

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31日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590746

研究課題名（和文）胆汁うっ滞治療薬開発を目的とした胆汁分泌機構の包括的解析

研究課題名（英文）Comprehensive study to elucidate molecular mechanisms behind intrahepatic cholestasis

研究代表者

加川 建弘（KAGAWA TATEHIRO）

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：30245469

研究成果の概要（和文）：胆汁うっ滞症は難治性疾患であり、より良い治療薬を開発するには胆汁分泌機構の詳細を明らかにする必要がある。ウルソデオキシコール酸は胆汁分泌を促進する作用を有しているが、どのようなメカニズムで作用しているかはわかっていなかった。本研究では細胞を用いた実験系を用いて、ウルソデオキシコール酸が胆汁酸トランスポーターである Bsep 蛋白を細胞膜上で安定させることにより胆汁分泌を促進していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Intrahepatic cholestasis is a difficult-to-treat disease. Although ursodeoxycholic acid has choleric effect and is widely used to treat cholestasis, molecular mechanisms behind this effect remain unknown. In this study we demonstrated that ursodeoxycholic acid induces choleresis by stabilizing bile salt export pump in the apical membrane.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1300000	390000	1690000
2011年度	1100000	330000	1430000
2012年度	600000	180000	780000
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：胆汁酸トランスポーター、胆汁うっ滞、胆汁分泌、ウルソデオキシコール酸

1. 研究開始当初の背景

肝内胆汁うっ滞症は臨床の現場で時々遭遇する難治性疾患であり、長期間持続すると胆汁性肝硬変に移行し、死に至るケースも散見される。胆汁分泌は肝臓の最も大きな役割の一つであり、胆汁は小腸における脂肪、ビタミンの吸収に必須だけでなく、脂質代謝、

糖代謝にも密接に関係している（Nat Rev Drug Discov. 2008;7:678-93）。近年、胆汁成分のトランスポーターが次々にクローニングされ、また胆汁酸をリガンドとする G protein coupled receptor や核内受容体、さらには小腸から分泌され、肝臓においてコレステロールから胆汁酸を合成する律速酵素である

CYP7A1を制御するFGF19の存在が明らかにされ、胆汁分泌に関与するプレーヤーの全貌が垣間見えるようになってきた (Cell Mol Life Sci. 2008;65:2461-83)。

胆汁分泌の律速段階は肝細胞の毛細胆管膜に局在するトランスポーターを介した胆汁成分の胆管内への排出である。胆汁酸、ビリルビンなどの有機アニオン、リン脂質、コレステロールはそれぞれ bile salt export pump (Bsep, ABCB11)、Mrp2 (ABCC2)、Mdr3 (ABCB4)、ABCG5/G8 によって排出される。我々はこれまで科学研究費補助金 (基盤 C、課題番号 17590681) を得て、Bsep の胆汁酸輸送活性測定系の確立、Bsep における糖鎖修飾の意義の解明 (Mochizuki K, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2007; 292: G818-28)、BSEP 変異で発症する先天性胆汁うっ滞症の発症メカニズムの解明 (Kagawa T, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2008; 294: G58-67) を行ってきた。

胆汁うっ滞治療薬としてウルソデオキシコール酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)が頻用されているが、その作用機序はよくわかっていない。また、Bsep など胆汁分泌に関与するトランスポーターが毛細胆管膜上でどのような分子とクラスターを形成しているかや、endocytosis, exocytosis の制御機構はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は UDCA の持つ利胆作用の作用機序を分子レベルで解明すること、胆汁分泌に関与するトランスポーターが毛細胆管膜上でどのような分子とクラスターを形成しているかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) Bsep 活性の測定

Transwell 上で Ntcp (Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide) と Bsep を共発現する MDCKII 細胞を培養し、lower chamber にトリチウムラベルした taurocholic acid (TC) を添加、1 時間培養後、upper chamber 中、及び細胞内の radioactivity を測定し、下記の計算式で Bsep 活性を算出した: (rate of transcellular TC flux)/(intracellular TC concentration)。

(2) Bsep 蛋白の検出

細胞内 Bsep 蛋白は特異的抗体を用いた immunoblot で検出した。apical membrane 上の Bsep 蛋白の検出は biotinylation 法により行った。細胞内の Bsep 蛋白半減期は cycloheximide 添加後、経時的に細胞を回収し、immunoblot で Bsep 蛋白を定量した。

4. 研究成果

(1) UDCA による利胆作用機序の解析

① Ntcp, Bsep を恒常的に発現する MDCKII 細胞株の樹立

Bsep の機能を見るためには胆汁酸を細胞に取り込む分子が必要である。そこで胆汁酸を取り込むトランスポーターである Ntcp を恒常的に発現する MDCKII 細胞に Bsep を transfection し、Ntcp, Bsep 両方を恒常的に発現する細胞株を樹立し、N1 細胞と命名した。

