

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860119

研究課題名(和文)炎症時におけるERMタンパク質変動とトランスポーター機能との関連

研究課題名(英文)Relation between ERM protein expression and transporter functions in inflammation

研究代表者

川瀬 篤史(KAWASE, Atsushi)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：80411578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：薬物の体内での分布を決める一因となる薬物輸送担体(トランスポーター)の機能はトランスポーター周辺環境に大きく依存している。今回着目したERMタンパク質(ezrin/radixin/moesin)はトランスポーターの膜局在に関与しており、本研究課題では炎症時のERMタンパク質の機能変動とその機構を検討した。炎症モデル動物でradixin機能が低下し、その原因のひとつに炎症時のインターロイキン産生を見出した。

研究成果の概要(英文)：The functions of transporters which are involved in drug disposition depend on surrounding environment such as ERM proteins (ezrin/radixin/moesin). Some transporters are anchored to plasma membranes by activated ERM proteins. However, the alterations in ERM proteins expression and the effects on transporter functions in inflammation remains unclear. We showed that the function of radixin and transporters were decreased in inflammation and that interleukin was involved in change of radixin.

研究分野：薬物動態学

キーワード：トランスポーター 炎症 裏打ちタンパク質 サイトカイン 一酸化窒素 肝臓

1. 研究開始当初の背景

【学術的背景】

薬物代謝酵素やトランスポーターの発現および活性は、性、内因性物質、環境、病態といった様々な要因により影響を受ける。例えば、感染症や炎症性疾患では、活性化した単球/マクロファージから産生された炎症性サイトカインにより、Multidrug resistance-associated protein (MRP)2 の量および活性が変動する。トランスポーター発現および機能変動は、基質薬物の体内動態に影響し、効果減弱や副作用を引き起こす原因となり得るため、炎症時のトランスポーター変動を正確に把握することは、臨床上極めて重要である。特に肝臓はウイルス性肝炎など炎症を受けやすいうえ、薬物代謝に重要な臓器であることから、炎症時の肝臓におけるトランスポーターの発現機構解析は重要であり、これまでに炎症時の肝臓トランスポーターの発現および機能変動に関する研究に取り組んできた。そのなかで、炎症時の肝臓にてトランスポーター (MRP2, P-糖タンパク質 (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP)) の発現量自体は変化しないものの、膜への局在が大きく低下することを明らかにした。したがって、MRP2, P-gp および BCRP の膜局在を決定する何らかの因子が炎症時に変動することが示唆された。

一方で近年、トランスポーターの細胞内局在を制御する因子として、ERM タンパク質 (Ezrin, Radixin, Moesin) が報告された。ERM タンパク質は、図 1 に示すように細胞骨格のアクチン線維 (F-アクチン) と排出トランスポーターである MRP2 などの膜内在性タンパク質とを連結させる機能を担っている。例えば、Radixin は肝臓における主要な ERM タンパク質であるが、Radixin 欠損マウスでは MRP2 の胆管側膜への局在化が低下し、高ビリルビン血症となる。すなわち、Radixin は MRP2 の膜局在において重要な役割を担っ

ている。また、Radixin は P-gp の膜局在にも関与することが報告されている。

このように ERM タンパク質はトランスポーターの細胞内局在および機能制御に極めて重要な因子であるものの、炎症時の ERM タンパク質の発現プロファイルおよびトランスポーター機能に対する影響についてはほとんど明らかになっていないが現状である。そこで、本研究では炎症状態での ERM タンパク質の発現プロファイルを明らかにするとともに、トランスポーターの発現・機能に及ぼす影響に関して検討を行う。

2. 研究の目的

これまで II 型コラーゲン誘発関節炎マウスおよびアジュバント関節炎ラット (AA ラット) を用いた検討を行ってきた。本研究では、既に肝臓におけるトランスポーター発現および機能に関する情報が蓄積されているラットを選択し、AA ラットを用い検討を行う。炎症は急性、亜急性および慢性期に大別され、作製した炎症モデル動物を用いることで、新規の抗炎症薬の評価や基礎研究が広く行われているが、申請者は AA ラットではアジュバント投与後 7 日に急性炎症、21 日に慢性炎症の症状を呈することを明らかにしており、炎症の各段階について評価できると考えている。また、ウイルス性肝炎モデルマウスについても併せて検討することで炎症モデル間の比較検討を行う。

1. 炎症時の ERM タンパク質の肝臓内局在と MRP2 および P-gp 発現局在との関連
2. トランスポーターの典型的基質の肝分布および胆汁中排泄の解析によるトランスポーター活性評価
3. 炎症性サイトカインおよび一酸化窒素 (NO) の ERM タンパク質発現に対する影響
4. ERM タンパク質の過剰発現およびノ

ックダウン時のトランスポーターの 発現変動

これまでに肝臓に発現する排出トランスポーターとERMタンパク質の関連については既にいくつかの報告があるものの、病態時の変動に着目した研究はほとんどなく、情報が乏しいのが現状である。

炎症時でのERMタンパク質の発現変動とトランスポーター機能に対する影響を明らかにすることで、トランスポーターの機能調節におけるERMタンパク質の重要性に関する知見が得られることである。炎症時の薬物動態変動におけるERMタンパク質の重要性が明らかとなれば、ERMタンパク質を標的とした阻害薬を開発することで、組織選択的なトランスポーター機能の抑制、それに伴う薬物の体内動態制御法の開発につながるものと考えている。

