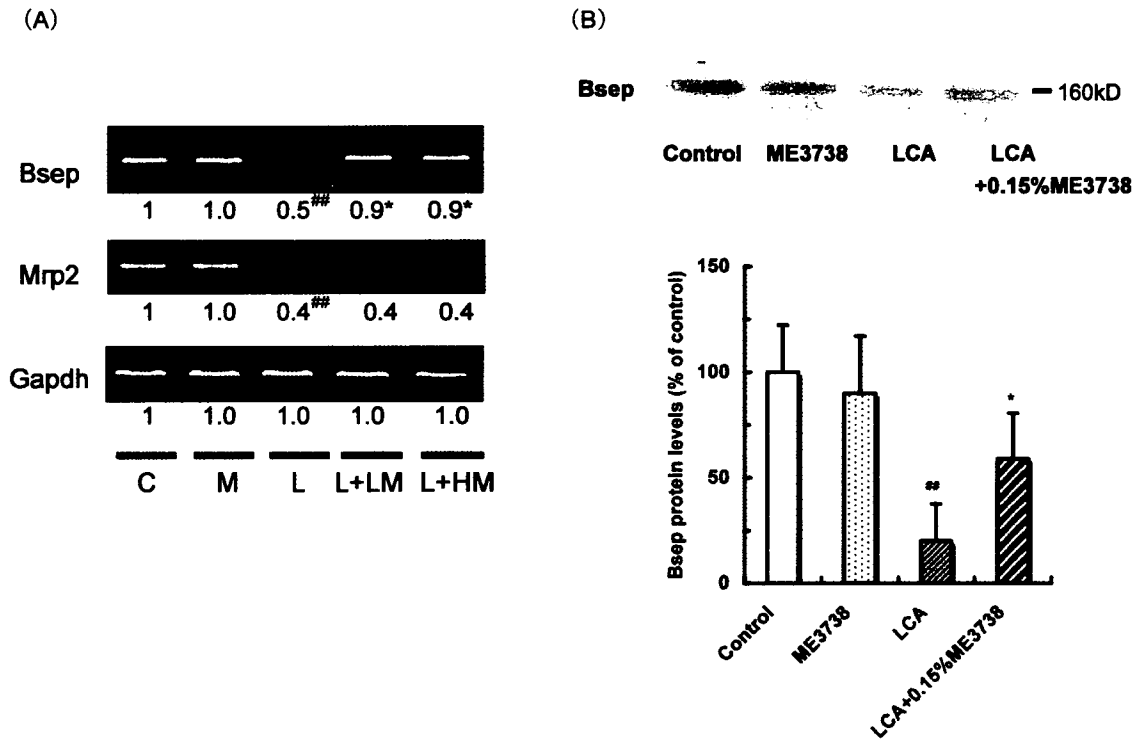


**Fig. 3 Biliary bile acid excretion.** The bile was collected for 30 min by bile duct cannulation from C57BL/6N mice fed a control, 0.15% ME3738, 0.75 % LCA, LCA+0.05 % ME3738 or LCA+0.15% ME3738 diet for 6 days. Biliary bile acid concentration was measured by enzyme-colorimetric method. Data are shown as the mean + S.D. (n=5).  
 ### Significantly different from control group (P<0.01), \*, \*\* Significantly different from LCA group (P<0.05, P<0.01, respectively)

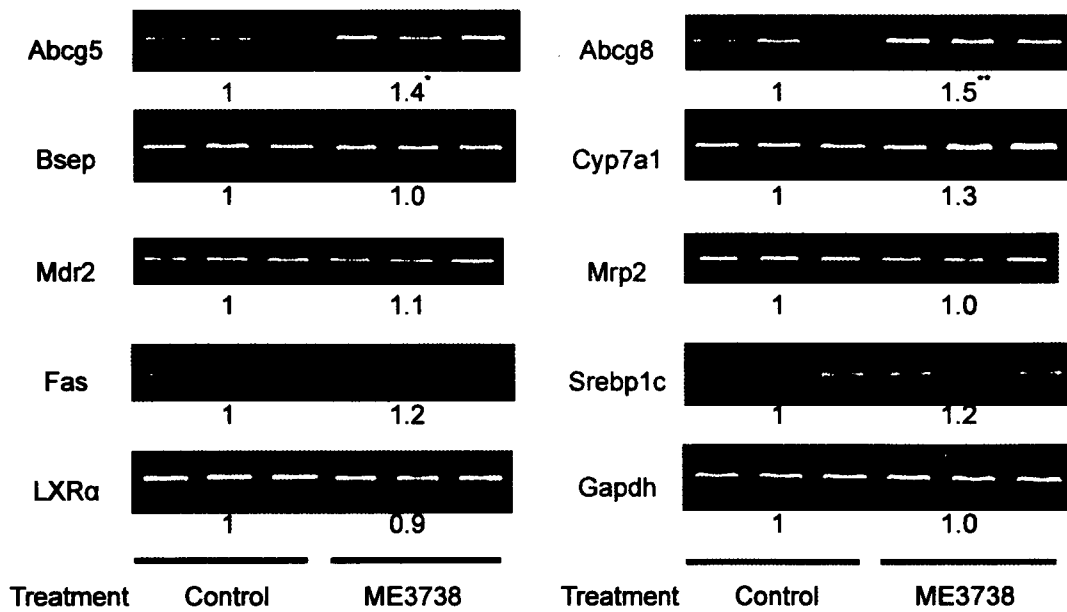
**Table 1 Biliary bile acid composition (µmol/min/kgw)**

