

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460192

研究課題名(和文) ABCトランスポーターの分解経路を標的とした疾病治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic method for ABC transporter-related diseases

研究代表者

林 久允 (HAYASHI, Hisamitsu)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：10451858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：進行性家族性肝内胆汁うっ滞症2型(PFIC2)は、ABCトランスポーターであるBSEPの先天性機能低下により発症する難治性肝疾患である。本研究では、研究代表者の基礎研究成果に基づき、PFIC2に対する、フェニル酪酸ナトリウム(NaPB)の有効性、安全性を検証する臨床研究を実施した。その結果、NaPBが、PFIC2の生化学検査値、肝組織病理像を改善することを確認した。

NaPBの本薬効発現には、BSEPの分解抑制作用が関与することから、BSEPの分解に関わる分子機構の解析を進め、当該機構に関わる分子群を複数同定した。また、他のABCトランスポーターの分解機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2), a pediatric liver disease, is caused by mutations in ABCB11 encoding BSEP, an ABC transporter. No effective medical therapy has been established for PFIC2. Based on our previous findings from in vitro and animal studies, in this research project, we carried out clinical study to evaluate efficacy and safety of sodium phenylbutyrate (NaPB) in patients with PFIC2. Therapy with NaPB significantly improved biochemical tests and liver histology in the patients. Because this effect of NaPB involved inhibition of BSEP degradation, molecular mechanism underlying the degradation of BSEP and other ABC transporters was studied. A couple of molecules responsible for this mechanism have been identified.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：ABCトランスポーター 胆汁うっ滞症 タンパク質分解

### 1. 研究開始当初の背景

ABC トランスポーターの機能活性化が治療に繋がると予測される疾患が多数報告されている。しかしながら、現在、ABC トランスポーターの機能増加をヒトで実現する方法論はなく、これら疾患群に対する薬物療法は存在しない。研究代表者は、ABC トランスポーターの細胞膜発現量を高め、単位細胞当たりの ABC トランスポーターの活性を増強する方法論の開発が、新たな疾患治療法の開発に直結すると考えた。これまでに、in vitro 試験、動物試験から、尿素サイクル異常症の治療薬であるフェニル酪酸ナトリウム (NaPB) が、胆汁酸排泄トランスポーター Bile salt export pump (BSEP)/ABCB11 の分解を阻害し、BSEP の細胞膜発現量を高める薬理作用を有することを見出している。

### 2. 研究の目的

BSEP の機能活性化が治療に繋がると想定される、肝内胆汁うっ滞症患者を対象とした臨床試験を行い、NaPB の有効性を検証する。本薬剤の治療効果に基づき、ABC トランスポーターの分解経路を標的とした疾病治療法の有用性を明らかにする。さらに、本方法論を ABC トランスポーター関連疾患群に対する治療戦略として一般化すべく、BSEP 以外の ABC トランスポーターの分解機構に着目した研究も実施する。

### 3. 研究の方法

肝内胆汁うっ滞症に対する NaPB の有効性の検証

小児期に発症する最も重篤な肝疾患である、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 (PFIC) を対象とし、NaPB の有効性、安全性を検証する。PFIC 6 症例を被験者とし、NaPB の用量漸増試験を実施する。

#### ABC トランスポーターの分解機構の解析

BSEP は、細胞膜においてユビキチン化を受けた後、分解をされることを見出している。cDNA ライブラリー、siRNA ライブラリーを用い、BSEP のユビキチン化に関わる分子群を特定する。また、BSEP 以外の ABC トランスポーターが、BSEP と同様にユビキチン化を起点として、細胞膜からの分解を受けるかを検討する。

### 4. 研究成果

肝内胆汁うっ滞症に対する NaPB の有効性の検証

PFIC1 3 症例を対象とした試験では、NaPB の服用開始後に、胆汁うっ滞に付随して生じる難治性掻痒感が有意に改善し、夜間の睡眠障害が解消した。その結果、被験者、及び保護者の QOL が著しく向上した。また、PFIC2 3 症例を対象とした試験では、本薬剤の服用に伴い、血液生化学検査値が有意に改善した。2 症例では、ビリルビン値が正常値まで低減した。また、胆汁栓、巨細胞性変化など、PFIC2 特有の肝組織病理像の著明な改善も認められた。

#### ABC トランスポーターの分解機構の解析

細胞膜に発現する BSEP をユビキチン化し、BSEP の細胞膜からの内在化、分解を促す分子群を複数同定した。また、BSEP 以外の疾患関連 ABC トランスポーターとしては、機能低下がアテローム性動脈硬化症、アルツハイマー病などのリスクとなることが報告されている ABCA1 を対象とした研究を実施した。その結果、ABCA1 の細胞膜におけるユビキチン化は、LXR との相互作用により抑制されること、本相互作用が、ABCA1 のリン酸化により制御されていることを見出した。遺伝子改変動物を用いた解析から、本制御機構は、肝実質細胞には存在するものの、マクロファージ、小腸上皮細胞には存在しないことが示唆された。

### 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8件)

Katsube A\*, Hayashi H\*,<sup>§</sup> Kusuhara H. Pim-1L Protects Cell Surface-Resident ABCA1 From Lysosomal Degradation in Hepatocytes and Thereby Regulates Plasma HDL Level. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** (査読有) 2016; 36(12):2304-2314. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.308472.

