

日本薬科大学学位論文

非アルコール性脂肪性肝疾患の病期進展による
シトクロム P450 分子種発現変動に関する研究

2024

川嶋 梓

本論文で使用した略号一覧表

CYP	シトクロム P450	Cytochrome P450
NAFLD	非アルコール性脂肪性肝疾患	Nonalcoholic fatty liver disease
NAFL	非アルコール性脂肪肝	Nonalcoholic fatty liver
NASH	非アルコール性脂肪肝炎	Nonalcoholic steatohepatitis
MCDD	メチオニン・コリン欠乏食	Methionine-choline-deficient diet
HFD	高脂肪食	High-fat diet
IR	インスリン抵抗性	Insulin resistance
VLDL	超低比重リポ蛋白	Very low density lipoprotein
CD	普通食	Control diet
HE	ヘマトキシリン・エオジン	Hematoxylin-Eosin
HCC	肝細胞癌	Hepatocellular carcinoma
CDAА	コリン欠乏食 L-アミノ酸	Choline deficient L-amino acid defined
HCD	高コレステロール食	High cholesterol diet
SREBP	ステロール調節エレメント結合タンパク質	Sterol regulatory element binding protein
PTEN	—	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
PPAR α	ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α	Peroxisome proliferator-activated receptor α
T-Cho	総コレステロール	Total-Cholesterol
TG	中性脂肪	Triglyceride
F-Cho	遊離コレステロール	Free-Cholesterol
NEFA	遊離脂肪酸	Non Esterified Fatty Acid
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ	Aspartate aminotransferase
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ	Alanine aminotransferase
Glu	グルコース	Glucose
TDM	薬物血中濃度モニタリング	Therapeutic drug monitoring
ROS	活性酸素種	Reactive oxygen species
HPLC	高速液体クロマトグラフィー	High performance liquid chromatography
NADPH	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (還元型)	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
IS	内部標準	Internal standard
12-OH LA	12-ヒドロキシラウリン酸	12-Hydroxylauric acid
LC/MS/MS	液体クロマトグラフィータンデム質量分析法または液体クロマトグラフィータンデム質量分析計	Liquid chromatography/tandem mass spectrometry
11-OH LA	11-ヒドロキシラウリン酸	11-Hydroxylauric acid
20-HETE	20-ヒドロキシエイコサテトラエン酸	20-Hydroxyeicosatetraenoic acid
OA	オレイン酸	Oleic acid
PA	パルミチン酸	Palmitic acid
ER	小胞体	Endoplasmic reticulum
IL	インターロイキン	Interleukin
TNF	腫瘍壊死因子	Tumor necrosis factor

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

- (1) Differential expression of Cytochrome P450 1A2 in simple fatty liver and steatohepatitis.

Fundamental Toxicological Sciences, **10** (6), 265-277 (2023).

Azusa Kawashima, Naoto Uramaru, Toshiyasu Mikuma, Makoto Osabe, Toshiyuki Higuchi

共著者として発表したその他の論文

- (1) Carbonic anhydrase 3 increases during liver adipogenesis even in pre-obesity, and its inhibitors reduce liver adipose accumulation. *FEBS Open Bio*, **12** (4), 827-834 (2022).

Hiroyuki Yamamoto, Naoto Uramaru, Azusa Kawashima, Toshiyuki Higuchi

- (2) Rhododendrol, a reductive metabolite of raspberry ketone, suppresses the differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes. *Molecular Medicine Reports*, **27** (2) 51 (2023).

Naoto Uramaru, Azusa Kawashima, Makoto Osabe, Toshiyuki Higuchi

目次

第1章 緒言	1
第2章 ラットにおける NAFL および NASH モデルの確立	5
第1節 序	5
第2節 体重、肝湿重量および相対肝湿重量	8
第3節 肝臓の組織像	9
第4節 血漿生化学検査値	10
第5節 肝臓脂質含量	11
第6節 考察	12
第7節 小括	13
第3章 NAFL および NASH モデルにおける CYP 分子種の発現変動の解析	14
第1節 序	14
第2節 NAFL および NASH モデルにおける CYP 分子種の mRNA およびタンパク質発現変動の解析	16
2-1 CYP1A サブファミリー分子種の発現変動の解析	16
2-2 CYP2B サブファミリー分子種の発現変動の解析	18
2-3 CYP2C サブファミリー分子種の発現変動の解析	20
2-4 CYP2D サブファミリー分子種の発現変動の解析	22
2-5 CYP2E サブファミリー分子種の発現変動の解析	24
2-6 CYP3A サブファミリー分子種の発現変動の解析	25
2-7 CYP4A サブファミリー分子種の発現変動の解析	27
第3節 考察	30
第4節 小括	32
第4章 CYP1A2 依存性薬物代謝活性の NAFL および NASH 間における反転変動	33
第1節 序	33
第2節 NAFL および NASH モデルにおける CYP1A2 活性変動の解析	34

2-1	NAFL および NASH モデルにおけるカフェイン 8-水酸化活性測定法の確立	34
2-2	NAFL および NASH モデルにおける CYP1A2 活性の比較検討	35
第3節	考察	36
第4節	小括	37
第5章	NASH における CYP4A1 依存性脂肪酸 ω 水酸化反応の亢進	38
第1節	序	38
第2節	NAFL モデルおよび NASH モデルにおける CYP4A1 の活性変動の解析	40
2-1	NAFL および NASH モデルにおけるラウリン酸 ω 水酸化活性測定法の確立	40
2-2	NAFL および NASH モデルにおける CYP4A1 活性の比較検討	42
第3節	考察	43
第4節	小括	44
第6章	脂肪酸負荷によるラット NAFL 様および NASH 様細胞における CYP1A2 発現変動	45
第1節	序	45
第2節	ラット NAFL 様および NASH 様細胞の作製	47
2-1	OA および OA+PA 負荷によるラット初代培養肝細胞における脂肪蓄積の評価	47
2-2	OA および OA+PA 負荷によるラット初代培養肝細胞における炎症状態の評価	48
第3節	NAFL 様細胞および NASH 様細胞における CYP1A2 発現レベルの変動	49
第4節	考察	50
第5節	小括	51
第7章	総括	52
	実験の部	57
	謝辞	68
	参考文献	69

第1章 緒言

医薬品（薬物）は、経口、静脈内および皮下などの経路を介して投与された後、循環血によって全身の各組織に分布して薬効を発揮する¹⁾。医薬品（薬物）は、生体外に排泄されやすい極性の高い代謝物に代謝されて薬効を失う場合と、代謝物が薬効または副作用を有する活性代謝物となる場合があることから、薬物代謝は医薬品の有効性および安全性に影響を及ぼす重要な要因の1つである²⁾。経口投与された医薬品（薬物）は、小腸で吸収され、門脈を介して肝臓に移行し、肝臓において代謝（初回通過効果）を受けるため³⁾、その薬効は肝臓を主とする薬物代謝能（初回通過効果能）に大きく左右される。肝臓は他の臓器よりも大きく、血流量が多いことから、ほとんどの医薬品（薬物）は主に肝臓で代謝される。そのため、何らかの原因によって肝臓の機能が低下すると、医薬品の代謝が変化し、想定外の薬効の増強、減弱、薬物間相互作用の発現などに繋がる可能性がある⁴⁾。事実、肝硬変患者にニフェジピン、プロプラノロールおよびアトルバスタチンなどを経口投与すると、薬物の血漿レベルが肝硬変のない患者よりも高くなる⁵⁻⁷⁾。一般に、急性の肝疾患では薬物代謝能はほとんど変化しないが、慢性化した肝硬変になると、薬物代謝能が著しく低下すると考えられている。肝機能低下が顕在化している場合、肝機能障害の程度に応じて減量や少量からの開始が添付文書で定められている医薬品がある。しかし、肝機能低下が顕在化する前段階の場合（罹患初期「未病」の場合）、薬物代謝活性に変動が起きている可能性があるにも関わらず、健常者と同様に処方されている状況である。それゆえ、肝機能低下が顕在化する以前の状態（未病段階）も含めたより詳細な代謝・体内動態を知ることが、臨床における「薬物治療の最適化」および「医薬品の適正使用」に貢献し得ると考えられる。

肝疾患が薬物の代謝・体内動態に及ぼす影響としては、一般に、肝の薬物代謝酵素活性（肝固有クリアランス）の減少、肝血流量の減少、肝細胞への薬物の取り込みの減少（トランスポーター活性の低下）、血漿における薬物タンパク結合の減少などがあげられる⁸⁾。これらの影響要因のうち、肝臓における薬物代謝（初回通過効果）に関与する酵素の活性変動は、薬物の化学形変化後の薬物の分布や排泄などの変化をもたらすため、薬物の体内運命への寄与度は大きい。肝臓には種々の薬物代謝酵素が存在するが、その中でも薬物代謝反応の中心的役割を演じているのがシトクロム P450（CYP）である。CYPは複数の分子種から成るスーパーファミリーとして存在しており、様々な医薬品、外来異物および内因性物質の酸化代謝を触媒するヘムタンパク酵素である⁹⁾。CYPは医薬品代謝の約75%に関与することから¹⁰⁾、肝臓におけるその発現/活性変動を知ることが薬物療法を行う上で重要である。肝臓におけるCYP依存性薬物代謝活性は、喫煙、飲酒、食事、服用薬（併用薬）などの外的要因のほか、人種差（動物の場合は種差、系統差）、年齢差、性差、疾患の有無、遺伝的要因などの様々な内的要因により変動

するが、これらは各種 CYP 分子種の発現レベルの多様な変動によるものである¹¹⁾。CYP 分子種の発現変動は、循環器疾患、糖尿病、肥満、炎症、感染症、肝疾患など種々の病態時において見られる¹²⁾。例えば、肝細胞癌 (Hepatocellular carcinoma ; HCC) 患者では、CYP2C9、CYP2D6、および CYP2E1 の活性が上昇する一方で、CYP1A2、CYP2C8、および CYP2C19 の活性が減少する¹³⁾。軽度または中等度の肝疾患では CYP2C19 発現が減少し¹⁴⁾、胆汁酸型の肝硬変では CYP1A2、CYP2C9 および 2E1 の発現レベルが低下する¹⁵⁾。また、肝硬変では CYP3A4 の発現レベルが低下することも報告されている¹⁶⁾。このように、肝疾患では CYP 分子種の発現低下のみならず発現上昇する場合もあることから、「薬物治療の最適化」および「医薬品の適正使用」を図る上で、CYP 分子種の発現調節に及ぼす肝疾患の種類およびそれらの病期の影響を無視することはできない。しかしながら、肝疾患の未病段階 (肝疾患症状の顕在化前) から病期進展に伴う CYP 分子種の発現変動についてはまだ不明な点が多い。

非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease ; NAFLD) は組織学的に肝細胞に脂肪の蓄積が認められる状態であり、病態がほとんど進行しない単純性脂肪肝である非アルコール性脂肪肝 (Nonalcoholic fatty liver ; NAFL) と、脂肪変性、炎症および組織損傷を合併して肝硬変や肝癌に進行する可能性のある非アルコール性脂肪肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis ; NASH) に大別される¹⁷⁾。NAFLD の有病率は肥満人口の増加に伴って増加しており、全世界における NAFLD の推定有病率 (全世界人口あたり) は、2000~2005 年で 20.13%、2006~2010 年で 23.75%、2011~2015 年で 26.80% にのぼる。また、そのうち NASH の有病率は 3~5% と推定されている¹⁸⁾。こうした NAFLD 患者の増加を背景に NAFLD を起因とした肝硬変および肝癌患者の増加が危惧される中で、NAFLD 患者の増加は世界的な問題として認識されるようになった。NAFL から NASH への進展には、酸化ストレスや炎症性サイトカインなどの二次的ストレスが加わる Two hit theory や、複数の因子が同時に関与する multiple-parallel hit hypothesis が提唱されている^{19,20)}。NAFLD の根本的な治療は確立されておらず、治療の中心は食事および運動療法による生活習慣の改善である。他方、NAFLD は肝臓におけるメタボリックシンドロームの表現型であり、その発症・進展には肥満、耐糖能異常、脂質異常症や高血圧症を合併していることから、NAFLD 患者は複数の医薬品を服用する機会が多い^{21, 22)}。それゆえ、NAFLD 患者に薬物治療を行う場合は、薬物相互作用の観点から、NAFLD (NAFL および NASH) における薬物代謝能の変化を考慮する必要がある。しかしながら、肝硬変などの重度の肝疾患時の薬物代謝・体内動態の変動については多くの情報が提供されている一方で²³⁻²⁵⁾、NAFLD、特に比較的軽症の NAFL における薬物代謝活性の変動に関する知見は少なく^{26,27)}、CYP 分子種の発現/活性の変動について NAFL および NASH を同時に比較検討した研究知見も乏しい²⁸⁻³¹⁾。従って、NAFLD (NAFL および NASH) に

における薬物代謝・体内動態の変化を解明することは、「薬物治療の最適化」および「医薬品の適正使用」を図る上で重要であると考えられる。

脂肪肝動物モデル研究において、炎症/組織損傷を伴わない単純性脂肪肝および炎症/組織損傷を伴う脂肪肝モデルの CYP の発現/活性レベルが変化することが実証されている。メチオニン・コリン欠乏食 (Methionine-choline-deficient diet; MCDD) の摂餌は、ラットの肝臓に脂肪蓄積と炎症/組織損傷を生じ (NASH モデル)、CYP2B1 および CYP2E1 の発現を普通食摂餌ラットに比べて顕著に低下させた^{28, 32)}。MCDD 誘発 NASH モデルマウスの肝臓においても同様に、複数の CYP 酵素活性が普通食摂餌マウスよりも低かった³³⁾。さらに、NASH モデルは四塩化炭素およびアセトアミノフェンによる肝障害の場合と同様にほとんどの CYP 分子種の発現を低下させるようである^{34, 35)}。一方、高脂肪高スクロース食をマウスに短期間 (4 週間) 与えると、炎症のない単純性脂肪肝が生成され (NAFL モデル)、肝臓における CYP1a1、1a2、2b10、および 2c29 の発現増加と、CYP3a11 の発現減少が認められている²⁶⁾。これらの NAFL における CYP 分子種の発現変化は、多くの CYP 分子種の発現低下が見られた MCDD 摂餌による変化とは異なるようである。この NAFL モデルと NASH モデルにおける CYP 分子種発現挙動の差異は、炎症の有無による可能性が考えられる。しかしながら、肝疾患症状が顕在化前 (未病段階) の NAFL における CYP 分子種の発現変動に関する情報は少なく^{26, 27)}、また、NAFLD の病期進展による CYP 分子種発現/活性の変動に着目して、NAFL および NASH における CYP 分子種の発現/活性を同時に比較検討した研究も乏しい²⁸⁻³¹⁾。さらに、病態程度の異なる脂肪肝/脂肪肝モデルを同時に作製し、単純性脂肪肝および脂肪肝における複数の CYP 分子種の発現変動を網羅的に比較検討した研究は見当たらない。

そこで本研究は、炎症を伴わない単純性脂肪肝 (NAFL) モデルと炎症を伴う脂肪肝 (NASH) モデルを同時に作製し、両モデル間における CYP 発現調節に関する差異を明確にすることを目的とした。以下、第 2 章では、炎症/組織損傷のない脂肪肝モデル (NAFL モデル) および炎症/組織損傷のある脂肪肝モデル (NASH モデル) を作製し、第 3 章では、NAFL および NASH モデルにおける主要な CYP 分子種の発現変動を比較検討した。また、第 4 章では NAFL および NASH モデル間で相反する発現レベルを示した CYP 1A2 の発現変動 (NAFL で発現上昇、NASH で発現低下) がその活性の変動に反映されるのか否かを明らかにするために、カフェイン 8-水酸化活性を指標として CYP1A2 依存性薬物代謝能 (活性) を評価した。さらに、第 5 章では、NASH モデルにおいて発現増加を示した CYP4A1 の発現変動がその活性の変動に反映されるか否かを明らかにするために、ラウリン酸 ω 水酸化活性を指標として CYP4A1 活性を評価した。さらに、第 6 章では CYP1A2 で認められた NAFL および NASH モデル間における反転発現現象のメカニズムを分子レベルで解明するために必要な *in vitro* 細胞実験系の

確立を目的として、ラット初代培養肝細胞への脂肪酸負荷誘導により NAFL 様および NASH 様細胞を作製し、CYP1A2 発現レベルを比較検討した。第 7 章では、これらの知見を総括した。

第2章 ラットにおける NAFL および NASH モデルの確立

第1節 序

NAFLD は、病期によって病理組織学的あるいは病態生理学的に異なる特徴を示すことから、表現型や病態の異なる様々な動物モデルが開発されている^{36,37)}。NAFLD 動物モデルは、栄養組成が様々な調製された飼料を動物に与えて作製する摂餌誘発モデル、脂質代謝に関与する遺伝子を人為的に変化させて作製する遺伝子編集モデルおよび化学物質の投与により酸化ストレスや DNA 変異を引き起こして肝損傷を誘発する化学物質誘発モデルの3つに大別され、それぞれ単独あるいは組み合わせることにより、様々な表現型や病態に対応した動物モデルを作製することができる³⁸⁾。これまでに報告されている多種多様な NAFLD 動物モデルの特徴を Table 1 に示す。

高脂肪食(High-fat diet; HFD) 誘発動物モデルは、45-75%の脂質含量に調製された飼料を動物に摂餌させることによって作製するモデルがよく知られている³⁹⁾。HFD を動物に摂餌させると、門脈を介して肝臓に遊離脂肪酸が流入し、中性脂肪 (Triglyceride; TG) として肝細胞に蓄積される⁴⁰⁾。HFD 誘発動物モデルの特徴は、ヒト NAFLD の病態生理学的特徴である肥満やインスリン抵抗性 (Insulin resistance; IR) を引き起こす点にある³⁸⁾。従って、HFD 誘発動物モデルはヒトにおける NAFLD に近い特徴を持つ動物モデルであると考えられる。しかし、HFD 誘発動物モデルは、げっ歯類の種・系統、摂餌の脂肪組成と含有量および摂餌期間などによって脂肪変性、炎症、線維症の重症度が異なる。ラットへの摂餌期間に着目すると、4週間の HFD 摂餌は炎症/組織損傷 (血漿 AST/ALT の上昇) を伴わない脂肪肝を引き起こすことが示されている⁴¹⁾。それゆえ、ヒト NAFL に近いラット NAFL モデルを作製するには、HFD の摂餌期間を比較的短期間の4週間程度に設定することが望ましいと考えられた。

一方、HFD 摂餌によって炎症/組織損傷を伴う脂肪肝 (NASH) モデルを作製することも可能である。すなわち、HFD の8週間以上の継続的な摂餌は NASH を誘発する^{42,43)}。しかしながら、一般にラット肝における薬物代謝酵素活性は年齢 (週齢) とともに低下する⁴⁴⁾。本研究の目的は NAFL および NASH モデルにおける CYP 分子種の発現レベルを同時に比較することであるため、4週間程度の HFD 摂餌により作製できる NAFL モデルと同じ摂餌期間で NASH モデルを作製できる摂餌条件を検討した。

MCDD 誘発動物モデルは、IR を示さず、体重減少を引き起こす点ではヒト NASH と病態が異なるものの、比較的短期間で明確な NASH 病態を示すために、広く研究に使用されている³⁸⁾。MCDD を動物に摂餌させると、肝臓から超低比重リポ蛋白 (VLDL) を分泌させるために必要なホスファチジルコリンの合成障害が起こり、肝臓からの TG 排泄が抑制されて脂肪肝を形成するとともに、肝臓における酸化ストレスを介して、肝細胞死、炎症および線維化を誘導する⁴⁵⁾。それゆえ、MCDD 誘発動物モデル

は、ヒト NASH における炎症と線維化のメカニズムをより適切に反映するモデルであるといえる。ラットへの比較的短期間である 2 週間または 4 週間の MCDD 摂餌は、肝細胞における脂肪蓄積および炎症を引き起こすことが示唆されている^{46, 47)}。以上より、MCDD 摂餌は HFD 摂餌誘発 NAFL モデルと同じ摂餌期間で NASH モデルの作製が可能であると考えられる。

そこで本章では、炎症/組織損傷を伴わない単純性脂肪肝モデル (NAFL モデル) と炎症/組織損傷を伴う脂肪肝モデル (NASH モデル) を同時に作製することを目的として、普通食 (Control diet; CD)、HFD、MCDD を 6 週齢の雄性 Wistar 系ラットに 4 週間摂餌させた後、CD、HFD および MCDD 群における肝湿重量、血漿生化学検査値および肝臓脂質含量を測定した。また、Oil Red O 染色および Hematoxylin-Eosin (HE) 染色により脂肪滴蓄積の程度を、Azan-Mallory 染色により肝組織の線維化の程度を比較評価した。

Table 1 Characteristics of NAFLD animal models.

食餌誘発モデル	肥満	IR	脂肪症	NASH	線維症	HCC	特徴
メチオニン・コリン欠乏食 (MCDD)	無	無	有	有	有	無	総エネルギーの 40%および 10%がスクロースおよび脂肪由来で、メチオニンとコリンが欠乏した飼料であり、一般的に NASH モデルとして使用されている動物モデルの一つである。比較的短期間でヒト NASH の組織学的表現型を再現するが、IR を示さず、体重減少を引き起こす点でヒト NAFLD とは大きく異なる ⁴⁹ 。
コリン欠乏食 L-アミノ酸食 (CDAA)	有	無	有	有	有	有	タンパク成分をアミノ酸で置換したコリン欠乏飼料であり、重篤な NASH 病態を示すが、MCDD よりも時間を要する。体重増加や IR を示さないことからヒト NAFLD とは大きく異なる ⁴⁹ 。
高コレステロール食 (HCD)	有	無	有	有	有	無	総カロリーの 1% がコレステロールに由来する飼料であり、単独摂餌では、NASH を引き起こすには不十分である ⁴⁹ 。
高脂肪食 (HFD)	有	有	有	有	有	無	総カロリーの 45-75% が脂肪由来の飼料である。げっ歯類の系統、飼料中の脂肪含有量、脂肪組成および摂餌期間によって脂肪変性、炎症、線維症の程度が異なる ⁵⁰ 。ヒト NASH と類似した NASH 病態を示すが、病理学的帰帰がそれほど深刻ではないため、研究での使用は制限される ⁴⁹ 。
高フルクトース食	無	有	有	無/有	無	-	単独摂餌では、NASH 病態を引き起こさないが、HFD との併用により NASH 病態を引き起こす ^{37,49} 。
アテローム生成食	無	無	有	有	有	-	飼料中に 1.25%コレステロールおよび 0.5%コール酸 を含有し、6 週間で脂肪変性および炎症が生じ、24 週間後に肝細胞のバレーニングおよび線維症を誘発する。体重増加および IR を誘発しない点でヒト NAFLD とは大きく異なる ^{38,49} 。
遺伝子編集モデル	肥満	IR	脂肪症	NASH	線維症	HCC	特徴
レプチン欠損 ob/ob マウス	有	有	有	無	無	無	肝臓の脂肪変性を示すが、NASH に特徴的な病態である肝線維化は示さない ³⁷ 。
レプチン受容体欠損 db/db マウス	有	有	有	無	無	無	食欲が異常に増加し、肥満、高血糖、高インスリン血症、IR および脂肪肝を発症するが、肝線維化は示さない ³⁷ 。
foz/foz マウス	有	有	有	有	有	無	食餌誘発性の NAFL から NASH への移行の影響は系統によって異なる ³⁹ 。
SREBP-1c トランスジェニックマウス	無	有	有	有	有	有	脂肪分化の障害に続発して重度の IR と糖尿病を発症する ³⁷ 。この脂肪組織で SREBP-1c を強制発現させたトランスジェニックマウスでは、標準的な食事を与えると 20 週で脂肪変性、炎症、線維症を引き起こす ⁵¹ 。ヒト NAFLD では内臓脂肪が増加するが、この SREBP-1c トランスジェニックマウスでは減少するため、ヒト NAFLD とは病態が異なる ^{37,52} 。
KK-A ^y マウス	有	有	有	無	無	-	肥満および IR と関連して脂肪肝を発症するが、重大な脂肪性肝炎は発症しない ³⁷ 。
PTEN 欠損マウス	無	無	有	有	有	有	広範な肝腫大および脂肪性肝炎を示し、ヒト NASH の組織病理診断と類似する特徴を有する ⁵³ 。
PPAR α 欠損マウス	無	無	有	無	無	-	通常の給餌条件下では、脂肪症は示さないが、飢餓状態条件下では、脂肪症を示す ⁵⁴ 。
AOX 欠損マウス	無	無	有	有	無	有	生後 7 日目で肝細胞の微小泡性脂肪変化を示し始め、生後 30 日までに肝実質細胞の脂肪変性の重症度が増加し、局所的な炎症細胞浸潤の同時発生を示し ⁵⁵ 、生後 15 カ月までに肝細胞腫瘍と HCC を発症する ⁵⁶ 。
MAT-1A 欠損マウス	無	無	有	有	有	有	生後 8 カ月後に脂肪性肝炎を自然発症し、肝細胞が増殖し、腫瘍の発生を引き起こす ³⁷ 。
化学物質誘発モデル	/						化学物質単独投与では、NAFLD 病態を示さないが、他のモデルと組み合わせることで様々な NAFLD モデルを作製することができる。代表的な化学物質としてストレプトゾシン、四塩化炭素、チオアセトアミド、ジエチルニトロソアミンがある ⁵⁷ 。

Insulin resistance, IR; Nonalcoholic steatohepatitis, NASH; Hepatocellular carcinoma, HCC; sterol regulatory element binding protein, SREBP; Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN; Peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α ; Acyl-coenzyme A oxidase, AOX; Methionine adenosyltransferase, MAT

第2節 体重、肝湿重量および相対肝湿重量

各飼料の詳細な栄養組成を Table 2 に示す。CD、HFD、または MCDD を4週間摂餌したラットの体重、肝湿重量および相対肝湿重量（肝湿重量/体重%）を Table 3 に示す。4週間後の HFD 摂餌ラット（HFD 群）の体重は、CD 摂餌ラット（CD 群）よりも有意に増加した。一方、MCDD 摂餌ラット（MCDD 群）の体重は、CD 群よりも有意に減少した。この結果は、MCDD がエネルギー代謝とエネルギー消費を促進することにより、体重を減少させるという以前の報告と一致している⁵⁸⁾。また、体重に対する肝湿重量（相対肝湿重量（肝湿重量/体重%））を算出したところ、HFD 群の相対肝湿重量は CD 群と差が認められなかったのに対して、MCDD 群の相対肝湿重量は CD 群より 1.7 倍増加した。このことは、4週間の MCDD 摂餌が肝肥大を呈することを示唆している。これらの結果は、Kirsch ら⁵⁹⁾の報告と類似している。

Table 2 Composition of experimental Diets.