さらに、本研究成果をがん治療の課題に応用することも期待される。がん細胞の抗がん剤耐性化は治療上大きな障壁であり、その一因として多剤排出トランスポーターの過剰発現がある。がん細胞におけるERMタンパク質の発現を制御することで、排出トランスポーターであるP-gpやMRP1などの機能を同時に減弱させることが出来れば、抗がん剤のデリバリー効率の改善に応用できる可能性が考えられる。そこで、炎症性サイトカインおよびNOのERMタンパク質の発現制御因子としての役割を検討するとともに、ERMタンパク質の過剰発現またはノックダウンのトランスポーター発現および機能に対する影響を評価する。また、ERMタンパク質はがん転移にも関わることから、転移抑制作用を発揮するターゲットとしても期待される。これらの検討は、炎症状態のトランスポーター発現制御機構および薬物動態に及ぼす影響のさらなる解明につながる可能性がある。

3. 研究の方法

炎症モデル動物におけるERMタンパク質の発現変動：AAラットは7週齢雌性SDラットの右後肢および尾根部にウシ結核死菌をアジュバントとして皮下投与し作製した。AAラットより肝臓、小腸および腎臓を採取し、各臓器より総RNA、ホモジネートおよび膜タンパク質を調製し、それぞれリアルタイムRT-PCR法、ウエスタンブロット法および免疫沈降法により、ERMタンパク質のmRNAおよびタンパク質レベルでの発現を検討した。Radixinはリン酸化され活性型となるため、ウエスタンブロット法では、活性型Radixinの割合についても検討した。ERMタンパク質の細胞内局在の検討では、OCTコンパウンド中で凍結した組織より凍結組織切片を作製し、ERMタンパク質に対する抗体を用い免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡によりERMタンパク質の細胞内発現分布を評価した。

炎症モデル動物におけるERMタンパク質変動のトランスポーター基質輸送に対する影響とERMタンパク質-トランスポーター複合体形成の変動：トランスポーター基質の体内動態について検討を行った。既にERMタンパク質の関与が報告されているMRP2およびP-gpについて典型的基質をいくつか取り上げ、基質をControlラットおよびAAラットに静脈内投与後の肝臓内への蓄積および胆汁中排泄量に対する炎症の影響を評価した。

炎症因子のERMタンパク質に対する影響：ヒト肝癌由来株HepG2およびラットより調製した初代培養肝細胞を用い、24wellプレートに播種し、培養した。炎症因子としてinterleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF)- α , NOなどを細胞に加え、回収した細胞より総RNAおよびタンパク質を抽出し、ERMタンパク質発現変動を検討した。さらに、細胞内分布について免疫染色法によ

り検討を行った。

4. 研究成果

AA ラット肝臓より調製した総 RNA を用い ERM タンパク質 mRNA 発現量を測定したところ, radixin のみ control ラットと比べ有意な低下がみられた。しかしながら, 肝ホモジネートを用いウエスタンブロット法によりタンパク質発現量を測定したところ, radixin タンパク質発現量には変化はみられなかった。そこで, 膜タンパク質を調製し同様の検討を行ったところ, AA ラットで radixin の細胞膜での発現(局在)低下がみられた。免疫沈降法により, ERM タンパク質とトランスポーター複合体量を測定したところ, P-gp または MRP2 と radixin の複合体低下が AA ラットで認められた。さらに, 活性型 Radixin の割合について検討したところ, AA ラットで活性化 radixin の低下がみられた。このとき, P-gp 基質である rhodamine123 の静脈内投与時の胆汁排泄について検討したところ AA ラットで胆汁排泄量の低下がみられた。以上のことより炎症時に肝臓で radixin 機能が低下し, 複合体を形成するトランスポーター機能が低下することが明らかとなった。

これらの結果をもとにヒト肝癌由来株 HepG2 およびラットより調製した初代培養肝細胞を用い, 炎症因子として IL-1 β , IL-6, TNF- α , NO 供与体などを細胞に加え, 回収した細胞より総 RNA およびタンパク質を抽出し, ERM タンパク質発現変動を検討した。IL-1 β の添加により radixin 発現量の低下および膜局在の低下が観察された。このことより, *in vivo* でみられた炎症時の radixin 機能低下に IL-1 β が一部寄与することが示唆された。

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1件)

Kawase A., Sakata M., Yada N., Nakasaka M., Shimizu T., Kato Y., Iwaki M., Decreased radixin function for ATP-binding cassette transporters in liver in adjuvant-induced arthritis rats. J. Pharm. Sci., 査読有, 103(12), 4058-4065., 2014

[学会発表](計2件)

Kawase A., Alterations in expression and function of ABC transporters and ERM proteins in inflammation. Global Education Seminar West 2014-1st., 2014年12月12日, Kyoto University (Kyoto, Japan).

川瀬篤史, 炎症時におけるトランスポーター変動と ERM タンパク質の関連. 第64回日本薬学会近畿支部総会・大会., 2014年10月11日, 京都薬科大学(京都, 日本)

[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

川瀬 篤史 (KAWASE, Atsushi)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：80411578

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：