

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790172

研究課題名(和文) Radixinのリン酸化変化に伴う胆汁排泄輸送体の局在変化が及ぼす生体への影響

研究課題名(英文) The role of phosphorylation status of radixin on the localization of biliary transporters

研究代表者

関根 秀一 (Sekine, Shuichi)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70401007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

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、胆汁排泄輸送体の局在変化に関わる因子としてRadixinなどのアンカー蛋白質のリン酸化状態の変化の生体への影響について検討を行った。その結果、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 which negatively regulates the canalicular membrane localization of Mrp2 and Bsep. Moreover, cholestatic drugs(CyclosporinA and Glibenclamide), including inhibitors of Bsep, one of biliary transporter, shows hepatotoxicity in the presence of the concentrated bile acids mixture by using human sandwich cultured hepatocytes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：胆汁うっ滞 トランスポーター 胆汁酸

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓の毛細胆管側膜には MRP2 (Multidrug resistance associated protein 2)、BSEP (Bile salt export pump) が発現しており、ATP の加水分解エネルギーを利用してビリルビンやグルタチオン (GSH)、胆汁酸等の内因性基質を濃縮的に胆汁中に排泄することで胆汁流の生成に寄与している。近年、これら慢性肝炎時に MRP2 や BSEP 及び Radixin の mRNA 発現量低下を伴わない胆管側膜での局在性の低下が報告されている。また Radixin の C 末端の脱リン酸化によりアンカーとしての機能を失い、細胞質へ局在変化することが知られている。これらから慢性肝疾患時の胆汁輸送体の局在変化にラット同様に Radixin のリン酸化の変化が関与していることを示唆している。

胆汁うっ滞時には胆汁排泄輸送体の基質である胆汁酸等が肝臓に蓄積し肝線維化や肝硬変、肝臓への進行に関わると考えられている。しかし現在、これら慢性肝疾患時における胆汁排泄輸送体の内在化に伴う胆汁酸等の蓄積が及ぼす生体への影響については明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究は MRP2 と BSEP の局在性が Radixin の C 末端のリン酸化状態を変化させることにより可逆的に制御されるという申請者の研究成果を基にして、慢性の肝炎モデルに被検化合物の投与を行い、局在性の回復に伴う胆汁うっ滞の改善が、肝硬変や肝臓への進行を抑制するか検証を行う。これらにより慢性肝疾患時における Radixin の脱リン酸化による胆汁排泄輸送体の内在化に伴う内因性基質の蓄積が肝病態の悪化に関わることを明らかとすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

既に構築した BSEP 及び MRP2 の N 末端に緑色蛍光色素 (GFP) を融合させた MRP2、BSEP-GFP 発現ベクターを肝細胞に導入し、

検討を行う。またヒト Sandwich cultured hepatocyte において、BSEP の内在化を伴う胆汁うっ滞や肝臓を誘発する薬物について、その毒性が胆汁酸の蓄積に依存するのかについて検討を行う。

### 4. 研究成果

本研究では、ラット、ヒト遊離肝細胞を用いた、新たな BSEP 機能評価系の構築を目的として、薬剤性肝臓を起す薬物について、BSEP の局在性と輸送機能への影響の検討を行った。BSEP-GFP 発現 MCRh7777 細胞株において、Molecular Devise 社の協力のもとハイコンテンツスクリーニングを用いて、肝臓を誘発することが既知の化合物 (25 化合物) について、評価を行った結果、Cyclosporin A に加えて胆汁うっ滞型肝臓を惹起する 9 化合物において、BSEP の内在化を引き起こす事が新たに明らかとなり、BSEP 内在化という新規阻害機序により肝臓が惹起される可能性が明らかとなった。また胆汁排泄輸送体の局在変化に関わる因子として Radixin などのアンカー蛋白質のリン酸化状態の変化の生体への影響について検討を行った。その結果、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 (Anxin 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。先の検討において BSEP 阻害を示した 9 化合物のうち Glibenclamide においては、ヒト肝細胞に対して毒性を示さなかった。本化合物について、詳細な検討を行った結果、Glibenclamide はヒト肝細胞内で速やかに代謝による消失が起きていることが、毒性を示さない原因であることが明らかとなり、ヒト Sandwich cultured hepatocytes を用いた手法が胆汁うっ滞型肝臓のスクリーニングや、局在制御のメカニ

ズムの解明に有用なツールとなることを示した。

#### 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11件)

1. Nakano T, Sekine S, Ito K, Horie T., Ezrin regulates the expression of Mrp2/Abcc2 and Mdr1/Abcb1 along the rat small intestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013 (査読有) 305(11):G807-17. doi: 10.1152/ajpgi.00187.2013.
2. Sekine S, Kimura T, Motoyama M, Shitara Y, Wakazono H, Oida H, Horie T., The role of cyclophilin D in interspecies differences in susceptibility to hepatotoxic drug-induced mitochondrial injury. *Biochem Pharmacol.* 2013 (査読有) 15;86(10):1507-14. doi: 10.1016/j.bcp.2013.08.027.
3. Hamada K, Kakigawa N, Sekine S, Shitara Y, Horie T., Disruption of ZO-1/claudin-4 interaction in relation to inflammatory responses in methotrexate-induced intestinal mucositis. *Cancer Chemother Pharmacol.* (査読有) 2013;72(4):757-65. doi: 10.1007/s00280-013-2238-2.
4. 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;28(4):314-20.
5. 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.
6. 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. doi: 10.1021/mp300083e.
7. 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. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0817.
8. 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. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.01.015.
9. 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. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.11.032.