Energy composition (gm%)	CD	HFD	MCDD
Carbohydrate	67.3	26.0	65.9
Protein	19.2	26.0	17.0
Fat	4.3	35.0	9.9
Calorie (kcal%)			
Carbohydrate	20	20	16
Protein	70	20	63
Fat	10	60	21
Calorie (kcal/g)	3.85	5.24	4.21

Table 3 Body weights, liver weights, and relative liver weights in the liver of CD-, HFD-, or MCDD-fed to rats for 4 weeks.

	CD	HFD	MCDD
Body weights (g)	243.1±7.01	259.4±3.63*	88.8±6.07*
Liver weights (g)	7.75±0.79	7.46±0.28	4.70±0.27*
Relative liver weights (Liver weights/Body weights %)	3.19±0.37	2.88±0.11	5.29±0.39*

Male Wistar rats were fed the CD, HFD, or MCDD for 4 weeks. During the experimental period, body weights were measured once a week. Liver weights were measured 4 weeks after the initiation of the experimental diets. Data are presented as mean ± standard deviation (SD), n = 6 in each group. **p* < 0.05 vs. control.

第3節 肝臓の組織像

CD、HFD、および MCDD を4週間摂餌したラットの肝臓組織像を Fig. 1 に示す。HFD および MCDD 群の肝臓は、CD 群の肝臓よりも見かけ上大きく、脂肪肝特有の白みを帯びた色調を呈していた。細胞内脂肪滴を赤色に染色する Oil Red O 染色では、HFD および MCDD 群の両群の肝臓において顕著な脂肪の蓄積が認められた。また、HE 染色では、MCDD 群において大脂肪滴の特徴である顕著なバルーニングが観察されたのに対して、HFD 群においては MCDD 群よりも小脂肪滴として観察された。さらに、細胞の線維化部分を青紫色に染色する Azan-Mallory 染色は、MCDD 群においてのみ肝組織の顕著な線維化像を示した。

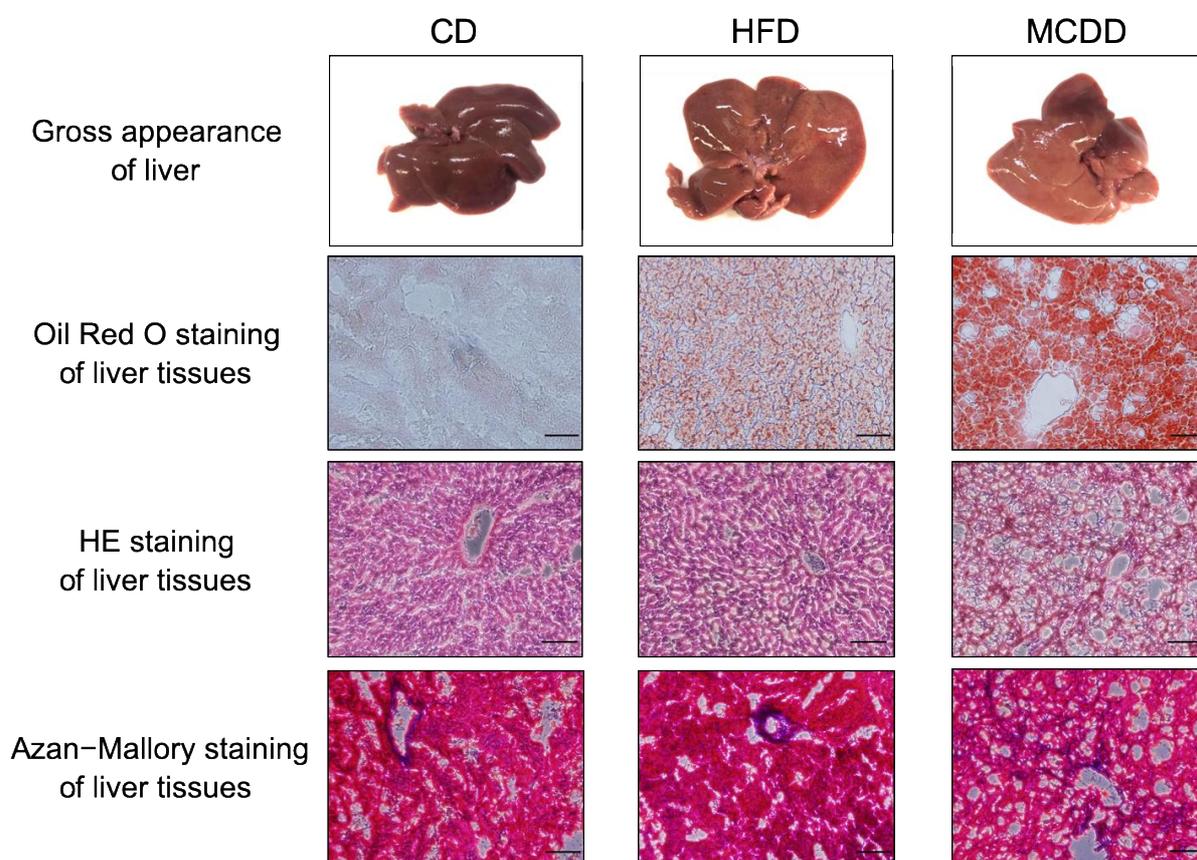


Fig. 1 Gross and microscopic findings in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks. Representative images of gross appearance of liver, Oil Red O staining, HE staining and Azan-Mallory staining of liver tissues from CD-, HFD-, or MCDD-fed rats. (Magnification of staining images: 100×, scale bars: 100 μm).

第4節 血漿生化学検査値

CD、HFD、および MCDD を4週間摂餌したラットにおける血漿脂質、血糖、肝機能への影響を評価するために、血漿中の総コレステロール (Total-Cholesterol ; T-Cho)、TG、遊離コレステロール (Free-Cholesterol ; F-Cho)、遊離脂肪酸 (Non Esterified Fatty Acid ; NEFA)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (Aspartate aminotransferase ; AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (Alanine aminotransferase ; ALT)、および グルコース (Glucose ; Glu) の各濃度を測定した (Table 4)。HFD 群の血漿中における T-Cho、TG、および F-Cho 濃度はそれぞれ CD 群の 63.9%、42.4%、および 49.6% まで減少した。MCDD 群では、TG、F-Cho、および Glu 濃度が CD 群のそれぞれ 19.4%、66.4%、および 54.7%まで減少した。また、肝組織損傷マーカーである血漿 AST および ALT 濃度をみると、HFD 群における血漿 AST および ALT 濃度は CD 群のそれらと比較して変化が認められなかったが、MCDD 群の血漿 AST および ALT 濃度は、それぞれ CD 群の 211% と 268%まで上昇した。これらのことから、MCDD 群では肝組織損傷を起こしていることが示唆された。

Table 4 Plasma biomarker levels in the liver of CD-, HFD-, or MCDD-fed to rats for 4 weeks.

	CD	HFD	MCDD
T-Cho (mg/dL)	75.4±12.5	48.2±3.1*	65.9±12.3
TG (mg/dL)	127.8±26.5	54.2±3.3*	24.8±3.5*
F-Cho (mg/dL)	11.9±1.3	5.9±0.6*	7.9±1.1*
NEFA (mEq/L)	0.95±0.16	0.96±0.27	0.90±0.14
AST (Karmen)	78.1±23.2	130.1±59.5	164.9±20.6*
ALT (Karmen)	10.4±0.9	10.4±1.2	27.9±4.7*
Glu (mg/dL)	119.3±19.5	127.8±7.1	65.2±3.9*

Male Wistar rats were fed the CD, HFD, or MCDD for 4weeks. T-Cho, TG, F-Cho, NEFA, AST, ALT, and Glu levels of plasma were measured 4 weeks after initiation of the experimental diets. Data are presented as mean ± standard deviation (SD), n = 6 in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

第5節 肝臓脂質含量

CD、HFD、および MCDD を4週間摂餌したラット肝における脂肪蓄積の程度を評価するために、肝臓の脂質含量を測定した (Fig. 2)。NEFA、T-Cho および F-Cho は、MCDD 群でのみ有意に上昇した。一方、TG は、HFD および MCDD 群の両群で上昇し、肝臓への脂肪蓄積が認められた。肝臓への TG の蓄積は、CD 群と比較して HFD 群では 2.1 倍に、MCDD 群では 35 倍に増加し、MCDD 群でより顕著な脂肪の蓄積を認めた。

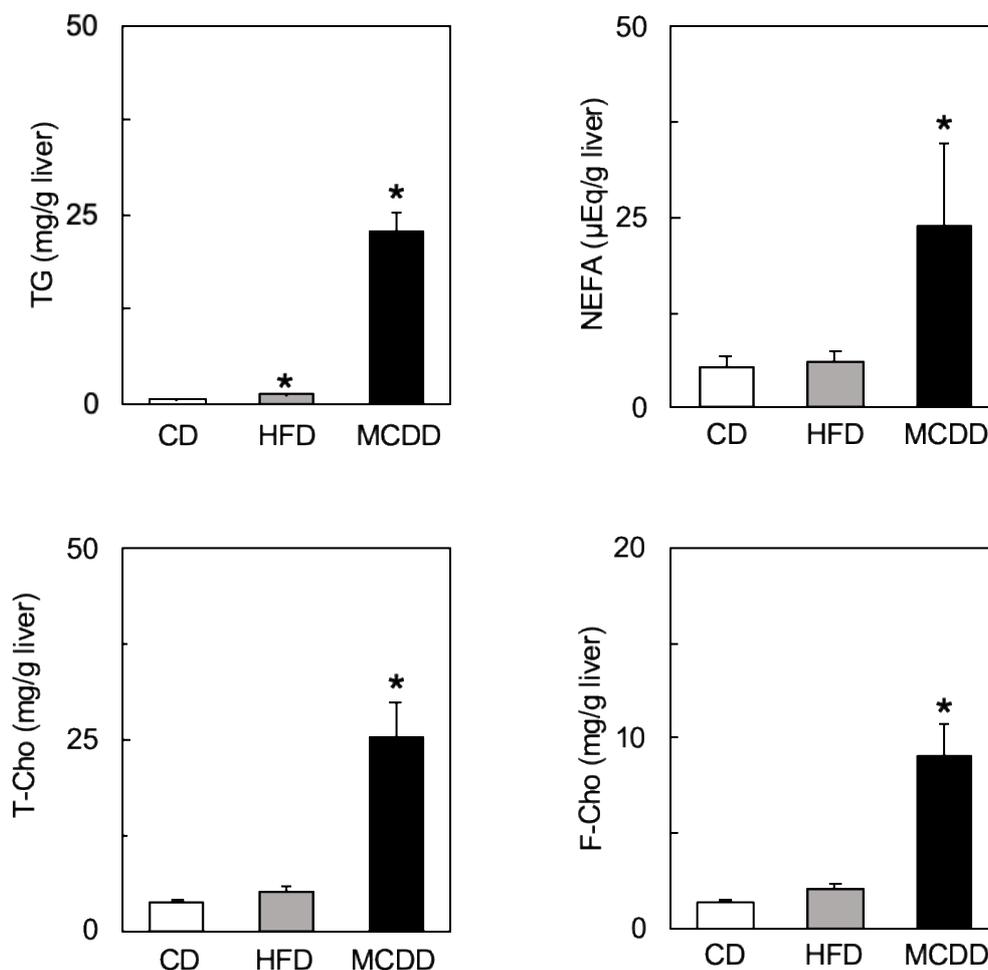


Fig. 2 Hepatic Lipid Contents in the liver of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks. After feeding the rats with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, the lipids in the livers were extracted, and the TG, NEFA, T-Cho, and F-Cho contents were measured using enzymatic methods. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

第6節 考察

本研究の目的である NAFL および NASH モデルにおける CYP 分子種の発現レベルを同時に比較する前段階の研究として、NAFL モデルおよび NASH モデルの同時作製に着手した。これまでに、比較的短期間である 4 週間のラットへの HFD 摂餌により NAFL モデルが作製できること、HFD 摂餌により NASH モデルを作製するにはより長期の摂餌が必要であること、および 2~4 週間のラットへの MCDD 摂餌により NASH モデルを作製できることが報告されている^{41-43, 46, 47)}。そこで本章では、比較的短期間の 4 週間の摂餌期間として、HFD 摂餌により NAFL モデルを、MCDD 摂餌により NASH モデルを作製することを試みた。

一般に、ヒトにおいて脂質代謝関連の検査は血液中の脂質関連マーカーで評価されている。ラットに HFD および MCDD を 4 週間摂餌後の脂質関連マーカー濃度を CD 群と比較したところ、HFD 群の血漿 T-Cho、TG、および F-Cho 濃度、ならびに MCDD 群の血漿 TG および F-Cho 濃度などの脂質代謝関連マーカーの減少がみられた (Table 4)。これらの結果は、ヒトにおいて脂肪肝を併発する脂質代謝異常症で一般的にみられる検査値とは逆の結果であった。一般に、HFD 誘発動物モデルでは、ヒト NAFLD と同様に血中 TG の増加を引き起こすことが知られている⁶⁰⁾。しかし、脂質代謝異常症を引き起こすには、より長期間の投与が必要であることも指摘されている³⁸⁾。それゆえ、4 週間の HFD 摂餌ラットにおいては、脂質代謝異常症には至らないモデルであると考えられる。4 週間の MCDD 群もまた血漿 TG が低下した。このことはいくつかの既報とよく一致する結果であるが、MCDD 摂餌による血漿 TG の低下の機序は不明である^{47, 61)}。

ラットへの 4 週間の HFD および MCDD 摂餌は、いずれも肝臓における TG 量を増加させ、特に MCDD 群における脂肪蓄積は顕著であった (Fig. 2)。これらの HFD および MCDD 群の肝臓における脂肪蓄積の程度の違いは、Oil Red O および HE 染色像においても同様に認められ、特に MCDD 群では大脂肪滴の特徴であるバルーニングの形成が顕著であった (Fig. 1)。肝組織損傷マーカーである血漿 AST および ALT 濃度を調べた結果、MCDD 群でのみ血漿 AST および ALT 濃度の増加が認められたことから、MCDD 群における肝臓では炎症/組織損傷があり、HFD 群ではそれが無い状態であることが示唆された (Table 4)。この MCDD 群における組織損傷は Azan-Mallory 染色によって MCDD 群においてのみ肝組織の顕著な線維化像が認められたことにより裏付けられた (Fig. 1)。これらの結果から、4 週間の HFD 摂餌は炎症/組織損傷を伴わない脂肪の蓄積による脂肪肝モデル (NAFL モデル) および 4 週間の MCDD 摂餌は脂肪の蓄積と組織線維化を惹起した病態モデル (NASH モデル) といえるものと判断された。

第7節 小括

本章では、比較的短期間である4週間のラットへのHFD摂餌およびMCDD摂餌によりNAFLモデルおよびNASHモデルの同時作製を試みた。

4週間のラットへのHFD摂餌では、肝臓中のTG量の増加に加えて、肝組織のOil Red O染色でCD摂餌ラットよりも強く染色されたが、HE染色では明瞭なブルーニングはなく、MCDD摂餌ラットよりも小さい脂肪滴に留まっていた。このことから、4週間のラットへのHFD摂餌は、初期の単純性脂肪肝（NAFL）を表現しているものと考えられた。また、肝組織損傷マーカーである血漿ASTおよびALT濃度、ならびに線維化の評価を目的としたAzan-Mallory染色においては有意な変化を認めなかったことから、炎症/組織損傷および線維化は呈していないものと考えられた。

4週間のラットへのMCDD摂餌では、肝臓におけるTG量の顕著な増加を認め、肝組織のOil Red O染色でHFD摂餌ラットよりも強く染色され、HE染色においては大脂肪滴の特徴である顕著なブルーニングが観察された。さらに、血漿ASTおよびALT濃度が増加し、Azan-Mallory染色で線維化像が観察されたことから、MCDD摂餌ラットは、脂肪蓄積に加えて、炎症から生じる組織線維化が形成されており、炎症/組織損傷および線維化などの病態生理学的特性からヒトにおけるNASHに類似していることが示唆された。

以上より、比較的短期間である4週間のラットへのHFD摂餌は、炎症/組織損傷を伴わない単純性脂肪肝（NAFL）を形成させること、および4週間のラットへのMCDD摂餌は、炎症/組織損傷を伴う脂肪肝炎（NASH）を形成させることが示唆された。従って、本研究では、HFD群およびMCDD群を、それぞれNAFLモデルおよびNASHモデルとして、これらのモデルを以降の研究に供した。

第3章 NAFL および NASH モデルにおける CYP 分子種の発現変動の解析

第1節 序

CYP は、薬物代謝の第一相反応を担う主要な薬物代謝酵素であり、医薬品代謝の約 75% に関与する¹⁰⁾。CYP によって触媒される薬物代謝は、生体内に投与された医薬品の排泄の促進や活性代謝物に変換するなど、医薬品の有効性や安全性において重要な役割を果たすことから、その発現/活性の変動を明らかにすることは、「薬物治療の最適化」を実現する上で重要である。近年、肝機能障害時の薬物代謝・動態の変動については多くの情報が提供されている²³⁻²⁵⁾。しかしながら、NAFLD、特に NAFL における薬物代謝能変動に関する知見は少なく^{26,27)}、NAFLD の病期進展による CYP 分子種発現/活性の変動に着目して NAFL および NASH における CYP 分子種の発現/活性を同時に比較検討した研究知見も乏しい²⁸⁻³¹⁾。さらに、病態程度の異なる脂肪肝/脂肪肝モデルを同時に作製し、単純性脂肪肝および脂肪肝における複数の CYP 分子種の発現変動を網羅的に比較検討した研究は見当たらない。

ヒトにおける CYP 分子種は 57 種存在し、その配列の類似性に基ついて 18 ファミリーおよび 43 サブファミリーに分類される¹⁰⁾。これらの CYP ファミリーのうち、CYP 1、2 および 3 の 3 つのファミリーが臨床で使用される医薬品の約 80% の代謝に関与している⁶²⁾。なかでも、CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1、3A4 および 3A5 は、特に医薬品代謝寄与に占める割合が高い (Fig. 3)¹¹⁾。また、CYP4 ファミリーは、医薬品代謝における貢献度は少ないものの、NAFLD の病態形成および進展と密接に関わりのある脂肪酸の代謝を触媒する¹⁰⁾。そこで本章では、ラット NAFL および NASH モデルにおける CYP 分子種の発現変動の差異を明らかにすることを目的として、薬物代謝への寄与度が高い CYP1、2、3 および薬物代謝に加えて脂肪酸代謝にも関与する CYP4A サブファミリーに着目した。

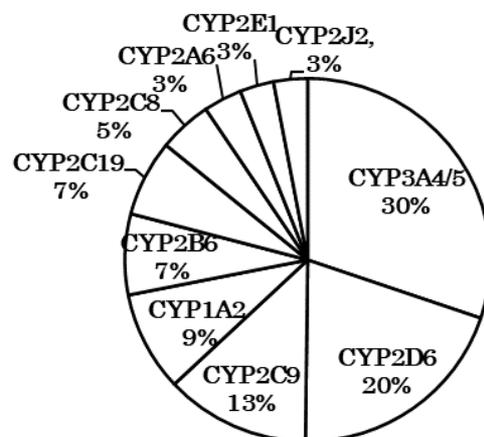


Fig. 3 Fraction of clinically used drugs metabolized by P450 isoforms.

CYP はヒト以外にも、微生物から植物、動物に至るまで多くの生物に存在し、その基質特異性や発現には種差、系統差、性差などが認められる⁶³⁾。CYP1 から 4 のファミリーに属するヒト、マウスおよびラットの主要な CYP 分子種を Table 5 に示す。本章では、CYP1、2、3 および 4 のファミリーの中から、薬物代謝および脂質代謝に関わる代表的なラット CYP 分子種として CYP1A1、1A2、2B1、2C6、2C11、2D1、2D2、2E1、3A1 および 4A1 を取り上げ、それらの mRNA レベルを定量的 real-time PCR にて評価した。さらに、興味深い挙動を示した分子種 (CYP1A1、1A2、2C6、2D1、3A1 および 4A1) のタンパク質発現レベルを Western blotting にて比較検討した。

Table 5 CYP enzymes of the major drug-metabolising CYP family in human, mouse and rat.

Family	Subfamily	Human	Mouse	Rat
CYP1	A	1A1, 1A2	1a1, 1a2	1A1, 1A2
	B	1B1	1b1	1B1
CYP2	A	2A6, 2A7, 2A13	2a4, 2a5, 2a12, 2a22	2A1, 2A2, 2A3
	B	2B6, 2B7	2b9, 2b10	2B1, 2B2, 2B3
	C	2C8, 2C9, 2C18, 2C19	2c29, 2c37, 2c38, 2c39, 2c40, 2c44, 2c50, 2c54, 2c55	2C6, 2C7*, 2C11*, 2C12*, 2C13*, 2C22, 2C23
	D	2D6, 2D7, 2D8	2d9, 2d10, 2d11, 2d12, 2d13, 2d22, 2d26, 2d34, 2d40	2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18
	E	2E1	2e1	2E1
CYP3	A	3A4, 3A5, 3A7, 3A43	3a11, 3a13, 3a16, 3a25, 3a41, 3a44	3A1, 3A2*, 3A9*, 3A18*, 3A23, 3A62
CYP4	A	4A11, 4A22	4a10, 4a12a*, 4a12b*, 4a14*	4A1, 4A2, 4A3, 4A8

*gender differences

第2節 NAFL および NASH モデルにおける CYP 分子種の mRNA およびタンパク質発現変動の解析

2-1 CYP1A サブファミリー分子種の発現変動の解析

CYP1A サブファミリーは、ヒトおよびラットにおいて CYP1A1 と CYP1A2 の2つの分子種が存在し、ヒトとラット間におけるアミノ酸配列の相同性は80%以上と高い⁶³⁾。CYP1A1 と CYP1A2 のアミノ酸配列は類似しているが、基質特異性や分布臓器が異なる。CYP1A1 は、肝臓での発現量は少なく、小腸、肺、胎盤、腎臓など様々な臓器に分布する肝外酵素である⁶⁴⁾。主としてベンゾ[a]ピレンなどの多環芳香族炭化水素の代謝および代謝活性化に関与するが、ペロスピロン、リオシグアト、グラニセトロンなどの医薬品代謝にも関わっている^{65, 66)}。一方、CYP1A2 は、主に肝臓に発現し、芳香族アミン類、芳香族ニトロ化合物、複素環式アミン類、ニトロソアミン類、マイコトキシンなどの外因性物質や、エストロゲンのような内因性物質の代謝⁶⁷⁾ や中枢神経興奮薬カフェイン、筋萎縮性側索硬化症治療薬リルゾール、薬物血中濃度モニタリング (Therapeutic drug monitoring; TDM) 対象医薬品である気管支拡張薬テオフィリンおよび抗精神病薬クロザピンなどの代謝に関与しており⁶⁸⁾、临床上重要な医薬品の代謝の約4%に関与することが知られている⁶⁹⁾。そこで、ラット NAFL および NASH モデルにおける CYP1A1 および 1A2 の発現量 (mRNA およびタンパク質量) を比較検討した。

CD、HFD、または MCDD を4週間摂餌したラットの肝ミクロソームにおける *CYP1A1* mRNA 量を調べた結果、*CYP1A1* mRNA 量は、HFD 群 (NAFL モデル) では変化しなかったのに対して、MCDD 群 (NASH モデル) において顕著に増加した (Fig. 4)。また、CYP1A1 タンパク質量もまた同様であった (Fig. 5)。これらのことから、CYP1A1 発現量は NAFLD の初期においては変化せず、病期進展状態 (炎症や組織損傷状態) において増加することが示唆された。これまでに、CYP1A1 の発現量は高脂肪高スクロース食負荷マウス肝およびラット肝硬変モデルにおいて変化しないことが報告されている^{26, 70)}。このことから推察すると、4週間の HFD 摂餌 NAFL モデルの病期は高脂肪高スクロース食負荷マウス肝に近いかもしれない。一方、MCDD 摂餌 NASH モデルにおける CYP1A1 発現量はラット肝硬変モデルのそれとは逆に増加した (Fig. 4, 5)。このことは4週間の MCDD 摂餌 NASH モデルの病期が肝硬変にまで進んでいないことおよび肝硬変前ステージの肝において CYP1A1 の発現が増加する時期がある可能性を示唆している。

CD、HFD、または MCDD を4週間摂餌したラットの肝ミクロソームにおける *CYP1A2* mRNA 量は、CD 群と比較して NAFL モデルにおいて1.4倍に増加し、NASH モデルは CD 群の0.3倍にまで減少した (Fig. 4)。これらの mRNA 量の変動はタンパク質量の変化と同様であった (Fig. 5)。CYP1A2 の

