

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14918

研究課題名(和文)胆汁鬱滞性肝障害や動脈硬化症の治療を可能とするABCB4活性化分子の探索

研究課題名(英文)Exploration of enhancer of ABCB4 to enable treatment of liver injury in cholestasis and arteriosclerosis

研究代表者

池田 義人 (IKEDA, Yoshito)

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40736980

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胆汁の主要成分のひとつであるリン脂質は、胆汁酸と混合ミセルを形成することで、胆汁酸の細胞毒性を減弱させる。胆汁中へのリン脂質排出には、肝細胞の毛細胆管膜上に発現しているABCトランスポーターの一種であるABCB4が関与している。本研究では、ABCB4のリン脂質排出を促進する分子を探索し、その機序解明を試みた。培養細胞と実験動物を用いた検討により、タウリン抱合型ヒオデオキシコール酸が極めて強力なABCB4のリン脂質排出促進作用を有することを見いだした。さらに、ABCB4のリン脂質排出機序において、胆汁酸とリン脂質の混合ミセル形成過程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

ABCB4が疎水性の高いリン脂質を親水的环境である胆汁中へと排出する分子機序の詳細については不明であった。これはHDLの形成に関与するABCA1など、他の脂質トランスポーターにおいても共通の問題点である。本研究によって、リン脂質との混合ミセル形成能が高いタウリン抱合型ヒオデオキシコール酸が、リン脂質の優れたアクセプター分子として作用することが示唆された。これらの知見が、ABCB4だけでなく、他の脂質トランスポーターの輸送機序解明にも役立ち、関連する疾患の治療薬開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Bile salts are associated with phospholipid, the main constituents of bile, in mixed micells. The association of bile salts and phospholipid protects hepatocytes from the cytotoxicity of bile salts. ABCB4, a member of the ATP binding cassette transporter family, is present in the canalicular membrane of hepatocytes, and plays an essential role in the secretion of phospholipids into bile. In this study, we searched enhancer of ABCB4-mediated phospholipid efflux, and tried elucidation of its mechanism. We showed that ABCB4-mediated phospholipid efflux was significantly stimulated by taurine-conjugated hyodeoxycholate using cultured cells and experimental animals. In addition, it is conceivable that the enhancing effect of taurine-conjugated hyodeoxycholate on the ABCB4-mediated phospholipid efflux may be due to the strong mixed micelle formation ability.

研究分野：脂質生化学

キーワード：リン脂質 胆汁酸 ABCトランスポーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆汁中へのリン脂質排出に関する ABC 輸送体 ABCB4 の遺伝子変異により胆汁中のリン脂質が欠損すると、深刻な肝疾患である進行性家族性肝内胆汁鬱滞 3 型(PFIC3)が生じることが知られている。胆汁鬱滞性肝障害が惹起される機序のひとつとして、胆汁酸が有する界面活性作用による細胞膜障害が考えられる。臨床では、胆汁鬱滞性肝障害の治療薬としてウルソデオキシコール酸が広く用いられており、その主な薬理作用は「利胆作用」や「細胞毒性の強い胆汁酸との置換作用」と考えられているが、未だに不明な点が残されており、奏効しない症例も報告されている。研究代表者はこれまでに、胆汁中に含まれるリン脂質が、胆汁酸と混合ミセルを形成することで、胆汁酸の細胞毒性を減弱することを報告してきた(Ikeda et al., Sci. rep. 2017)。そのため、ABCB4 のリン脂質排出を促進することで胆汁鬱滞性肝障害の治療につながるのではないかと考えた。

