

ラット閉塞性黄疸モデルにおける Farnesoid X receptor (FXR) の発現

平 山 裕

新潟大学大学院医歯学総合研究科

機能再建医学講座小児外科学分野

(主任：窪田正幸教授)

The Expression of Farnesoid X Receptor (FXR) in Cholestatic Rat Model

Yutaka HIRAYAMA

Division of Pediatric Surgery,

Department of Regenerative and Transplant Medicine,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Masayuki KUBOTA)

要 旨

Farnesoid X receptor (FXR) は胆汁酸を生理的リガンドとし、胆汁酸代謝制御に重要な役割を果たすと考えられている核内受容体型転写因子である。近年、胆汁酸トランスポーターの発現や肝細胞における胆汁酸合成調節（律速酵素 Cyp7 α 1）に関与していることが明らかにされており、FXR の胆汁うっ滞性疾患への関与や FXR 分子機構に基づく創薬の可能性が注目されている。本研究では、Wistar rat に総胆管結紮手術を施行して閉塞性黄疸モデルを作製し、胆汁うっ滞時の胆汁酸腸肝循環構成臓器における FXR の発現の変化を検討した。方法は Real-time PCR 及び Western blotting 法により FXR の発現を検討し、免疫染色によって発現組織を確認した。正常ラットでは FXR、及び FXR の活性化制御を受ける輸送蛋白 Ileal bile acid-binding protein (I-babp) は回腸に強く発現していた。また、肝臓においては肝細胞以外に類洞における星細胞にも FXR の発現を認めた。一方、結紮モデルでは回腸の FXR の発現は保持されていたのに対し、I-babp の発現量は低下していた。胆汁うっ滞肝における FXR、及び FXR の活性化制御を受けるトランスポーター Bile salt excretory pump (Bsep) の発現は低下した。この時、肝線維化の進行と共に類洞における FXR 陽性肝星細胞の数も減少していた。胆管結紮によって腸管内に胆汁酸が存在しない状況下では回腸での FXR の発現が保持されるにも関わらず I-babp の発現は減少したことから、I-babp はリガンド依存性の FXR 転写活性制御を受けることが示唆された。一方、胆汁うっ滞肝では肝組織内にリガンドは存在するものの、FXR 自身の発現が down-regulate することで Bsep の発現量が減少し、胆管側への胆汁酸排泄が減少する可能性

Reprint requests to: Yutaka HIRAYAMA
Department of Pediatric Surgery
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences
1-757 Asahimachi - Dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通り 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科機能再建医学講座
小児外科学分野 平山 裕

が考えられた。このことは胆汁うっ滞時における FXR、及びその活性化制御を受ける胆汁酸トランスポートの発現は生体内においてリガンド依存性に、かつ生体の恒常性を維持する方向へ変化することを示唆している。また、胆汁うっ滞肝における FXR mRNA 発現量の低下は肝細胞と肝星細胞の両者における FXR の発現低下を反映した結果であることがわかった。肝線維化の病態進行における肝星細胞の関与を形態学的に評価する上で、抗 FXR 抗体は有用なマーカーとなりうると思われた。

キーワード：FXR, 胆汁酸トランスポーター, 閉塞性黄疸モデル, 肝星細胞

緒 言

リガンド依存性の転写因子である核内受容体は、標的遺伝子の発現を介して個体発生における形態形成や細胞内増殖・分化、及び生体のホメオスタシスの維持や高次神経機能の制御など、様々な生理機能に参与する¹⁾。近年、当初リガンド未知のオーファンレセプターとされていた核内受容体のリガンドが次々に同定され、これまで代謝中間体と位置付けられていた化合物が核内受容体を介する標的遺伝子の転写活性化システムを中心的に制御していることが明らかになった²⁾。コレステロールや胆汁酸代謝に参与する核内受容体は、Farnesoid X receptor (FXR: NR1H4), Liver X receptor (LXR: NR1H3), Pregnane X receptor (PXR: NR1I2) 等が知られ、ほとんどが Retinoid X receptor (RXR: NR2B) とヘテロダイマーを形成して、転写因子結合領域である EcR 応答配列: AGGTCA a TCCAGT (IR-1 型) に結合し、その転写を活性化する (図 1)³⁾。FXR は、胆汁酸を生理的リガンドとする核内受容体型転写因子であり、別名 Bile acid receptor (BAR) とも呼ばれている⁴⁾。FXR の主要発現臓器は肝臓、小腸、腎臓であるが、脳、大腸、副腎、卵巣、精巣にも弱い発現を認めることが mRNA レベルの研究で報告された⁵⁾。また、FXR 欠損マウスでは脂質代謝異常を認めることが報告されており、FXR は in vivo の実験系においても胆汁酸プールのセンサーとして胆汁酸腸肝循環の中心的な役割を果たしているものと考えられる⁶⁾。

