

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06750

研究課題名(和文) 肝再生における臓器間連携による薬物動態変化と毒性発現を考慮した薬物治療戦略

研究課題名(英文) Strategy of personalized drug therapy considering organ crosstalk of drug metabolism and toxicity during liver regeneration

研究代表者

佐能 正剛 (SANOH, Seigo)

広島大学・医系科学研究科(薬)・助教

研究者番号：00552267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：部分肝切除肝再生モデルマウスを用いて、薬物代謝・毒性研究を行った。肝切除から肝再生過程において、小腸における薬物代謝酵素の発現量が増加するものが観察された。これは、肝機能低下に伴い解毒機能を維持するために、肝臓と小腸の臓器間連携機構が働き、代償誘導が惹起された結果と考えられた。また、医薬品の中には肝再生能を変化させるものがあった。このような医薬品は薬物動態を変化させ、肝毒性発現に関与する可能性があり薬物治療において注意する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓がんの治療において、腫瘍摘出のために、肝臓の再生機能を期待した肝切除術がなされることが多い。肝再生される間も、さまざまな薬物治療がなされることがあるが、肝切除による肝機能低下による薬物動態の変化や副作用発現を考慮した個別化薬物療法の実践が求められる。本研究で得られた、肝再生過程における薬物代謝酵素の臓器間連携や、薬剤の肝再生に与える影響評価に関する知見は、最適な薬物治療の提案に有用となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The studies of drug metabolism and toxicity were conducted using a partial hepatectomy (PH) mouse model for liver regeneration. During the process of hepatic regeneration from hepatectomy, an increase in the expression of cytochrome P450, one of drug-metabolizing enzymes expressed in the small intestine was observed. The finding was considered to be a result of compensatory induction by the organ crosstalk between the liver and small intestine to maintain the function of detoxification due to decreased liver function. In addition, such drugs which alter the ability of liver regeneration may affect the pharmacokinetics and be involved in hepatotoxicity, which requires attention in drug therapy.

研究分野：薬物代謝学、毒性学

キーワード：肝再生 臓器間連携 薬物代謝 毒性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓がんの治療は、腫瘍の大きさ・数および肝機能の程度によって、種々の治療オプションから選択されるが、その中で、腫瘍摘出のための肝切除術がなされることが多い。場合によっては、肝切除後に部分肝移植がなされることもある。正常な肝臓が 30% 程度残っていた場合、数か月で概ね再生が完了することから、これは肝再生を期待した外科的治療となる。一方、肝切除術・肝移植を受けた患者 (移植ドナーも含む) は、鎮痛剤、免疫抑制剤や抗がん剤など様々な薬物治療がなされる。しかし、肝機能が低下しているため、肝機能低下による体内動態変化や副作用の可能性を考慮に入れた個別化薬物療法の実践が求められる。

実際、Hughes *et al.*, *Dig. Liver Dis.* (2015) の報告において、肝切除後に解熱鎮痛剤アセトアミノフェンを投薬したところ、血中濃度の増加が顕著であったという知見は、肝切除による肝機能低下が薬物動態に反映された結果と考えられる。さらには、Muraki *et al.*, *Ann. Transplant.* (2011) の報告では、肝移植の患者において肝機能が賦活化するまでの間、免疫抑制剤タクロリムスの代謝は、肝臓だけでなく小腸も関与することを示唆したデータが報告されており、肝切除から肝再生が完了するまでの間、肝臓と肝外組織における薬物代謝の臓器間連携が起きている可能性も示唆された。

一方、肝切除後の肝再生機構には、interleukin-6、hepatocyte growth factor、epidermal growth factor、transforming growth factor  $\beta$ 、胆汁酸や脂質などが関与していることが知られる。このことから、これら因子を介して、肝再生に影響を与える薬剤は、上述のような薬物代謝の臓器間連携がかく乱され、毒性発現の原因となることも想定される。しかしながら、臓器間連携も含めて、このような機構については十分にわかっていない。

### 2. 研究の目的

肝再生研究に汎用される部分肝切除肝再生モデルマウスを用いて、肝切除によって肝機能が低下している状態から再生するまでの過程における、残存する肝臓と小腸などの肝外組織中の薬物代謝酵素やトランスポーターの発現量変化を精査し、その臓器間連携メカニズムについて明らかにする。さらには、肝再生能に影響を与える薬剤を見出し、そのメカニズムの解明を通して、肝再生能のかく乱が薬物動態変化や副作用発現の原因となる可能性を精査し、最適な薬物治療アプローチを提案することを目的とする。