発現量については、ラット肝硬変モデルやヒトの肝疾患（肝硬変、HCC、C型肝炎など）において減少することが先行研究において報告されており^{13,70-73}、肝臓における CYP1A2 の発現量は肝疾患や NAFLD において減少するものと想定されている。興味深いことに、HFD 摂餌 NAFL モデル(HFD 群)において CYP1A2 の発現は CD 群よりも増加し(Fig. 4, 5)、MCDD 摂餌 NASH モデルでは逆に、CYP1A2 の発現量は CD 群よりも著しく減少した(Fig. 4, 5)。MCDD 群 (NASH モデル) における CYP1A2 の発現低下は、これまでの報告と一致していたが⁷⁴、NAFL モデルにおいて CYP1A2 の発現量が増加するとの報告はなく、本研究において初めて示唆された。この先行研究との差異は、本研究で作製された NAFL モデルの方が既報の NAFL モデルよりも肝疾患の未病段階(肝疾患症状の顕在化前)に近い状態を表現していることによるものかもしれない。

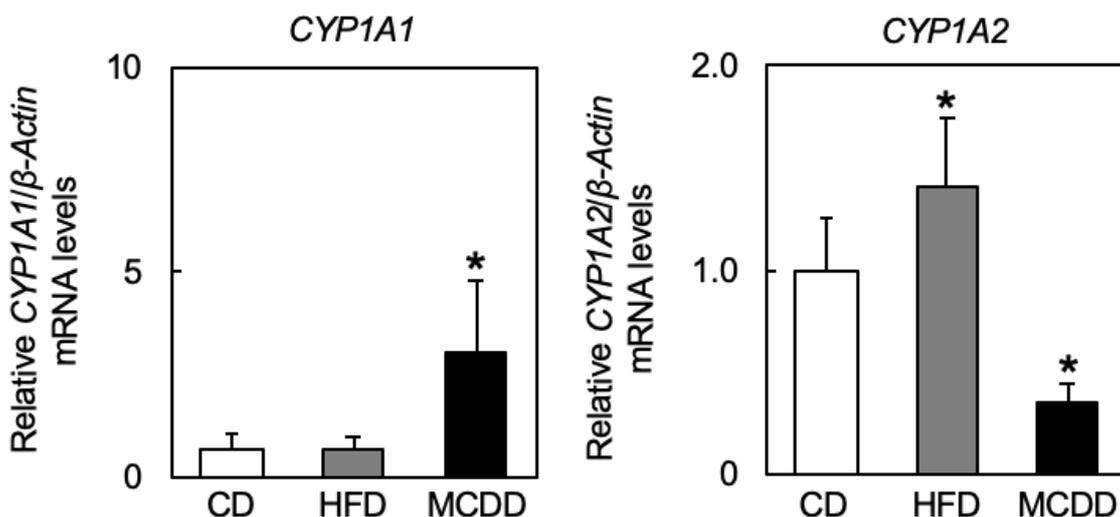
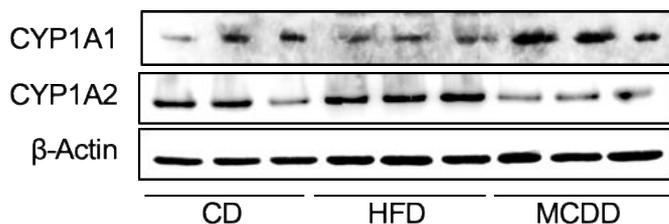


Fig. 4 Changes in mRNA levels of *CYP 1A1* and *1A2* in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, they were sacrificed, total RNA was extracted from the CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers, and the mRNA expression levels of *CYP*1A1 and 1A2 were measured using quantitative PCR. Relative mRNA levels were determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

(A)



(B)

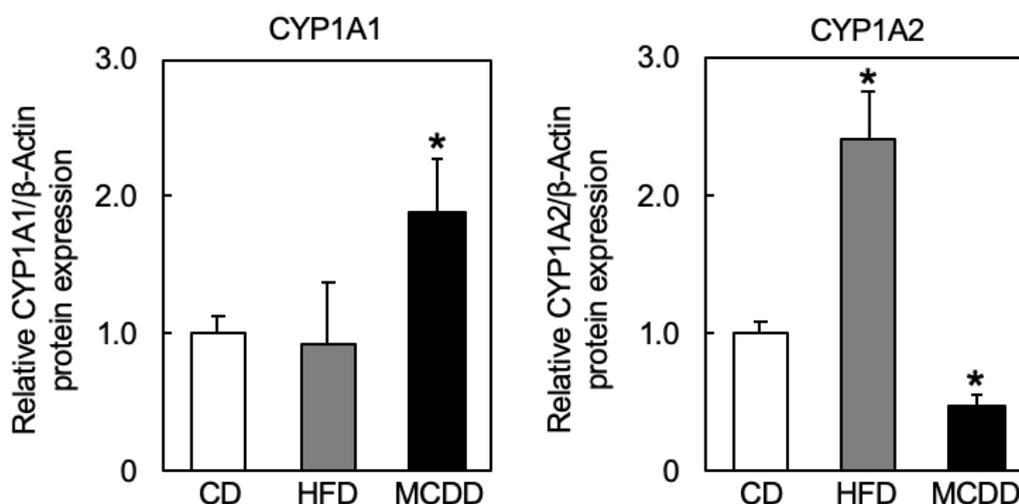


Fig. 5 Changes in expression levels of CYP 1A1 and 1A2 in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, the rats were sacrificed, and liver microsomes were prepared from CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers. The protein levels of CYP 1A1 and 1A2 in rat liver microsomes were measured using western blot analysis. (A) Typical image obtained via blotting. (B) Relative protein expression was determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

2-2 CYP2B サブファミリー分子種の発現変動の解析

ヒトにおいて、CYP2B サブファミリーは CYP2B6 および 2B7 の 2 つの分子種が存在するが、CYP2B7 は不活性な偽遺伝子である。ヒト CYP2B6 は当初、その発現量は総肝 CYP 量の 1%未満と少なく、薬物代謝への寄与度は低いと考えられていた。しかしその後、CYP2B6 量の総肝 CYP 量に占める割合が 2~10%であることが判明し、抗がん薬シクロホスファミド、イフォスファミド、タモキシフェンや向精神薬ジアゼパム、ミダゾラム、クロチアゼパム、TDM 対象医薬品である抗てんかん薬バルプロ酸などを含む 3~12%の医薬品代謝に関与することが示唆されており、医薬品代謝における

CYP2B6 の重要性が広く認識されている⁷⁵⁾。ラットにおいては、CYP2B1、2B2 および 2B3 の 3 つの分子種が存在し、このうち、CYP2B1 および 2B2 は、ヒト CYP2B6 と約 75% の相同性を保持しているが^{63,76)}、その触媒活性は、CYP2B1 の方がはるかに高いことが知られている⁶³⁾。

これまでに、ヒト CYP2B6 の発現および活性は、肝疾患の影響を受けにくいことが報告されている^{13,73)}。また、HFD 誘発ラット NAFL モデルおよび MCDD 誘発ラット NASH モデルにおける CYP2B1 (ヒト CYP2B6 に相当)²⁸⁾、高脂肪高スクロース食負荷マウス NAFL モデルにおける *Cyp2b10* (ヒト CYP2B6 に相当)²⁶⁾、ヒト NAFL および NASH 患者の肝組織における CYP2B6²⁹⁾ の発現変動に関する研究が行われているが、一貫した結果が得られていない。そこで、ラット NAFL および NASH モデルにおける CYP2B1 (ヒト CYP2B6 に相当) mRNA レベルを比較検討した。

CD、HFD、または MCDD を 4 週間摂餌したラットの肝ミクロソームにおける CYP2B1 mRNA 量を調べた結果、CYP2B1 mRNA 量は、MCDD 群 (NASH モデル) において低下する傾向を示したが、HFD 群 (NAFL モデル) および MCDD 群 (NASH モデル) のいずれにおいても有意な変化は認められなかった (Fig. 6)。このことは、ヒト CYP2B6 の発現/活性が肝疾患の影響を受けにくいとの知見^{13,73)} を支持するものであった。

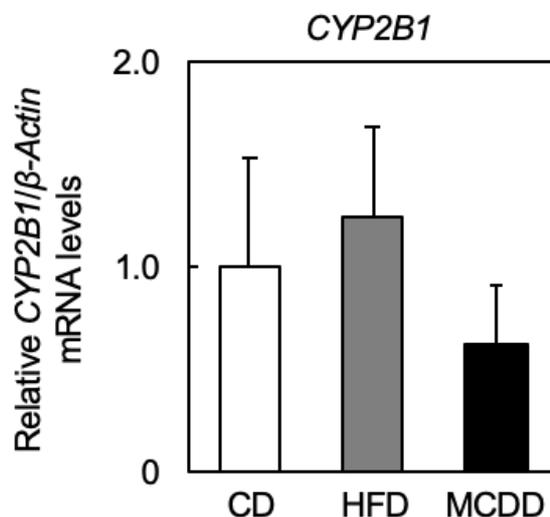


Fig. 6 Changes in mRNA levels of *CYP2B1* in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, they were sacrificed, total RNA was extracted from the CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers, and the mRNA expression levels of *CYP2B1* were measured using quantitative PCR. Relative mRNA levels were determined after normalization with β-actin. Data are represented as mean ± standard deviation (SD), n = 6 in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

2-3 CYP2C サブファミリー分子種の発現変動の解析

ヒト CYP2C サブファミリーには、CYP2C8、2C9、2C18、および 2C19 の 4 つの分子種が存在し、これらの分子種でヒト総肝含量の 20% を占める⁶³⁾。このうち、CYP2C9 は肝臓に最も多く発現し、さらに、CYP3A4 に続いて 2 番目に多くの医薬品の代謝に関与することから、ヒト薬物代謝研究において特に重要な分子種である^{77, 78)}。ラットにおいては、CYP2C6、2C7、2C11、2C12、2C13、2C22 および 2C23 の 7 つの分子種が存在し、CYP2C7 および 2C12 が雌で優位に発現するのに対して、CYP2C11 および 2C13 は雄ラットで優位に発現する。CYP2C11 は、雄ラット肝における主要な分子種で、ラット肝総 CYP 含有量の 50% を占め⁶³⁾、機能的にヒト CYP2C9 に相当する⁷⁹⁾。また、ラット CYP2C6 は、肝臓と小腸で発現し、ヒト CYP2C9 に相当する分子種であると考えられている^{80, 81)}。また、CYP2C22 は主に肝臓で発現し、CYP2C23 は主に腎臓で発現する⁶³⁾。

これまで、肝疾患時の CYP2C の発現および活性の変動に関する複数の報告がある。すなわち、ヒト CYP2C19 の発現および活性は、肝硬変、HCC、C 型肝炎などの肝疾患の影響を受けやすい^{25, 73, 82)}。対照的に、ヒト CYP2C9 の発現および活性は、肝疾患の影響を受けにくい^{25, 73, 83)}。NAFLD 動物モデルを用いた研究では、オレイン酸を 3 週間負荷した NAFLD モデルラットにおいて CYP2C11 のタンパク質発現レベルが減少した²⁷⁾。一方、高脂肪高スクロース食負荷マウスでは、*Cyp2c29* (ヒト CYP2C9 に相当) mRNA 量が増加した²⁶⁾。さらに、ラットおよびマウス NASH モデルでは、ラット 2C11 およびマウス *Cyp2c29* の発現レベルが減少した^{74, 84)}。ヒト NAFLD 患者を対象とした研究では、NAFLD および NASH 患者において CYP2C19 の発現量および活性が低下したが、NASH 患者における CYP2C9 の発現量は変化を認めず活性は増加した²⁹⁾。これらの報告をまとめると NAFLD 病態下での CYP2C の発現および活性の変動に関して一貫した結果が得られておらず、ヒトおよび動物モデルにおける肝疾患の進行度の違いが影響しているものと推察される。そこで、ラット NAFLD および NASH モデルにおける CYP2C6 および 2C11 (いずれもヒト CYP2C9 に相当) mRNA 量を比較検討した。

CD、HFD、または MCDD を 4 週間摂餌したラットの肝ミクロソームにおける CYP2C6 および 2C11 mRNA 量を調べた結果、CYP2C6 および 2C11 mRNA 量は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFLD モデル) においてほとんど変化しなかったが、MCDD 群 (NASH モデル) において有意に減少した (Fig. 7)。さらに、MCDD 群 (NASH モデル) における CYP2C サブファミリーの mRNA レベルが、タンパク質発現レベルに反映されるか否かを確認するために、CYP2C6 タンパク質発現レベルを Western blotting にて比較検討したところ、mRNA の変動と同様の挙動を示した (Fig. 8)。これらの NASH モデルにおける CYP2C6 および 2C11 の発現低下は、既報の NASH モデルで得られていると一致していた^{74, 84)}。

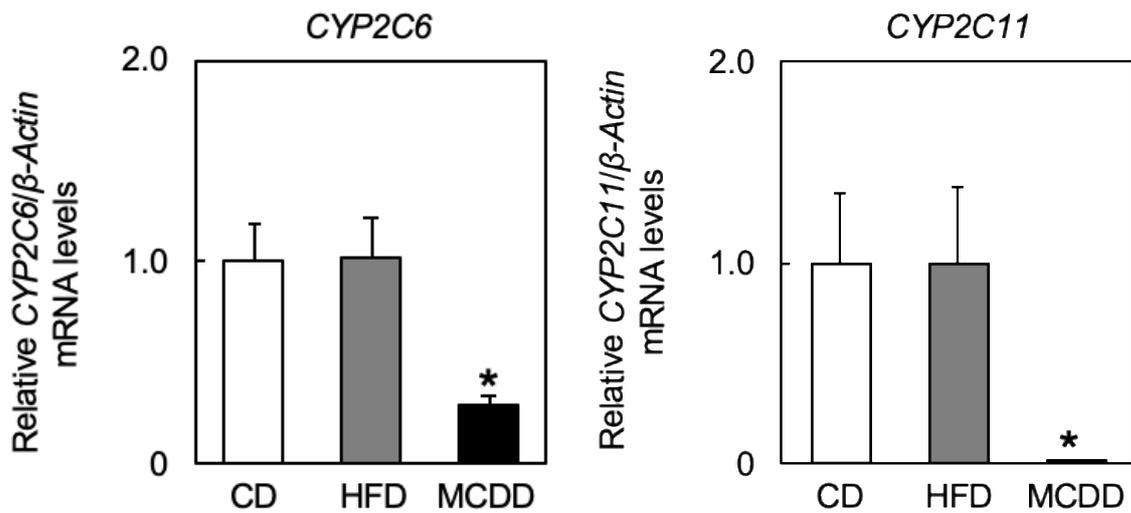


Fig. 7 Changes in mRNA levels of *CYP 2C6* and *2C11* in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, they were sacrificed, total RNA was extracted from the CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers, and the mRNA expression levels of *CYP 2C6* and *2C11* were measured using quantitative PCR. Relative mRNA levels were determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), n = 6 in each group. * p < 0.05 vs. control.

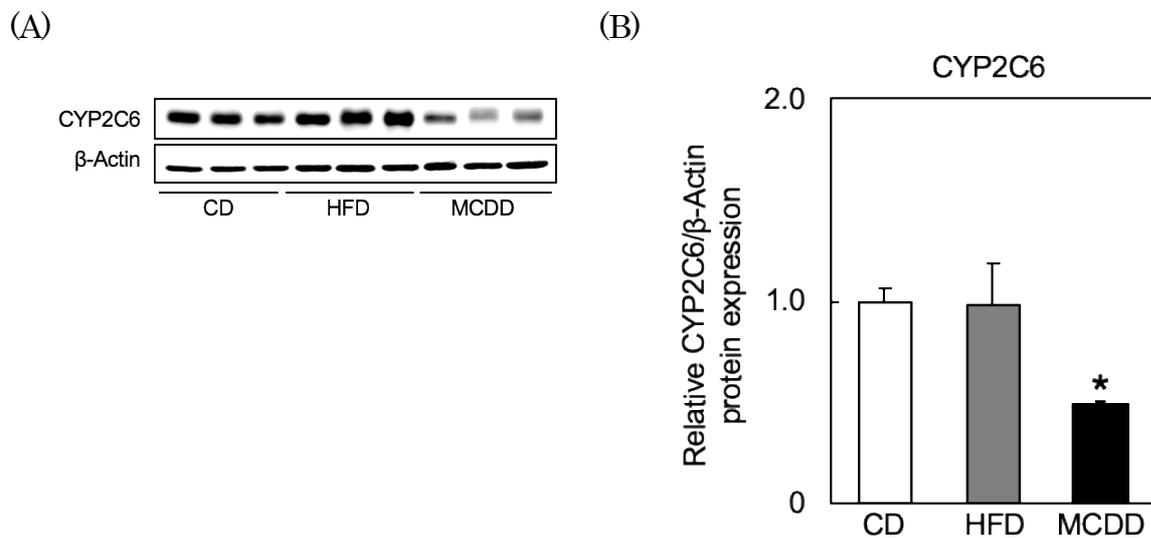


Fig. 8 Changes in expression levels of CYP 2C6 in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, the rats were sacrificed, and liver microsomes were prepared from CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers. The protein levels of CYP 2C6 in rat liver microsomes were measured using western blot analysis. (A) Typical image obtained via blotting. (B) Relative protein expression was determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), n = 6 in each group. * p < 0.05 vs. control.

2-4 CYP2D サブファミリー分子種の発現変動の解析

ヒト CYP2D サブファミリーは、CYP2D6、2D7 および 2D8 の 3 つの分子種が存在する⁶³⁾。ヒト CYP2D6 は、肝臓における総 CYP 発現量の約 4% を占め、麻薬性鎮痛薬、抗がん薬、抗不整脈薬、抗精神病薬、抗うつ薬など、臨床で用いられる医薬品の約 30% の代謝に関与する⁶⁹⁾。ラットにおいては、CYP2D1、2D2、2D3、2D4、2D5 および 2D18 の 6 つの分子種が同定されており、いずれの分子種もヒトとの相同性は 70% 以上と高い相同性を保持している⁶³⁾。また、ラット CYP2D1、2D4、2D5 および 2D18 が、肝臓を含む様々な臓器に発現しているのに対して、CYP2D2 および 2D3 は主に肝臓、腎臓、小腸に発現する。さらに、ラット CYP2D3 は、性の成熟に伴ってその発現量が増加することが知られている⁸⁵⁾。

C 型肝炎、B 型肝炎、薬剤性肝炎、アルコール性肝硬変、原発性硬化性胆炎および原因不明の肝疾患を含む肝疾患患者を対象とした研究において、CYP2D6 の基質であるデブリキソンの代謝が、中等症から重症の患者では低下したが、軽症の患者では変化を認めなかった⁸⁶⁾。高脂肪高スクロース食を負荷したマウス NAFL モデルにおける *Cyp 2d22* (ヒト *CYP2D6* に相当) mRNA 量は変化しなかったが²⁶⁾、MCD 誘発 ob/ob マウス NASH モデルにおいては *Cyp2d22* の発現量が減少することが報告されている⁸⁴⁾。CYP2D6 は、医薬品代謝において非常に重要な役割を果たしているにも関わらず、NAFLD における CYP2D の発現変動に関する知見は、ヒトでは乏しく²⁹⁾、ラットでは見当たらない。そこで、ラット NAFL および NASH モデルにおける *CYP2D1* (ヒト *CYP2D6* に相当) mRNA 量およびラットにおいては主に肝に存在する *CYP2D2* mRNA 量を比較検討した。

CD、HFD、または MCDD を 4 週間摂餌したラットの肝ミクロソームにおける *CYP2D1* および *2D2* mRNA 量を調べた結果、*CYP2D1* および *2D2* mRNA 量は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) においてほとんど変化しなかったが、MCDD 群 (NASH モデル) において有意に減少した (Fig. 9)。さらに、Western blotting により、CYP2D1 タンパク質レベルを比較検討したところ、mRNA の変動と同様の挙動を示した (Fig. 10)。これらの結果は、Frye ら⁸⁶⁾ のヒト肝疾患患者の中等症から重症の患者の結果に類似しており、肝臓における炎症や組織損傷を生じた病期に進むと CYP2D サブファミリー分子種の発現量は低下する可能性を示唆している。

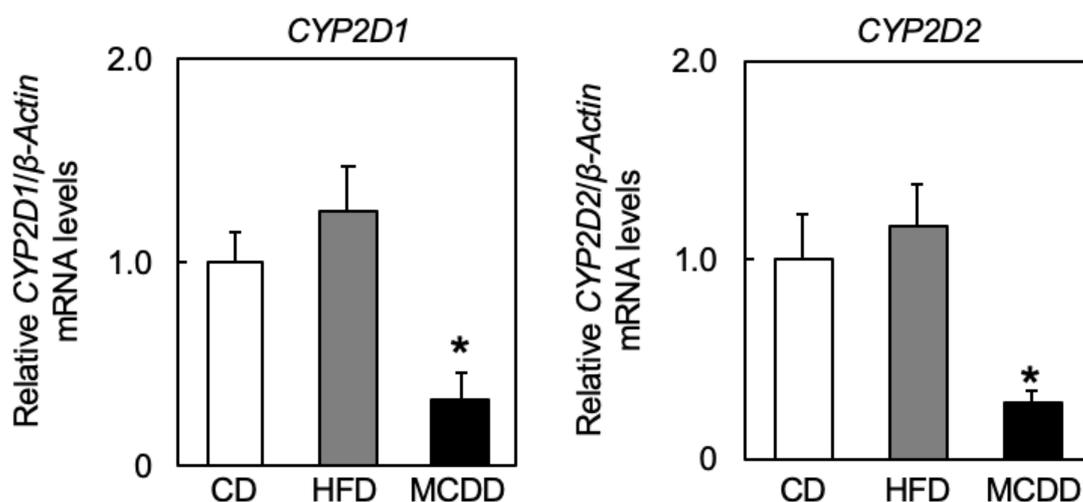


Fig. 9 Changes in mRNA levels of *CYP 2D1* and *2D2* in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, they were sacrificed, total RNA was extracted from the CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers, and the mRNA expression levels of *CYP 2D1* and *2D2* were measured using quantitative PCR. Relative mRNA levels were determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

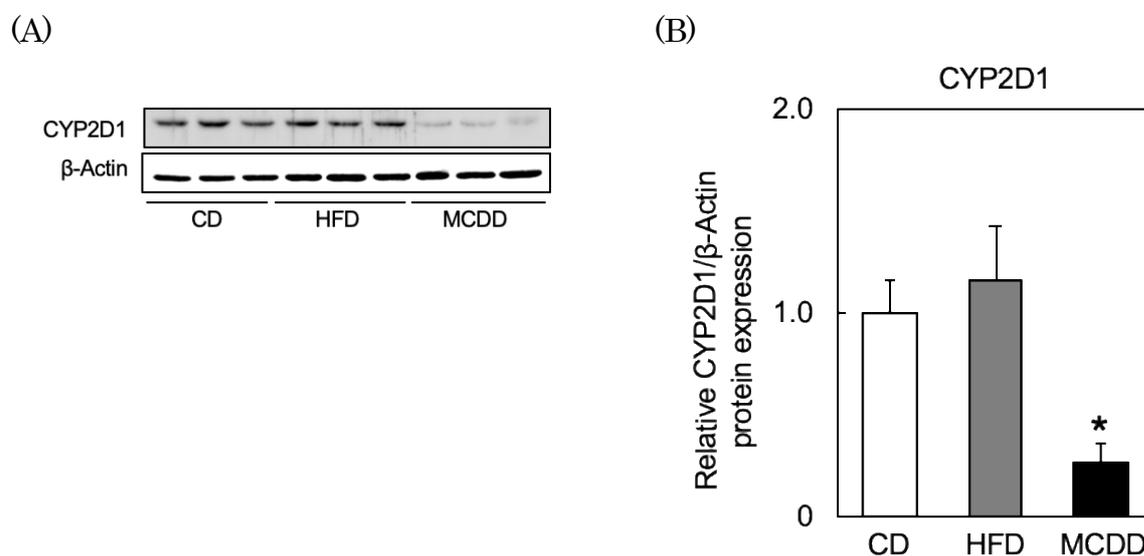


Fig. 10 Changes in expression levels of CYP 2D1 in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, the rats were sacrificed, and liver microsomes were prepared from CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers. The protein levels of CYP 2D1 in rat liver microsomes were measured using western blot analysis. (A) Typical image obtained via blotting. (B) Relative protein expression was determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

2-5 CYP2E サブファミリー分子種の発現変動の解析

CYP2E サブファミリーは、ヒトおよびラットの間で80%の相同性を保持している⁶³⁾。ヒト CYP2E1 は、CYP3A4、2C9 に続いて3番目に肝臓における発現量が多く、肝総 CYP 含有量の24.8%を占める⁸⁷⁾。医薬品代謝においては、解熱鎮痛薬アセトアミノフェン、揮発性麻酔薬ハロタン、エンフルランおよびイソフルラン、非ステロイド性抗炎症薬サリチル酸、および TDM 対象医薬品である抗てんかん薬バルプロ酸など、臨床で使用される医薬品の代謝の3%に関与する^{10,11,88)}。また、CYP2E1 は、エタノール、四塩化炭素、*N,N*-ジメチルニトロソアミンなど多くの毒物学的に重要な基質の代謝的活性化を触媒する⁸⁹⁾。さらに、CYP2E1 は、多価不飽和脂肪酸のような内因性物質の代謝にも関与する。CYP2E1 による脂肪酸代謝は、ミトコンドリアやペルオキシソームにおける脂肪酸 β 酸化の代替経路として、過剰供給された脂肪酸の ω 水酸化反応を触媒する⁹⁰⁾。この脂肪酸を代謝する過程で、過酸化水素、ヒドロキシルラジカルおよびスーパーオキシドアニオンなどの活性酸素種 (Reactive oxygen species; ROS) が生成され、酸化ストレスや細胞傷害を引き起こす⁹¹⁾。酸化ストレスは、NAFLD の病態と密接に関わっており、NAFL から NASH への進展を引き起こす一因と考えられている⁹⁰⁾。従って、CYP2E1 は、NAFLD の発症および進展におけるメカニズム解明の観点から、最も研究されている CYP 分子種である。