一方、胆汁酸の腸肝循環は肝臓・回腸末端を中心に局在している胆汁酸トランスポーターの働きと肝細胞に特異的に発現している胆汁酸生成の律

速酵素 Cholesterol 7 α -hydroxylase 遺伝子チトクローム P450 7 α (Cyp7 α 1) の胆汁酸合成調節によって成立している⁷⁾。近年、それら胆汁酸トランスポーターの発現は核内受容体の標的遺伝子の活性化制御を受けることが明らかにされ、特に回腸上皮細胞内のサイトゾール結合蛋白として発見された Ileal bile acid-binding protein (I-BABP)⁸⁾ や、肝細胞の毛細胆管側膜上に存在する胆汁酸排泄性 ABC トランスポーター Bile salt excretory pump (BSEP: ABCB11)⁹⁾ は、FXR を介した発現調節が機能していると想定されている。既に、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型 (PFIC type2) では BSEP 遺伝子の mutation が、Dubin-Johnson syndrome では MRP2 遺伝子の mutation が明らかにされ、胆汁酸トランスポーターの発現異常と胆汁うっ滞性先天性疾患との関連については、そのメカニズムが次第に明らかになって来ている¹⁰⁾⁻¹¹⁾。

本研究では、ラット閉塞性黄疸モデルを作製し胆汁うっ滞時の胆汁酸腸肝循環構成臓器における FXR の発現について検討することで、胆汁うっ滞性疾患の病態解明を試みたので報告する。

材料と方法

1. 動物と実験処置

生後 6～7 週の雄の Wistar ラット (平均 170 \pm 15g) を使用し、全身麻酔下に開腹・総胆管結紮 (Bile duct ligation: BDL) 手術を施行した。コントロール群として開腹侵襲のみを与えた Sham 群を作製した。術後 2 日, 4 日, 7 日, 10 日, 14 日目 (2～14 postoperative days: POD) に屠殺し (各 n = 4), 肝臓, 腎臓, 小腸, 大腸, 脾臓,

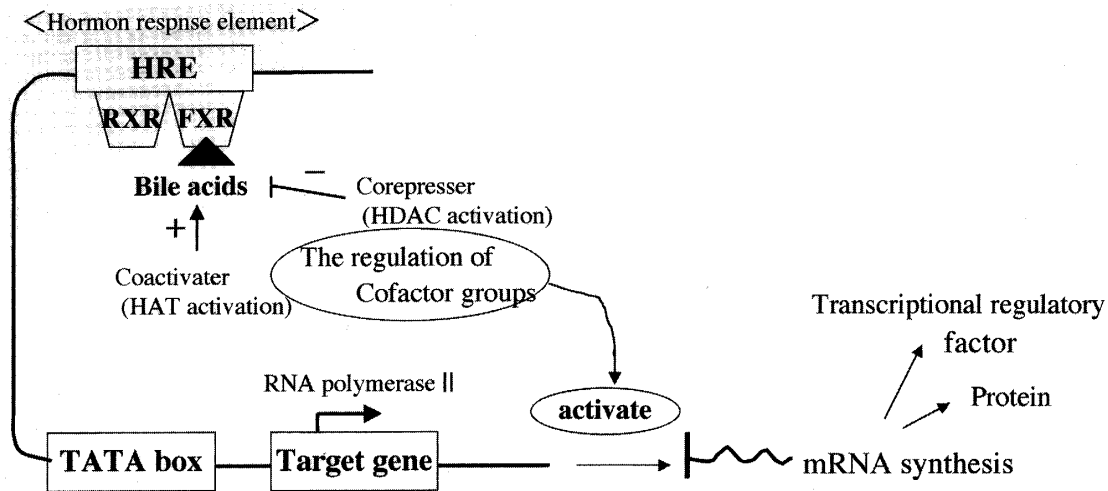


図1 核内受容体と転写制御システム

脾臓, 精巣を摘出した. 摘出した小腸は幽門輪から回盲弁までを5分節に分割し, 更に各1分節を前後2つに分けることで合計10分割 (Segment 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b: 平均 $6 \pm 0.5\text{cm}$) して評価した.

2. 総胆汁酸値の測定

血中の総胆汁酸, 総蛋白, アルブミン, 総ビリルビン, 直接ビリルビン, アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 値を測定し, 栄養状態, 黄疸, 肝機能上昇の指標とした. 更に, 提出臓器組織内の胆汁うっ滞の指標として, 2cm角の肝臓, 両側腎臓, 小腸 Segment 1a + 1b, 及び Segment 5a + 5bを生食 5ml とホモジナイズして遠心分離後, その上層液 3ml を採取し総胆汁酸値を測定した.

3. Western blotting

hFXR-pCMV を transfect した plasmid 導入強制発現細胞 (COS-1 cell hFXR-pCMV transfect-ed), 及びラット正常肝細胞から核抽出した内在性タンパクに対し, 抗ヒト FXR モノクローナル抗体 (Perseus Proteomics, 東京) を用いて Western blotting (蛋白量 $25-50 \mu\text{g}/\text{lane}$) を施行した.

4. 免疫組織化学的解析

10%ホルマリン固定パラフィン包埋後, 薄切切片を抗ヒト FXR モノクローナル抗体 (Perseus Proteomics, 東京), 抗ラットマクロファージ抗体

CD68 (ED-1; BMA, Switzerland), 抗ヒト Desmin モノクローナル抗体 (Dako, 東京) を用いて免疫染色 (1: 500-1: 1000 希釈) を行った. 二次抗体にはラットシンプルステイン Max-PO/Multi (Nichirei, 東京) を使用し, 発色基質は 3, 3'-Diaminobenzidine (Dojin, 熊本) を使用した. 二重染色における第二抗体の発色基質は, 4-Chloro-1-naphthol (Nakarai, 京都) を用いた.