	$\beta$ MCA	TBMCA	UDCA	TUDCA	CA	TCA	CDCA	TCDC	DCA	TDCA	LCA	TLCA
Control	N.D.	0.22 ± 0.06 (0.11)	N.D.	0.02 ± 0.00 (0.01)	N.D.	2.24 ± 0.37 (0.88)	N.D.	0.01 ± 0.00 (0.01)	N.D.	0.02 ± 0.00 (0.01)	N.D.	N.D.
ME3738	N.D.	0.37 ± 0.04 (0.14)	N.D.	0.04 ± 0.01 (0.01)	N.D.	2.23 ± 0.25 (0.83)	N.D.	0.02 ± 0.00 (0.01)	N.D.	0.02 ± 0.01 (0.01)	N.D.	N.D.
LCA	N.D.	0.17 ± 0.10 (0.11)	N.D.	N.D.	N.D.	0.43 ± 0.18 (0.27)	N.D.	0.69 ± 0.21 (0.43)	N.D.	0.04 ± 0.01 (0.03)	N.D.	0.25 ± 0.05 (0.16)
LCA +0.05%ME3738	N.D.	0.15 ± 0.08 (0.04)	N.D.	0.02 ± 0.02 (0.01)	N.D.	1.22 ± 0.73 (0.34)	N.D.	1.58 ± 0.66 (0.44)	N.D.	0.02 ± 0.01 (0.01)	N.D.	0.59 ± 0.29 (0.16)
LCA +0.15%ME3738	N.D.	0.48 ± 0.24 (0.10)	N.D.	N.D.	N.D.	1.14 ± 0.74 (0.25)	N.D.	2.00 ± 0.81 (0.43)	0.01 ± 0.01 (0.00)	0.16 ± 0.14 (0.03)	N.D.	0.80 ± 0.46 (0.17)

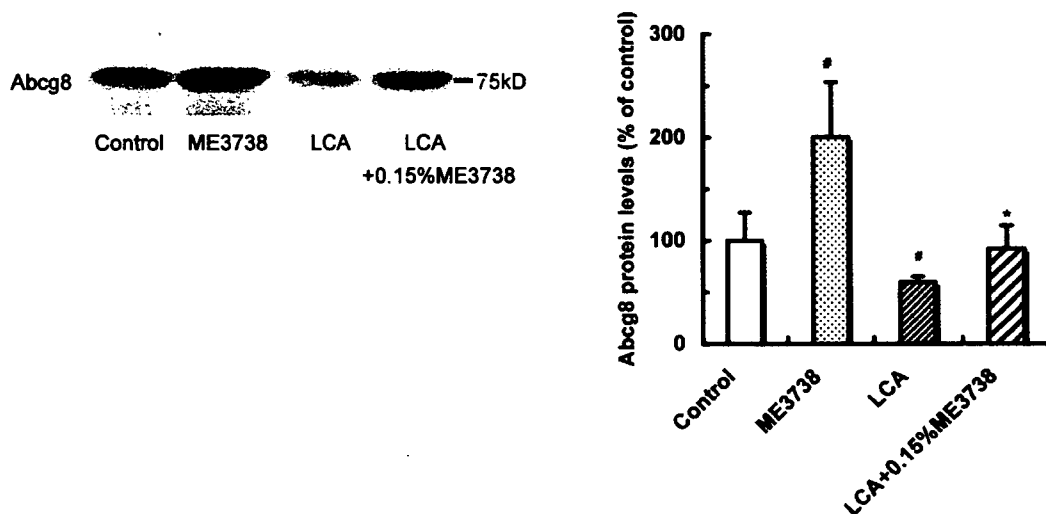
Data are expressed as the mean ± S.D. and N.D. represents below 0.01 µmol/min/kgw  
 Numbers in parenthesis represent % of the total bile acids.



**Fig. 4 Expression of bile acid-related genes(A) and hepatic Bsep protein levels(B).**  
 (A) Hepatic cDNA was prepared from C57BL/6N mice fed a control (C), 0.15% ME3738 (M), 0.75% LCA (L), LCA+0.05% ME3738 (L+LM) or LCA+0.15% ME3738 (L+HM) diet for 6 days. The hepatic mRNA levels were measured by RT-PCR. Data are shown as the mean.  
 (B) Bsep protein levels were measured by Western blot analysis. Plasma membrane proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and electrically transferred to nitrocellulose membranes for immuno-staining with anti-mouse BSEP antibody. Data are shown as the mean + S.D.(n=4). <sup>##</sup> Significantly different from control group (P<0.01). <sup>\*</sup> Significantly different from LCA group (P<0.05).



**Fig. 5 Expression of lipid-related genes.** Hepatic cDNA was prepared from wild-type mice fed a control or 0.15% ME3738 diet for 6 days. The hepatic mRNA levels were measured by RT-PCR. \*,\*\* Significantly different from control group ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , respectively)



**Fig. 6 Hepatic Abcg8 protein levels.** Hepatic Abcg8 protein levels were measured by Western blot analysis. Plasma membrane proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and electrically transferred to nitrocellulose membranes for immuno-staining with Abcg8 polyclonal antibody. Data are shown as the mean + S.D.(n=5). # Significantly different from control group ( $P < 0.05$ ), \* Significantly different from LCA group ( $P < 0.05$ ).