NAFLD における CYP2E1 の発現および活性の変動に関する知見として、マウス、ラットおよびヒトでは、異なる傾向が見られる。すなわち、いくつか矛盾があるものの、CYP2E1 の発現および活性は、マウスにおいて減少を示す一方で、ラットおよびヒトでは増加を示す⁹²⁾。しかしながら、報告の多くは NAFLD の病期が不明、または NASH に着目した研究であり、NAFL に関する報告は少ない²⁷⁾。また、NAFL と NASH を同時に比較検討した研究は、ヒトを対象とした Fisher ら²⁹⁾や Aljomah ら³⁰⁾、Varela ら³¹⁾ の報告以外に見当たらない。そこで、ラット NAFL および NASH モデルにおける *CYP2E1* mRNA 量を比較検討した。

CD、HFD、または MCDD を4週間摂餌したラットの肝ミクロソームにおける *CYP2E1* mRNA 量を調べた。その結果、*CYP2E1* mRNA 量は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) においてほとんど変化しなかったが、MCDD 群 (NASH モデル) において有意に減少した (Fig. 11)。このことは、CYP2E1 が ROS 生成による酸化ストレスとそれに続く細胞傷害を誘発させる^{90,91)} ことと一見矛盾するように思えるが、NAFL から NASH へ進展する過程においては CYP2E1 が十分存在しており、それにより炎症と組織傷害が進行し、その組織損傷ステージでは CYP2E1 発現が低下したことを示しているのかもしれない。しかしながら、この発現低下の理由については不明のままである。また、このことは病期が NASH に進行すると、エタノール代謝能が著しく低下し、飲酒によるエタノール毒性がさらに強まる可能性があることを暗示するものである。

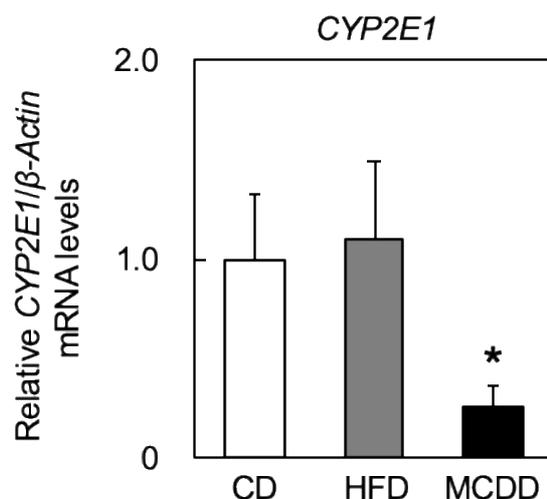


Fig. 11 Changes in mRNA levels of *CYP 2E1* in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, they were sacrificed, total RNA was extracted from the CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers, and the mRNA expression levels of *CYP2E1* were measured using quantitative PCR. Relative mRNA levels were determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

2-6 CYP3A サブファミリー分子種の発現変動の解析

ヒト CYP3A サブファミリーは、CYP3A4、3A5、3A7 および 3A43 の 4 つの分子種が存在し、このうち CYP3A4 はヒト肝において最も豊富に存在する分子種である⁹³⁾。さらに、CYP3A4 によって代謝を受ける医薬品の割合は 50%と CYP 分子種の中で最も医薬品代謝への寄与度が高い⁶⁹⁾。従って、CYP3A4 は、「薬物治療の最適化」を考える上で最も重要な分子種であるといえる。ラットにおいては CYP3A1、3A2、3A9、3A18、3A23 および 3A62 の 6 つの分子種が存在する。このうち、CYP3A1 はラット肝における主要な CYP3A サブファミリーである⁶³⁾。

CYP3A4 の発現/活性は、肝疾患の影響を特に受けやすく、また、疾患によって様々な変動が報告されている。例えば、ラットの肝硬変モデルでは、CYP3A4 の発現/活性が低下する⁹⁴⁾ 一方で、アルコール性肝障害では発現が増加する⁹⁵⁾。ヒトにおける肝硬変、HCC、B 型肝炎、C 型肝炎では、CYP3A4 の発現/活性が低下する^{16, 73, 96, 97)} が、閉塞性黄疸では変化しない¹⁶⁾。また、NAFLD における CYP3A サブファミリーの発現/活性は、いくつか矛盾があるものの、NAFLD の病期進展により減少するようである^{27, 74, 98)}。そこで、ラット NAFL および NASH モデルにおける CYP3A1 (ヒト CYP3A4 に相当) の発現量を比較検討した。

CD、HFD、または MCDD を 4 週間摂餌したラットの肝ミクロソームにおける *CYP3A1* mRNA 量を調べた。その結果、*CYP3A1* mRNA 量は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) においてほとんど変化しなかったが、MCDD 群 (NASH モデル) において有意に減少した (Fig. 12)。さらに、*CYP3A1* のタンパク質発現量を Western blotting にて比較検討したところ、mRNA の変動と同様の挙動を示した (Fig. 13)。これらの結果は、*CYP3A1* の発現が炎症/組織損傷を伴う脂肪肝炎 (NASH) において低下することを示唆しており、この挙動は、ラット肝硬変およびヒト肝硬変、HCC、B 型肝炎、C 型肝炎と同様であった。*CYP3A4* は臨床で使用されている医薬品の 50% の代謝に関わっている。それゆえ、NASH、それに続く肝硬変および肝癌などの重症肝疾患において医薬品の *CYP3A4* 依存性代謝が低下し、血中未変化体濃度の上昇が起りやすくなる可能性が考えられた。

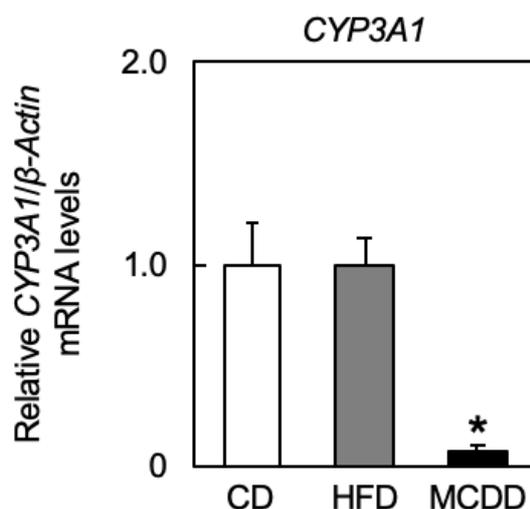


Fig. 12 Changes in mRNA levels of *CYP 3A1* in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, they were sacrificed, total RNA was extracted from the CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers, and the mRNA expression levels of *CYP 3A1* were measured using quantitative PCR. Relative mRNA levels were determined after normalization with β-actin. Data are represented as mean ± standard deviation (SD), n = 6 in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

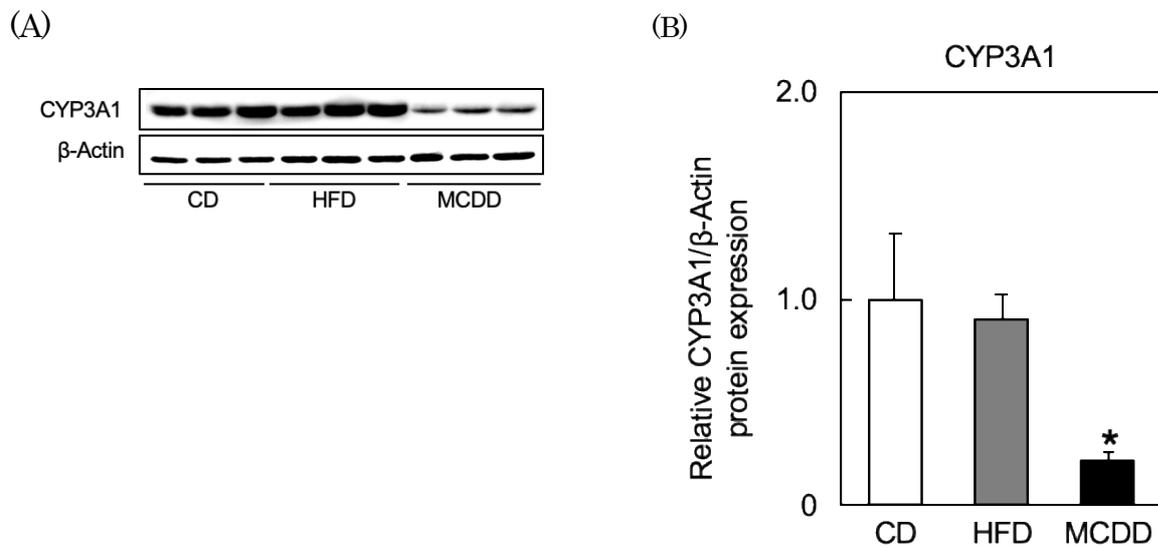


Fig. 13 Changes in expression levels of CYP 3A1 in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, the rats were sacrificed, and liver microsomes were prepared from CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers. The protein levels of CYP 3A1 in rat liver microsomes were measured using western blot analysis. (A) Typical image obtained via blotting. (B) Relative protein expression was determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

2-7 CYP4A サブファミリー分子種の発現変動の解析

ヒト CYP4A サブファミリーは、CYP4A11 および 4A22 の 2 つの分子種が存在する。CYP4A11 は、主に肝臓や腎臓に発現し、中鎖脂肪酸の代謝を触媒する^{99,100}。また、CYP4A11 は、免疫抑制薬タクロリムス¹⁰¹、キサンチンオキシダーゼ阻害薬フェブキシostat¹⁰²、抗がん薬エキセメスタン¹⁰³ など医薬品の代謝にも関与する。CYP4A22 は、肝臓での発現が低く、酵素活性は CYP4A11 に比べて劣るため⁹⁹、CYP4A11 が主要なヒト CYP4A の分子種であると考えられている。ラットにおいては、CYP4A1、4A2、4A3 および 4A8 の 4 つの分子種があり、このうち、CYP4A1、4A2 および 4A3 は、脂肪酸の代謝を触媒する¹⁰⁰。

CYP4A サブファミリーは脂肪酸の代謝を触媒することから、NAFLD の病態形成および進展におけるメカニズムの解明および創薬標的の観点から関心が高まっている分子種である¹⁰⁴⁻¹⁰⁶。CYP4A サブファミリーの発現/活性は、HFD 負荷マウス (NAFL モデル)、db/db マウス (NAFL モデル)、MCDD 負荷マウス (NASH モデル) および NAFLD 患者において増加することが示されている^{104, 106-108}。そこで、本研究において作製した NAFL および NASH モデルにおいても先行研究と同様の変動をするか

否かを検討することを目的として、NAFL および NASH モデルにおける CYP4A1 の発現量を比較検討した。

CD、HFD、または MCDD を 4 週間摂餌したラットの肝ミクロソームにおける *CYP4A1* mRNA 量を Fig. 14 に示す。*CYP4A1* mRNA 量は、HFD 群 (NAFL モデル) では変化しなかったのに対して、MCDD 群 (NASH モデル) において顕著に増加した。さらに、CYP4A1 のタンパク質発現レベルを Western blotting にて比較検討したところ、mRNA の変動と同様の挙動を示した (Fig. 15)。これらのことから、本研究における MCDD 群 (NASH モデル) においても、既報と同様に CYP4A1 の発現量が増加することが確認された。

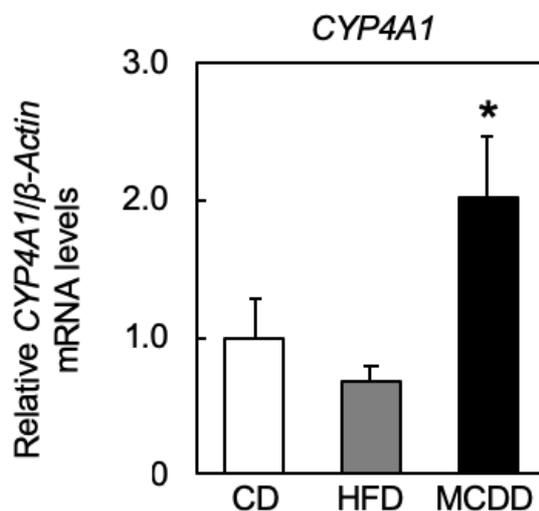


Fig. 14 Changes in mRNA levels of *CYP 4A1* in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, they were sacrificed, total RNA was extracted from the CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers, and the mRNA expression levels of CYP 4A1 measured using quantitative PCR. Relative mRNA levels were determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

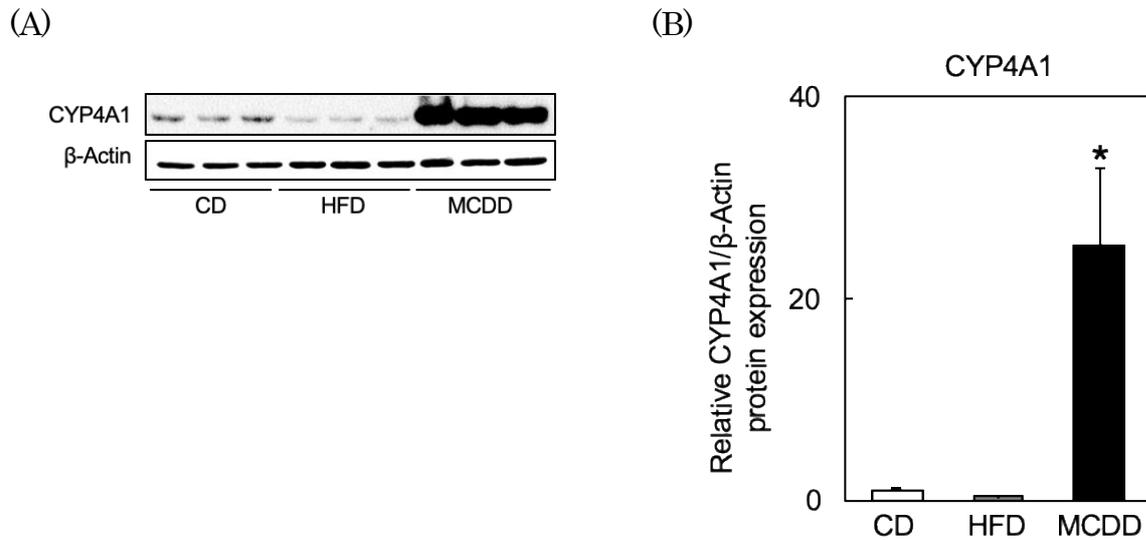


Fig. 15 Changes in expression levels of CYP 4A1 in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks.

After feeding the rats CD, HFD, or MCDD for 4 weeks, the rats were sacrificed, and liver microsomes were prepared from CD-, HFD-, or MCDD-fed rat livers. The protein levels of CYP 4A1 in rat liver microsomes were measured using western blot analysis. (A) Typical image obtained via blotting. (B) Relative protein expression was determined after normalization with β -actin. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

第3節 考察

本章では、NAFL および NASH モデルにおける CYP 分子種の発現の差異を明らかにするために、HFD および MCDD 摂餌ラットにおける主要な CYP 分子種の mRNA およびタンパク質発現レベルを CD 摂餌ラットと比較した。

各 CYP 分子種の mRNA およびタンパク質発現レベルは、いずれの CYP 分子種においても一致した (Fig.4-15)。HFD 摂餌 NAFL モデルでは、CYP1A2 のみ発現量の増加がみられた (Fig. 4, 5)。一方、MCDD 摂餌 NASH モデルでは、CYP1A1 および 4A1 の発現量は増加したのに対して、CYP1A2、2C6、2C11、2D1、2D2、2E1、および 3A1 の発現量は減少した (Fig. 4-15)。この MCDD 摂餌 NASH モデルにおける CYP1A1 以外の CYP 分子種の上方制御または下方制御は、以前の報告のものと類似していた^{32, 107, 108})。また、NASH モデルでの CYP4A1 の発現上昇は、種差は異なるものの以前の報告のものと類似していた^{107, 108})。

従来から、ヒトにおける炎症/組織損傷を伴う肝疾患では、CYP 分子種の発現低下によって薬物代謝能が低下すると考えられている。しかし、本研究では、炎症/組織損傷を伴う NASH モデルにおいて CYP1A1 および 4A1 の発現が誘導された (Fig. 4, 5, 14, 15)。これまでの研究で、NASH モデルにおける芳香族炭化水素受容体の発現レベルに応じて CYP1A1 発現が誘導されること、および HepG2 細胞のオレイン酸処理が脂質過酸化を促進することが実証されている¹⁰⁹)。さらに、CYP1A1 発現は、LPS 誘導性の NF- κ B 活性化によって誘導され、肺組織の損傷および炎症に寄与する¹¹⁰)。また、ヒトおよびマウスの CYP4A サブファミリーは、脂肪酸の水酸化、活性酸素種の生成、脂質過酸化、NF- κ B シグナル伝達経路の活性化などの炎症系を誘導することにより、NAFL から NASH への進行に関連している可能性がある^{104, 105})。従って、NASH モデルにおける CYP1A1 および 4A1 の発現レベルの増加には、脂肪肝における炎症/組織損傷の有無が関与している可能性が考えられた。

興味深いことに、CYP1A2 の発現レベルは、NAFLD 病期初期である NAFL モデルにおいて増加し、NAFLD 進行期である NASH モデルでは減少した (Fig. 4, 5)。この NAFL および NASH モデル間で相反する発現挙動は、CYP1A2 依存性の薬物代謝能 (活性) が、肝疾患症状が顕在化前 (未病段階) の炎症/組織損傷のない肝疾患 (NAFL) の初期段階で亢進し、脂肪性肝炎 (NASH) では減弱する可能性を示唆している。

以上のことが、ヒトの場合でも同様に起こるものと想定すると、TDM 対象医薬品を含む CYP1A2 依存性の薬物代謝能 (活性) が、肝臓における脂肪蓄積初期段階から病期の進展と共に変動する可能性が考えられた。一方、炎症誘導に関与すると考えられている CYP1A1 および 4A1 の NASH モデルにおける発現誘導は、NAFL から NASH への進展において重要な役割を演じているものと推察された。これ

らの知見は、NAFLD 病期進展と各 CYP 分子種による薬物代謝能との関係性および薬物動態変動を考慮する上で重要な基礎データになり得るものと考えられた。

第4節 小括

本章では、NAFLおよびNASHモデルにおける各CYP分子種の発現変動の差異を明らかにすることを目的として、HFD摂餌NAFLモデル（HFD群）およびMCDD摂餌NASHモデル（MCDD群）における主要なCYP分子種のmRNAレベルおよびタンパク質発現レベルをCD摂餌ラット群（CD群）と比較した。

CYP1A1、1A2、2C6、2D1、3A1および4A1のmRNAおよびタンパク質発現レベルは、いずれのCYP分子種においても一致した。HFD群（NAFLモデル）において、CD群と比較してCYP1A2のみ発現量の増加を認めた。MCDD群（NASHモデル）では、CYP1A2、2C6、2C11、2D1、2D2、2E1および3A1の発現量が有意に減少したが、CYP1A1および4A1の発現量は顕著に増加した。このMCDD摂餌NASHモデルにおけるCYP1A1以外のCYP分子種の上方制御または下方制御は、以前の報告のものと類似していた。

本章において、CYP1A2の発現が未病状態のNAFL期で誘導され、炎症/組織損傷および線維化を伴うNASH期では逆に正常肝よりも低下することが初めて明らかとなった。さらに、CYP1A1および4A1の発現が、既報と同様に、NAFLモデルでは変化しないがNASHモデルにおいて上昇することが実証された。

以上より、本章で認めたCYP発現変動がヒトの場合でも同様に起こるものと想定すると、TDM対象医薬品を含むCYP1A2依存性の薬物代謝能（活性）は、肝臓における脂肪蓄積初期段階から病期の進展とともに変動する可能性が考えられた。一方、炎症誘導に関与すると考えられているCYP1A1および4A1のNASHモデルにおける発現誘導は、NAFLからNASHへの病態の進展において重要な役割を演じているものと推察された。

第4章 CYP1A2 依存性薬物代謝活性の NAFL および NASH 間における反転変動

第1節 序

前章において、CYP1A2 の発現量が NAFL および NASH モデル間において相反することを初めて示唆した（第3章第2節2-1）。すなわち、CYP1A2 発現量は NAFL において正常肝よりも増加した一方、NASH においては逆に正常肝よりも減少した（Fig. 4, 5）。この CYP1A2 は、気管支拡張薬テオフィリンや抗精神薬クロザピンなどの TDM の対象となる薬物の代謝に関与する^{111, 112)}。そこで、前章において見出された CYP1A2 発現量の反転変動が薬物代謝能（活性）の変動に反映されるのか否かを明らかにするために、CYP1A2 依存性薬物代謝活性を検討した。

CYP1A2 の代表的な基質であるカフェインは、CYP1A2 活性を評価するための指標として広く用いられている。ラットおよびヒトによるカフェインの代謝経路を Fig. 16 に示す。カフェインの主代謝経路および各代謝反応を触媒する CYP 分子種には種差がある。ラット肝におけるカフェインの代謝は、8-水酸化反応が主要な代謝反応であり、主に CYP1A2 によって触媒されてカフェイン 8-水酸化体（1,3,7-Trimethyluric acid）が生成されることが報告されている¹¹³⁾。そこで、CD、HFD および MCDD の4週間摂餌ラットの肝ミクロソームにおける CYP1A2 活性をカフェイン 8-水酸化体である 1,3,7-Trimethyluric acid の生成量を指標として、高速液体クロマトグラフィー（High performance liquid chromatography; HPLC）を用いて定量的に評価した。

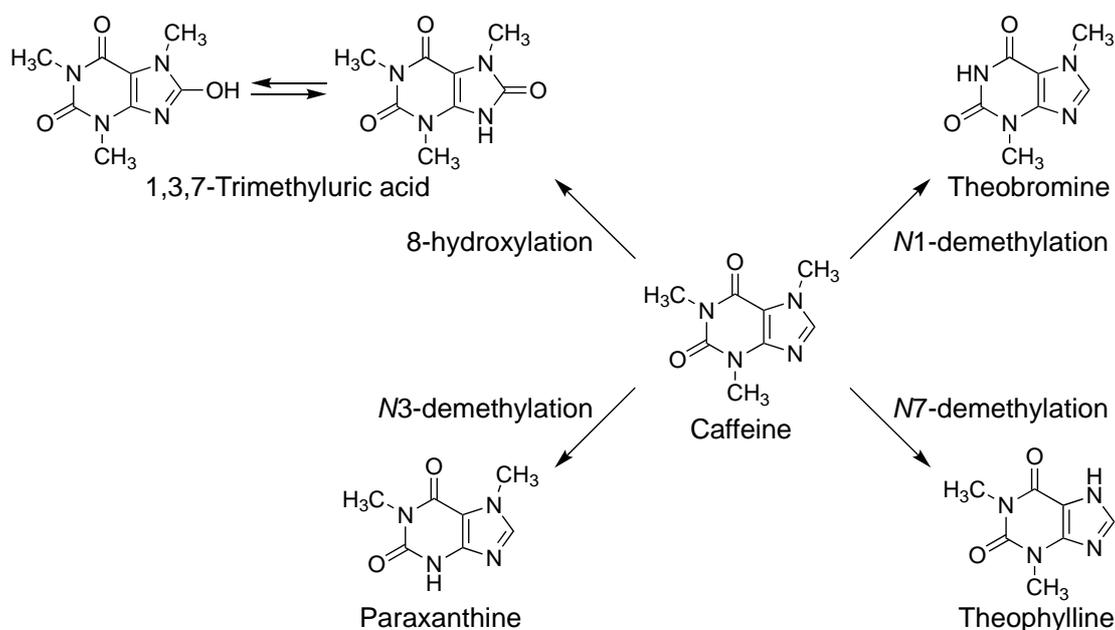


Fig. 16 The metabolic pathways of caffeine.