② Bsep 活性に及ぼす影響

N1 細胞において UDCA は Ntcp 活性には影響を与えなかったが、Bsep 活性を濃度依存性に上昇させた。100 μM の濃度では約 1.45 倍に上昇させた。TC、cholic acid (CA)、tauroursodeoxycholic acid (TUDCA)

は Bsep 活性を上昇させなかったが、norUDCA は UDCA と同様に Bsep 活性を増強した。

③ Bsep 蛋白に及ぼす影響

UDCA による Bsep 活性上昇のメカニズムを明らかにするため、Bsep 蛋白の挙動を解析した。細胞全体の Bsep 蛋白発現量は UDCA で変化しなかったが、apical membrane 上の Bsep 蛋白発現量は UDCA により、濃度依存性に増加した。また、apical membrane 上の Bsep 蛋白の半減期は、UDCA 添加により、2.4 時間から 5.0 時間に延長した。このことから UDCA が apical membrane 上の Bsep 蛋白を安定化させることにより、活性化していることが明らかとなった。

④ 他の蛋白に及ぼす影響

UDCA の作用が Bsep 特異的かどうかを検討するため、apical protein として transferrin receptor、GL-GPI を、basolateral protein として Na⁺K⁺-ATPase を対象蛋白として UDCA の影響を検討した。UDCA 投与により、これら蛋白の細胞内、及び、細胞膜上の発現量は変化しなかった。このことから、UDCA 作用は Bsep 特異的であることが明らかとなった。

⑤ 各種阻害剤と影響

阻害剤として、protein kinase A 阻害剤 (KT 5720)、adenylate cyclase 阻害剤 (2',5'-dideoxyadenosine)、p38^{MAPK} 阻害剤 (SB 202190)、phosphatidylinositide 3 (PI3)-kinase 阻害剤 (LY 294002)、microtubule polymerization 阻害剤 (nocodazole)、protein transport 阻害剤 (brefeldin A)、Ca²⁺ 阻害剤 (BAPTA-AM) の影響を検討した。その

結果、SB 202190、LY 294002、nocodazole、brefeldin A は Bsep 活性を阻害したが、UDCA による Bsep 活性化効果は阻害しなかった。すなわち、UDCA の作用は protein kinase A、PI3-kinase、microtubule 非依存性であり、apical membrane 上の Bsep の endocytosis を抑制することにより、分解を回避させ、安定化させているものと推察された。

⑥ 疾患に関与する変異を有する Bsep に対する影響

BSEP の変異によって生じる先天性疾患が 2 つ知られている。一つは進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 (progressive familial intrahepatic cholestasis 2、PFIC2) であり、進行性で、小児期に肝移植が必要となる疾患である。一方、良性反復性肝内胆汁うっ滞症 2 (benign recurrent intrahepatic cholestasis 2、BRIC2) は発黄を繰り返すが、肝硬変に進行することは少なく、予後良好である。これらの疾患に対する UDCA の効果は controversial であり、本研究では PFIC2 変異である G982R、D482G、BRIC2 変異である A570T を有する Bsep を恒常的に発現する MDCKII 細胞を樹立し、UDCA の影響を検討した。その結果、UDCA は A570T を wild-type Bsep と同様、有意に活性化したが、G982R、D482G に対しては効果が見られなかった。このことから、UDCA は胆汁酸輸送活性をある程度維持している BRIC2 変異体に対しては活性化作用を有するが、ほとんど活性のない PFIC2 変異体に対しては効果がないことが示唆された。

(2) Bsep 結合蛋白の探索

Bsep を恒常的に発現する HEK 細胞

などを用いて、免疫沈降法にて Bsep 結合蛋白の解析をおこなった。現在までに数個の結合蛋白を同定し、現在さらなる解析を行っている。

(3) 本研究課題の成果

本研究では UDCA の作用機序を明らかにし、胆汁分泌機構の理解を進めるができた。将来的には胆汁分泌に関与する分子機構の解明をさらに発展させ、胆汁うっ滞の治療薬開発につなげたい。

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 13 件)

- (1) Kagawa T, et al (7 名、1 番目)
Ursodeoxycholic acid stabilizes the bile salt export pump in the apical membrane in MDCK II cells. *J Gastroenterol* (in press). 査読有り
- (2) Koizumi J, Kagawa T, et al (15名、11 番目). Partial splenic embolization using n-butyl cyanoacrylate: intraprocedural evaluation by magnetic resonance imaging. *Eur Radiol*. 2013;23(5):1429-42. 査読有り
- (3) Koizumi J, Kagawa T, et al (15名、8番 目). Carbon Dioxide (CO₂) vs Iodinated Contrast Digital Subtraction Angiography during Balloon-occluded Retrograde Transvenous Obliteration (BRTO) Using Foam Sclerosant for Gastric Varices. *J Vasc Interv Radiol*. 2012; 23:1453-1459. 査読有り
- (4) Mizukami H, Kagawa T, et al (12名、2 番 目). Complete Response after Short-Term Sorafenib Treatment in a Patient with Lymph Node Metastasis of