ABCB4 は、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リン脂質であり、ABCB4 の発現では多剤耐性は生じない。また、ABCB4 が疎水性の高いリン脂質を親水的环境である胆汁中へと排出するためには、モノマー分子の状態にある胆汁酸の存在が必要であることが知られていた。しかし、生体内に存在する様々な胆汁酸は、分子構造の違いに起因して物性が異なる。そして胆汁酸が ABCB4 のリン脂質排出を促進するために重要な物性などは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、胆汁鬱滞性肝障害への治療につなげるため ABCB4 のリン脂質排出を強力に促進する分子の探索を行った。また、ABCB4 のリン脂質排出機序を解明するため、リン脂質排出活性促進に重要な分子の物性について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ABCB4 を恒常的に過剰発現する培養細胞を樹立するため、pIREShyg3 ベクターにヒト ABCB4 遺伝子が挿入された pIREShyg3/ABCB4 プラスミドをヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に導入した。ABCB4 の発現は特異的な抗体を用いたウエスタンブロット法により確認した。ABCB4 安定発現細胞 HEK/ABCB4 と非発現細胞 HEK293 にタウリン抱合型及びグリシン抱合型のコール酸、ウルソデオキシコール酸、ヒオデオキシコール酸を添加し、培地中へのリン脂質排出に与える影響を評価した。ABCB4 から排出されるリン脂質の多くはホスファチジルコリン(PC)であるため、酵素定量法により PC を特異的に定量した。

(2) 各胆汁酸が有する PC との混合ミセル形成能を検討するため、0.1 mM PC ベシクルに各胆汁酸を添加し、光散乱を測定した。粒子径の大きなベシクルでは大きな光散乱がみられるが、ミセルが形成されると粒子径が小さくなるため光散乱も小さくなる。PC ベシクルを混合ミセルへと相転移させるために必要な胆汁酸濃度を明らかにし、PC 排出促進活性との相関関係を評価した。

(3) 各胆汁酸の投与が胆汁組成に与える影響を評価するため、*Abcb4* ホモ遺伝子欠損マウスと野生型マウスにタウリン抱合型及びグリシン抱合型のコール酸、ウルソデオキシコール酸、ヒオデオキシコール酸を尾静脈から持続注射により投与した。胆汁を回収するため、麻酔下マウスの総胆管を結紮し、胆嚢にカテーテルを留置した。各胆汁酸投与中における胆汁流量および胆汁酸排出量、PC 排出量、コレステロール排出量を評価した。

(4) 1% コール酸を摂餌させることで作出した胆汁鬱滞性肝障害マウスにタウリン抱合型ウルソデオキシコール酸とタウリン抱合型ヒオデオキシコール酸を 1 日 1 回 3 週間、尾静脈注射により投与し、胆汁鬱滞性肝障害に与える影響を評価した。7 日毎に採血し、血漿中の AST、ALT 濃度を測定することで肝障害を評価した。

4. 研究成果

(1) ABCB4 安定発現細胞 HEK/ABCB4 にタウリン抱合型及びグリシン抱合型のコール酸、ウルソデオキシコール酸、ヒオデオキシコール酸を添加した結果、非発現細胞 HEK293 と比較して、培地中 PC 含量が増大した。なかでも、タウリン抱合型ヒオデオキシコール酸添加群では顕著に増大することをみいだした。

(2) タウリン抱合型ヒオデオキシコール酸は、他の胆汁酸と比較して、高い混合ミセル形成能を有することを明らかにした。また、各胆汁酸の疎水性指数や臨界ミセル濃度よりも、PC との混合ミセル形成能が ABCB4 の PC 排出促進活性と強い相関関係を示すことを明らかにした。

(3) *Abcb4* の有無にかかわらず、各胆汁酸の投与群では、対象の生理食塩水投与群よりも胆汁流量、胆汁酸排出量が増大した。野生型マウスへの各胆汁酸投与は胆汁中PC排出量を増大させた。なかでもタウリン抱合型ウルソデオキシコール酸とタウリン抱合型ヒオデオキシコール酸投与群の胆汁中PC排出量の増大は顕著であった。一方、*Abcb4* ホモ遺伝子欠損マウスの各胆汁酸投与群ならびに生理食塩水投与群において、胆汁中PCはほとんど検出されなかった。これら結果より、タウリン抱合型ウルソデオキシコール酸とタウリン抱合型ヒオデオキシコール酸は ABCB4 による胆汁中PC排出を促進することが明らかとなった。