第2節 NAFL および NASH モデルにおける CYP1A2 活性変動の解析

2-1 NAFL および NASH モデルにおけるカフェイン 8-水酸化活性測定法の確立

ラット肝ミクロソームにおけるカフェイン代謝のクロマトグラムを Fig. 17 に示す。好氣的条件下、カフェインを NADPH 存在下においてラット肝ミクロソームと反応させた時、カフェイン 8-水酸化体である 1,3,7-Trimethyluric acid が生成した。基質であるカフェイン、代謝物である 1,3,7-Trimethyluric acid および内部標準である 7-(2-hydroxypropyl)theophylline は、それぞれ 21.2 分、13.8 分、27.7 分に検出された (Fig. 17)。次に、ラット肝ミクロソームにおけるカフェイン 8-水酸化活性の経時変化および酵素量依存性について検討した。その結果、本活性はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (還元型) (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form); NADPH) (最終濃度; 10 mM) および基質カフェイン (最終濃度; 1 mM) 存在下、肝ミクロソーム 1.6 mg protein/mL (Fig. 18A) および反応時間 20 分まで直線的に増加した (Fig. 18B)。これらの結果より、カフェイン 8-水酸化酵素活性測定条件は、10 mM NADPH、1 mM カフェインおよび 1.6 mg protein/mL の肝ミクロソーム共存下、反応時間を 20 分とし、生成された 1,3,7-Trimethyluric acid 量を測定し、1,3,7-Trimethyluric acid 生成量を肝ミクロソームタンパク質 mg 当たりの CYP1A2 活性 (nmol/min/mg protein) として評価した。

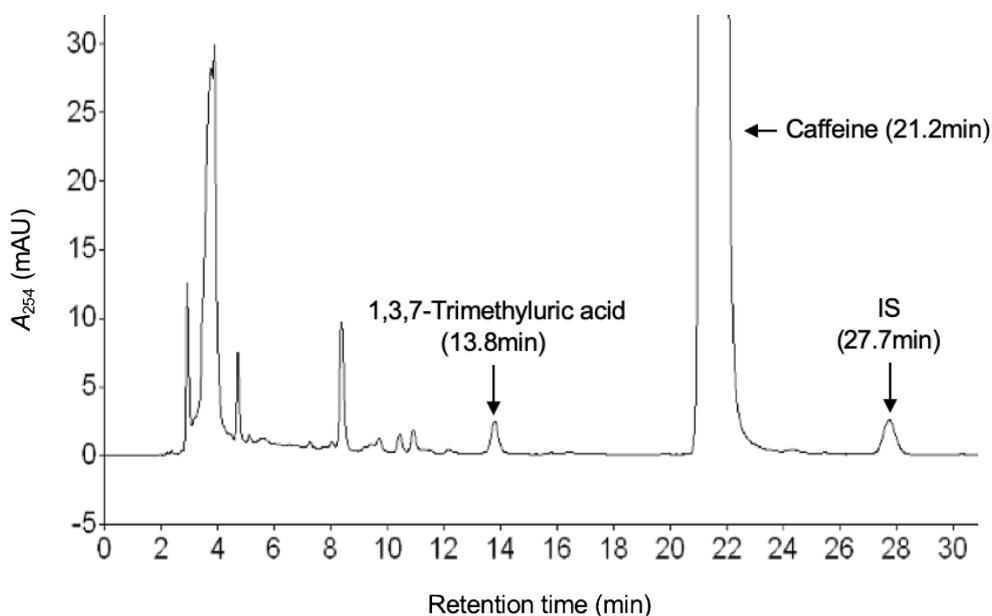


Fig. 17 HPLC chromatogram of caffeine and 1,3,7-Trimethyluric acid formed with rat liver microsomes in the presence of NADPH.

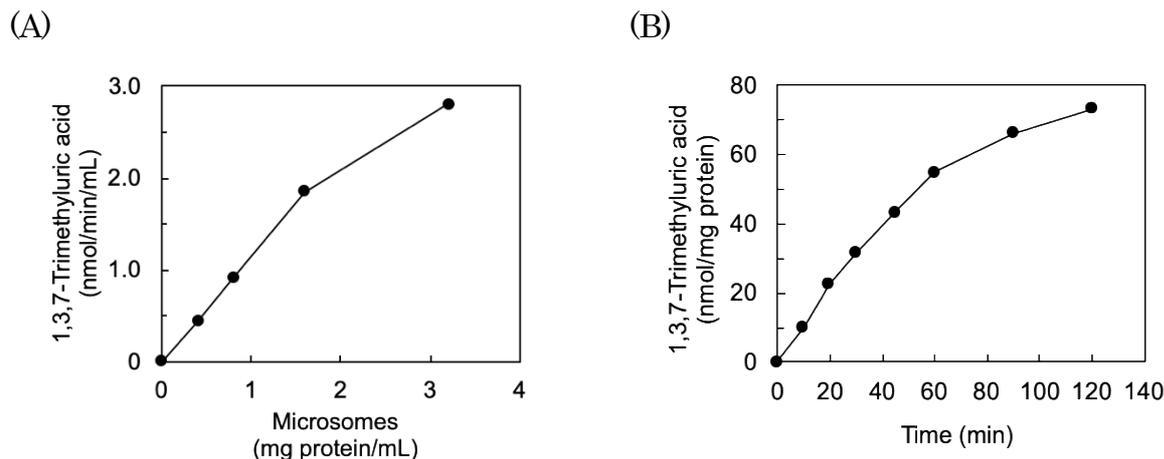


Fig. 18 Dependency of the amounts of microsome proteins on 1,3,7-Trimethyluric acid formed from caffeine by rat liver microsomes. (A) Dependency of the amounts of microsomes on 1,3,7-Trimethyluric acid formed from caffeine by rat liver microsomes. (B) The time course of 1,3,7-Trimethyluric acid from caffeine in the presence of NADPH.

2-2 NAFL および NASH モデルにおける CYP1A2 活性の比較検討

CD、HFD、または MCDD を 4 週間摂餌したラットの肝ミクロソームにおける 1,3,7-Trimethyluric acid の生成量 (CYP1A2 活性) を測定した。その結果、CYP1A2 活性は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) において有意に増加し、MCDD 群 (NASH モデル) では有意に減少した (Fig. 19)。この NAFL および NASH モデル間における CYP1A2 活性の反転現象は、mRNA/タンパク質発現レベルの挙動とよく一致することが確認された (Fig. 4, 5)。

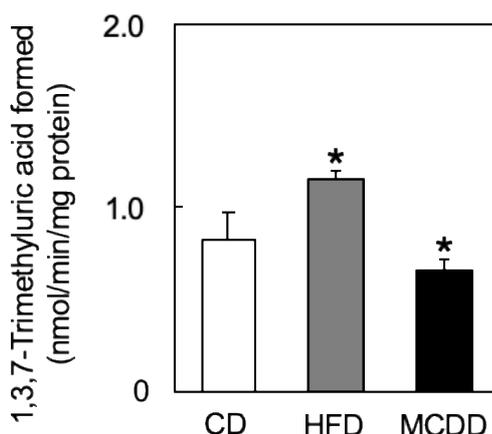


Fig. 19 Changes in CYP 1A2 activities in the livers of rats fed with CD, HFD, or MCDD for 4 weeks. The caffeine 8-oxidase activities catalyzed by CYP1A2 in rat liver microsomes from CD-, HFD-, or MCDD-fed rats were determined by measuring the formed 8-hydroxy caffeine using HPLC. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

第3節 考察

本章では、前章において見出された NAFL および NASH モデル間における CYP1A2 の発現レベルの反転現象と活性との関係性を明らかにするために、CYP1A2 依存性薬物代謝活性を検討した。その結果、NAFL および NASH モデルにおける CYP1A2 活性レベルは mRNA/タンパク質発現レベルの挙動とよく一致しており、NAFL および NASH モデル間における CYP1A2 の反転発現現象は、その酵素活性に反映されていることが確認された (Fig. 19)。

ラット肝ミクロソームにおける CYP1A2 のおおよび活性レベルが、NAFL モデルで上昇し、NASH モデルで低下したことから、NAFL において CYP1A2 依存性薬物代謝能が上昇することにより血中未変化体濃度が低下すること、および NASH において代謝能低下による血中未変化体濃度の増加が生じる可能性が示唆された。ヒトにおいて CYP1A2 が触媒する医薬品代謝反応は、CYP3A4、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 に続いて 5 番目に多く、ヒト臨床に用いられる医薬品代謝の約 4%に参与する^{69, 78)}。なかでも、CYP1A2 の基質となるテオフィリンおよびクロザピンは、TDM 対象医薬品であり、特に血中濃度治療域が狭く、CYP1A2 の発現/活性が変動することにより、血中未変化体濃度の低下による疾患治療のコントロール不良ならびに血中未変化体濃度の上昇による重篤な毒性症状や薬物有害反応の出現を引き起こすことが懸念される。従って、CYP1A2 により代謝される医薬品の「薬物治療の最適化」を図るには、NAFLD の病期進展による CYP1A2 発現/活性の大きな変動が生じることを想定し、NAFL および NASH 患者における CYP1A2 の薬物代謝および薬物動態の変化を解析することが必要であると考えられた。

ラット NAFL モデルにおける CYP1A2 の発現誘導には、肝臓における脂肪蓄積・肝細胞の脂肪細胞化が、NASH モデルにおける CYP1A2 の発現低下には、肝臓における炎症/組織損傷が関与しているものと推察される。しかしながら、本研究において NAFL および NASH モデルにおける CYP1A2 の発現レベルの反転現象のメカニズムを解明するまでには至らなかった。そのため、今後、細胞および分子レベルに掘り下げた解析・研究が必要である。

第4節 小括

本章では、前章において見出された NAFL および NASH モデル間における CYP1A2 の反転現象が薬物代謝能（活性）の変動に反映されるのか否かを明らかにするために、CYP1A2 依存性カフェイン 8-水酸化活性を指標として検討した。

NAFL および NASH モデルにおける CYP1A2 依存性カフェイン 8-水酸化活性は、CYP1A2 の mRNA/タンパク質発現レベルの挙動と相関し、NAFL モデルで上昇し、NASH モデルで低下した。このことは、NAFLD 病期進展に伴い CYP1A2 の発現/活性が反転することにより、薬物の血中未変化体濃度が大きく変動し、想定外の薬効の増強、減弱および薬物間相互作用の発現などに繋がる可能性を示唆している。

以上のように、CYP1A2 の活性レベルが、その mRNA/タンパク質発現と同様に、肝疾患症状が顕在化前（未病段階）の炎症/組織損傷のない NAFL 期で誘導され、炎症/組織損傷および線維化を伴う NASH 期では逆に正常肝よりも低下することが初めて明らかとなった。従って、「薬物治療の最適化」を図るためには、NAFL および NASH 患者における薬物代謝および薬物動態の解析が必要であることが示唆された。この NASH モデル間における CYP1A2 の発現/活性の反転現象には、炎症/組織損傷および線維化の有無が関係しているものと推察された。

第5章 NASH モデルにおける CYP4A1 依存性脂肪酸 ω 水酸化反応の亢進

第1節 序

脂肪酸の代謝経路には、ミトコンドリアおよびペルオキシソームにおける β 酸化ならびにミクロソームにおける ω 酸化の3つの経路がある。通常、ほとんどの脂肪酸はミトコンドリアにおける β 酸化によって代謝されるが、脂肪酸の供給が過剰になると ω 酸化が亢進する¹¹⁴⁾。脂肪酸代謝に関与する多くのCYPが、脂肪酸の炭素鎖内部(ω -1, ω -2, ω -3)の水酸化を触媒するのに対して、CYP4Aサブファミリーは主として脂肪酸の ω 水酸化反応を触媒し、ヒトCYP4A11はラウリン酸をはじめとする中鎖脂肪酸の ω 水酸化活性が高いことが知られている¹¹⁵⁾。ラットでは、CYP4A1、4A2、4A3の3つのCYPアイソフォームがラウリン酸の ω 水酸化を触媒するが、なかでもCYP4A1の触媒活性が最も高い¹⁰⁰⁾。ラットにおけるラウリン酸の代謝経路をFig. 20に示す。

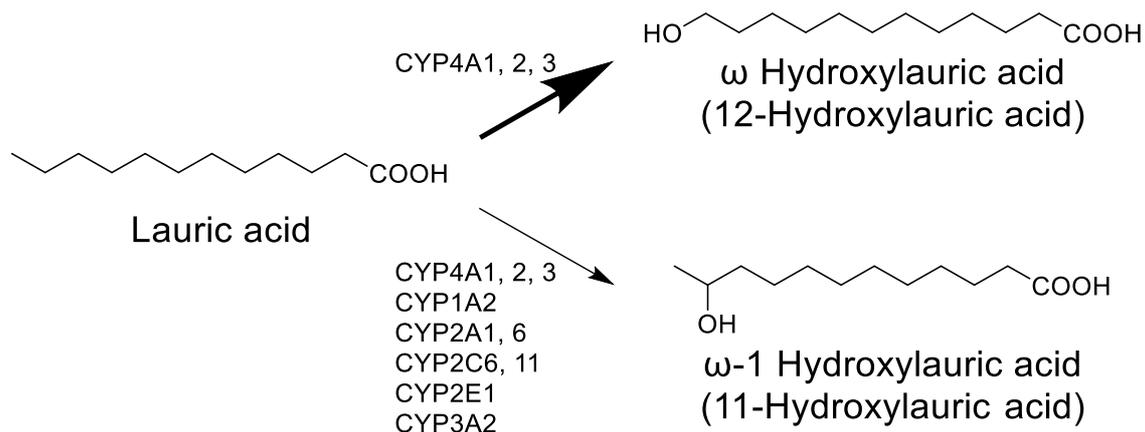


Fig. 20 Hydroxylation of Lauric acid by CYPs in rat.

脂肪酸は、いずれの経路で代謝を受ける場合も、代謝される過程でROSを発生する。ROSは、脂質過酸化を引き起こし、小胞体 (Endoplasmic reticulum; ER) ストレスや炎症反応を誘導することで、NAFLDの病態形成の一因を成すことが知られている¹¹⁶⁾。NAFLDでは、脂肪酸過多による直接的およびミトコンドリア機能異常による間接的な ω 酸化経路の活性化が起こる¹⁰⁴⁾。このことから、潜在的なROSの供給源であるCYP4Aサブファミリーが、NAFLDの発症や進展に重要な役割を果たしているものと推論されている¹⁰⁴⁾。実際に、Zhangら¹⁰⁶⁾は、CYP4A14を過剰発現させたC57BL/6マウスにおいて脂肪肝が形成されること、HFDを摂餌させたCYP4A14遺伝子欠損マウスの肝臓において脂肪の

蓄積が抑制されること、さらに、MCDD を摂餌させた CYP4A14 遺伝子欠損マウスにおいて肝臓脂質の蓄積、炎症および線維化が著しく軽減されることなどを示唆している。また、ヒト正常肝細胞株 HepaRG 細胞を用いた過剰なグルコースとパルミチン酸処理により開発された脂肪肝モデル細胞を用いた研究において、ER 誘発 ROS 産生が CYP4A の選択的阻害剤 HET0016 や siRNA 処理によって減少した¹¹⁷⁾。これらのことから、CYP4A サブファミリーは脂肪肝の病態進展表現型である NASH 形成における炎症発症に寄与するものと推定されている。

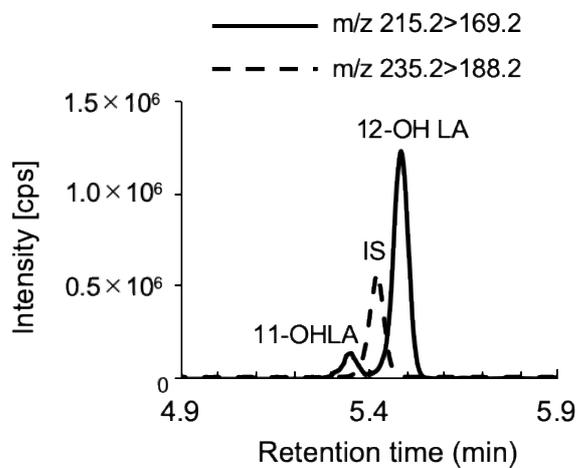
前章において、CYP4A1 の発現量は病期初期の NAFL モデルでは変化なく、病期進展型である NASH モデルにおいて著しく増加することを認めた (第 3 章第 2 節 2-7、Fig. 14, 15)。そこで、NAFL および NASH モデルにおける CYP4A1 発現変動と活性変動の関係を明らかにするために、ラット肝ミクロソームにおける CYP4A1 活性をラウリン酸の 12-水酸化体 (ω 水酸化体) である 12-ヒドロキシラウリン酸 (12-Hydroxylauric acid; 12-OH LA) の生成量を指標として液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry; LC/MS/MS) にて定量的に評価した。

第2節 NAFL モデルおよび NASH モデルにおける CYP4A1 の活性変動の解析

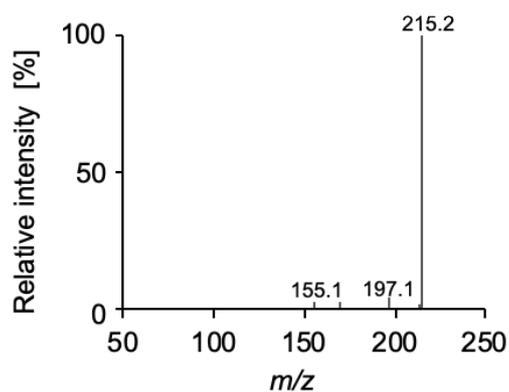
2-1 NAFL および NASH モデルにおけるラウリン酸 ω 水酸化活性測定法の確立

ラット肝ミクロソームにおけるラウリン酸代謝物の多重反応モニタリング測定から得られたクロマトグラムを Fig. 21A に、プロダクトイオンスキャン測定から得られたラウリン酸 ω -1 水酸化体である 11-Hydroxy lauric acid (11-OH LA ; ω -1 水酸化体) およびラウリン酸 ω 水酸化体である 12-Hydroxy lauric acid (12-OH LA ; ω 水酸化体) のプロダクトイオンスペクトルを Fig. 21B および C にそれぞれ示す。好氣的条件下、ラウリン酸を NADPH 存在下においてラット肝ミクロソームと反応させた時、11-OH LA、12-OH LA および内標準物質である 12-Hydroxy lauric-d20 Acid が、それぞれ 5.4 分、5.5 分および 5.5 分に検出された (Fig. 21A)。また、その代謝は ω -1 水酸化反応より ω 水酸化反応が有意に進行した (Fig. 21D)。従って、CYP4A1 活性は ω 水酸化活性 (12-OHLA 生成量) を指標として評価した。次に、ラット肝ミクロソームにおけるラウリン酸 ω 水酸化活性の経時変化および肝ミクロソーム酵素量依存性について検討した。その結果、本活性は基質ラウリン酸 (25 μ M) および NADPH (1 mM) 存在下、反応時間 5 分、肝ミクロソーム 0.4 mg protein/mL まで直線的に増加した (Fig. 22A, 22B)。これらの結果より、以降の実験において、ラウリン酸 ω 水酸化活性測定条件は、1 mM NADPH、25 μ M ラウリン酸および 0.4 mg protein/mL の肝ミクロソーム共存下、反応時間を 5 分とし、生成された 12-OHLA 量を測定し、12-OHLA 生成量を肝ミクロソームタンパク質 mg 当たりの CYP4A1 活性 (nmol/min/mg protein) として評価した。

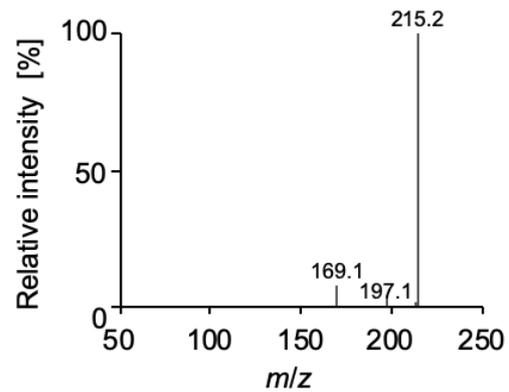
(A)



(B)



(C)



(D)

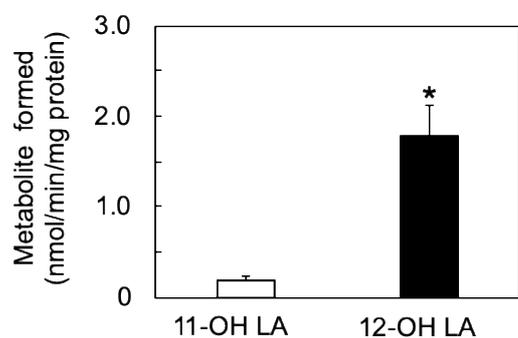


Fig. 21 *In vitro* metabolism of lauric acid by rat liver microsomes.

(A) Chromatograms of lauric acid metabolites formed by rat liver microsomes. (B) Product ion spectrum of 11-OH LA. (C) Product ion spectrum of 12-OH LA. (D) Amounts of 11-Hydroxylauric acid and 12-Hydroxylauric acid formed by rat liver microsomes. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

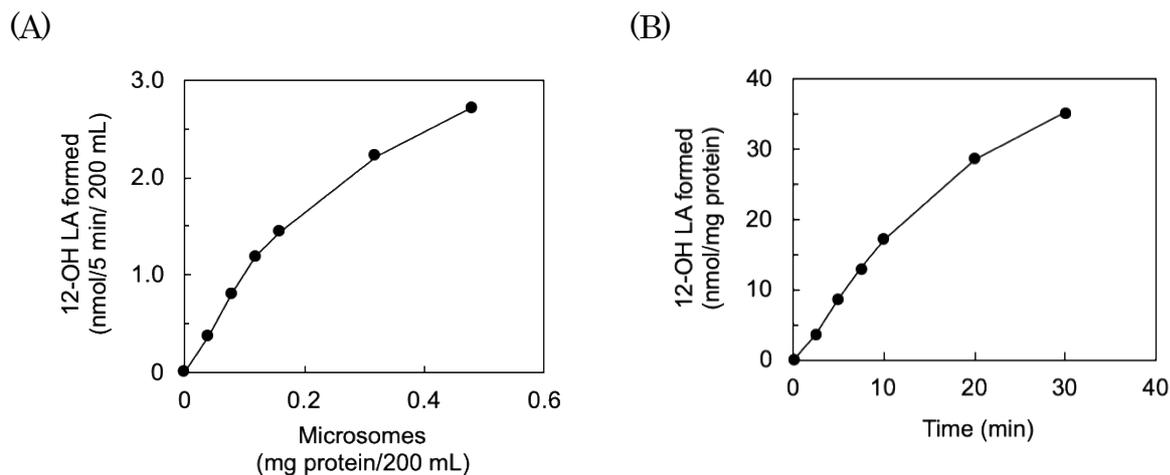


Fig. 22 Dependency of the amounts of microsome proteins and time course on 12-Hydroxy lauric acid formed from lauric acid by rat liver microsomes.

(A) Dependency of the amounts of microsomes on 12-Hydroxy lauric acid formed from lauric acid by rat liver microsomes. (B) The time course of 12-Hydroxy lauric acid from lauric acid in the presence of NADPH.

2-2 NAFL および NASH モデルにおける CYP4A1 活性の比較検討

CD、HFD、または MCDD を 4 週間摂餌したラットの肝ミクロソームにおける 12-OH LA 生成量 (CYP4A1 活性) を測定した。その結果、CYP4A1 活性は、CD 群と比較して MCDD 群 (NASH モデル) において 2.4 倍に上昇したが、HFD 群 (NASH モデル) では変化が認められなかった (Fig. 23)。この NAFL および NASH モデル肝における CYP4A1 活性の変動は、mRNA/タンパク質発現レベルの挙動と同様であった (Fig. 14, 15)。

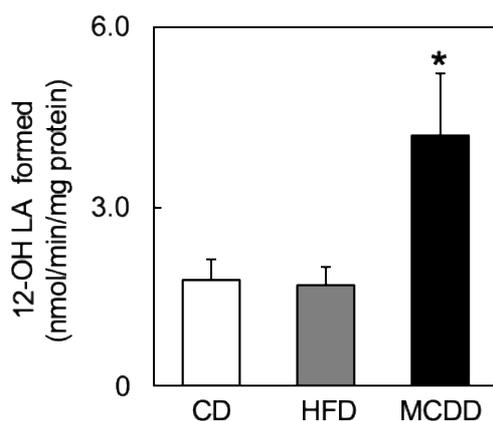


Fig. 23 Changes in CYP 4A1 activities in the liver of CD-, HFD-, or MCDD-fed to rats for 4 weeks. CYP4A1 activities in rat liver microsomes from CD-, HFD-, or MCDD-fed rats toward lauric acid. CYP4A1 activity was determined by measuring ω hydroxylation activity toward lauric acid. 12-Hydroxy lauric acid (12-OH LA) was measured using LC/MS/MS. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 6$ in each group. * $p < 0.05$ vs. control.

