

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月14日現在

機関番号：12501
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2009～2012
 課題番号：21249003
 研究課題名（和文） 慢性肝炎時の胆汁うっ滞における胆汁排泄輸送体の局在制御に関する分子論的解明
 研究課題名（英文） Molecular analysis of localization of biliary transporters in chronic hepatitis
 研究代表者
 堀江 利治（HORIE TOSHIHARU）
 千葉大学・大学院薬学研究院・教授
 研究者番号：90120154

研究成果の概要（和文）：本研究では、慢性肝炎モデルにて、胆汁うっ滞の改善に伴う肝病態に対する影響を評価すると共に、ヒト肝スライス等を用いてヒトでの有効性を検証することを目的として研究を行い、胆汁排泄輸送体の局在変化に関わる因子としてEthan DIGEを用いた2次元蛍光ディフレンシャル解析により胆汁輸送体の局在制御を担う可能性のある複数の蛋白質（Anexin A2）を同定し、MRP2の膜局在の制御因子であることを明らかとした。さらにMRP2と同様に胆汁流の生成に関わるBSEPの機能低下時において、培地中の胆汁酸に依存した毒性感受性の亢進することをヒト、ラット及びヒト肝細胞を用いたSandwich cultured hepatocyteにおいて見出した。

研究成果の概要（英文）： In this study, we examined localization of biliary transporters and physiological liver failure in chronic hepatitis by using human liver slices. We could determine the new binding partners (AnexinA2 etc) of biliary transporters by using two-dimensional fluorescence differential analysis with Ethan DIGE. And we could characterize AnexinA2 regulate the canalicular membrane localization of Mrp2. Moreover, inhibitors (CyclosporinA and Glibenclamide) of Bsep, one of biliary transporter, shows toxicity in the presence of the concentrated bile acids mixture by using human sandwich cultured hepatocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	16,900,000	5,070,000	21,970,000
2010年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2011年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2012年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
総計	35,600,000	10,680,000	46,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：プロテオーム / 放射線 / 臨床 / 薬学

1. 研究開始当初の背景

肝疾患時には胆汁うっ滞がしばしば

発症し、肝障害の重篤化を招く。我々は、急性の酸化ストレス時に胆汁排泄輸送体の局在変化による機能低下に起因する肝内性胆汁うっ滞を明らかとし、そのメカニズムを解明してきた。一方でC型肝炎などの慢性肝疾患時にも胆汁排泄輸送体の mRNA 発現量は変化せずに輸送体の膜局在性の低下による胆汁うっ滞が報告されている。長期にわたる胆汁うっ滞は胆汁酸などの蓄積により、肝硬変・肝癌へと進行することから、その早期発見と治療法の確立は重要である。そこで、本研究においては慢性の酸化ストレスに起因する慢性肝疾患時の胆汁うっ滞に関して、酸化ストレスの発生と胆汁酸の肝臓内蓄積について分子生物学的解析を行う。それに基づき慢性肝疾患時の胆汁うっ滞に対する新たな診断法の確立と治療標的分子を見出す。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに明らかとした MRP2 の局在性を上昇させるシグナル伝達の関連因子に着目し、それら活性化、阻害剤及び利胆薬等を慢性肝炎モデルマウスにて、胆汁うっ滞の改善に伴う肝病態に対する影響を評価すると共に、ヒト肝スライス等を用いてヒトでの有効性を検証することを目的として研究を行った。さらに胆汁うっ滞の起因となる酸化ストレスの発生機序に関して、これまでの研究背景からミトコンドリアに着目した研究を行った。

3. 研究の方法

- (1) *in vivo* と *in vitro* の慢性肝炎モデルにおけるプロテオミクス解析により、胆汁排泄輸送体の局在変化時に特異的に変動する因子を同定した。
- (2) C型肝炎ウイルスのコア蛋白質を発現している肝細胞(Hep-39b)とそのコントロ