Hepatocellular Carcinoma. *Case Rep Oncol* 2012;5:380-384. doi: 10.1159/000341259. 査読有り

- (5) Hirose S, Kagawa T, et al (9名、2番目). Type 1 gastric cancer presenting as protein-losing gastroenteropathy and ball-valve syndrome. *Dig Endosc*. 2012; 24:55.doi:10.1111/j.1443-1661.2011.0116 4.x. 査読有り
- (6) Koizumi J, Kagawa T, et al (7 名、5 番 目). Balloon-occluded retrograde transvenous obliteration of gastric varices: use of CT-guided foam sclerotherapy to optimize technique. *AJR Am J Roentgenol*. 2012 Jul;199(1):200-7. 査読有り
- (7) Kagawa T, et al (20 名、1 番目) Weight-based high- and low-dose ribavirin in combination with peginterferon α -2b therapy for genotype 2 chronic hepatitis C: A randomized trial. *Hepatol Res* 2012 Apr;42(4):351-358. 査 読有り
- (8) Miyata M, Kagawa T, et al (6 名、4 番 目). Involvement of multiple elements in FXR-mediated transcriptional activation of FGF19. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012 May 3;132(1-2):41-47. 査読有り
- (9) Takashimizu S, Kagawa T, et al (7 名、 4 番 目). Effect of endothelin a receptor antagonist on hepatic hemodynamics in cirrhotic rats. Implications for endothelin-1 in portal hypertension. *Tokai J Exp Clin Med*. 2011 Jul 20;36(2):37-43. 査読有り
- (10) Koizumi J, Kagawa T, et al (11 名、6 番 目). C-arm CT-guided foam sclerotherapy for the treatment of gastric

varices. J Vasc Interv Radiol. 2010 Oct;21(10):1583-7. 査読有り

(1 1) [Kagawa T](#), et al (8名、1番目). Transcatheter arterial chemoembolization plus radiofrequency ablation therapy for early stage hepatocellular carcinoma: comparison with surgical resection. Cancer 2010;116:3638-44. 査読有り

(1 2) Numata M, [Kagawa T](#), et al (20名、2番目). Differential Impact of Adherence to Pegylated Interferon and Ribavirin in the Treatment of Genotype 1 High Viral Titer Chronic Hepatitis C 2010, Article ID 702748. doi:10.1155/2010/702748 査読有り

(1 3) [Kagawa T](#), Keeffe EB. Long-term effects of antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. Hepatitis Research and Treatment 2010, Article ID 562578. doi:10.1155/2010/562578 査読有り

[学会発表] (計9件)

(1) 加川建弘. 肝内胆汁うっ滞症におけるBSEP SNPの解析. ワークショップ: 肝臓における薬物代謝研究の展開. 第48回日本肝臓学会総会. 2012. 6. 7-6. 8 金沢

~~(1)~~ (2) 鶴谷康太、[加川建弘](#). 肝内胆汁うっ滞症における ABCB11 V444A polymorphism と HLA genotype の解析. 第34回胆汁酸研究会. 2012. 12. 1、名古屋

~~(2)~~ (3) 宮田昌明、畑竜也、[加川建弘](#). 胆汁酸動態の調節因子であるヒト回腸 FGF19は複数のFXR応答領域を介して転写調節される. 第33回胆汁酸研究会. 2011. 11. 19 大阪

~~(3)~~ (4) [Kagawa T](#).

Ursodeoxycholic acid activates bile salt export pump stably expressed in MDCK II cells. 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 10. 29-11. 2, 2010, Boston, USA

~~(4)~~ (5) [加川建弘、渡辺勲史、峯徹哉](#). 胆汁酸トランスポーターにおける糖鎖修飾の意義 -肝硬変症における胆汁うっ滞との関係-. ワークショップ1 (胆汁酸と生体機能調節、疾患との関わり) 第14回日本肝臓学会大会. 2010. 10. 13-10. 14 横浜

~~(5)~~ (6) [加川建弘](#). UDCAによるbile salt export pump活性化機序の解析. 第32回胆汁酸研究会. 2010. 11. 6. 仙台

~~(6)~~ (7) [加川建弘](#). UDCAによるbile salt export pump活性化機序の解析. 第5回トランスポーター研究会. 2010. 7. 10-11. 東京

~~(7)~~ (8) [加川建弘](#). ウルソデオキシコール酸による胆汁酸トランスポーター活性化機序の解析. 第6回東日本胆汁酸研究会. 2010. 7. 31. 東京

~~(8)~~ (9) [加川建弘](#). UDCAによる胆汁酸トランスポーター活性化機序の解析. 第9回生体機能研究会. 2010. 7. 30-31. 箱根

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加川 建弘 (KAGAWA TATEHIRO)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：30245469