5. RT-PCR 解析

① 1 サイクル (94°C , 10 分), ② 30 サイクル ([a] 94°C , 1 分, [b] $50-56^\circ\text{C}$, 1 分, [c] 72°C , 1 分), ③ 1 サイクル (72°C , 1 分), ④ 4°C 保存の標準プロトコールで施行した. 各 primer は, FXR (F: 5'-AAT GAC CCA GGA AGA GTA CG-3', R: 5'-TTC ACC CTC CAA GAC ATC AG-3', Product: 243bp), I-babp (F: 5'-CAC TAT GGC CTT CAC CGG CAA ATA-3', R: 5'-ACC CTC CAT CTT CAC GGT TGC CTT-3', Product: 228bp), Bsep (F: 5'-CGA TGA CCT CAG AAA TAA TCC TGG-3', R: 5'-GCC GCA ATG ATG TTA GTG AAG G-3', Product: 126bp), β -actin (F: 5'-AAG TCC CTC ACC CTC CCA AAA G-3', R: 5'-AAG CAA TGC TGT CAC CTT CCC-3', Product: 96bp) でデザインした.

6. Real-time PCR 解析

① 1 サイクル (95°C , 10 分), ② 40 サイクル

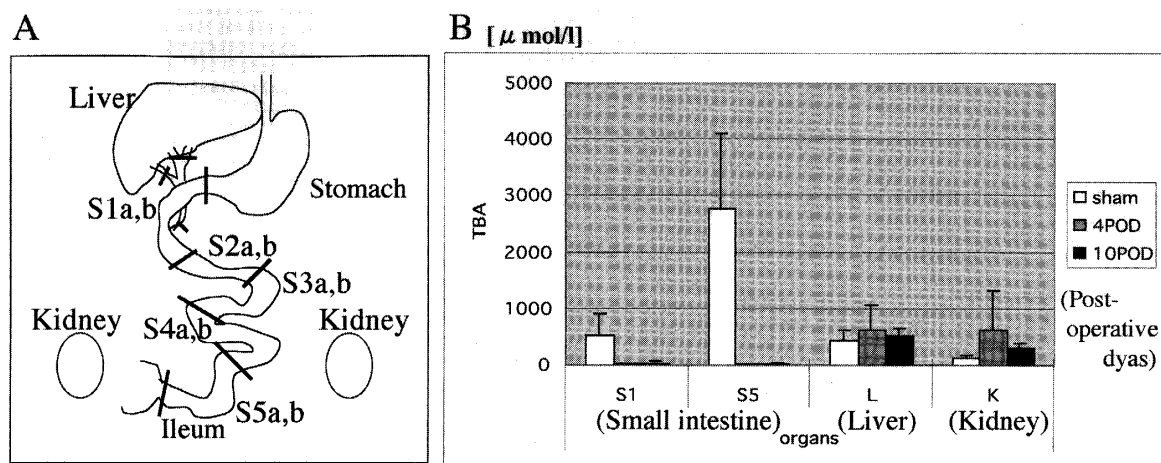


図2 Sham群, 及びBDL群における摘出臓器組織内の総胆汁酸値の相対的变化

A: 胆汁酸の腸肝循環構成臓器. 小腸は十二指腸から回腸末端までを5分節 (Segment 1-5) に分割摘出して測定した (S1a-b; duodenum, S2a-S4a; jejunum, S4b-S5b; ileum). 肝臓は2cm角を, 腎臓は両側ともにホモジネートした. B: BDL群では腸管内総胆汁酸量の減少を認め, 肝臓・腎臓では逆に胆汁うっ滞の所見を認めた.

([a] 95℃, 5秒, [b] 68℃, 20秒), ③ Melt curve 解析; 60℃でスタート, 95℃終了 (0.2℃/秒) のシヤトル PCR法 (SYBR Green by TAKARA Smart cycler) 標準プロトコールで施行した. 各 primer は, RT-PCRと共通の primerを採用し, また定量的評価は β -actin との比を算出することによって行った.

成 績

1. 血液・生化学検査

総胆管結紮ラット (BDL群) は, 術後2日目には高ビリルビン血症 (D-bilirubin 優位) となり閉塞性黄疸の病像を呈した. 総胆汁酸値は術後7日目に, ALTは術後4~7日目にかけて最も上昇した.

2. 各組織内総胆汁酸 (図2)

Sham群における小腸内総胆汁酸量は, 回腸側 Segment 5 (5a + 5b) は十二指腸側 Segment 1 (1a + 1b) の5倍量であったのに対し, BDL群では著明に減少していた. 逆に, BDL群の肝臓においては, sham群に比べ胆汁酸量は1.2~1.5倍に増加していた. 腎臓においても同様に, BDL

群では1.5~2.5倍の総胆汁酸値の上昇が見られた.

3. 肝組織形態

HE染色上, BDL群の肝臓において, 門脈域を中心とした軽度~中等度の炎症細胞 (好中球, リンパ球, 好酸球, マクロファージ) 浸潤と門脈域の拡大, 細胆管の増生が見られ, 胆汁うっ滞時の肝組織変化の像を呈した. また, 術後日数を経るにつれ肝細胞は不規則に壊死し, 所々 feathery necrosis の像を認めた.