### 3. 研究の方法

部分肝切除肝再生モデルマウス (2/3 partial hepatectomy (PH) マウス) の作製

麻酔下で C57BL/6J 雄マウスの 2/3 の肝臓 (中間葉と左葉) を切除し、1 週間で肝再生が完了する肝再生モデルマウス (PH マウス) を作製した。通常飼料として MF 飼料 (オリエンタル酵母株式会社) を、精製飼料として AIN-93G (日本クレア株式会社) を摂餌し飼育した。

評価化合物の投与

各評価化合物 (コール酸、リファンピシン) は、肝切除 1 時間前とその後 3 日間、200mg/kg の割合で PH マウスに反復経口投与し (コントロール群は 0.5% メチルセルロース) 肝臓などの組織を採取した。また、肝臓がヒト化されたヒト肝細胞キメラマウス (PXB mouse<sup>®</sup>, 株式会社フェニックスバイオ) にリファンピシンを 200mg/kg、4 日間反復投与後、肝臓などの組織を採取した。以上の動物実験は承認された広島大学動物実験計画、株式会社フェニックスバイオ動物実験計画に従い行った。

mRNA 発現評価

細胞増殖関連遺伝子、薬物動態関連遺伝子 (薬物代謝酵素、トランスポーター) 脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現評価は、回収した肝臓などの組織サンプルから RNA 抽出と逆転写を行い、リアルタイム RT-PCR を行った。

胆汁酸濃度測定

血漿、肝臓中の一次胆汁酸、二次胆汁酸濃度は、分析前処理後、質量分析装置 LC-MS/MS (Nexera HPLC system, LCMS-8050 system, 株式会社島津製作所) を用いて測定した。

脂質濃度測定

肝臓中トリグリセリド濃度を LabAssay<sup>™</sup> Triglyceride (富士フィルム和光純薬株式会社) により測定した。

### 4. 研究成果

(1) PH マウスにおける肝再生

PH マウスにおいて、通常飼料摂取群では 2/3 肝切除後、肝重量は増加し、7 日までに肝重量が回復したことを確認できた。一方で、通常飼料から精製飼料に変更したところ、肝重量の十分な回復は観察されなかった (図 1)。一方、肝細胞増殖の指標となる CyclinD1 の mRNA 発現は、通常飼料摂取群において、切除後 1 日目から上昇したのに対し、精製飼料摂取群では、それより遅れて 3 日目から発現が上昇した。この結果より、両食餌群で 2/3 肝切除後の肝再生は確認できた一方で、精製飼料摂取群では肝再生が遅延した可能性が示唆された。

(2) PH マウスの肝再生過程における肝臓、小腸に発現する薬物代謝酵素の mRNA 発現変化

肝臓と小腸に発現する 7 種類のシトクローム P450 (CYP) 分子種 (Cyp2b10, Cyp2c29, Cyp2c55, Cyp2d22, Cyp2d26, Cyp3a11, Cyp3a13) の肝再生過程における mRNA 発現変動を検討した。通常飼料摂取群では、Cyp2c55 の発現が切除後 3 日目に肝臓において増加し、Cyp3a13 の発現は、切除後 1 日目で小腸において増加した。一方、精製飼料摂取群では、通常飼料摂取群より多くの分子種の変動が観察され、Cyp2c55、Cyp3a11 の発現が肝臓において切除後 3 日目で増加し (図 2)、Cyp2b10 の発現は、肝臓と小腸両方において切除後 1 日目で増加した。また、Cyp2c29、Cyp3a11、Cyp2d22、Cyp3a13 の発現は、小腸において切除後 1 日目で増加した (図 2)。以上の知見は、2/3 の肝臓が切除されたことにより、肝臓全体における薬物代謝能が低下したことを受けて、残存する肝臓と小腸においてその代謝能を補うための代償的な CYP 分子種の酵素誘導が生じた可能性が考えられた。その中で、精製飼料摂取群では肝再生が遅延したことに伴い、代償誘導が大きく機能した可能性が示唆された。

(3) 肝切除後の血液中胆汁酸濃度の変動

腸肝循環の動態を示し、かつ肝再生への寄与も知られる胆汁酸が肝切除後の肝臓と小腸の CYP の発現制御に関与している可能性を考え、肝再生過程における血漿中胆汁酸濃度の変動について調べた。その結果、肝切除前の血漿中胆汁酸濃度は、精製飼料摂取群において通常飼料群の 1/3 程度であった。一方、肝切除後 3 日目において精製飼料摂取群で顕著な濃度増加がみられた (図 3)。精製飼料摂取群で肝再生が遅延したのは、肝切除前の低い胆汁酸濃度が原因であると考えられた。しかしながら、3 日目の胆汁酸濃度の増加はそのメカニズムは不明であるが、遅延した肝再生を促す機構が働いた可能性がある。