ール細胞(Hep-sw6)において、C型肝炎時に併発し胆汁うっ滞の起因となる酸化ストレスの発生機序に関して、ミトコンドリアに着目した検討を行った。

4. 研究成果

- (1) 本研究においては、モデルとして汎用されるLipopolysachalideの投与を行い、胆汁排泄輸送体の局在変化に関わる因子として膜裏打ちタンパク質であるRadixinとの結合が重要な因子であることを明らかとし、更にヒト及びラット肝スライスを用いて、酸化ストレスがヒトにおいても胆汁輸送体の局在に影響を与えていることを明らかとした。更に、Ethan DIGEを用いた2次元蛍光ディファレンシャル解析により胆汁輸送体の局在制御を担う可能性のある複数の蛋白質の同定に成功した。本年度の検討により得られたこれら結果は、そこで本研究では、これまでに明らかとしたMRP2の局在性を上昇させるシグナル伝達の関連因子についてEthan DIGEを用いた2次元蛍光ディファレンシャルの解析を行った結果、MRP2と新規に結合する蛋白質としてAnnexinA2を同定した。本蛋白質とMRP2との結合に関してGST-pull down assayにより検討を行ったところ、MRP2の局在の上昇時には、AnnexinA2と結合の減少が認められた。本検討における詳細な解析からAnnexinAが、MRP2を含む膜蛋白質の細胞内動態に関わる重要な因子であることを明らかとした。また、MRP2と同様に毛細胆管側膜に発現し胆汁うっ滞の生成に関わるBSEPの機能低下時において、培地中の胆汁酸に依存した毒性感受性の亢進することをヒト、ラット肝細胞Sandwich cultured hepatocyteにおいて見出した。
- (2) C型肝炎ウイルスコア蛋白質の発現細胞から単離したミトコンドリアについて、ミトコンドリアへの鉄の取り込みが上昇することが明らかとなり、この鉄取り込みの上昇には、

カルシウムユニポーターが関与することを明らかとした。さらにカルシウムユニポーターの阻害剤によりHep39bにおけるコア蛋白質と鉄の共存化に増悪する細胞障害に対して抑制効果を示し、C型肝炎の新規治療標的となる可能性を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

1. Fujiyama N, Shitara Y, Horie T., The Mechanism of the Down-Regulation of Hepatic Transporters in Rats with Indomethacin-Induced Intestinal Injury. *Dig Dis Sci*. (査読有)2013 [Epub ahead of print]
2. Shitara Y, Takeuchi K, Horie T., Long-lasting inhibitory effects of saquinavir and ritonavir on OATP1B1-mediated uptake. *J Pharm Sci*. (査読有)2013 [Epub ahead of print]
3. Oga EF, Sekine S, Horie T., Ex vivo and in vivo investigations of the effects of extracts of *Vernonia amygdalina*, *Carica papaya* and *Tapinanthus sessilifolius* on digoxin transport and pharmacokinetics: Assessing the significance on rat intestinal P-glycoprotein efflux. *Drug Metab Pharmacokinet*. (査読有) 2013 . [Epub ahead of print]
4. Shitara Y, Nakamichi N, Norioka M, Shima H, Kato Y, Horie T., Role of organic cation/carnitine transporter 1 in uptake of phenformin and inhibitory effect on complex I respiration in mitochondria. *Toxicol Sci*. (査読有)2013;132(1):32-42.
5. Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, Sugiyama Y., Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm Drug Dispos*. (査読有) 2013;34(1):45-78.
6. Oga EF, Sekine S, Shitara Y, Horie T., P-glycoprotein mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of herbals on digoxin transport. *J Ethnopharmacol*. (査読有)2012;144(3):612-7.
7. Ueda K, Higashi K, Limwikrant W, Sekine S, Horie T, Yamamoto K, Moribe K., Mechanistic differences in permeation behavior of supersaturated and solubilized solutions of carbamazepine revealed by nuclear magnetic resonance measurements. *Mol Pharm*. (査読有)2012;9(11):3023-33.
8. Oga EF, Sekine S, Shitara Y, Horie T., Potential P-glycoprotein-mediated drug-drug interactions of antimalarial agents in Caco-2 cells. *Am J Trop Med Hyg*. (査読有)2012;87(1):64-9.
9. Suzuki K, Shitara Y, Fukuda K, Horie T., Long-lasting inhibition of the intestinal absorption of fexofenadine by cyclosporin A in rats. *J Pharm Sci*. (査読有) 2012 Jul;101(7):2606-15.
10. Sekine S, Mitsuki K, Ito K, Kugioka S, Horie T., Sustained intrahepatic glutathione depletion causes proteasomal degradation of multidrug resistance-associated protein 2 in rat liver. *Biochim Biophys Acta*. (査読有) 2012;1822(6):980-7.
11. Shitara Y, Takeuchi K, Nagamatsu Y, Wada S, Sugiyama Y, Horie T., Long-lasting inhibitory effects of cyclosporin A, but not tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake. *Drug Metab*