4. Western blotting (図3)

核抽出内在性タンパクと plasmid 導入 COS-1 細胞の両者とも 55kDa 前後のバンドが確認でき, ラット FXR に対する抗ヒト FXR 抗体の交差性を確認した.

5. 免疫組織化学

① FXRの発現 (図4, 表1): Sham群の小腸では回腸末端を中心 (S4-5) に腸上皮細胞の核に強く FXRの発現が認められ, 特に微絨毛の増殖帯~先端部に目立っていた. S1~S3での発現は少なかった. 肝臓では肝細胞の核に陽性所見が見られ, また類洞に小型の FXR陽性細胞を認めた. 腎臓では近位尿細管の核に強く発現を認めた.

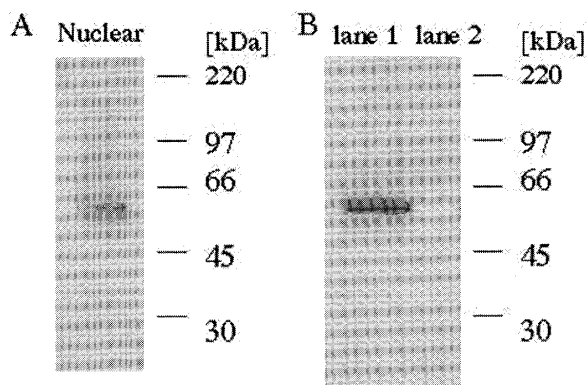


図3 抗ヒト FXR 抗体を用いた Western blotting 法による評価

A : ラット正常肝細胞から核抽出した内在性タンパクのバンド (loading protein dose : $50 \mu\text{g/lane}$). B : hFXR-pCMV をトランスフェクトしたプラスミド導入 FXR 強制発現細胞のバンド (loading protein dose : $25 \mu\text{g/lane}$). lane 1; COS-1 cell hFXR-pCMV transfected. lane 2; untransfected. A,B いずれも 55kDa 前後のバンドを確認した.

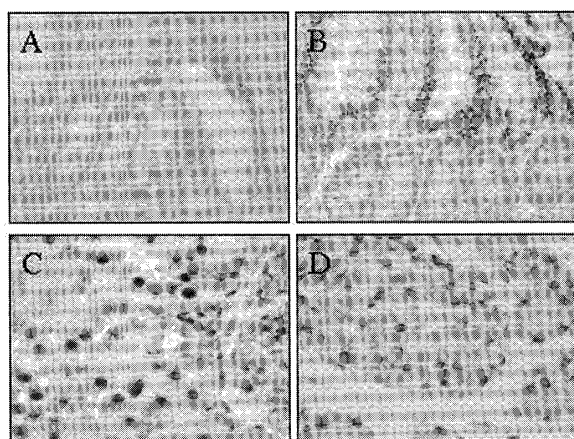


図4 Sham 群における FXR 発現臓器 (免疫染色)

A : 十二指腸の上皮細胞にはほとんど発現していなかった ($\times 400$). B : 回腸末端微絨毛の増殖帯から先端部にかけての上皮細胞核に強い発現を認めた ($\times 400$). C : 腎近位尿管の核に強く発現していた ($\times 1000$). D : 膵ラ氏島内の細胞に軽度発現を認めた ($\times 1000$).

表1 FXR 発現臓器のまとめ～免疫染色の結果～

Hepatocyte	Bile duct	HSCs	Kupffer cell
+++	±	++	-
Kidney	Duodenum	Jejunum	Ileum
+++	+	+	+++
Adrenal	Pancreas	Spleen	Testis
-	+	-	-

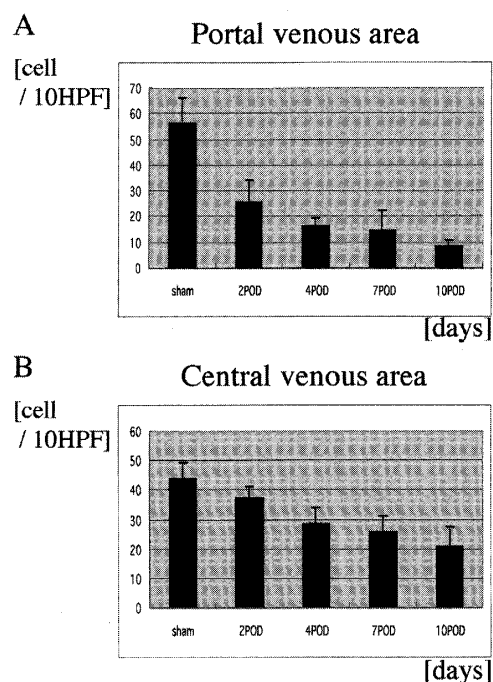


図5 BDL 群肝小葉内における FXR 陽性細胞数の変化

A : Portal venous area, B : Central venous area. A,B いずれも FXR 陽性細胞数の減少を認めたが、門脈域 (グリソン鞘) 周囲でより著明に減少していた.

が、脾臓では FXR 陽性細胞は認めなかった. 膵ラ氏島内の細胞にも軽度の発現を認めた. BDL 群の小腸では回腸上皮細胞の核内陽性所見は保持されており、有意な変化は認められなかった. 一方、肝細胞では核内陽性所見が一部軽度低下していた. 類洞の FXR 陽性細胞は細胞数が減少していた (図5). 腎臓における有意な変化は認められなかった.