(4) コール酸投与による肝再生や CYP 発現への影響

精製飼料摂取群において肝切除後 3 日目の胆汁酸濃度増加を肝切除直後から再現するために、胆汁酸の一種である cholic acid (CA) を投与した。その結果、細胞増殖の指標である CyclinD1 の mRNA 発現が肝切除後 1 日目で増加したことを鑑みると、胆汁酸と肝再生の関係性が確認できた。また、その中で、(2)で観察された精製飼料摂取群、肝切除 3 日目において発現増加した Cyp3a11 は、CA 投与により肝切除後 1 日目から増加する傾向がみられた。このことから、肝切除後の肝再生過程において CYP 発現の変動に胆汁酸が一部関与している可能性が示唆された。しかしながら、変動した CYP 分子種すべてについて胆汁酸だけでは説明できず、今後さらなる検討が必要である。

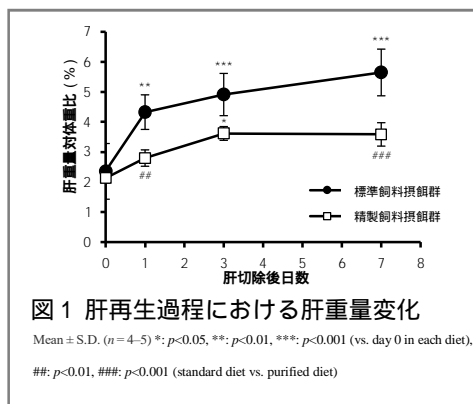


図 1 肝再生過程における肝重量変化

Mean ± S.D. (n = 4-5) \*; p < 0.05, \*\*; p < 0.01, \*\*\*; p < 0.001 (vs. day 0 in each diet), ##; p < 0.01, ###; p < 0.001 (standard diet vs. purified diet)

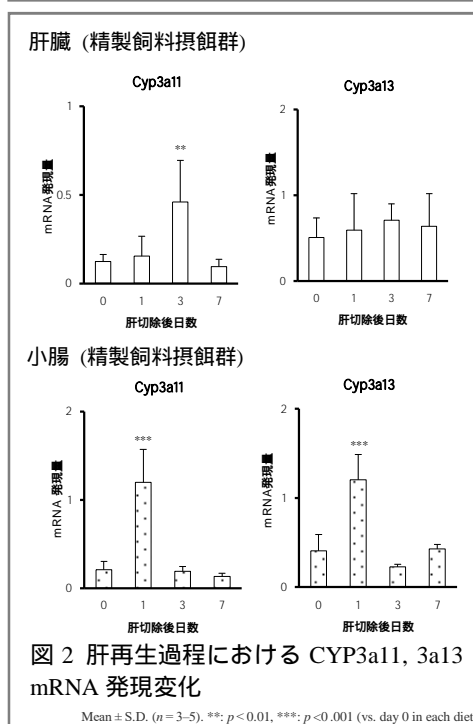


図 2 肝再生過程における CYP3a11, 3a13 mRNA 発現変化

Mean ± S.D. (n = 3-5) \*\*; p < 0.01, \*\*\*; p < 0.001 (vs. day 0 in each diet)

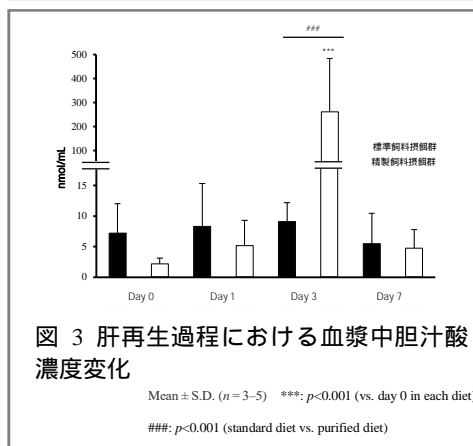


図 3 肝再生過程における血漿中胆汁酸濃度変化

Mean ± S.D. (n = 3-5) \*\*\*; p < 0.001 (vs. day 0 in each diet), ###; p < 0.001 (standard diet vs. purified diet)

#### (5) リファンピシンを PH マウスに投与後の肝再生に与える影響

リファンピシンは肝臓中の胆汁酸濃度を増加させ、胆汁うっ滞毒性の副作用を有する薬剤である。胆汁酸と肝再生の関与を考えると、リファンピシンのような胆汁酸濃度を变化させる薬剤は肝再生能に影響を与えるのではないかと考えた。