(4) 通常食を与えたマウスに比較して、1%コール酸含有食を与えたマウスでは血中AST、ALT濃度の上昇がみられた。コール酸含有食摂取マウスにタウリン抱合型ウルソデオキシコール酸とタウリン抱合型ヒオデオキシコール酸を投与した結果、対象の生理食塩水投与群と比較していずれも肝障害の改善傾向がみられた。一方、*Abcb4* ホモ遺伝子欠損マウスにみられた胆汁鬱滞性肝障害はタウリン抱合型ウルソデオキシコール酸投与群に改善傾向がみられた。そのため、タウリン抱合型ヒオデオキシコール酸は胆汁中へのPC排出促進によって肝障害を改善したものと考えられた。また、タウリン抱合型ウルソデオキシコール酸はPC排出促進に加え、他の胆汁酸との置換作用による影響も考えられた。しかし個体差もみられており、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4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Ikeda Yoshito, Morita Shin-ya, Hatano Ryo, Tsuji Tokuji, Terada Tomohiro | 4. 巻 1864 |
| 2. 論文標題 Enhancing effect of taurohyodeoxycholate on ABCB4-mediated phospholipid efflux | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids | 6. 最初と最後の頁 1495 ~ 1502 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbalip.2019.06.001 | 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 - |
| 1. 著者名 Morita Shin-ya, Ikeda Yoshito, Tsuji Tokuji, Terada Tomohiro | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 Molecular Mechanisms for Protection of Hepatocytes against Bile Salt Cytotoxicity | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin | 6. 最初と最後の頁 333 ~ 340 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-01029 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ikeda Yoshito | 4. 巻 45 |
| 2. 論文標題 Exploration of Enhancer of ABCB4-mediated Phospholipid Efflux for the Protection of Hepatocytes Against Bile Salts | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 MEMBRANE | 6. 最初と最後の頁 182 ~ 186 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5360/membrane.45.182 | 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 - |
| 1. 著者名 Ikeda Yoshito | 4. 巻 140 |
| 2. 論文標題 Mechanism of Taurohyodeoxycholate-induced Biliary Phospholipid Efflux Understanding the Function of the ABCB4 Enhancer for Developing Therapeutic Agents against Bile Salt-induced Liver Injury | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI | 6. 最初と最後の頁 1329 ~ 1334 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00156 | 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8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田義人、森田真也、波多野亮、辻 徳治、寺田智祐 |
| 2. 発表標題 タウロヒオデオキシコール酸が有する胆汁中リン脂質排出促進作用とその機序 |
| 3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会・大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 池田義人、森田真也、波多野 亮、辻 徳治、寺田智祐 |
| 2. 発表標題 胆汁リン脂質排出促進作用による新規肝機能改善薬の探索 |
| 3. 学会等名 第28回日本医療薬学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田義人、森田真也、波多野 亮、辻 徳治、寺田智祐 |
| 2. 発表標題 ABCB4によるリン脂質排出を強力に促進する分子の探索 |
| 3. 学会等名 第12回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田義人、森田真也、波多野 亮、辻 徳治、寺田智祐 |
| 2. 発表標題 タウロヒオデオキシコール酸によるリン脂質排出トランスポーターABCB4の活性化 |
| 3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 池田義人、森田真也、辻 徳治、寺田智祐 |
| 2. 発表標題 タウロヒオデオキシコール酸によるABCB4リン脂質排出の促進 |
| 3. 学会等名 第60回 日本脂質生化学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 池田義人、森田真也、辻 徳治、寺田智祐 |
| 2. 発表標題 ABCB4リン脂質排出を促進する分子の探索とメカニズムの解明 |
| 3. 学会等名 日本膜学会第40年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 池田義人 |
| 2. 発表標題 タウロヒオデオキシコール酸が有する胆汁中リン脂質排出促進作用とその機序 |
| 3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 池田義人 |
| 2. 発表標題 胆汁酸毒性低減を指向する肝細胞膜リン脂質トランスポーター活性化因子の探索 |
| 3. 学会等名 膜シンポジウム2020（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|