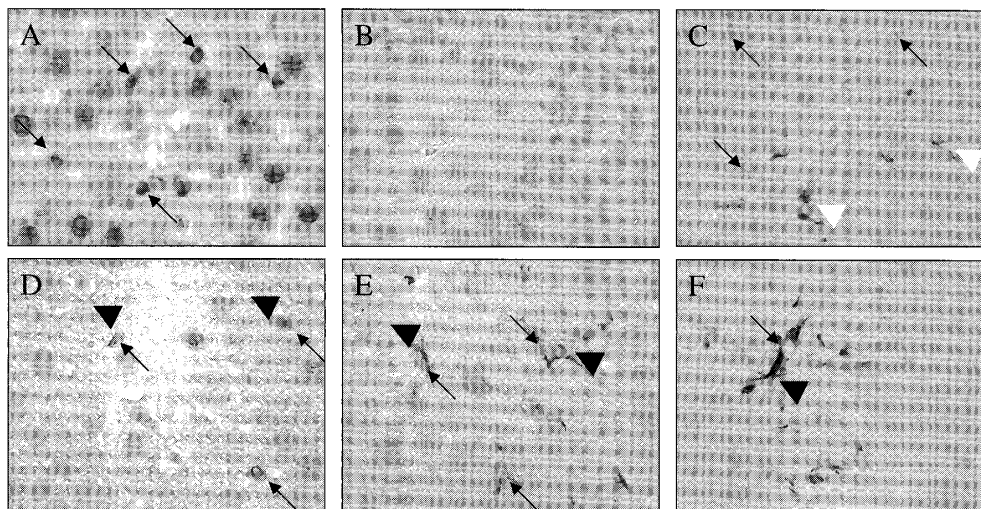


図6 Sham群とBDL群の肝臓におけるFXRの発現変化(A, B), 及びFXRとED-1(C), FXRとDesminの二重染色像(D, E, F)

A: Sham群における肝細胞核, 肝類洞における小型細胞(→)のFXR陽性所見(×1000). B: BDL群(10POD)におけるFXRの発現変化. 肝細胞核においてFXRの軽度発現低下を認め, また肝類洞のFXR陽性細胞は数が減少した(×1000). C: 肝類洞におけるFXR陽性細胞(→)とED-1陽性クッパー細胞(▽)の二重染色像. 両者の一致を認めなかった(×1000). D, E, F: Sham群(D), BDL群4POD(E), BDL群10POD(F)における肝類洞のFXR陽性細胞(→)とDesmin陽性肝星細胞(▼)の二重染色像. 両者の一致から肝類洞におけるFXR陽性細胞は肝星細胞であることが分かった. また, 胆汁うっ滞とそれに伴うグリソン鞘の線維化が進む過程において, 肝星細胞核におけるFXR発現は低下していった(×1000).

② FXRとCD68(ED-1), 及びFXRとDesminの二重染色(図6): 肝類洞におけるFXR陽性細胞は, CD68(ED-1)を発現していないがDesmin陽性にて肝星細胞と見なされた.

6. RT-PCR, Real-time PCR(図7)

Sham群とBDL群を比較すると, 小腸(回腸中心)ではFXR mRNAの発現量がほぼ保たれていたのに対し, 肝臓では術後4日目以降, 50%の水準までの発現低下を認めた. I-babp mRNAは, BDL群においてその発現はほとんど抑制されていた. Bsep mRNAは, 術後4日目で65%, 術後10日目で50%まで発現が低下した. RT-PCR, Real-time PCRのいずれの方法においても結果はほぼ一致し, また免疫染色の成績とも矛盾しないものであった.

考 察

コレステロールは生体における細胞膜の形成やステロイド, 及び胆汁酸の生合成に不可欠であり, 肝臓における oxysterol (24-hydroxycholesterol) や胆汁酸合成の唯一の基質となる. 胆汁酸は胆汁中に排泄され脂質の消化吸収に関与することで, 余分のコレステロールを体外に排泄するための重要な代謝経路を担い, その95%以上は回腸末端から再吸収されて肝臓へと戻る¹²⁾. この腸肝循環の過程でもう一つ重要な役割を担っているのがCyp7 α 1であり, Small heterodimer partner (SHP) 依存経路, 非依存経路の2つのカスケードを介して胆汁中に排泄される胆汁酸量を規定している¹³⁾. 一方, 実際に胆汁酸の輸送担体となるのが胆汁酸トランスポーターと呼ばれる膜タンパク質