リファンピシンを PH マウスに投与したところ、コントロール群と比較して、肝切除 1 日目から肝重量が増加する傾向が観察され、3 日目では、その増加が抑制される傾向が観察された。また、CyclinD1 の mRNA 発現は、コントロール群と比較して、1 日目で増加し、3 日目では低下する傾向が認められ (図 4)、肝重量変化を反映する結果となった。これは、リファンピシンは、肝切除後 1 日目に肝再生を促進させたものの、その後、肝再生を抑制させたものと考えられた。

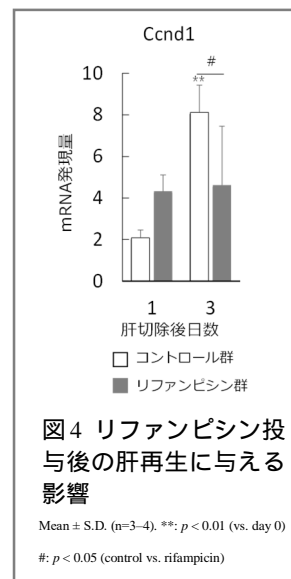


図 4 リファンピシン投与後の肝再生に与える影響

Mean ± S.D. (n=3-4). \*\*: p < 0.01 (vs. day 0)

#: p < 0.05 (control vs. rifampicin)

#### (6) リファンピシンを PH マウスに投与後の胆汁酸濃度の変動

リファンピシンを PH マウスに投与したところ、コントロール群と比較して、肝切除 1 日目から肝臓中一次胆汁酸濃度が増加した。一方、二次胆汁酸濃度は、肝切除後 3 日目において減少した (図 5)。この胆汁酸濃度変化が、(5)の結果で観察された肝切除後 1 日目で肝再生が促進され、3 日目で抑制した結果に関与している可能性が示唆された。二次胆汁酸濃度は腸内細菌によって生成されることを鑑みると、二次胆汁酸濃度の減少は、リファンピシンの抗菌剤としての作用が、マウス腸内細菌に毒性影響を与えたことが原因であると考えられた。肝再生には、二次胆汁酸や腸内細菌が産生するその他代謝物が関与している可能性もある。

一方、脂質と肝再生の関係性も報告されているが、リファンピシンは肝臓中脂質濃度を増加させる副作用を有することも知られていることから、脂質濃度の変化が(5)のような肝再生に影響を与えた可能性も考えられた。

実際、リファンピシン投与群では、コントロール群と比較して、切除後 1 日目から肝臓中トリグリセリド濃度が増加しており、今後、肝再生に影響を与える因子をさらに明らかにしていく必要がある。

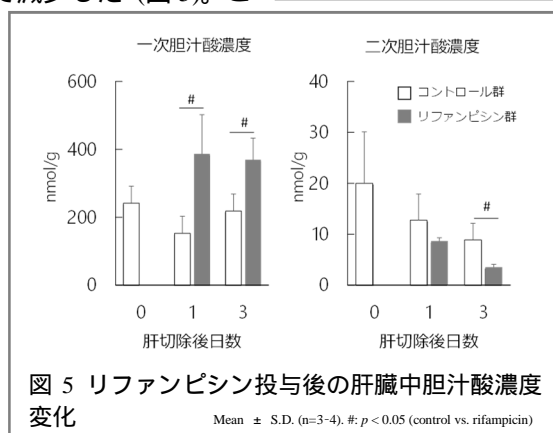


図 5 リファンピシン投与後の肝臓中胆汁酸濃度変化

Mean ± S.D. (n=3-4). #: p < 0.05 (control vs. rifampicin)

#### (7) ヒト肝細胞キメラマウスにおけるリファンピシンの影響

ヒト肝細胞キメラマウスにリファンピシンを投与したところ、細胞増殖の指標である CCNB1 の mRNA 発現がコントロール群と比較して増加しており、肝再生が促進されたことが示唆された。このことから、ヒト肝臓においても、同様の現象を引き起こす可能性が考えられた。

