

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15355

研究課題名（和文）リン脂質排出トランスポーターの活性化による関連疾患治療とリン脂質排出機序の解明

研究課題名（英文）Activation of phospholipid efflux transporter to treat related diseases and elucidation of the mechanism of phospholipid efflux

研究代表者

池田 義人（Ikeda, Yoshito）

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40736980

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：胆汁中へのリン脂質排出促進は、胆汁鬱滞時にみられる肝障害を軽減することが期待できた。研究代表者らはこれまでに、マウスや培養細胞を用いた実験からタウリン抱合型ヒオデオキシコール酸などが胆汁中へのリン脂質排出を担うトランスポーター（ABCB4）からのリン脂質排出を促進する結果を得ていた。本研究では、タウリン抱合型ヒオデオキシコール酸がマウスの胆汁鬱滞性肝障害を改善することと、リン脂質排出促進作用機序においてABCB4の細胞外ループドメインが重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆汁鬱滞時にみられる胆汁酸による肝組織障害をABCB4からのリン脂質排出を促進するタウリン抱合型ヒオデオキシコール酸などの投与によって改善できることを明らかにした。ABCB4からのリン脂質排出低下は、薬剤性肝障害の発症にも関連しているのではないかと注目されており、これら肝障害の改善にも有用な知見が得られたと考えられる。

また、ABCB4がリン脂質を胆汁中に排出する機序について詳細は不明であった。本研究によって、リン脂質排出に重要と考えられるABCB4の部位が示唆されたことから、タウリン抱合型ヒオデオキシコール酸よりも高いリン脂質排出促進作用を有する薬剤の開発に繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The enhancement of phospholipid efflux into bile was expected to alleviate cholestatic liver injury. In previous experiments using mice and cultured cells, we found that taurine-conjugated hyodeoxycholic acid promotes the efflux of phospholipids from ABCB4, which plays an essential role in the secretion of phospholipids into bile. In this study, we demonstrated that taurine-conjugated hyodeoxycholic acid ameliorates cholestatic liver injury in mice, and that the extracellular loop domain of ABCB4 is important for promoting phospholipid efflux.

研究分野：脂質生化学

キーワード：胆汁酸 リン脂質 ABCトランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆汁中には主要な脂質としてリン脂質(22.8mol%)のほかに、胆汁酸(70.4mol%)とコレステロール(6.8mol%)が含まれており、特に胆汁酸が有する界面活性作用は食事由来の脂質や脂溶性ビタミンの腸管吸収に重要である。しかし、高濃度の胆汁酸は、細胞膜の脂質二分子膜構造を破壊するため、胆汁鬱滞性肝障害の発症機序の一つと考えられている。これまでに研究代表者らは、ヒト胆汁中のさまざまな胆汁酸による肝細胞障害が、胆汁中の主要リン脂質であるホスファチジルコリン(PC)と胆汁酸との混合ミセル形成によって減弱することを報告してきた。すなわち、胆汁中への PC 排出を促進する薬物は、胆汁鬱滞時にみられる肝障害を軽減することが期待できた。

胆汁中への PC 排出には、肝細胞の毛細胆管膜上に発現する ATP-binding cassette B4 (ABCB4)が重要であることが知られている。ABCB4 は、多剤排出トランスポーターABCB1 (P糖タンパク質)と高いアミノ酸配列同一性(76%)および類似性(86%)を有するにもかかわらず、排出する基質は主に PC であり、ABCB4 の発現では多剤耐性は生じない。また、ABCB4 が疎水性の高い PC 分子を親水的環境である胆汁中へと排出するためには、モノマー分子状態にある胆汁酸が必要であることが報告されていた。そして我々は、ABCB4 からの PC 排出を、タウリン抱合型ヒデオキシコール酸(THDC)やタウリン抱合型ウルソデオキシコール酸(TUDC)が促進することを報告してきた。しかし、ABCB4 からの PC 排出機序において胆汁酸がどのように作用しているのかについては詳細が不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、ABCB4 の PC 排出活性化によって胆汁鬱滞性肝障害の改善が可能かどうか検討を行うとともに、胆汁酸が ABCB4 からの PC 排出を促進する機序の解明を目的に検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 胆汁鬱滞マウスを作出するため、1%コール酸を含有させた餌を 21 日間摂取させた。胆汁の鬱滞を評価するため、摂餌開始から 7 日毎に採血し、血中の総胆汁酸濃度を測定するとともに、21 日目に回収した胆汁に含有される総胆汁酸濃度を測定した。また、超高速液体クロマトグラフ-質量分析装置を用いて各胆汁酸の濃度を測定した。

(2) 1%コール酸含有食を与える事で作出した胆汁鬱滞マウスの肝組織障害を評価するため、7 日毎に採血し、血漿中の aspartate aminotransferase (AST)活性と alanine aminotransferase (ALT)活性を測定した。さらに THDC や TUDC の投与が胆汁鬱滞性肝障害の改善に有用かどうか検討するため、1 日 1 回、21 日間、尾静脈注射により投与した。対象群には生理食塩水を投与した。また THDC や TUDC の投与が及ぼす影響が Abcb4 の発現に依存するかどうか評価するため、Abcb4 ヘテロ欠損マウスを用いても検討を行った。