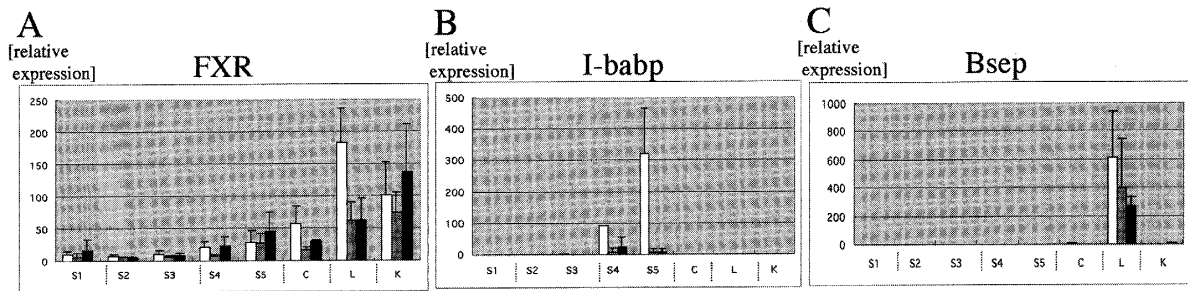


図7 Real-time PCR 解析結果

Sham 群 (White bar), BDL 群 4POD (Gray bar), BDL 群 10POD (black bar). A : FXR mRNA の発現変化. Sham 群に比し BDL 群の肝臓における発現低下が認められた. 小腸における有意な発現変化は認められなかった. B : I-babp mRNA の発現変化. Sham 群に比し BDL 群の回腸にて有意な発現低下を認めた. C : Bsep mRNA の発現変化. いずれも肝臓において特異的に発現し, 線維化の進行に伴いその発現は低下した.

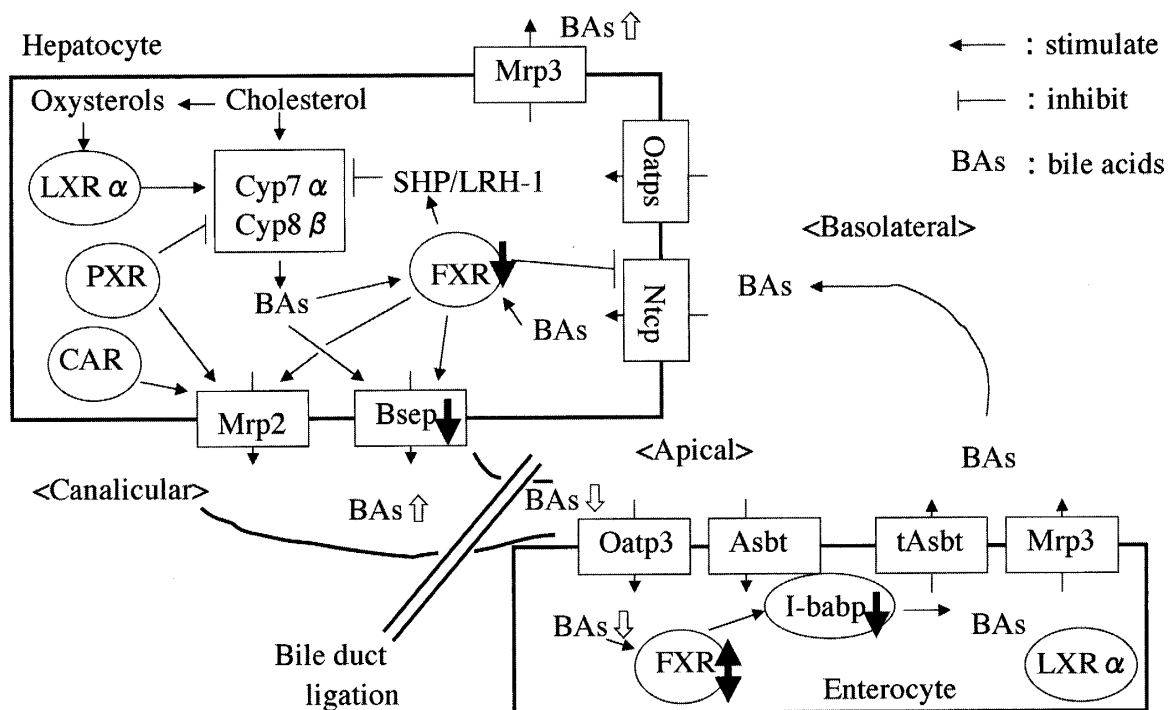


図8 胆汁うっ滞時の胆汁酸腸肝循環：ラットモデル

ファミリー ABC (ATP-binding cassette) タンパク質であり, 胆汁酸依存性または胆汁酸非依存性に肝細胞からの排泄と腸管からの再吸収 (回腸末端のみに存在する特異的な能動輸送とそれ以外の部位での受動拡散) を行っている. 近年, Cyp7α1

や胆汁酸トランスポーターの発現が核内受容体型転写因子により制御されていることが報告された. このことは, コレステロール代謝産物である oxysterol や胆汁酸が, 核内受容体を介して自身の生合成や運搬に関わるタンパク質をコードする遺

伝子発現を制御し、ホルモンとしての役割を果たすことを意味している。特に、1999年のFXRの発見は胆汁酸＝生体内調節因子という概念を明確にし、種々の肝胆道疾患(胆汁酸の腸肝循環不全)やその病態生理を理解する上でのkey factorとして注目される一つのきっかけになった^{14) - 15)}。その後、FXRの活性化制御を直接受ける標的遺伝子として、肝細胞におけるBSEP遺伝子、下部小腸(回腸)におけるI-BABP遺伝子等が報告され、胆汁酸代謝の活性化制御の詳細が次第に明らかになってきた^{16) - 17)}。