#### (8) まとめ

本研究より、肝切除後の肝再生過程において CYP 発現の変動が肝臓だけでなく小腸においてもみられ、臓器間連動が生じた可能性が考えられた。また、小腸だけでなく、脳における薬物代謝酵素発現への影響を示唆する可能性を示すデータも得られており、今後、肝臓と肝外組織の薬物代謝に関する臓器間連動にかかわる分子を同定していく必要がある。また、今回の結果から、胆汁酸、脂質、腸内細菌叢に影響を与える食事や薬物治療も肝再生能を促進または遅延させる可能性が示唆された。本知見は、臨床で肝切除後の薬物治療を安全に行う上で重要な知見となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 佐能 正剛	4. 巻 52
2. 論文標題 肝再生における臓器連関による薬物代謝能の変化を考慮した個別化薬物治療にむけて	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 26-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chieri Fujino, Seigo Sanoh, Yuka Tamura, Yuji Ishida, Chise Tateno, Shigeru Ohta, Yaichiro Kotake	4. 巻 2
2. 論文標題 Changes in Bile Acid Concentrations in Chimeric Mice Transplanted with Different Replacement Indexes of Human Hepatocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 29-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujino Chieri, Sanoh Seigo, Tateno Chise, Ohta Shigeru, Kotake Yaichiro	4. 巻 370
2. 論文標題 Coordinated cytochrome P450 expression in mouse liver and intestine under different dietary conditions during liver regeneration after partial hepatectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Toxicology and Applied Pharmacology	6. 最初と最後の頁 133-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.taap.2019.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐能 正剛
2. 発表標題 ヒト肝細胞キメラマウスを用いた薬物動態・肝毒性評価と今後の展望
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 掛田 雄基, 佐能 正剛, 高岡 尚輝, 森岡 晶, 立野 知世, 古武 弥一郎
2. 発表標題 ヒト肝細胞キメラマウスを用いたアミオダロン, リファンピシンの脂肪肝発症の種差解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 油野 陽香, 佐能 正剛, 大月 佑也, 藤野 智恵里, 太田 茂, 古武 弥一郎
2. 発表標題 PXRアゴニストによる肝切除後肝再生への影響
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐能 正剛
2. 発表標題 肝細胞スフェロイドやヒト肝細胞キメラマウスによる薬物動態を考慮したin vitro・in vivo肝毒性評価
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大月 佑也, 佐能 正剛, 藤野 智恵里, 太田 茂, 古武 弥一郎
2. 発表標題 マウス肝再生過程における肝外組織での薬物代謝酵素cytochrome P450の発現変動
3. 学会等名 第61回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐能 正剛
2. 発表標題 内外環境因子が肝再生や代謝能に与える影響
3. 学会等名 第2回医薬品毒性機序研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 油野 陽香, 佐能 正剛, 掛田 雄基, 藤野 智恵里, 立野 知世, 太田 茂, 古武 弥一郎
2. 発表標題 マウス肝再生能におけるリファンピシンの影響
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐能 正剛
2. 発表標題 肝再生過程における薬物代謝酵素の臓器間連携メカニズムの解明に向けて
3. 学会等名 令和元年度 内外環境応答・代謝酵素研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐能 正剛
2. 発表標題 シトクロムP450およびアルデヒド酸化酵素の生体内環境応答機序の解明
3. 学会等名 第38回生体と金属・化学物質に関する研究会(チョークトーク2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐能 正剛, 藤野 智恵里, 油野 陽香, 田村 優香, 石田 雄二, 立野 知世, 太田 茂, 古武 弥一郎
2. 発表標題 食餌成分や医薬品成分がマウス肝再生・肝機能に与える影響
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019 第27回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐能 正剛, 藤野 智恵里, 田村 優香, 菅原 豪, 吉実 康美, 柳 愛美, 石田 雄二, 立野 知世, 太田 茂, 古武 弥一郎
2. 発表標題 ヒト肝細胞キメラマウスにおける胆汁酸プロファイルと薬物性胆汁うっ滞の評価
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤野 智恵里
2. 発表標題 肝再生過程におけるシトクロムP450の発現変動と食餌成分や化学物質による肝再生への影響
3. 学会等名 平成30年度内外環境応答・代謝酵素研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujino Chieri, Sanoh Seigo, Tateno Chise, Ohta Shigeru, Kotake Yaichiro,
2. 発表標題 Characterization of variations in CYP expression during liver regeneration after partial hepatectomy in mice: possible contribution of endogeneous molecules
3. 学会等名 2018 International Meeting on 22nd MDO and 33rd JSSX (国際学会)
4. 発表年 2018年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学薬学部・広島大学大学院医系科学研究科 生体機能分子動態学研究室ホームページ  
<https://kotake-l.hiroshima-u.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古武 弥一郎 (KOTAKE Yaichiro) (20335649)	広島大学・医系科学研究科(薬)・教授  (15401)	
研究分担者	太田 茂 (OHTA Shigeru) (60160503)	広島大学・医系科学研究科(薬)・名誉教授  (15401)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	藤野 智恵里 (FUJINO Chieri)		
研究協力者	大月 佑也 (OHTSUKI Yuya)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	油野 陽香  (YUNO Haruka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関