第3節 考察

本章では、NAFLおよびNASHモデル肝におけるCYP4A1mRNA/タンパク質発現変動が活性に反映されるか否かを明らかにするために、CYP4A1活性を比較検討した。CYP4Aは、 ω -1水酸化反応よりも ω 水酸化反応を優先的に触媒することが知られている¹¹⁸⁾。実際に本研究においても、ラット肝ミクロソームによるラウリン酸の代謝は、 ω -1水酸化反応よりも ω 水酸化反応が有意に進行した (Fig. 21D)。従って、CYP4A1活性は12-水酸化活性 (12-OH LA 生成量) を指標として評価した。

MCDD摂餌ラット (NASHモデル) において、CYP4A1活性の変動はmRNA/タンパク質発現レベルの挙動と同様であった (Fig. 14, 15, 23)。本研究で作製されたNASHモデルにおけるCYP4A1発現/活性の誘導は、他のNASHモデル動物の報告と類似していた^{107, 108)}。CYP4Aサブファミリーは、脂肪酸の酸化、活性酸素の生成、脂質過酸化、NF- κ Bシグナル伝達経路の活性化などに関与して炎症を誘導することにより、NAFLからNASHへの進行に関連している可能性がある^{104, 105)}。従って、ここで作製されたNASHモデルで見られたCYP4A1発現誘導は、NAFLDの病期進展 (NAFLからNASHへの進行) に密接に関連しているものと推察された。

興味深いことに、近年、ヒトCYP4A11は、アラキドン酸の ω 水酸化反応を触媒することにより生理活性脂質である20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) を生成し¹¹⁹⁾、20-HETEは、TGF- β 1/Smad3 signaling pathwayを介して肝線維化を誘導することが報告されている¹²⁰⁾。さらに、MCDD摂餌CYP4A14ノックアウトマウスでは、MCDD摂餌正常マウスと比較して肝臓の脂質蓄積が有意に低下し、炎症、肝障害および肝線維化も改善されている¹⁰⁶⁾。それゆえ、ヒトCYP4A11を選択的阻害することは20-HETEの生合成を抑制することによりNAFLからNASHへの病期進展を防止できる可能性が考えられ、CYP4A11が新たな治療標的となり得ることを期待させる。このようにNASHにおけるCYP4Aサブファミリーの役割が明らかになりつつある一方で、CYP4AサブファミリーがNAFLからNASHへの進展に関わる役割やそのメカニズムは不明な点が多いのが現状である。本研究で作製されたNAFL/NASHモデルは、NAFLからNASHへの病期進展メカニズム解析やCYP4A選択的阻害による病期進展防止を指向したNASH治療薬の創製研究に有用なソースとなり得るものと考えられる。

第4節 小括

NASH モデルにおける CYP4A1 依存性ラウリン酸 ω 水酸化活性は、その mRNA およびタンパク質発現誘導と相関して NASH モデルで増加し、NAFL モデルにおいては変化しなかった。これらのことから、炎症の誘導に関与するとされている CYP4A1 の発現誘導は、NAFL から NASH への病期進展に密接に関連しているものと推察された。また、CYP4A サブファミリーの発現制御や活性阻害が NAFL から NASH への病期進展防止のための新たな治療標的となり得ることが期待される。さらに、本研究で作製された NAFL および NASH モデルは、NAFL から NASH への病期進展メカニズム解明や CYP4A 選択的阻害による病期進展防止を指向した NASH 治療薬の創製研究に有用なモデルであると考えられた。

第6章 脂肪酸負荷によるラット NAFL 様および NASH 様細胞における CYP1A2 発現変動

第1節 序

本研究において、ラット肝における CYP1A2 の発現/活性が NAFL モデルにおいて上昇し、NASH モデルにおいては逆に正常ラット肝よりも低下することを明らかにした。この反転発現変動のメカニズムを解明するには、分子細胞生物学レベルでの解析が必要である。

脂肪酸は、構造の違いにより炭素 - 炭素間に二重結合を持たない飽和脂肪酸と、一つ以上の二重結合を持つ不飽和脂肪酸に分類され、炭素数や二重結合数の違いにより生物学的作用が異なる。なかでも、一価不飽和脂肪酸であるオレイン酸 (Oleic acid; OA) および飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (Palmitic acid; PA) は、食事中に最も豊富に存在する脂肪酸であり¹²¹⁾、健常者および NAFLD 患者の肝臓中 TG を構成する主要な脂肪酸である¹²²⁾。OA および PA は、細胞への脂肪蓄積作用を有しており、*in vitro* 実験において脂肪変性を誘導するために広く使われている¹²³⁾。一般に、OA および PA では、脂肪蓄積作用の強さや細胞機能への影響が異なる。*In vitro* 実験において OA は、PA よりも細胞への強い脂肪蓄積作用を有することが報告されている¹²⁴⁾。一方で、PA は、細胞への脂肪蓄積作用のほか、NASH 病態に寄与すると考えられている ROS 産生増大による酸化ストレス、ER ストレス、炎症、線維症、ミトコンドリア機能障害 (アポトーシス) などを誘発する作用を有する¹²⁵⁾。また、OA および PA は、脂肪酸による細胞毒性への影響において相反する作用を持つことが知られている。すなわち、OA は、オートファジーを活性化し、細胞における脂肪蓄積を促進することで、脂肪毒性を軽減する作用を持つ一方で、PA は、アポトーシスを誘導し、カスパーゼ依存性 Beclin 1 を介してオートファジーを抑制する作用を持つ^{126, 127)}。Moravcová ら¹²⁸⁾ は、ラット初代培養肝細胞を 0.5 mM OA で単独負荷すると、細胞毒性のない脂肪肝が形成されたのに対して、0.25 mM PA 単独負荷では細胞毒性が顕著に表れることを示している。また、Chen ら¹²⁵⁾ は、HepG2 細胞を PA 単独負荷すると、アポトーシス、酸化ストレス、ER ストレス、ミトコンドリア機能不全、肝細胞の炎症が誘発されることを明らかにしている。いずれの研究においても細胞保護作用を有する OA を共存させると PA 単独による炎症などの細胞毒性が軽減されたものの、OA および PA 共存負荷 (OA+PA 負荷) により単純性脂肪肝ではなく脂肪肝に類似した肝細胞が形成されることが示唆されている^{125, 128)}。これらのことから考えると、ラット初代培養肝細胞の OA 単独負荷により炎症/組織損傷のない脂肪肝に類似した NAFL 様細胞の作製が、OA+PA 負荷により炎症/組織損傷のある脂肪肝に類似した NASH 様細胞を作製が可能であることが想像できる。そこで、NAFL および NASH における CYP1A2 発現調節機序に関する分子細胞生物学的解析に必要なラッ

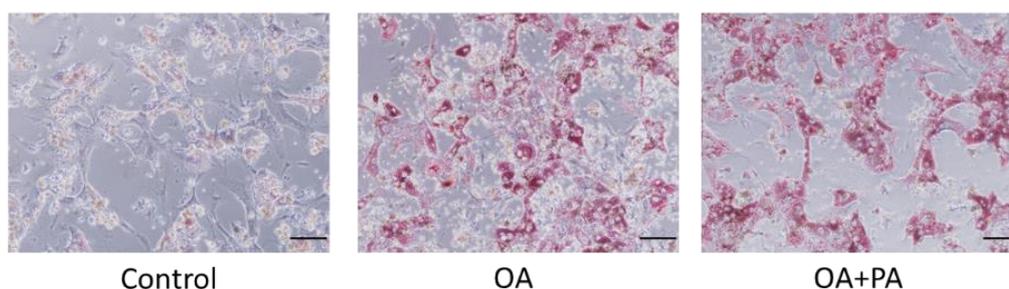
ト NAFL 様および NASH 様細胞を脂肪酸負荷 (OA または OA+PA 負荷) によって作製し、NAFL 様および NASH 様細胞における CYP1A2 タンパク質発現量を比較検討した。

第2節 ラット NAFL 様および NASH 様細胞の作製

2-1 OA および OA+PA 負荷によるラット初代培養肝細胞における脂肪蓄積の評価

OA または OA+PA (OA:PA 組成比 = 2 : 1) 負荷したラット初代培養肝細胞の脂肪蓄積の程度を評価するために、ラット初代培養肝細胞を OA 単独または OA+PA 添加培地で 24 時間培養した。Oil Red O 染色し、顕微鏡観察後、Oil Red O を抽出して、540 nm の吸光度により評価した。その結果、OA 単独または OA+PA 負荷細胞の両群において、対照細胞と比較して顕著な脂肪の蓄積が認められた (Fig. 24A, B)。

(A)



(B)

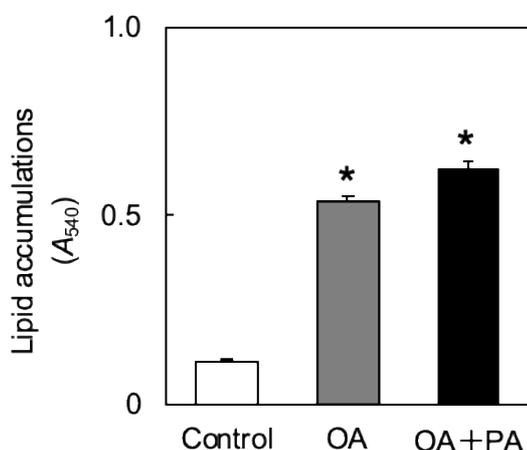


Fig. 24 Lipid accumulations in primary rat hepatocytes treated with OA or a combination of OA and PA

The primary rat hepatocytes were treated with or without OA or a combination of OA (0.5 mM) and PA (0.25 mM) for 24 h. The lipid accumulation in the primary cultured hepatocytes was examined using Oil Red O staining. (A) Microscopic findings of the Oil Red O staining of the primary rat hepatocytes were treated with or without OA or a combination of OA and PA. (Magnification: 100 ×, scale bars: 100 μm). (B) The amounts of stained lipid droplets dissolved in isopropanol were quantified using spectrophotometry at 540 nm. Data are represented as mean ± standard deviation (SD), n = 3 in each group. * $p < 0.05$ vs. 10% FBS-Williams' medium E alone. OA, oleic acid; OA+PA, combination of oleic acid and palmitic acid.

2-2 OA および OA+PA 負荷によるラット初代培養肝細胞における炎症状態の評価

炎症状態では炎症性サイトカインの発現・分泌が亢進していることが知られており、細胞レベル実験において炎症の程度を調べる場合、一般に、Interleukin (IL)-1 β 、IL-6、Tumor Necrosis Factor (TNF)- α などの炎症性サイトカインの発現量を指標として炎症状態の有無が判定されている。そこで、*IL-1 β* mRNA 量を指標として炎症の程度を評価した。ラット初代培養肝細胞を OA 単独または OA+PA 添加培地で 24 時間培養した後、*IL-1 β* mRNA 量を定量的 real-time PCR により評価した。その結果、*IL-1 β* mRNA 発現量は、対照細胞と比較して OA 単独負荷細胞においては有意な差は認められず、OA+PA 負荷細胞において有意に増加した (Fig. 25)。これらの結果と脂肪蓄積の結果を考えあわせると (Fig. 24, 25)、OA 負荷ラット初代培養肝細胞は NAFL 様細胞、OA+PA ラット初代培養肝細胞は NASH 様細胞とみなされた。

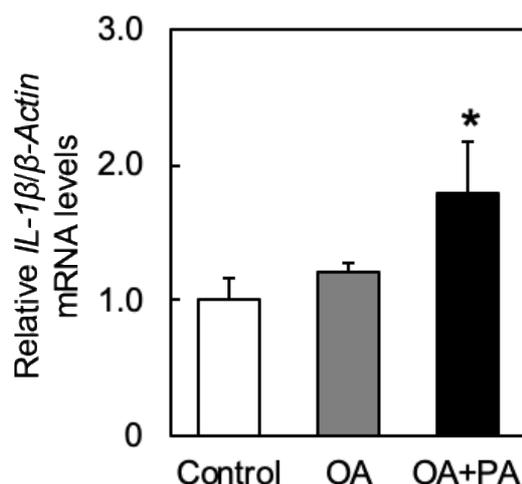


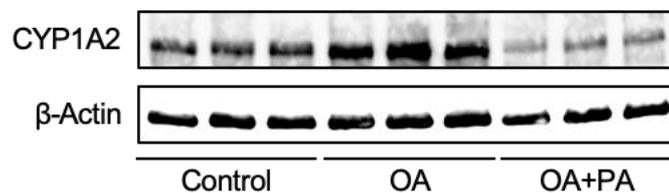
Fig. 25 *IL-1 β* mRNA levels in primary rat hepatocytes treated with OA or a combination of OA and PA

The primary rat hepatocytes were treated with or without OA or a combination of OA (0.5 mM) and PA (0.25 mM) for 12 h. *IL-1 β* mRNA levels were examined via quantitative PCR. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 3$ in each group. * $p < 0.05$ vs. 10% FBS-Williams' medium E alone. OA, oleic acid ; OA+PA, combination of oleic acid and palmitic acid.

第3節 NAFL 様細胞および NASH 様細胞における CYP1A2 発現レベルの変動

NAFL 様細胞および NASH 様細胞における CYP1A2 タンパク質発現レベルを Western blotting により検討した。Fig. 26 に示すように、NAFL 様細胞における CYP1A2 発現量は対照細胞よりも有意に増加し、NASH 様細胞では有意に減少した。この *in vitro* 細胞実験による結果は、ラット NAFL および NASH モデルで認められた CYP1A2 の反転発現変動とよく一致しており、ラット NAFL 様および NASH 様細胞間においても再現されることが示唆された (Fig. 26)。

(A)



(B)

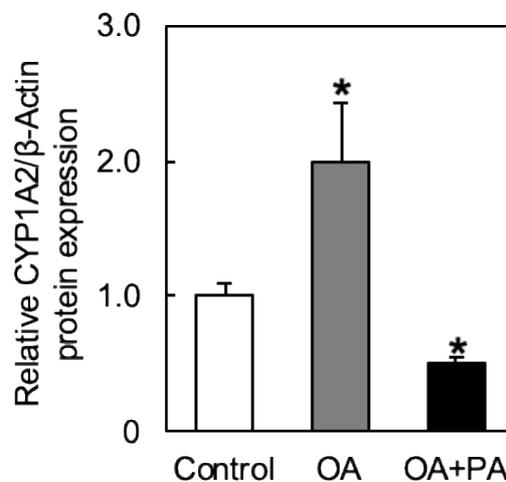


Fig. 26 Changes in expression levels of CYP 1A2 in primary rat hepatocytes treated with OA or a combination of OA and PA.

Primary rat hepatocytes were treated with OA or a combination of OA (0.5 mM) and PA (0.25 mM) for 24 h. (A) Western blots showing CYP1A2 protein in hepatocytes. (B) Quantification of CYP1A2 protein levels. Data are represented as mean \pm standard deviation (SD), $n = 3$ in each group. * $p < 0.05$ vs. 10% FBS-William's medium E alone. OA, oleic acid; OA+PA, combination of oleic acid and palmitic acid.

第4節 考察

本章では、ラット NAFL および NASH モデル間での CYP1A2 の発現/活性の発現反転挙動が、ラット初代培養肝細胞系 (*in vitro* 細胞実験系) においても再現できるか否かを調べるために、ラット初代培養肝細胞を用いて脂肪肝 (NAFL) 様および脂肪肝炎 (NASH) 様細胞を作製し、これらモデル間における CYP1A2 タンパク質発現量の差異を評価した。ラット初代培養肝細胞を OA または OA+PA 負荷したところ、OA および OA+PA 負荷肝細胞のいずれにおいても、細胞における顕著な脂肪蓄積が認められた (Fig. 24)。また、炎症性サイトカインである *IL-1 β* mRNA 量は、正常肝細胞と比較して OA+PA 負荷肝細胞でのみ有意な増加を認めた (Fig. 25)。これら結果から、OA 負荷肝細胞は炎症/組織損傷のない NAFL 様細胞、および OA+PA 負荷肝細胞は脂肪の蓄積に加えて炎症惹起されている NASH 様細胞であると判断された (Fig. 24, 25)。

NAFL 様および NASH 様細胞における CYP1A2 タンパク質発現レベルは、NAFL および NASH モデルで認められた CYP1A2 発現の反転変動と同様に、NAFL モデルでは増加したが、NASH モデルでは減少した (Fig. 26)。本研究で作製された NAFL 様細胞および NASH 様細胞は、Moravcová ら¹²⁸⁾ が作製したものとよく類似しているようである。それゆえ、これらの NAFL 様および NASH 様細胞は、CYP1A2 のみならず、CYP4A サブファミリーの発現機能機序解析や阻害剤探索研究、さらには NAFLD 病期進展による各種 CYP 発現調節および薬物代謝活性変動を解析するための研究に有用であるものと考えられた。

第5節 小括

ラット初代培養肝細胞への OA 負荷および OA+PA 負荷により、いずれにおいても対照細胞と比較して細胞内における顕著な脂肪蓄積を認めた。一方、炎症性サイトカインである *IL-1 β* mRNA 量は、OA+PA 負荷でのみ対照と比較して有意に増加した。これらのことから、OA 負荷肝細胞は、炎症を伴わない脂肪の蓄積による NAFL 様細胞、および OA+PA 負荷肝細胞は脂肪の蓄積と炎症を惹起した NASH 様細胞といえるものと判断された。

CYP1A2 発現レベルは NAFL 様細胞において増加したが、NASH 様細胞では減少した。従って、*in vivo* の NAFL および NASH モデル間で認められた CYP1A2 発現の反転変動が *in vitro* 細胞実験系において再現されることが実証された。

第7章 総括

NAFLD の発症・進展には肥満、耐糖能異常、脂質異常症や高血圧症などの生活習慣病が関連している。それゆえ、NAFLD 患者は複数の医薬品を服用する機会が多く、薬物相互作用の見地から NAFL/NASH における薬物代謝能の変化を考慮する必要がある。しかしながら、NAFLD、特に NAFL における薬物代謝能変動に関する知見は少ない。従って、NAFLD における薬物代謝および薬物動態の変化を解明することは「薬物治療の最適化」を図る上で重要である。これまでに、NAFLD 動物モデルを用いた CYP 分子種の発現/活性の変動に関する研究報告がいくつかあるが、NAFLD の病期進展による CYP 分子種発現/活性の変動に着目して CYP 分子種の発現/活性について NAFL および NASH モデルを同時に比較検討した研究も乏しい。さらに、病態程度の異なる脂肪肝/脂肪肝炎モデルを同時に作製し、単純性脂肪肝および脂肪肝炎における複数の CYP 分子種の発現変動を網羅的に比較検討した研究は見当たらない。そこで本研究は、炎症/組織損傷を伴わない単純性脂肪肝 (NAFL) モデルと炎症/組織損傷を伴う脂肪肝 (NASH) モデルにおける CYP 発現調節に関する差異を明確にすることを目的とした (第1章)。

まず、第2章では、炎症/組織損傷のない脂肪肝モデル (NAFL モデル) と炎症/組織損傷を伴う脂肪肝モデル (NASH モデル) の同時作製を検討した。次いで、第3章では、NAFL および NASH モデルにおける主要な CYP 分子種の発現変動を比較検討した。また、第4章では NAFL および NASH モデル間で相反する発現レベルを示した CYP1A2 の発現変動が、活性の変動に反映されるのか否かを明らかにするために、カフェイン 8-水酸化活性を指標として CYP1A2 依存性薬物代謝能 (活性) を評価した。さらに、第5章では、NASH モデルにおいて認められた CYP4A1 の発現誘導が、活性の変動に反映されるか否かを明らかにするために、ラウリン酸の ω 水酸化活性を指標として CYP4A1 活性を評価した。そして、第6章では、NAFL および NASH モデル間において相反する発現挙動 (発現/活性反転現象) が認められた CYP1A2 の発現調節メカニズムを解明するための第一歩として、ラット初代培養肝細胞から作製した NAFL 様および NASH 様細胞を用いた *in vitro* 細胞実験系にて検討した。以下に本研究で得られた知見を総括する。

1. ラットにおける NAFL および NASH モデルの確立

本研究では、NAFL および NASH における CYP 分子種の発現変動を同時に解析することを目的とし、組織損傷および炎症を伴わない単純性脂肪肝モデル (NAFL モデル) と組織損傷および炎症を伴う脂肪肝モデル (NASH モデル) の同時作製を試みた。

6週齢の雄性 Wistar 系ラットを CD、HFD、MCDD の 3 群に分けて 4 週間摂餌した。体重を 1 週間毎に測定し、飼育終了後、肝湿重量、血漿生化学検査値および肝臓脂質含量を測定した。また、脂肪滴蓄積の程度を Oil Red O および HE 染色により、肝組織の線維化の程度を Azan-Mallory 染色により評価した。Oil Red O 染色では、HFD 群および MCDD 群の両群の肝臓において顕著な脂肪の蓄積が認められた。また、肝臓中の TG は、HFD 群および MCDD 群の両群において CD 群よりも有意に上昇した。HE 染色では、MCDD 群において脂肪滴の特徴である顕著なバルーニングが観察されたのに対して、HFD 群においては明瞭なバルーニングはなく、MCDD 群よりも小さい脂肪滴に留まっていた。したがって、HFD 群は初期の単純性脂肪肝 (NAFL) を表現しているものと考えられた。肝臓組織の線維化を評価するために Azan-Mallory 染色にて解析したところ、MCDD 群においてのみ肝組織の顕著な線維化像が認められた。これを反映して、肝組織損傷マーカーである血漿 AST および ALT 濃度は MCDD 群でのみ有意に増加した。これらのことから、MCDD 群では、炎症から生じる組織線維化が惹起されており、肝組織傷害/炎症および線維化などの病態生理学的特性からヒトにおける NASH を表現しているものと判断された。

以上より、比較的短期間である 4 週間のラットへの HFD 摂餌は、組織損傷や炎症を伴わない単純性脂肪肝 (NAFL) を形成させること、および MCDD の 4 週間摂餌は、組織損傷や炎症を伴う脂肪肝炎 (NASH) を形成させることが示唆された。従って、HFD 群および MCDD 群を、それぞれ NAFL モデルおよび NASH モデルとして、以降の研究に供した。

2. NAFL および NASH モデルにおける CYP 分子種の発現変動の解析

NAFL および NASH モデルにおける各 CYP 分子種の発現変動の差異を明らかにすることを目的として、NAFL/NASH モデルにおける CYP 分子種 (*CYP1A1*, *1A2*, *2B1*, *2C6*, *2C11*, *2D1*, *2D2*, *2E1*, *3A1*, *4A1*) の mRNA 量を定量的 real-time PCR にて評価した。その結果、*CYP1A2* 以外の CYP 分子種 mRNA 量は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) においてほとんど変化しなかったが、MCDD 群 (NASH モデル) において *CYP2C6*, *2C11*, *2D1*, *2D2*, *2E1* および *3A1* の mRNA 量が有意に減少した。興味深いことに、*CYP1A2* mRNA 量は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) において有意に増加し、MCDD 群 (NASH モデル) では有意に減少した。一方、*CYP1A1* および *4A1* mRNA 量は、NAFL モデルでは変化しなかったのに対して、NASH モデルにおいて顕著に増加した。さらに、*CYP1A1*, *1A2*, *2C6*, *2D1*, *3A1* および *4A1* のタンパク質発現レベルを Western blotting にて比較検討したところ、mRNA の変動と同様の挙動を示した。

従来から、ヒトにおける組織損傷や炎症を伴う肝疾患では、CYP 分子種の発現低下によって薬物代

謝能が低下すると考えられている。しかし、本研究において、CYP1A2 の発現は NAFLD 病期初期にあたる NAFL 期で誘導され、炎症・線維化を伴う NASH 期では逆に正常肝よりも低下することが見出された。さらに、CYP1A1 および 4A1 の発現は、既報と同様に、NAFL では変化しないが NASH において上昇することが示唆された。これらの知見は、NAFLD 病期進展と各 CYP 分子種による薬物代謝能との関係性および薬物動態変動を考慮する上で重要な基礎データになり得るものと考えられた。

3. CYP1A2 依存性薬物代謝活性の NAFL および NASH モデル間における反転変動

NAFL および NASH モデル間で相反する発現レベルを示した CYP1A2 は、気管支拡張薬テオフィリンや抗精神薬クロザピンなどの TDM の対象となる薬物の代謝に関与する。そこで、CYP1A2 の発現変動が薬物代謝能（活性）の変動に反映されるのか否かを明らかにするために、CYP1A2 依存性薬物代謝活性は、ラット肝ミクロソームにおけるカフェイン 8-水酸化活性を指標として評価した。その結果、CYP1A2 の活性は、CD 群と比較して HFD 群 (NAFL モデル) において有意に増加し、MCDD 群 (NASH モデル) では有意に減少した。この NAFL および NASH モデル間における CYP1A2 活性の反転現象は、mRNA/タンパク質発現レベルの挙動とよく一致していた。このことは、NAFLD の初期段階の NAFL における CYP1A2 依存性薬物代謝能が上昇することにより血中未変化体濃度が低下する可能性、および NASH においては、代謝能低下による血中未変化体濃度の増加が生じる可能性を示唆している。従って、今後、CYP1A2 によって代謝を受ける薬物による「薬物治療の最適化」を図るためには、NAFL および NASH 患者における薬物代謝および薬物動態の解析が必要であると考えられた。

4. NASH モデルにおける CYP4A1 依存性脂肪酸のω水酸化反応の亢進

CYP4A サブファミリーは脂肪酸のω水酸化反応を触媒する酵素である。そこで、ラット肝ミクロソームにおける CYP4A1 活性をラウリン酸の 12-水酸化体（ω水酸化体）である 12-OH LA の生成量を指標として LC/MS/MS にて定量的に評価した。その結果、CYP4A1 の活性は、その mRNA/タンパク質発現変動と同様に NAFL モデルでは変化せず、NASH モデルにおいて有意に増加した。最近、ヒト CYP4A11 (ラット CYP4A1 に相当する) は、アラキドン酸のω水酸化によって生理活性脂質である 20-HETE に変換し、この 20-HETE は TGF-β1/Smad3 シグナル伝達を介して肝線維化を誘導することが報告されている。NASH モデルでの CYP4A1 の発現上昇は、動物種は異なるものの以前の報告と変動が一致しており、本研究で作製したラット NASH モデルにおいても再現された。それゆえ、NASH における CYP4A1 発現/活性の誘導は脂肪肝における持続的炎症とそれに続く組織線維化に関与するものと推察された。このことは、CYP4A サブファミリーの阻害や発現抑制が NAFL から NASH への病期

進展防止のための新たな治療標的となり得ることを示唆している。

5. 脂肪酸負荷によるラット NAFL 様および NASH 様細胞における CYP1A2 発現変動

本研究において、ラット肝ミクロソームにおける CYP1A2 の発現/活性が NAFL モデルにおいて上昇し、NASH モデルにおいては逆に正常ラット肝よりも低下することを明らかにした。この反転変動のメカニズムを解明するには、分子細胞生物学レベルでの解析が必要である。そこで、NAFL および NASH における CYP1A2 発現調節機序解析の一步として、ラット初代培養肝細胞の NAFL 様および NASH 様細胞の作製を試みた。正常ラット肝臓から常法により採取した肝細胞を OA 単独負荷により炎症/組織損傷のない NAFL 様細胞が作製された。また、飽和脂肪酸が ER ストレスや酸化ストレスを介して線維化を誘導することを利用して、OA+PA 負荷によって脂肪蓄積と炎症が惹起された NASH 様細胞が作製された。CYP1A2 タンパク質発現レベルは、OA 負荷肝細胞 (NAFL 様細胞) では増加したが、OA+PA 負荷肝細胞 (NASH 様細胞) では減少した。従って、NAFL において正常肝よりも上昇した CYP1A2 の発現/活性が NASH において逆に正常肝よりも低下した要因の一つとして、炎症や線維化の有無が影響している可能性が示唆された。これらのことから、NAFL および NASH モデル間において認められた CYP1A2 発現の反転変動が初代培養肝細胞系においても再現されることが示された。また、本研究で作製された NAFL 様細胞および NASH 様細胞は既報によるものとよく類似しており、本研究で作製された NAFL 様細胞および NASH 様細胞は、CYP1A2 のみならず、CYP4A サブファミリーの発現機能機序解析や阻害剤探索研究、さらには NAFLD 病期進展による各種 CYP の発現調節および薬物代謝活性変動を解析するために有用であるものと考えられた。