この様に分子生物学的手法により脂質代謝経路の解明が進む中、現在までin vivoにおける核内受容体の蛋白レベルの報告はほとんど無い。今回、まず新規に作製された抗FXR抗体を用いてラット全身臓器におけるFXR蛋白の発現、局在を明らかにした。その結果、FXRは肝・腎・小腸といった胆汁酸腸肝循環の重要な構成臓器に発現しており、しかも小腸においては回腸末端に強い発現を認め、十二指腸・空腸・回腸では脂質代謝における役割の比重を異にすることで腸肝循環を成立させていることが示唆された。また、Groberらの報告と同様、I-babpはFXRとほぼ重複する範囲の腸管に発現していた¹⁷⁾。いずれの所見も、胆汁酸の再吸収には回腸末端が重要な役割を果たすことを裏付けるものと理解される¹⁸⁾。胆管結紮における実験的腸肝循環不全状態とは、リガンドである胆汁酸の部位による濃度差の存在を意味する。本研究では、小腸でのFXR発現はmRNA量、蛋白量ともに有意な変化を認めなかったのに対し、I-babpのmRNA発現量は著明に低下していた。即ち、腸管内胆汁酸非存在下では、FXRの発現は保持されるにも関わらず下流域に位置するI-babp発現は減少し、このことからI-babpはリガンド依存性のFXR転写活性制御を受けているものと考えられる¹⁹⁾。

胆汁うっ滞時の肝臓における種々の胆汁酸トランスポーターの発現については、多数の報告がある。Lee, Takikawaらはラット胆汁うっ滞肝のBsep発現の低下を報告しており、本研究の結果と一致していた^{20) - 21)}。また、本研究ではBsep

の発現と同時に胆汁うっ滞時のFXR発現についても検討した。免疫染色上の差は僅かであったものの、mRNAレベルではFXRは発現が低下した。つまり胆汁うっ滞肝では肝細胞内にリガンドである胆汁酸が存在するものの、FXR自身の発現が抑制されることでその活性化制御を受けるBsepの発現量が減少し、胆管側への胆汁酸排泄(主にアミノ酸抱合型胆汁酸)を減じている可能性が示唆された(図8)。一方で、ヒトの肝障害性疾患においてBSEP及びMRP2のmRNA発現量は低下～不変との報告もあり²²⁾、これらの相違は急性期と慢性期、又はそれに伴う胆汁酸負荷の程度差によりトランスポーターの発現量が変化していることを示唆している²⁰⁾。胆管結紮モデルでは短期間に胆汁うっ滞とそれに伴う胆管内圧の上昇を招く極端な急性期の病態モデルであり、本研究で観察したFXRとBsepの発現低下は、それ以上の胆汁酸負荷を避けてホメオスタシスを維持する方向へ作用しているとも解釈される。実際、肝細胞の基底膜側に発現するMrp3は、閉塞性黄疸時に発現増強すると報告されていることから²³⁾、肝細胞内に蓄積した胆汁酸は血中輸送され、尿中に排泄することで毒性回避のメカニズムが機能しているものと理解される²⁴⁾。ところが近年、これらトランスポーターは肝細胞中にプールを持ち、遺伝子レベルでの転写を待たずに短時間に細胞膜上にtranslocationすることで機能したり、逆に胆汁うっ滞時には毛細胆管膜上から近くの小胞に移動し機能を消失することが報告された^{25) - 26)}。Bsep輸送能低下に関しても毛細胆管膜へのvesicular targetingの障害による影響が大きいとの報告もあり²⁷⁾、胆汁うっ滞時には毛細胆管側の膜上トランスポーター機能がより重要な因子になっているものと考えられる。

本研究では、新しい知見として形態的に肝類洞壁におけるFXR陽性細胞の存在を確認し、マクロファージ系マーカーや肝星細胞(Ito細胞、脂肪摂取細胞)マーカーとの二重染色の所見から肝星細胞であることを確認した。Fiorucciらは、培養星細胞においてFXRのmRNA発現を報告している²⁸⁾。今回、ラット胆汁うっ滞肝におけるFXR

mRNA 発現量の低下は、肝細胞と肝星細胞の両者における FXR の発現低下を反映した結果であることが初めて分かった。肝星細胞は肝線維化・類洞の毛細血管化に関与するが^{29) - 30)}、その病態機序に FXR を介した胆汁酸と核内受容体の転写制御システムも関与しているのか、だとすればどのような形で機能しているのか詳細は不明であり、抗 FXR 抗体は今後肝線維化の病態進行における肝星細胞の関与を形態学的に評価する上で有用なマーカーになりうると思われた。

近年、リガンド-核内受容体システムの解明が進むにつれ、疾患との関連やレセプターを標的分子とした創薬研究が注目されている³¹⁾。既に、FXR 欠損マウス胆管結紮モデルにおける胆汁梗塞の欠如や³²⁾、FXR アゴニスト (GW4064) 投与による胆汁うっ滞時の肝保護作用効果も報告されている³³⁾。いずれも胆汁うっ滞性肝疾患において FXR を介した治療薬作製の有用性を示唆する知見であり、FXR を介する胆汁酸代謝メカニズムの解明は新規治療法開発への一助となるものと思われた。

結 語

FXR、及びその活性化制御を受ける胆汁酸トランスポーターの発現は、胆汁うっ滞ラットモデルにおいてリガンド依存性に、かつ生体の恒常性を維持する方向へシフトする。また、肝臓では肝細胞に加え肝星細胞にも FXR が発現し、胆汁うっ滞肝における FXR mRNA 発現量の低下は両者における FXR の発現低下を反映している。