- Pharmacokinet. (査読有)
2012;27(4):368-78.
12. Ogimura E, Sekine S, Horie T., Bile salt export pump inhibitors are associated with bile acid-dependent drug-induced toxicity in sandwich-cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 2011;416(3-4):313-7.
13. Sekine S, Ito K, Saeki J, Horie T., Interaction of Mrp2 with radixin causes reversible canalicular Mrp2 localization induced by intracellular redox status. *Biochim Biophys Acta.* (査読有) 2011;1812(11):1427-34.
14. Tanii H, Shitara Y, Horie T., Population pharmacokinetic analysis of letrozole in Japanese postmenopausal women. *Eur J Clin Pharmacol.* 2011;67(10):1017-25.
15. Saeki J, Sekine S, Horie T., LPS-induced dissociation of multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) and radixin is associated with Mrp2 selective internalization in rats. *Biochem Pharmacol.* (査読有) 2011;81(1):178-84.
16. Okuda T, Norioka M, Shitara Y, Horie T., Multiple mechanisms underlying troglitazone-induced mitochondrial permeability transition. *Toxicol Appl Pharmacol.* (査読有) 2010;248(3):242-8.
17. Sekine S, Yano K, Saeki J, Hashimoto N, Fuwa T, Horie T., Oxidative stress is a triggering factor for LPS-induced Mrp2 internalization in the cryopreserved rat and human liver slices. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 2010;399(2):279-85.
18. Yano K, Sekine S, Nemoto K, Fuwa T, Horie T., The effect of dimeric acid on LPS-induced downregulation of Mrp2 in the rat. *Biochem Pharmacol.* (査読有) 2010;80(4):533-9.
19. Hamada K, Shitara Y, Sekine S, Horie T., Zonula Occludens-1 alterations and enhanced intestinal permeability in methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* (査読有) 2010;66(6):1031-8.
20. Moriyama T, Kemi M, Okumura C, Yoshihara K, Horie T., Involvement of advanced glycation end-products, pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine, in doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Toxicology.* (査読有) 2010;268(1-2):89-97.
21. Doi H, Horie T., Salicylic acid-induced hepatotoxicity triggered by oxidative stress. *Chem Biol Interact.* 2010;183(3):363-8.
22. Maeda T, Miyazono Y, Ito K, Hamada K, Sekine S, Horie T., Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. *Cancer Chemother Pharmacol.* (査読有) 2010;65(6):1117-23.
23. Nakano T, Sekine S, Ito K, Horie T., Correlation between apical localization of Abcc2/Mrp2 and phosphorylation status of ezrin in rat intestine. *Drug Metab Dispos.* (査読有) 2009;37(7):1521-7.
24. Shitara Y, Nagamatsu Y, Wada S, Sugiyama Y, Horie T., Long-lasting inhibition of the transporter-mediated hepatic uptake of sulfobromophthalein by cyclosporin a in rats. *Drug Metab Dispos.* (査読有) 2009;37(6):1172-8.

[学会発表] (計 2 1 件)

1. 伊藤好美, 関根秀一, 堀江利治, 小池和彦, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江肇, 堤武也, 三好秀征, 藤永秀剛, 新澤靖子, 藤江肇, 堤武也, 三好秀征, 藤永秀剛, 新澤 靖子 C型肝炎ウイルスコア蛋白質と鉄により誘発される細胞障害増悪に対するミトコンドリア鉄取り込み機構の関与第 132 年会 日本薬学会 2012 年 03 月 28-31 日 札幌
2. 小澤口尚子, 関根秀一, 堀江利治 薬物誘発性肝障害発生機序における肝ミトコンドリア内グルタチオン量の関与 第 132 年会日本薬学会 2012 年 03 月 28-31 日 札幌
3. 関根秀一, 薄田健史, 荻村栄一郎, 堀江利治 BSEP 阻害剤による胆汁酸依存的毒性のサンドイッチ培養肝細胞での評価法の確立 第 27 年会日本薬剤学会 2012 年 5 月 24-26 日 神戸
4. 関根秀一, 伊藤晃成, 堀江利治 酸化ストレス誘発性胆汁滞時における胆汁排泄輸送体の局在制御機構の解明 肝病態生理研究会 2012 年 6 月 6 日 金沢
5. 伊藤好美, 関根秀一, 堀江利治, 小池和彦, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江肇, 堤武也, 三好秀征, 藤永秀剛, 新澤靖子, 藤江肇, 堤武也, 三好秀征, 藤永秀剛, 新澤 靖子 C 型肝炎の病態悪化に対するミトコンドリア鉄蓄積と鉄取り込み機構の関与 肝病態生理研究会 2012 年 6 月 6 日 金沢
6. Shuichi Sekine, Eiichiro Ogimura, Toshiharu Horie Evaluation of bile acid dependent drug-induced liver injury in sandwich cultured rat hepatocytes MDO-ISSX 2012 年 6 月 17-21 日, Noordwijk aan Zee, The Netherlands
7. Shuichi Sekine, Eiichiro Ogimura, Toshiharu Horie Sandwich-cultured hepatocytes enable a predictive evaluation of BSEP/Bsep dysfunction-mediated, drug-induced hepatotoxicity SOT 2012 年 3 月 11-15 日 San Francisco, USA
8. 佐伯淳二郎, 関根秀一, 堀江利治 肝炎時の胆汁排泄輸送体 Mrp2 の内在化機構解明 第 131 年会日本薬学会 2011 年 3 月 28-31 日 静岡
9. 伊藤好美, 関根秀一, 堀江利治, 小池和彦, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江肇, 堤武也, 三好秀征, 藤永秀剛, 新澤 靖子 C 型肝炎ウイルスコア蛋白質により誘発されるミトコンドリア障害に対する鉄蓄積の関与 第 131 年会 日本薬学会 2011 年 3 月 28-31 日 静岡
10. 堀江利治, 関根秀一, 伊藤晃成 細胞内レドックス状態の変化による Mrp2-radixin 複合体の局在制御機構の解明 第 26 年会 日本薬剤学会 2011 年 5 月 29 日-31 日 東京
11. 堀江利治, 関根秀一, 伊藤晃成 酸化ストレス誘発性胆汁鬱滞における MRP2 の局在制御機構の解明第 33 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2011 年 11 月 24-25 日 岡山
12. 荻村 栄一郎, 関根秀一, 堀江 利治 Sandwich culutured rat hepatocytes を用いた胆汁酸依存性薬剤肝障害の定量的評価法第 26 回 日本薬物動態学会 2011 年 11 月 16-18 日 広島
13. 荻村 栄一郎, 関根秀一, 堀江 利治 Sandwich cultured rat hepatocytes を用いた胆汁酸依存性薬剤性肝障害の定量的評価第 38 回 日本トキシコロジー