以上より、比較的短期間の 4 週間 HFD または MCDD 摂餌ラットにより、炎症/組織損傷のない単純性脂肪肝 NAFL モデルおよび炎症/組織損傷ならびに線維化を伴う脂肪肝 NASH モデルがそれぞれ作製された。CYP 分子種のうち、CYP1A2 の発現/活性は NAFLD 病期初期にあたる NAFL 期において正常ラット肝よりも誘導され、炎症/組織損傷および線維化を伴う NASH 期においては逆に正常肝よりも低下することを初めて明らかにした。また、NASH における CYP4A1 発現/活性の上昇は NAFL から NASH への病期進展に関与するものと推察された。ラット NAFL 様および NASH 様細胞を用いた *in vitro* 細胞実験系において、*in vivo* の NAFL および NASH モデル間で認められた CYP1A2 発現の反転変動が再現されることが実証された。CYP 分子種の発現変動がヒトでも同様であると想定すると、本研究で得られた知見は、NAFLD 病期進展と各 CYP 分子種による薬物代謝能との関係性および薬物動

態変動を考慮する上で重要な基礎データになり得るとともに、NAFLD 病期進展による CYP 分子種の発現変動を考慮して「薬物治療の最適化」を図る必要があることを提唱するものである。

実験の部

実験材料

1. 試薬

普通食 (control diet; CD、11% calories from fat)(cat. D12450B)、高脂肪食 (high-fat diet; HFD、60% calories from fat) (cat. D12492) およびメチオニン・コリン欠乏食 (methionine-choline-deficient diet; MCDD)(cat.A02082002B)は、Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ, USA) から購入した。コレステロール (T-Cho) E-テストワコー、遊離コレステロール (F-Cho) E-テストワコー、トリグリセライド (TG) E-テストワコー、遊離脂肪酸 (NEFA) C-テストワコー、トランスアミナーゼ (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)) C II-テストワコー、グルコース (Glu) C II-テストワコー、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、10%中性緩衝ホルマリン溶液、tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)、イソフルラン、トリプシンインヒビター、コラゲナーゼ、radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer、Protease Inhibitor Cocktail、ImmunoStar LD および ImmunoStar Zeta は、FUJIFILM Wako Pure Chemical Co. (Tokyo, Japan) から購入した。Lipid extraction kit (cat. STA-612) は、Cell Biolabs Inc. (San Diego, CA, USA) から購入した。Lipid assay kit (cat. AK09F) は Cosmo Bio Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) は、Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。ISOGEN-LS および ISOGEN- II は、Nippon Gene Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix および Thunderbird SYBR NEXT qPCR Mix は、Toyobo Co., Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。Polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) 膜は、Millipore Sigma (Bedford, MA, USA) より購入した。抗ラット CYP1A1 抗体 (cat. ab79819) は、Abcam (Cambridge, UK) から購入した。抗ラット CYP1A2 抗体 (cat. sc-53241)、抗ラット CYP2C6 抗体 (cat. sc-53245)、抗ラット CYP3A1 抗体 (cat. sc-53246)、および抗ラット CYP4A1 抗体 (cat. sc-53248) は、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA) から購入した。抗ラット CYP2D1 抗体 (cat. 17868-1-AP) は、Proteintech Group, Inc. (Rosemont, IL, USA) から購入した。オレイン酸ナトリウム、パルミチン酸ナトリウム、L-グルタミン、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free 10 mM phosphate-buffered saline (PBS (-))、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液、bicinchoninic acid 溶液、bovine serum albumin (BSA)、細胞培養用 fatty acid, endotoxin-free BSA、HRP 標識抗ラット β -actin 抗体 (cat. A3854)、Williams' medium E 培地、Eagle's minimal essential medium (EMEM) 培地および Ca^{2+} , Mg^{2+} -free Hanks' balanced salt solution、12-Hydroxylauric acid (12-OH LA) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入し

た。HRP 標識抗マウス IgG 抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) から購入した。Hyclone™ 細胞培養用ウシ血清 (fetal bovine serum; FBS) は、Cytiva (Marlborough, MA, USA) から購入した。セルストレイナー (40 μm) は、Corning (Corning, NY, USA) から購入した。4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) および *O,O'*-Bis(2-aminoethyl)ethyleneglycol-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) は、Dojindo Lab. (Kumamoto, Japan) から購入した。1,3,7-Trimethyluric acid は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。11-Hydroxylauric acid (11-OH LA) は Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada) から購入した。コラーゲンコート 6 ウェルプレートおよび 24 ウェルプレートは、AGC Techno Glass Co. Ltd. (Shizuoka, Japan) から購入した。すべて化学物質は、市販の高純度または HPLC 用、LC/MS 用のものを使用した。

2. 分析機器

2-1 分光光度計

Multiskan Sky High マイクロプレート分光光度計 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

2-2 顕微鏡

Olympus IX71 (Olympus Co., Tokyo, Japan)

2-3 高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography; HPLC)

HPLC 装置 : HITACHI GL-7450 (HITACHI Ltd., Tokyo, Japan)

UV 検出器 : HITACHI L-7400 (HITACHI Ltd., Tokyo, Japan)

ポンプ : HITACHI L-7110 (HITACHI Ltd., Tokyo, Japan)

2-4 液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry; LC/MS/MS)

AB SCIEX QTRAP® 6500 system (AB Sciex LLC, MA, USA)

2-5 リアルタイム PCR 装置

StepOne Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, CA, USA)

2-6 ゲル撮影・イメージング 高感度化学発光・蛍光・可視光イメージング装置

WSE-6100H LuminoGraph I (ATTO Co., Tokyo, Japan)

3. 実験動物、飼料

雄性 Wistar 系ラット (5 週齢、体重 100–120 g) を Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan) から購入した。購入後、飼育室にて 22°C、12 時間の明暗サイクル、相対湿度 55% の環境で通常の実験食 (CE-2)(CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan)を与えて 1 週間馴化させた。その後、CD、HFD、MCDD 給餌の 3 群 (各群 n=6) に分けて 4 週間給餌した。なお、食餌と水は自由に摂取させ、2–3 日毎に食餌の補充および交換を行なった。動物実験は、日本薬科大学動物実験倫理委員会の承認 (承認番号: AE2021–003) 得て実験を行った。

4. 血漿および肝臓の採取

飼育期間終了後に一晩絶食を行い、イソフルラン麻酔下で心臓から全血採血した後、肝臓を摘出した。また、心臓から採血した血液は、ヘパリン処理し、遠心分離 (3,000 × g, 10 min, 4°C) 後、血漿を分取した。分取した血漿は分析まで–80°Cで保存した。

5. 細胞画分の調製

ラット肝臓に肝湿重量の 4 倍量の 1.15% KCl 溶液を含むホモジネート緩衝液 (10 mM phosphate buffer (pH7.4)) を加え、Potter-Elvehjem homogenizer を使用してホモジナイズし、肝ホモジネート液を調製した。肝ホモジネート液を遠心分離 (9,000 × g, 20 min, 4°C) して S9 画分を得た。さらに、S9 画分を超遠心機にて遠心分離 (105,000 × g, 60 min, 4°C) 後、沈殿を得た。可溶性画分を含む得られた沈殿を 2 倍量のホモジネート緩衝液に再懸濁した後、遠心分離 (105,000 × g, 60 min, 4°C) により再沈殿させた。沈殿物を肝湿重量と等量のホモジネート緩衝液に懸濁し、肝ミクロソーム画分を得た。肝ミクロソーム画分は実験に使用するまで–80°Cで保存した。

6. タンパク濃度の測定

肝組織の細胞画分または細胞溶解液のタンパク質濃度は Bicinchoninic acid (BCA) 法で測定した¹²⁹⁾。プレートリーダーに検量線用標準タンパク質としてウシ血清アルブミン肝組織の酵素溶液 (肝ミクロソーム画分) または細胞溶解液を 20 μL ならびに BCA/CuSO₄ · 5 H₂O (50:1) を 200 μL 入れ、37°C で 30 分間静置後、分光光度計 (562 nm) で測定した。

第2章に関する実験

1. 各種染色による肝臓の組織学的解析

ラットから摘出した肝臓を5 mm 四方に切断し、10%中性緩衝ホルマリン液で一晩固定した。その後、20%スクロース溶液中に一晩保存し、続いて30%スクロース溶液に置換して再び一晩保存した後、O.C.T. Compound (Sakura Seiki, Tokyo, Japan) を用いて封入した。クライオスタットを使用して凍結切片を作製し、22°Cで一晩乾燥させて凍結切片を各染色法にて染色を行った。

1-1 Oil red O 染色

Oil red O 原液 (イソプロパノール溶液) を精製水にて60%に希釈し、15分静置した。その後、フィルター (0.45 μm) をろ過し、Oil red O 染色液を調製した。凍結切片を精製水で5分間洗浄し、調製した Oil red O 染色液を用いて22°C、30分間染色した。続いて、精製水および60%イソプロパノールで洗浄し、37°Cで3時間乾燥させてグリセロール (水溶性封入材) を封入し、標本を得た。得られた標本は、光学顕微鏡で観察した。

1-2 HE 染色

凍結切片を精製水で洗浄し、ヘマトキシリン染色液で10分間染色した後、精製水で5分間洗浄した。その後、エオジン染色液で5分間染色を行った。70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール、無水エタノール、無水エタノール・キシレン (1:1)、キシレンの順で脱水・透徹を行った後、マウントクイック (Daido Sangyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) (非水溶性封入材) を用いて封入し、標本を得た。得られた標本は、光学顕微鏡で観察した。

1-3 Azan-Mallory 染色

凍結切片を精製水で洗浄し、アゾカルミン G 液で10分間染色した後、精製水で5分間洗浄した。その後、アニリンアルコールで分別し、1%エタノールおよび精製水で洗浄した。その後、5%りんタングステン酸で15分間媒染し、精製水で洗浄した。その後、アニリン青・オレンジ G で5分間染色した。70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール、無水エタノール、無水エタノール・キシレン (1:1)、キシレンの順で脱水・透徹を行った後、マウントクイックを用いて封入し、標本を得た。得られた標本は、光学顕微鏡で観察した。

2. 血漿生化学分析

「実験材料」4.で調製した血漿の T-Cho、F-Cho、TG、NEFA、ALT、AST および Glu 濃度は、それぞれ対応する測定キットを用いて酵素法により測定した。

3. 肝臓脂質の測定

「実験材料」5.で調製した肝ホモジネート液より、Lipid extraction kit を用いて肝臓脂質を抽出した。肝臓脂質中の T-Cho、F-Cho、TG、および NEFA 含有量は、それぞれ対応する測定キットを用いて酵素法により測定した。

4. 統計解析

各データは、6 例の平均値および標準偏差で表した。統計処理はすべて、一元配置分散分析を行なった後、Dunnett's test 法にて有意差検定した。計算には R ソフトウェア (R Development Core Team) を使用し、統計的有意性は $p < 0.05$ とした。

第 3 章に関する実験

1. RNA の抽出と定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)

1-1 mRNA の抽出

「実験材料」5.で調製した肝ホモジネート液から ISOGEN-LS を用いて全 RNA を抽出した。RNA 濃度は、分光光度計 (260 nm) を用いて測定した。

1-2 定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)

抽出した RNA から ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて逆転写し、cDNA を合成した。得られた cDNA を Thunderbird Next SYBR qPCR Mix および StepOne™ real-time PCR system を用いて qPCR にて、ラット *CYP 1A1*、*1A2*、*2B1*、*2C6*、*2C11*、*2D1*、*2D2*、*2E1*、*3A1*、*4A1* および β -actin mRNA 発現量を測定した。qPCR に使用したプライマー配列を Table 6 に示す。mRNA 量は $\Delta\Delta Ct$ 法¹³⁰⁾ を使用して計算され、内部標準である β -actin mRNA 量に対して標準化した。

Table 6 Primer sequences used for quantitative PCR.

	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
<i>β-actin</i>	TGTCACCAACTGGGACGATA	GCATGAGGGAGCGCGTAA
<i>CYP1A1</i>	ACGTGAGCAAAGAGGCTGAA	TCGTGGTCATAACGTCTGCC
<i>CYP1A2</i>	TCGAACCAGTCAACCAGGTG	GTCCTTGCTGCTCTTCACGA
<i>CYP2B1</i>	AGGACCATGGAGCCCAGTAT	AGAAATCCTCAGCTTGGCCC
<i>CYP2C6</i>	TTGCTCCTGCTGAAGTGTCC	AATGTCACAGGTCACCGCAT
<i>CYP2C11</i>	CAGTCCTAGTCCTGGTGCTCACT	CTGAAGGGTGTTCCTCAATGATTG
<i>CYP2D1</i>	TTGGTCATTTGTCTTTGGGAGC	CACAGGCCAGTCCCATTTCAG
<i>CYP2D2</i>	CACCTTACGGACCTGAGTGG	GGCAATCACGTTGCTCACAG
<i>CYP2E1</i>	TCCCCAAGTCTTTCACCAAGTT	GAGCCAAGGTGCAGTGTGAAC
<i>CYP3A1</i>	CCTCTGTTTGCCATCACGGA	GACAGGTTTGCTTTCTCTTGC
<i>CYP4A1</i>	AGGAGCGAGGAACTGCATTG	CGGAGCTCCACAACGGAAT

2. Western blotting 解析 (ウェスタンブロット解析)

「実験材料」5.で調製した肝ミクロソーム中の各 CYP 分子種タンパク質発現量を測定した。肝ミクロソームを 2×Sample buffer (125 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.2% sodium dodecyl sulfate, 20% glycerol, 0.04% bromophenol, 0.1 M dithiothreitol) との混合比が 1:1 となるように混合し、5 分間煮沸してサンプルを調製した。1 レーンあたり 40 μg のタンパク質量のサンプルを 10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、PVDF 膜 (ブロッティング膜)(Millipore Sigma, Bedford, MA, USA) に転写した。さらに、ブロッティング膜を Blocking buffer (2% Skim milk in T-TBS (20 mM Tris-HCl buffered saline containing 0.05% Tween20)) にて、22°C、2 時間インキュベーションし、ブロッキング処理をした。ブロッキング後、ブロッティング膜は T-TBS で 5 分間の振盪洗浄を 3 回行った後、一次抗体を用いて 22°C、2 時間インキュベーションし、T-TBS で 5 分間の振盪洗浄を 3 回行った。その後、HRP 標識二次抗体を用いて 22°C、1 時間インキュベートした。検出は化学発光試薬を用いて、化学発光撮影装置で検出した。各 CYP 分子種の CYP タンパク質発現量は、内部標準であるβ-actin タンパク質発現量に対して標準化し、CS Analyzer 4 ソフトウェア (ATTO, Tokyo, Japan) で解析した。

3. 統計解析

統計解析は、「第 2 章に関する実験」4.と同じ方法で行なった。

第4章に関する実験

1. 酵素反応

カフェインの代謝反応では、酵素溶液（肝ミクロソーム画分、最終濃度：1.6 mg protein/mL）にカフェイン（最終濃度：1 mM）、NADPH（最終濃度：10 mM）および0.1 M Na/Kリン酸緩衝液（pH 7.4）を加えた溶液（全量 2 mL）を酵素反応溶液とした。なお、添加した酵素溶液は酵素反応溶液の 1/10 とした。37°Cで5分間プレインキュベーション後、カフェインを加えて好氣的条件下、20分間インキュベーションし、2 mLの2%硫酸亜鉛/0.2 mM HCl 溶液を加えて反応をただちに停止させた。溶液を5 mLの内部標準（7-(2-hydroxypropyl)theophylline）を含む酢酸エチル溶液で2回抽出した。得られた有機層を減圧留去し、残渣をアセトニトリル 200 μ L で溶解し、コスモナイスフィルターS (0.45 μ m) を用いてろ過したものを HPLC 測定用試料とした。

2. HPLC-UV 測定

HPLC-UV の条件を以下に示す。なお、試料の測定は各試料 20 μ L を HPLC に注入し、HPLC クロマトグラムの解析は GL サイエンスのソフトウェアで行った。

分析カラム：CAPCELLPAK C18 UG120 column (particle size 5 μ m, 4.6 \times 250 mm)

(Shiseido Co., Ltd., Tokyo, Japan)

カラム温度：40°C

UV 検出波長：254 nm

試料注入量：20 μ L

溶離液：アセトニトリル：0.1%ギ酸=5：95

流速：1.0 mL/min

試料注入量：20 μ L

保持時間：1,3,7-Trimethyluric acid (13.2 min); 7-(2-hydroxypropyl)theophylline (26.1 min)

3. 統計解析

統計解析は、「第2章に関する実験」4.と同じ方法で行なった。

第5章に関する実験

1. 酵素反応

ラウリン酸の代謝反応では、酵素溶液（肝ミクロソーム画分、最終濃度：0.4 mg protein/mL）にラウリン酸（最終濃度：25 μ M）、NADPH（最終濃度：1 mM）および0.1 M Na/K リン酸緩衝液（pH 7.4）を加えた溶液（全量 200 μ L）を酵素反応溶液とした。なお、添加した酵素溶液は酵素反応溶液の 1/40 とした。37°Cで5分間プレインキュベーション後、ラウリン酸を加えて好氣的条件下、5分間インキュベーションした。反応は内部標準（12-OH LA-d20）を含むアセトニトリルを酵素反応溶液の2倍量を加えて氷冷下で停止させた。30分間氷冷下で放置後、冷却遠心機で遠心分離（14,000 \times g, 15 min, 4°C）し、上清をコスモナイスフィルターS（0.45 μ m）でろ過し、LC/MS/MS測定用試料とした。

2. LC/MS/MS測定

<LC/MS/MS条件>

分析カラム：InertSustain C8 column (length 100 mm, i.d. 2.1 mm, particle size 3 μ m)
(GL Sciences, Tokyo, Japan)

カラム温度：40°C

検出：・ Negative ion mode

・ Product ion scan mode (precursor ion, m/z 215.2) for identification

・ Multiple reaction monitoring mode for quantification

(12-OH LA, 11-OH LA: m/z 215.2/169.2, m/z 215.2/197.2)

(12-OH LA-d20: m/z 235.2/188.2)

・ Ion source temperature 400 °C

・ Ionization voltage 4500 V

・ Ion source gas 1 : 60 psi, ion source gas 2 : 60 psi,
curtain gas: 30 psi, collision gas: 10 psi.

試料注入量：5 μ L

溶離液：(A) 0.1% formic acid in water : (B) 0.1% formic acid in acetonitrile
Gradient B% (min) = 30 (0-3) \rightarrow 100 (8-11) \rightarrow 30 (11-15)

流速：0.35 mL/min

保持時間：11-OH LA (5.4 min); 12-OH LA (5.5 min); 12-OH LA-d20 (5.4 min)

3. 統計解析

統計解析は、「第2章に関する実験」4.と同じ方法で行なった。

第6章に関する実験

1. ラット初代肝細胞の採取と培養

ラットの初代培養肝細胞は、雄性 Wistar 系ラット (6 週齢、体重 120–140 g) を使用し、Two step コラゲナーゼ灌流法により単離した¹³¹⁾。ラットをイソフルランで麻酔し、開腹後、上大静脈を結紮し、下大静脈にカニューレを挿入し、前灌流液 (10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 4.2 mM sodium hydrogen carbonate in Ca^{2+} , Mg^{2+} -free Hanks' balanced salt solution (pH 7.2)) を用いて 30 mL/min で 5 分間肝灌流した。その後、コラゲナーゼ液 (10 mM HEPES, 5 mM calcium chloride, 4.2 mM sodium hydrogen carbonate, 0.005% trypsin inhibitor, 0.05% collagenase in Ca^{2+} , Mg^{2+} -free Hanks' balanced salt solution (pH 7.5)) を 30 mL/min で 5 分間肝灌流した。肝灌流後、肝臓を摘出し、コラゲナーゼ液 30 mL 中で肝臓を分散させ、粗肝細胞溶液を滅菌ガーゼでろ過をした。ろ液を $700 \times g$ で 6 分間遠心分離した。上清を除去し、EMEM 30 mL で再懸濁し、懸濁液を $700 \times g$ で 6 分間遠心分離し、この操作を 2 回繰り返した。その後、10%FBS、2 mM グルタミン、100 units/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを含む Williams' medium E (以下、10% FBS-Williams' medium E) 30 mL で懸濁し、セルストレイナー (40 μm) でろ過した。細胞数は、Trypan blue 法により計測した。肝細胞溶液を 10% FBS-Williams' medium E にて 4×10^5 cells/mL に調製し、コラーゲンコート細胞培養用 6 ウェルプレート (1.2×10^6 cells/well) または 24 ウェルプレート (2×10^5 cells/well) に肝細胞を播種し、37°C、5% CO_2 の条件下で一晩培養し、実験に供した。

2. ラット初代培養肝細胞における脂肪肝モデルおよび脂肪肝炎モデルの作製

オレイン酸ナトリウム (OA, 3 mM)、または オレイン酸ナトリウムとパルミチン酸ナトリウムを 2 : 1 (OA 3 mM : PA 1.5 mM) の割合で混合したものと BSA (1.5 mM) を超音波破碎機にて完全に溶解させた。10% FBS-Williams' medium E 培地で実験濃度 (OA: 0.5 mM または OA+PA: 0.5 mM OA および 0.25 mM PA) まで希釈し、肝細胞を 12 または 24 時間培養した。

3. Oil red O 染色による初代培養肝細胞の組織学的解析

培養終了後、24 ウェルプレート各ウェルから培養液を除き、PBS (-)(1 mL/well) で2回洗浄後、10%中性緩衝ホルマリン液 (300 μ L/well)を加えて、室温で15分間放置し、細胞を固定した。10%中性緩衝ホルマリン液を除き、Oil Red O 染色液 (60%イソプロパノール溶液)(300 μ L/well) を加えて30分間染色した。染色後、Oil Red O 染色液 (60%イソプロパノール) を除き、細胞を60%イソプロパノール (1 mL/well) で1回洗浄後、さらにPBS (-)(1 mL/well) で2回洗浄した。PBS (-)(500 μ L/well) を加え、光学顕微鏡にて観察した。鏡検後、PBS(-)を除き、37°Cで乾燥させた。乾燥させた後、Solvent for Oil Red O Extraction を加えて、30分間放置した。その後、24well プレートから96well プレートに100 μ L 取り、540 nm における吸光度を測定することにより数値化した。

4. 定量的 real-time PCR によるラット *IL-1 β* mRNA レベルの解析

4-1 ラット初代肝細胞からの mRNA の抽出

培養終了後、24 ウェルプレート各ウェルから培養液を除き、PBS (-)(1 mL/well) で2回洗浄後、ISOGEN-II を用いて全 RNA を抽出した。RNA 濃度は、分光光度計 (260 nm) を用いて測定した。

4-2 定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR)

ラット *IL-1 β* および β -actin のプライマー配列を Table 7 に示す。「第3章に関する実験」の1-2と同じ方法で実験を行った。

Table 7 Primer sequences used for quantitative PCR.