謝 辞

最後に実験の計画、及び実技の指導、論文校閲を頂いた新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞病理学分野 内藤 眞教授、研究協力頂いた東京大学先端科学研究センター 田中 十志也先生、浜窪 隆雄先生、児玉 龍彦先生、抗体を恵与頂いたペルセウスプロテオミクス社 (東京) 内山 靖智先生、岩成 宏子先生に深く感謝致します。また、本研究に関して助言・協力頂いた長谷川 剛先生、姜 淑英先生、大橋 瑠子先生をはじめ教

室の皆様、及び新潟大学大学院医歯学総合研究科分子細胞機能学分野 藤井 博先生に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Mangelsdorf DJ: The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 83: 841 - 850, 1995.
- 2) Gustafsson JA: Seeking ligands for lonely orphan receptors. *Science* 284: 1285 - 1286, 1999.
- 3) Laffitte BA: Identification of the DNA binding specificity and potential target genes for the farnesoid X- activated receptor. *J Biol Chem* 275: 10638 - 10647, 2000.
- 4) Kuipers F: The farnesoid X receptor as modulator of bile acid metabolism. *Rev Endocr Metab Disord* 5: 319 - 326, 2004.
- 5) Forman BM: Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell* 81: 687 - 693, 1995.
- 6) Sinal CJ: Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/ BAR impairs bile acid and lipid homeostasis *Cell* 102: 731 - 744, 2000.
- 7) Lu TT: Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. *Mol Cell* 6: 507 - 515, 2000.
- 8) Gong YZ: Molecular cloning, tissue distribution, and expression of a 14 - kDa bile acid - binding protein from rat ileal cytosol. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4741 - 4745, 1994.
- 9) Gerloff T: The sister of P - glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273: 10046 - 10050, 1998.
- 10) Strautnieks SS: A gene encoding a liver - specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis. *Nat Genet* 20: 233 - 238, 1998.
- 11) Kartenbeck J: Absence of the canalicular isoform of the MRP gene - encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin - Johnson syndrome. *Hepatology* 23: 1061 - 1066, 1996.
- 12) Russell DW: Nuclear orphan receptors control cholesterol catabolism. *Cell* 97: 539 - 542, 1999.
- 13) Chiang JY: Bile acid regulation of hepatic physiology III. Bile acids and nuclear receptors.

- Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 284: G349 - 356, 2003.
- 14) Makishima M: Identification of a nuclear receptor for bile acids. Science 284: 1362 - 1365, 1999.
- 15) Parks DJ: Bile acids: natural ligands for an orphan nuclear receptor. Science 284: 1365 - 1368, 1999.
- 16) Ananthanarayanan M: Human bile salt export pump promoter is transactivated by the farnesoid X receptor/bile acid receptor. J Biol Chem 276: 28857 - 28865, 2001.
- 17) Grober J: Identification of a bile acid - responsive element in the human ileal bile acid - binding protein gene. J Biol Chem 274: 29749 - 29754, 1999.
- 18) Takikawa H: Intestinal absorption of lithocholate and its sulfate and glucuronide in rats. J Gastroenterol Hepatol 10: 383 - 386, 1995.
- 19) Kanda T: Effect of bile on the intestinal bile - acid binding protein (I - BABP) expression. In vitro and in vivo studies. FEBS Lett 384: 131 - 134: 1996.
- 20) Lee JM: Expression of the bile salt export pump is maintained after chronic cholestasis in the rat. Gastroenterology 118: 163 - 172, 2000.
- 21) Takikawa H: Hepatobiliary transport of bile acids and organic anions. J Hep - Bil - Panc Surg 9: 443 - 447, 2002.
- 22) Zollner G: Hepatobiliary transporter expression in percutaneous liver biopsies of patients with cholestatic liver diseases. Hepatology 33: 633 - 646, 2001.
- 23) Ogawa K: Characterization of inducible nature of MRP 3 in rat liver. Am J Physiol 278: G438 - 446, 2000.
- 24) Michael T: Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. Physiol Rev 83: 633 - 671, 2003.
- 25) Schmitt M: Regulation of the dynamic localization of the rat bsep gene - encoded bile salt export pump by anisoosmolarity. Hepatology 33: 509 - 518, 2001.
- 26) Crocenzi FA: Regulation of synthesis and trafficking of canalicular transporters and its alteration in acquired hepatocellular cholestasis. Experimental therapeutic strategies for its prevention. Current Medicinal Chemistry 11: 501 - 524, 2004.
- 27) Crocenzi FA: Estradiol - 17 β - D - glucuronide induces endocytic internalization of bsep in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 285, G449 - 459, 2003.
- 28) Fiorucci S: The nuclear receptor SHP mediates inhibition of hepatic stellate cells by FXR and protects against liver fibrosis. Gastroenterology 127: 1497 - 1512, 2004.
- 29) Iredale JP: Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. J Clin Invest 102: 538 - 549, 1998.
- 30) Fridman SL: Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. J Biol Chem 275: 2247 - 2250, 2000.
- 31) Makishima M: Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. J Pharmacol Sci 97: 177 - 183, 2005.
- 32) Wagner M: Role of farnesoid X receptor in determining hepatic ABC transporter expression and liver injury in bile duct - ligated mice. Gastroenterology 125: 825 - 838, 2003.
- 33) Liu Y: Hepatoprotection by the farnesoid X receptor agonist GW4064 in rat models of intra - and extrahepatic cholestasis. J Chem Invest 112: 1678 - 1687, 2003.

(平成17年12月14日受付)