学会学術年会 2011年7月11-13日 横浜

14. 釘岡里恵, 関根秀一, 三ツ木香織、伊藤晃成、堀江利治 酸化ストレス時における Mrp2 タンパク分解に対するユビキチン様修飾因子の関与 第 26 年会日本薬剤学会 2011年5月29日-31日 東
15. 矢野健太郎, 関根秀一, 根本華奈子, 不破亨, 堀江利治 LPS 誘発性胆汁うっ滞時の Mrp2 機能低下に対するジメルミン酸の抑制効果について 第 130 年会日本薬学会 2010年3月28-30日 岡山
16. 中埜貴文, 関根秀一, 伊藤晃成, 堀江利治 小腸における MRP2, MDR1 発現部位差に対する ezrin の関与第 130 年会日本薬学会 2010年3月28-30日 岡山 Shuichi Sekine, Kousei Ito, Toshiharu Horie "Canalicular Mrp2 localization is reversibly regulated by the phosphorylation status of its anchoring protein 9th ISSX 2010年9月4-8日 Istanbul Turkey
17. 佐伯淳二郎, 関根秀一, 堀江利治 LPS 誘発性 Mrp2 内在化における Mrp2-radixin 間相互作用解消の関与 第 25 回 日本薬物動態学会 2010年10月7-9日 大宮
18. 荻村栄一郎, 関根秀一, 堀江利治 Bsep 局在スクリーニング系構築による薬剤誘発性 Bsep 内在化機構の解明 第 25 回 日本薬物動態学会 2010年10月7-9日 大宮
19. 関根秀一, 設楽悦久, 堀江利治 薬物誘発性ミトコンドリア膜透過性遷移における種差の解明 37 回 日本トキシコロジー学会学術年会 2010年6月16-18日 沖縄
20. 三ツ木香織, 関根秀一, 堀江利治 酸化

ストレス時における Mrp2 タンパク分解に対するユビキチン様修飾因子の関与 第 129 年会 日本薬学会 2009年3月26-28日 京都

21. 佐伯淳二郎, 関根秀一, 月田早智子, 堀江利治 LPS 誘発性 Mrp2 局在変化への Radixin の脱リン酸化の関与 第 24 回 日本薬物動態学会 2009年11月27-29日 京都

[図書] (計2件)

1. Kato M, Shitara Y, Kitajima M, Tachibana T, Igarashi M, Horie T, Sugiyama Y., 2010, Extrapolation of In vitro Metabolic and P-Glycoprotein-mediated Transport data to In vivo by Modeling and Simulations, in "Enzyme- and Transporter-Based drug-drug interactions" pp299-315, Springer, NY, USA
2. 堀江利治 薬物代謝 pp.313-344(分担執筆)「新有機医薬品合成化学」、田口武夫、小林進、東山公男編、廣川書店 2012

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

発明者：関根秀一, 堀江利治

権利者：千葉大学

番号：2011-152087号

出願年月日：2011年7月23日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/yakuzai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉大学・大学院薬学研究院・

教授 堀江利治 (HORIE TOSHIHARU)

研究者番号：90120154

(2) 研究分担者

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授 設楽悦久 (SHITARA YOSHIHISA)

研究者番号：00306656

千葉大学・大学院薬学研究院・助教 関根秀一 (SEKINE SHUICHI)

研究者番号：70401007