10. 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. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.07.015.
11. 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. doi: 10.1016/j.bcp.2010.09.016.

[学会発表](計 31 件)

1. 野崎麻友香、関根秀一、伊藤晃成 サンドイッチ培養肝細胞における薬剤毒性評価と薬剤性胆汁うっ滞リスクの相関性の検討 日本薬学会 第 134 年会 2014 年 3 月 27 日 熊本
2. 田中彩香、関根秀一、白川真帆、堀江利治、伊藤晃成 反応性代謝物を考慮した薬剤性肝障害発症におけるミトコンドリア毒性の関与 日本薬学会 第 134 年会 2014 年 3 月 27 日 熊本
3. 荒川公一、関根秀一、田中彩香、劉聡、伊藤晃成 LPS 併用薬剤性肝障害モデルラットにおけるミトコンドリア機能評価 日本薬学会 第 134 年会 2014 年 3 月 27 日 熊本
4. 深貝明子、関根秀一、大泉久美子、伊藤晃成 胆汁酸排泄輸送体阻害に伴う肝細胞毒性に寄与する胆汁酸分子種の解析 日本薬学会 第 134 年会 2014 年 3 月 27 日 熊本
5. 薄田健史、関根秀一、青木重樹、伊藤晃成 血管側胆汁酸排泄輸送体 MRPs 阻害薬物による胆汁酸依存性肝細胞障害に関する検討 日本薬学会 第 134 年会 2014 年 3 月 27 日 熊本
6. 関根秀一、薄田健史、堀江利治、伊藤晃成 サンドイッチ培養肝細胞を用いた胆汁うっ滞性肝障害誘発薬物の毒性評価系の構築 第 35 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2013 年 11 月 22 日 東京
7. 田中彩香、関根秀一、白川真帆、堀江利治、伊藤晃成 Establishment of in vitro screening system for the reactive metabolite induced mitochondrial toxicity 第 28 回日本薬物動態学会 2013 年 10 月 9 日 東京
8. 薄田健史、関根秀一、伊藤晃成 The involvement of basal efflux of bile acids on drug induced bile acids-dependent hepatotoxicity in rat sandwich cultured hepatocytes 第 28 回日本薬物動態学会 2013 年 10 月 9 日 東京
9. 薄田健史、関根秀一、荻村栄一郎、橋本希美、伊藤晃成、堀江利治 HepaRG 細胞を用いた薬物誘発性胆汁酸依存性毒性の評価系の確立 第 40 回 日本毒性学会 2013 年 6 月 17 日 千葉
10. 関根秀一、浅田千晶、前田友子、書川尚子、堀江利治 メトトレキサート誘発性消化管障害における好中球浸潤の関与 第 40 回 日本毒性学会 2013 年 6 月 17 日 千葉
11. 白川真帆、関根秀一、伊藤晃成、堀江利治 ミトコンドリアの毒性感受性決定因子としてのミトコンドリア内 GSH 量の検討 日本薬剤学会 第 28 年会 2013 年 5 月 23 日 愛知
12. 大久保江美、関根秀一、若林賢一、笠松俊夫、西山直宏、堀江利治 生体成分共存下におけるカテキンの安定性と ROS の生成 第 20 回年会 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 2012 年 8 月 25 日 仙台

13. 関根秀一、伊藤晃成、堀江利治 酸化ストレス誘発性胆汁滞滞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
14. 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
15. Shuichi Sekine, Eiichiro Ogimura, Toshiharu Horie Evaluation of bile acid dependent drug-induced liver injury in sandwich cultured rat hepatocytes MD0-ISSX 2012年6月17-21日, Noordwijk aan Zee, The Netherlands
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 小澤口尚子, 関根秀一, 堀江利治 肝障害誘発性薬物による肝毒性に対する肝ミトコンドリア中のグルタチオン量の関与 第19年会 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 2011年12月17日 仙台
21. 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
22. Enoche F.Oga, 関根秀一、設楽悦久、堀江利治 POTENTIAL P-GLYCOPROTEIN MEDIATED DRUG-DRUG INTERACTIONS OF SOME ANTI-MALARIALS 第26回 日本薬物動態学会 2011年11月16-18日 広島
23. 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
24. 関根秀一、木村 友映、本山 碧、堀江 利治 薬物誘発性ミトコンドリア感受性の動物間種差における Cyclophilin D の関与 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
25. 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
26. 釘岡里恵, 関根秀一, ミツ木香織、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 東京
27. 書川尚子, 関根秀一, 浅田千晶、前田智

- 子、堀江利治 メトトレキサート誘発性  
消化管バリア機能障害における好中球  
浸潤の関与 第 26 年会日本薬剤学会  
2011 年 5 月 29 日-31 日 東京
28. 長里美希, 関根秀一、日比野 翔、堀江  
利治 癌細胞の多剤耐性における PDZ タ  
ンパク質の関与 第 26 年会日本薬剤学会  
2011 年 5 月 29 日-31 日 東京
29. 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
30. 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  
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
31. 佐伯淳二郎, 関根秀一, 堀江利治 肝炎  
症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

〔図書〕(計 1 件)

分担 DDS 製剤の開発・評価の実用化手法  
2013 年 技術情報協会  
芦澤一英 他 総 680 ページ (266-269 ペ  
ージ)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

被験化合物の肝毒性を評価する方法および  
肝毒性を有する化合物のスクリーニング方  
法

発明者：関根秀一

権利者：千葉大学

特許 (発明)

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

関根 秀一 (SEKINE SHUICHI)

千葉大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：70401007