	Forward (5' \rightarrow 3')	Reverse (5' \rightarrow 3')
<i>β-actin</i>	TGTCACCAACTGGGACGATA	GCATGAGGGAGCGCGTAA
<i>IL-1β</i>	ACAAGGAGAGACAAGCAACGAC	TCTTCTTTGGGTATTGTTTGGG

5. CYP1A2 のウェスタンブロット解析

培養終了後、6 ウェルプレート各ウェルから培養液を除き、PBS (-)(2 mL/well) で2回洗浄後、細胞をPBS (-)(1 mL/well) で細胞を回収し、冷却遠心機で遠心分離 (2,000 \times g, 2 min, 4°C) し、上清を除去した。沈殿に Protease Inhibitor Cocktail を加えた RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM sodium chloride, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate) を加えて超音波で破碎し、冷却遠心機で遠心分離 (14,000 \times g, 15 min, 4°C) し、上清を細胞溶解液とした。細胞溶解液のタンパク質濃度を BCA 法¹²⁹⁾ で測定した。細胞溶解液を 2 \times Sample buffer との混合比が 1:1 と

なるように混合し、5 分間煮沸してサンプルを調製した。1 レーンあたり 20 μg のタンパク量のサンプルを 10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。ウェスタンブロットは、「第 3 章に関する実験」の 2 と同じ方法で実験を行った。

6. 統計解析

統計解析は、「第 2 章に関する実験」4. と同じ方法で行なった。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導・ご鞭撻を賜りました日本薬科大学薬学部 衛生薬学分野教授 樋口 敏幸 先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の遂行するにあたり、終始ご指導を賜りました日本薬科大学薬学部 衛生薬学分野講師 浦丸 直人 先生、同 長部 誠 先生に厚くお礼申し上げます。

本研究の LC/MS/MS 分析に際し、ご指導頂きました日本薬科大学薬学部 分子機能科学分野講師 三熊 敏靖 先生に感謝申し上げます。

本研究の審査にあたり、有益なご助言とご高閲を賜りました日本薬科大学薬学部 井上 俊夫 教授、瀧沢 裕輔 准教授に心から感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なるご協力を頂きました日本薬科大学 衛生薬学分野の皆様心から感謝申し上げます。

研究する機会と支援を頂きました独立行政法人 国立病院機構 東京医療センター薬剤部の先生方に感謝申し上げます。

最後に、このように勉強する環境を与え、支えてくれた家族に感謝申し上げます。

令和6年3月

川嶋 梓

参考文献

1. Curry SH. Drug distribution and effect. *J R Coll Physicians Lond.* 1970; 4 (4): 315-334.
2. 薬物代謝概論. 薬物代謝学 医療薬学・医薬品開発の基礎として. 第 3 版. 東京: 東京化学同人; 2010. p. 3-10
3. Tsunoda SM, Gonzales C, Jarmusch AK, Momper JD, Ma JD, Contribution of the Gut Microbiome to Drug Disposition, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Variability. *Clin Pharmacokinet.* 2021; 60 (8): 971-984.
4. Palatini P, De Martin S, Pharmacokinetic drug interactions in liver disease: An update. *World J Gastroenterol.* 2016; 22 (3): 1260-1278.
5. Kleinbloesem CH, van Harten J, Wilson JP, Danhof M, van Brummelen P, Breimer DD, Nifedipine: kinetics and hemodynamic effects in patients with liver cirrhosis after intravenous and oral administration. *Clin Pharmacol Ther.* 1986; 40 (1): 21-28.
6. Kalam, M.N., Rasool, M.F., Alqahtani, F., Imran, I., Rehman, A.U., Ahmed, N, Development and evaluation of a physiologically based pharmacokinetic drug-disease model of propranolol for suggesting model informed dosing in liver cirrhosis patients. *Drug Des. Devel. Ther.* 2021; 15: 1195-1211.
7. Lipitor® [package insert]. Canonsburg, P.A, (2022): Available at: [Accessed 2023 May 10]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2022/020702Orig1s079correctedlbl.pdf
8. 個人差・種差・病態・栄養による薬物代謝の変動. 薬物代謝学 医療薬学・医薬品開発の基礎として. 第 3 版. 東京: 東京化学同人; 2010. p. 140-160
9. Manikandan P, Nagini S, Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets.* 2018; 19 (1): 38-54.
10. Zhao M, Ma J, Li M, Zhang Y, Jiang B, Zhao X, Huai C, Shen L, Zhang N, He L, Qin S, Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (23): 12808.
11. Zanger UM, Schwab M, Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013; 138 (1): 103-141.
12. Gandhi A, Moorthy B, Ghose R, Drug disposition in pathophysiological conditions. *Curr Drug*

- Metab.* 2012; 13 (9): 1327-1344.
13. Zhou J, Wen Q, Li SF, Zhang YF, Gao N, Tian X, Fang Y, Gao J, Cui MZ, He XP, Jia LJ, Jin H, Qiao HL, Significant change of cytochrome P450s activities in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2016; 7 (31): 50612-50623.
 14. Adedoyin A, Arns PA, Richards WO, Wilkinson GR, Branch RA, Selective effect of liver disease on the activities of specific metabolizing enzymes: investigation of cytochromes P450 2C19 and 2D6. *Clin Pharmacol Ther.* 1998; 64 (1) :8-17.
 15. George, J., Liddle, C., Murray, M., Byth, K., Farrell, G.C, Pre-translational regulation of cytochrome P450 genes is responsible for disease-specific changes of individual P450 enzymes among patients with cirrhosis. *Biochem. Pharmacol.* 1995; 49: 873-881.
 16. Yang LQ, Li SJ, Cao YF, Man XB, Yu WF, Wang HY, Wu MC, Different alterations of cytochrome P450 3A4 isoform and its gene expression in livers of patients with chronic liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2003; 9 (2): 359-363.
 17. Torres, D.M., Williams, C.D., Harrison, S.A, Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin. Gastroenterol Hepatol.* 2012; 10: 837-858.
 18. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M, Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016; 64(1): 73-84.
 19. Day, C.P. and James, O.F, Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998; 114: 842-845.
 20. Buzzetti, E., Pinzani, M., Tsochatzis, E.A, The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016; 65: 1038-1048.
 21. Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M., Manini, R., Natale, S., Vanni, E., Villanova, N., Melchionda, N, Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology.* 2003; 37: 917-923.
 22. Rector, R.S., Thyfault, J.P., Wei, Y., Ibdah, J.A, Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J. Gastroenterol.* 2008; 14: 185-192.
 23. Dietrich CG, Götze O, Geier A, Molecular changes in hepatic metabolism and transport in cirrhosis and their functional importance. *World J Gastroenterol.* 2016; 22 (1): 72-88.

24. Tanaka E, Clinical importance of non-genetic and genetic cytochrome P450 function tests in liver disease. *J Clin Pharm Ther.* 1998; 23 (3): 161-170.
25. Villeneuve JP, Pichette V, Cytochrome P450 and liver diseases. *Curr Drug Metab.* 2004; 5 (3): 273-282.
26. Chiba, T., Noji, K., Shinozaki, S., Suzuki, S., Umegaki, K., Shimokado, K, Diet-induced non-alcoholic fatty liver disease affects expression of major cytochrome P450 genes in a mouse model. *J. Pharm. Pharmacol.* 2016; 68: 1567-1576.
27. Zhang WV, Ramzan I, Murray M, Impaired microsomal oxidation of the atypical antipsychotic agent clozapine in hepatic steatosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007; 322 (2): 770-777.
28. Cho, S.J., Kim, S.B., Cho, H.J., Chong, S., Chung, S.J., Kang, I.M., Lee, J.I., Yoon, I.S., Kim, D.D, Effects of nonalcoholic fatty liver disease on hepatic CYP2B1 and in vivo bupropion disposition in rats fed a high-fat or methionine/ choline-deficient diet. 2016; *J. Agric. Food. Chem.* 2016; 64: 5598-5606.
29. Fisher CD, Lickteig AJ, Augustine LM, Ranger-Moore J, Jackson JP, Ferguson SS, Cherrington NJ, Hepatic cytochrome P450 enzyme alterations in humans with progressive stages of nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos.* 2009; 37 (10): 2087-2094.
30. Aljomah G, Baker SS, Liu W, Kozielski R, Oluwole J, Lupu B, Baker RD, Zhu L, Induction of CYP2E1 in non-alcoholic fatty liver diseases. *Exp Mol Pathol.* 2015; 99 (3): 677-681.
31. Varela NM, Quiñones LA, Orellana M, Poniachik J, Csendes A, Smok G, Rodrigo R, Cáceres DD, Videla LA, Study of cytochrome P450 2E1 and its allele variants in liver injury of nondiabetic, nonalcoholic steatohepatitis obese women. *Biol Res.* 2008; 41 (1): 81-92.
32. Stärkel P, Sempoux C, Leclercq I, Herin M, Deby C, Desager JP, Horsmans Y, Oxidative stress, KLF6 and transforming growth factor-beta up-regulation differentiate non-alcoholic steatohepatitis progressing to fibrosis from uncomplicated steatosis in rats. *J Hepatol.* 2003; 39 (4): 538-546.
33. Na, A.Y., Jo, J.J., Kwon, O.K., Shrestha, R., Cho, P.J., Kim, K.M., Ki, S.H., Lee, T.H., Jeon, T.W., Jeong, T.C, Investigation of nonalcoholic fatty liver disease-induced drug metabolism by comparative global toxicoproteomics. *Toxicol, Appl. Pharmacol.* 2018; 352: 28-37.
34. Sasame H.A., Castro J.A., Gillette J.R, Studies on the destruction of liver microsomal

- cytochrome P-450 by carbon tetrachloride administration. *Biochem Pharmacol.* 1968; 17: 1759-1768.
35. Bao, Y., Phan, M., Zhu, J., Ma, X., Manautou, J.E., Zhong, X.B, Alterations of cytochrome P450-mediated drug metabolism during liver repair and regeneration after acetaminophen-induced liver injury in mice. *Drug Metab. Dispos.* 2022; 50: 694-703.
 36. Lau JK, Zhang X, Yu J, Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol.* 2017; 241 (1): 36-44.
 37. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T, Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012; 18 (19): 2300-2308.
 38. Van Herck MA, Vonghia L, Francque SM, Animal Models of Nonalcoholic Fatty Liver Disease-A Starter's Guide. *Nutrients.* 2017; 9 (10): 1072.
 39. Jacobs A, Warda AS, Verbeek J, Cassiman D, Spincemaille P, An Overview of Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: From Past to Present. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2016; 6 (2): 185-200.
 40. Bradbury MW, Berk PD, Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clin Liver Dis.* 2004; 8 (3): 639-671, xi.
 41. Kai M, Miyoshi M, Fujiwara M, Nishiyama Y, Inoue T, Maeshige N, Hamada Y, Usami M, A lard-rich high-fat diet increases hepatic peroxisome proliferator-activated receptors in endotoxemic rats. *J Surg Res.* 2017; 212: 22-32.
 42. Park HJ, Lee JY, Chung MY, Park YK, Bower AM, Koo SI, Giardina C, Bruno RS, Green tea extract suppresses NFκB activation and inflammatory responses in diet-induced obese rats with nonalcoholic steatohepatitis. *J Nutr.* 2012; 142 (1): 57-63.
 43. Poulsen MM, Larsen JØ, Hamilton-Dutoit S, Clasen BF, Jessen N, Paulsen SK, Kjær TN, Richelsen B, Pedersen SB, Resveratrol up-regulates hepatic uncoupling protein 2 and prevents development of nonalcoholic fatty liver disease in rats fed a high-fat diet. *Nutr Res.* 2012; 32 (9): 701-708.
 44. Fujita S, Chiba M, Ohta M, Kitani K, Suzuki T, Alteration of plasma sex hormone levels associated with old age and its effect on hepatic drug metabolism in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990; 253 (1): 369-374.

45. Corbin KD, Zeisel SH, Choline metabolism provides novel insights into nonalcoholic fatty liver disease and its progression. *Curr Opin Gastroenterol.* 2012; 28 (2): 159-165.
46. Karahan N, İşler M, Koyu A, Karahan AG, Başyığıt Kiliç G, Cırış IM, Sütçü R, Onaran I, Cam H, Keskin M, Effects of probiotics on methionine choline deficient diet-induced steatohepatitis in rats. *Turk J Gastroenterol.* 2012; 23 (2): 110-121.
47. Weltman MD, Farrell GC, Liddle C, Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology.* 1996; 111 (6): 1645-1653.
48. Ibrahim SH, Hirsova P, Malhi H, Gores GJ, Animal Models of Nonalcoholic Steatohepatitis: Eat, Delete, and Inflammation. *Dig Dis Sci.* 2016; 61 (5): 1325-1336.
49. Santhekadur PK, Kumar DP, Sanyal AJ, Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2018; 68 (2): 230-237.
50. Kanuri G, Bergheim I. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) . *Int J Mol Sci.* 2013; 14 (6): 11963-11980.
51. Nakayama H, Otabe S, Ueno T, Hirota N, Yuan X, Fukutani T, Hashinaga T, Wada N, Yamada K, Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism.* 2007; 56 (4): 470-475.
52. Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, Brown MS, Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev.* 1998; 12 (20): 3182-3194.
53. Sato W, Horie Y, Kataoka E, Ohshima S, Dohmen T, Iizuka M, Sasaki J, Sasaki T, Hamada K, Kishimoto H, Suzuki A, Watanabe S, Hepatic gene expression in hepatocyte-specific Pten deficient mice showing steatohepatitis without ethanol challenge. *Hepatol Res.* 2006; 34 (4): 256-265.
54. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W, Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest.* 1999; 103 (11): 1489-1498.
55. Cook WS, Jain S, Jia Y, Cao WQ, Yeldandi AV, Reddy JK, Rao MS, Peroxisome proliferator-

- activated receptor alpha-responsive genes induced in the newborn but not prenatal liver of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase null mice. *Exp Cell Res.* 2001; 268 (1): 70-76.
56. London RM, George J. Pathogenesis of NASH: animal models. *Clin Liver Dis*, 2007; 11 (1): 55-74, viii.
 57. Delire B, Stärkel P, Leclercq I, Animal Models for Fibrotic Liver Diseases: What We Have, What We Need, and What Is under Development. *J Clin Transl Hepatol.* 2015; 3 (1): 53-66.
 58. Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee GS, Ng RK, Turner SM, Badger TM, Pitas RE, Maher JJ, Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *J Lipid Res.* 2006; 47: 2280-2290.
 59. Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, Kirsch RE, Hall Pde L, Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003; 18 (11): 1272-1282.
 60. Oligschlaeger Y, Shiri-Sverdlov R, NAFLD preclinical models: more than a handful, less of a concern? *Biomedicines.* 2020; 8 (2): 28.
 61. Li H, Toth E, Cherrington NJ, Asking the right questions with animal models: methionine- and choline-deficient model in predicting adverse drug reactions in human NASH. *Toxicol Sci.* 2018; 161 (1): 23-33.
 62. Ingelman-Sundberg M, Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004; 369 (1): 89-104.
 63. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R, Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006; 2 (69): 875-894.
 64. Nishimura M, Yaguti H, Yoshitsugu H, Naito S, Satoh T, Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR. *Yakugaku Zasshi.* 2003; 123 (5): 369-375.
 65. Lang D, Radtke M, Bairlein M, Highly Variable Expression of CYP1A1 in Human Liver and Impact on Pharmacokinetics of Riociguat and Granisetron in Humans. *Chem Res Toxicol.* 2019; 32 (6): 1115-1122.
 66. Mizuno Y, Tani N, Komuro S, Kanamaru H, Nakatsuka I, In vitro metabolism of perospirone in rat, monkey and human liver microsomes. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2003; 28 (1):

- 59-65.
67. Landi MT, Sinha R, Lang NP, Kadlubar FF, Human cytochrome P4501A2. *IARC Sci Publ.* 1999; 148: 173-195.
 68. Klomp F, Wenzel C, Drozdziak M, Oswald S, Drug-Drug Interactions Involving Intestinal and Hepatic CYP1A Enzymes. *Pharmaceutics.* 2020; 12 (12): 1201.
 69. Zuber R, Anzenbacherová E, Anzenbacher P, Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med.* 2002; 6 (2): 189-198.
 70. Floreani M, De Martin S, Gabbia D, Barbierato M, Nassi A, Mescoli C, Orlando R, Bova S, Angeli P, Gola E, Sticca A, Palatini P, Severe liver cirrhosis markedly reduces AhR-mediated induction of cytochrome P450 in rats by decreasing the transcription of target genes. *PLoS One.* 2013; 8(4): e61983.
 71. Hartleb M, Romańczyk T, Becker A, Mańczyk I, Waluga M, Spalińska M, Zieliński M, The theophylline disposition after caffeine administration in liver cirrhosis: an index of liver function. *Ital J Gastroenterol.* 1992; 24 (6): 332-337.
 72. Rodopoulos N, Wisén O, Norman A, Caffeine metabolism in patients with chronic liver disease. *Scand J Clin Lab Invest.* 1995; 55 (39): 229-242.
 73. Drozdziak M, Lapczuk-Romanska J, Wenzel C, Skalski L, Szelaż-Pieniek S, Post M, Parus A, Syczewska M, Kurzawski M, Oswald S, Protein Abundance of Drug Metabolizing Enzymes in Human Hepatitis C Livers. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (5): 4543.
 74. Hanagama M, Inoue H, Kamiya M, Shinone K, Nata M, Gene expression on liver toxicity induced by administration of haloperidol in rats with severe fatty liver. *Leg Med (Tokyo).* 2008; 10 (4): 177-184.
 75. Wang H, Tompkins LM, CYP2B6: new insights into a historically overlooked cytochrome P450 isozyme. *Curr Drug Metab.* 2008; 9 (7) :598-610.
 76. Ekins S, Wrighton SA, The role of CYP2B6 in human xenobiotic metabolism. *Drug Metab Rev.* 1999; 31 (3): 719-754.
 77. Goldstein JA, Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol.* 2001; 52 (4): 349-355.
 78. Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, Ball SE, Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic

- explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos.* 2004; 32 (11): 1201-1208.
79. Wójcikowski J, Haduch A, Daniel WA, Effect of antidepressant drugs on cytochrome P450 2C11 (CYP2C11) in rat liver. *Pharmacol Rep.* 2013; 65 (5): 1247-1255.
 80. Daniel WA, Haduch A, Syrek M, Boksa J. Direct and indirect interactions between antidepressant drugs and CYP2C6 in the rat liver during long-term treatment. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2006; 16 (8): 580-587.
 81. Haduch A, Ogórka T, Boksa J, Daniel WA. Interactions between neuroleptics and CYP2C6 in rat liver--in vitro and ex vivo study. *Pharmacol Rep.* 2005; 57 (6): 872-877.
 82. Piqué JM, Feu F, de Prada G, Röhss K, Hasselgren G. Pharmacokinetics of omeprazole given by continuous intravenous infusion to patients with varying degrees of hepatic dysfunction. *Clin Pharmacokinet.* 2002; 41 (12): 999-1004.
 83. Nelson E, Rate of metabolism of tolbutamide in test subjects with liver disease or with impaired renal function. *Am J Med Sci.* 1964; 248: 657-659.
 84. Li H, Clarke JD, Dzierlenga AL, Bear J, Goedken MJ, Cherrington NJ. In vivo cytochrome P450 activity alterations in diabetic nonalcoholic steatohepatitis mice. *J Biochem Mol Toxicol.* 2017; 31 (2): 10.1002/jbt.21840.
 85. Chow T, Imaoka S, Hiroi T, Funae Y, Developmental changes in the catalytic activity and expression of CYP2D isoforms in the rat liver. *Drug Metab Dispos.* 1999; 27 (2): 188-192.
 86. Frye RF, Zgheib NK, Matzke GR, Chaves-Gnecco D, Rabinovitz M, Shaikh OS, Branch RA, Liver disease selectively modulates cytochrome P450-mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 2006; 80 (3): 235-245.
 87. Song Y, Li C, Liu G, Liu R, Chen Y, Li W, Cao Z, Zhao B, Lu C, Liu Y, Drug-Metabolizing Cytochrome P450 Enzymes Have Multifarious Influences on Treatment Outcomes. *Clin Pharmacokinet.* 2021; 60 (5): 585-601.
 88. Bello M, Mendieta-Wejebe JE, Correa-Basurto J, Structural and energetic analysis to provide insight residues of CYP2C9, 2C11 and 2E1 involved in valproic acid dehydrogenation selectivity. *Biochem Pharmacol.* 2014; 90 (2): 145-158.
 89. Tanaka E, Terada M, Misawa S, Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role. *J Clin Pharm Ther.* 2000; 25 (3): 165-175.

90. Leung TM, Nieto N. CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2013; 58 (2): 395-398.
91. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC, Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001; 281 (5): G1135-1139.
92. Merrell MD, Cherrington NJ. Drug metabolism alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Rev.* 2011; 43 (3): 317-334.
93. de Wildt SN, Kearns GL, Leeder JS, van den Anker JN. Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet.* 1999; 37 (6): 485-505.
94. Bastien MC, Leblond F, Pichette V, Villeneuve JP, Differential alteration of cytochrome P450 isoenzymes in two experimental models of cirrhosis. *Can J Physiol Pharmacol.* 2000; 78 (11): 912-919.
95. Niemelä O, Parkkila S, Pasanen M, Iimuro Y, Bradford B, Thurman RG, Early alcoholic liver injury: formation of protein adducts with acetaldehyde and lipid peroxidation products, and expression of CYP2E1 and CYP3A. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998; 22 (9): 2118-2124.
96. Li S, Hu ZH, Miao XH, Effects of chronic HBV infection on human hepatic cytochrome P450 3A4. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2006; 86 (38) :2703-2706.
97. Ye L, Yang X, Guo E, Chen W, Lu L, Wang Y, Peng X, Yan T, Zhou F, Liu Z, Sorafenib metabolism is significantly altered in the liver tumor tissue of hepatocellular carcinoma patient. *PLoS One.* 2014; 9 (5): e96664.
98. Cobbina E, Akhlaghi F, Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) - pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters. *Drug Metab Rev.* 2017; 49 (2): 197-211.
99. Jarrar YB, Lee SJ. Molecular Functionality of Cytochrome P450 4 (CYP4) Genetic Polymorphisms and Their Clinical Implications. *Int J Mol Sci.* 2019; 20 (17): 4274.
100. Simpson AE. The cytochrome P450 4 (CYP4) family. *Gen Pharmacol.* 1997; 28 (3): 351-359.
101. Wang J, Li K, Zhang X, Teng D, Ju M, Jing Y, Zhao Y, Li G, The correlation between the expression of genes involved in drug metabolism and the blood level of tacrolimus in liver transplant recipients. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 3429.
102. Mukoyoshi M, Nishimura S, Hoshida S, Umeda S, Kanou M, Taniguchi K, Muroga H, In vitro

- drug-drug interaction studies with febuxostat, a novel non-purine selective inhibitor of xanthine oxidase: plasma protein binding, identification of metabolic enzymes and cytochrome P450 inhibition. *Xenobiotica*. 2008; 38 (5): 496-510.
103. Kamdem LK, Flockhart DA, Desta Z, In vitro cytochrome P450-mediated metabolism of exemestane. *Drug Metab Dispos*. 2011; 39 (1): 98-105.
104. Gao H, Cao Y, Xia H, Zhu X, Jin Y, CYP4A11 is involved in the development of nonalcoholic fatty liver disease via ROS-induced lipid peroxidation and inflammation. *Int J Mol Med*. 2020; 45 (4): 1121-1129.
105. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR, CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest*. 2000; 105 (8): 1067-1075.
106. Zhang X, Li S, Zhou Y, Su W, Ruan X, Wang B, Zheng F, Warner M, Gustafsson JÅ, Guan Y, Ablation of cytochrome P450 omega-hydroxylase 4A14 gene attenuates hepatic steatosis and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114 (12): 3181-3185.
107. Zhai T, Xu W, Liu Y, Qian K, Xiong Y, Chen Y, Honokiol alleviates methionine-choline deficient diet-induced hepatic steatosis and oxidative stress in C57BL/6 mice by regulating CFLAR-JNK pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2020: 2313641.
108. Liu Y, Xu W, Zhai T, You J, Chen Y, Silibinin ameliorates hepatic lipid accumulation and oxidative stress in mice with non-alcoholic steatohepatitis by regulating CFLAR-JNK pathway. *Acta Pharm Sin B*. 2019. 9 (4): 745-757.
109. Xia H, Zhu X, Zhang X, Jiang H, Li B, Wang Z, Li D, Jin Y, Alpha-naphthoflavone attenuates non-alcoholic fatty liver disease in oleic acid-treated HepG2 hepatocytes and in high fat diet-fed mice. *Biomed Pharmacother*. 2019; 118: 109287.
110. Tian, L.X., Tang, X., Ma, W., *et al.* (2020): Knockout of cytochrome P450 1A1 enhances lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by targeting NF-κB activation. *FEBS Open Bio*. 2020; 10: 2316-2328.
111. Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, Conca A, Deckert J, Domschke K, Eckermann G, Egberts K, Gerlach M, Greiner C, Gründer G, Haen E, Havemann-Reinecke U, Hefner G, Helmer R, Janssen G, Jaquenoud E, Laux G, Messer T, Mössner R, Müller MJ, Paulzen M, Pfuhlmann B, Riederer P, Saria A, Schoppek B, Schoretsanitis G, Schwarz M, Gracia MS,

- Stegmann B, Steimer W, Stingl JC, Uhr M, Ulrich S, Unterecker S, Waschgl R, Zernig G, Zurek G, Baumann P, Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry*. 2018; 51 (1-02): 9-62.
112. Kallstrom TJ. Evidence-based asthma management. *Respir Care*. 2004; 49 (7): 783-792.
113. Kot M, Daniel WA, Relative contribution of rat cytochrome P450 isoforms to the metabolism of caffeine: the pathway and concentration dependence. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75 (7): 1538-1549.
114. Musso G, Gambino R, Cassader M, Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res*. 2009; 48 (1): 1-26.
115. Edson KZ, Rettie AE. CYP4 enzymes as potential drug targets: focus on enzyme multiplicity, inducers and inhibitors, and therapeutic modulation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) synthase and fatty acid ω -hydroxylase activities. *Curr Top Med Chem*. 2013; 13 (12): 1429-1440.
116. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010; 52 (5): 1836-1846.
117. Ryu JS, Lee M, Mun SJ, Hong SH, Lee HJ, Ahn HS, Chung KS, Kim GH, Son MJ, Targeting CYP4A attenuates hepatic steatosis in a novel multicellular organotypic liver model. *J Biol Eng*. 2019; 13: 69.
118. Choi YJ, Zhou Y, Lee JY, Ryu CS, Kim YH, Lee K, Kim SK. Cytochrome P450 4A11 inhibition assays based on characterization of lauric acid metabolites. *Food Chem Toxicol*. 2018; 112: 205-215.
119. Hardwick JP. Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochem Pharmacol*. 2008; 75 (12): 2263-2275.
120. Li B, Ma Y, Tan L, Ren H, Wu L, Su Q, Song J, Chen W, Gong P, Jin Y. 20-Hydroxytetraenoic acid induces hepatic fibrosis via the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway. *Toxicol Lett*. 2023; 373: 1-12.
121. Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H, Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76 (4): 750-757.
122. Gómez-Lechón MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE, A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact*. 2007; 165 (2):

- 106-116.
123. Yao HR, Liu J, Plumeri D, Cao YB, He T, Lin L, Li Y, Jiang YY, Li J, Shang J, Lipotoxicity in HepG2 cells triggered by free fatty acids. *Am J Transl Res.* 2011; 3 (3): 284-291.
124. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, Fantoni LI, Marra F, Bertolotti M, Banni S, Lonardo A, Carulli N, Loria P, Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24 (5): 830-840.
125. Chen X, Li L, Liu X, Luo R, Liao G, Li L, Liu J, Cheng J, Lu Y, Chen Y, Oleic acid protects saturated fatty acid mediated lipotoxicity in hepatocytes and rat of non-alcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* 2018; 203: 291-304.
126. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV Jr, Ory DS, Schaffer JE, Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100 (6): 3077-3082.
127. Mei S, Ni HM, Manley S, Bockus A, Kassel KM, Luyendyk JP, Copple BL, Ding WX, Differential roles of unsaturated and saturated fatty acids on autophagy and apoptosis in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 339 (2): 487-498.
128. Moravcová A, Červinková Z, Kučera O, Mezera V, Rychtrmoc D, Lotková H, The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. *Physiol Res.* 2015; 64 (Suppl 5): S627-636.
129. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC, Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150; 76-85.
130. Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C (T)) Method. *Methods.* 2001; 25 (4): 402-408. *Hepatology.* 2016; 64(1): 73-84.
131. Berry MN and Friend DS, High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol.* 1969; 43 (3): 506-520.