(3) 胆汁酸が ABCB4 からの PC 排出を促進する機序を解明するため、ABCB4 やその変異体を恒常的に過剰発現する培養細胞を樹立した。pIREShyg3 ベクターにヒト ABCB4 遺伝子やヒト ABCB4 変異体遺伝子が挿入されたプラスミドを作成し、ヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に導入した。ABCB4 ならびに ABCB4 変異体の発現はウエスタンブロット法を用いて確認した。ABCB4 と ABCB4 変異体から排出された培地中 PC 量を酵素定量法にて測定し、変異によるアミノ酸置換が ABCB4 の PC 排出活性に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 1%コール酸含有食を摂餌させたマウスの血中ならびに胆汁中の総胆汁酸濃度は、通常食を摂餌させた対象マウスと比較して顕著に高く、胆汁鬱滞が生じていることが示唆された。さらに、胆汁中の各胆汁酸組成を測定した結果、通常食摂餌群では胆汁中に排出される胆汁酸のうちタウリン抱合型ミユリコール酸とタウリン抱合型コール酸が約 75%を占めていたのに対し、1%コール酸含有食摂餌群ではコール酸とタウリン抱合型コール酸が約 95%を占めていた。

(2) 通常食を与えたマウスと比較して、1%コール酸含有食を与えたマウスでは血中 AST、ALT の活性上昇、すなわち胆汁鬱滞性肝障害が生じていることが示唆された。これらマウスに THDC もしくは TUDC を投与した結果、対象の生理食塩水投与群と比較していずれも血中 AST、ALT の活性上昇抑制がみられた。一方、Abcb4 の発現量が低下している Abcb4 ヘテロ欠損マウスでは THDC、TUDC 投与による血中 AST、ALT 活性への影響は減弱していた。以上の結果から、THDC や TUDC は Abcb4 の発現量に依存して胆汁鬱滞性肝障害を改善することが示唆された。

(3) ABCB4 はそのアミノ酸配列から 2 か所のアスパラギンが糖鎖修飾されることが予想されていた。そこで、該当するアスパラギンをグルタミンに置換した結果、糖鎖修飾不全によるタンパク質サイズの低下がウエスタンブロットの結果から示された。また、プロテアソーム阻害剤によって ABCB4 変異体発現量の増加がみられたことから、糖鎖修飾不全がプロテアソームによるタンパク質分解を亢進することが示唆された。さらに、ABCB4 の細胞外ループを構成するアミノ酸残基のうち 3 つをそれぞれ ABCB4 と非常に類似性の高い ABCB1 に置換した ABCB4[B1]置換体を作成した。ABCB4[B1]置換体からの PC 排出に及ぼす胆汁酸の影響を評価した結果、胆汁酸の PC 排出促進作用に顕著な低下がみられた。これら結果から、ABCB4 の細胞外ループドメインはタンパク質の安定性や胆汁酸による PC 排出促進作用に重要であることが示されたが、その分子機序を詳細に解明するためには、さらなる検討が必要と考えている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Morita Shin-ya, Ikeda Yoshito	4. 巻 206
2. 論文標題 Regulation of membrane phospholipid biosynthesis in mammalian cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 115296 ~ 115296
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2022.115296	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田義人、江村花、山野智美、塩本雅樹、木ノ本達暉、横山春香、岡田芽依、土反伸和
2. 発表標題 タウリン抱合型胆汁酸が有する胆汁鬱滞性肝障害に対する改善作用
3. 学会等名 膜シンポジウム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江村花、池田義人、塩本雅樹、木ノ本達暉、横山春香、岡田芽依、山野智美、土反伸和
2. 発表標題 タウリン抱合型胆汁酸投与が胆汁鬱滞性肝障害に与える影響
3. 学会等名 第72回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江村花、池田義人、塩本雅樹、木ノ本達暉、横山春香、岡田芽依、山野智美、土反伸和
2. 発表標題 タウリン抱合型胆汁酸投与による胆汁鬱滞性肝障害への影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山野智美、池田義人、塩本雅樹、木ノ本達暉、横山春香、岡田芽依、江村花、土反伸和
2. 発表標題 Abcb4欠損マウスへのタウリン抱合型胆汁酸投与が及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 池田義人、森田真也	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 3
3. 書名 アグリバイオ トランスポーターと健康	

1. 著者名 池田義人、森田真也	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 3
3. 書名 メディカル・サイエンス・ダイジェスト 特集 疫学からみた肝炎との闘い	

〔産業財産権〕

〔その他〕

滋賀医科大学医学部附属病院 薬剤部 https://www.shiga-med.ac.jp/~hqpharm/index.html 神戸薬科大学 医薬細胞生物学研究室 https://medicinalcellbiolo.wixsite.com/kpu-med-cell-biol

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------