(\*:equally contribution, §:corresponding author)

Ito S\*, Hayashi H\*, Sugiura T, Ito K, Ueda H, Togawa T, Endo T, Tanikawa K, Kage M, Kusuhara H, Saitoh S. Effects of 4-phenylbutyrate therapy in a preterm infant with cholestasis and liver fibrosis. **Pediatr Int.** (査読有) 2016;58(6):506-509. DOI:

10.1111/ped.12839. (\*:equally contribution)

Hayashi H§, Naoi S, Hirose Y, Matsuzaka Y, Tanikawa K, Igarashi K, Nagasaka H, Kage M, Inui A, Kusuhara H. Successful treatment with 4-phenylbutyrate in a patient with benign recurrent intrahepatic cholestasis type 2 refractory to biliary drainage and bilirubin absorption. **Hepatol Res.** (査読有) 2016;46(2):192-200. DOI: 10.1111/hepr.12561. (§:corresponding author)

Matsuzaka Y\*, Hayashi H\*,§, Kusuhara H. Impaired Hepatic Uptake by Organic Anion-Transporting Polypeptides Is Associated with Hyperbilirubinemia and Hypercholanemia in Atp11c Mutant Mice. **Mol Pharmacol.** (査読有) 2015;88(6):1085-92. (\*:equally contribution, §:corresponding author)

Mizuno T\*, Hayashi H\*,§, Kusuhara H. Cellular Cholesterol Accumulation Facilitates Ubiquitination and Lysosomal Degradation of Cell Surface-Resident ABCA1. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** (査読有) 2015;35(6):1347-56. DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.305182. (\*:equally contribution, §:corresponding author)

Hasegawa Y\*, Hayashi H\*,§, Naoi S, Kondou H, Bessho K, Igarashi K, Hanada K, Nakao K, Kimura T, Konishi A, Nagasaka H, Miyoshi Y, Ozono K, Kusuhara H. Intractable itch relieved by 4-phenylbutyrate therapy in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis type 1. **Orphanet J Rare Dis.** (査読有) 2014;15:9:89. DOI: 10.1186/1750-1172-9-89. (\*:equally contribution, §:corresponding author)

Naoi S\*, Hayashi H\*,§, Inoue T, Tanikawa K, Igarashi K, Nagasaka H, Kage M, Takikawa H, Sugiyama Y, Inui A, Nagai T, and Kusuhara H. Improved liver dysfunction and

relieved intractable pruritus after 4-phenylbutyrate therapy in a patient with progressive familial intrahepatic cholestasis type 2. **J Pediatr.** (査読有) 2014;164(5):1219-1227.e3. DOI: 10.1016/j.jpeds.2013.12.032. (\*:equally contribution, §:corresponding author)

Aida K\*, Hayashi H\*,§, Inamura K, Mizuno T, and Sugiyama Y. Differential roles of ubiquitination in the degradation mechanism of cell surface-resident BSEP and MRP2. **Mol Pharmacol.** (査読有) 2014;85(3):482-91. DOI: 10.1124/mol.113.091090. (\*:equally contribution, §:corresponding author)

〔学会発表〕(計14件)

林 久允、ドラッグリポジショニングによる小児難治性肝疾患の医薬品開発、第37回日本臨床薬理学会学術総会、2016/12/2、米子コンベンションセンター(鳥取、米子)

林 久允、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の克服に向けた病態解明と診断・治療法の開発、第38回胆汁酸研究会、2016/11/26、久留米シティプラザ(福岡、久留米)

林 久允、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の診断法、治療法について、第151回お茶の水木曜会、2016/7/14、順天堂大学(東京、文京区)

林 久允、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の診断法、治療法の開発、第11回トランスporter研究会年会 2016/7/2、京都大学 宇治キャンパスきはだホール(京都、宇治)

Hisamitsu Hayashi, Development of pharmacotherapy for progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC), ABC 2016, 2016/3/10, Innsbruck, Austria

林 久允、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症に対する特効薬開発を指向したドラッグリポジショニング研究、JDDW2015 第23回日本消化器関連学会週間、2015/10/8、グランドプリンス新高輪(東京、港区)

林 久允、胆汁酸トランスporter-Bile salt export pumpを標的とした創薬研究、第31回日本DDS学会学術集会、

2015/7/2、京王プラザホテル（東京、新宿区）

林 久允、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症の特効薬の開発、第29回日本薬物動態学会ワークショップ、2015/5/15、一橋講堂（東京、千代田区）

林 久允、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症に対するフェニル酪酸の治療効果の検証、第118回日本小児科学会、2015/4/19、大阪国際会議場（大阪、大阪市）

林 久允、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症治療を指向したドラッグリポジショニング研究、第36回胆汁酸研究会、2014/11/22、東海大学校友会館（東京、千代田区）

林 久允、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症に対する医薬品開発、第36回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2014/11/20、徳島大学（徳島、徳島市）

Hisamitsu Hayashi, Beneficial effects of 4-phenylbutylate therapy in patients with familial intrahepatic cholestasis, AASLD2014, 2014/11/10, Massachusetts, Boston

林 久允、ドラッグリポジショニングによる進行性家族性肝内胆汁うっ滞症治療薬の開発、第31回日本小児肝臓研究会、2014/7/17、久留米大学筑水会館（福岡、久留米）

林 久允、4-phenylbutyrate の PFIC2 症例に対する治療効果の検討、第21回肝細胞研究会、2014/6/27、東京医科歯科大学 M&D タワー（東京、文京区）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：

発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 久允（HAYASHI, Hisamitsu）  
東京大学・大学院薬学系研究科・助教  
研究者番号：10451858

(2) 研究分担者

なし（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし（ ）

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし（ ）