

## 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 24 年 4 月 30 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590861

研究課題名（和文） フェニルブチレートの胆汁うっ滞抑制作用の検討

研究課題名（英文） A study on the anti-cholestatic effect of phenylbutyrate

研究代表者

滝川 一（TAKIKAWA HAJIME）

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：70197226

研究成果の概要（和文）：4-PB をラットに投与したところ、Bsep の基質である TC の胆汁中最大排泄量が増加し、TC 投与により毛細胆管膜で増加した Bsep 量がさらに増加したと考えられた。これに対して、Mrp2 の基質である BSP の胆汁中最大排泄量は変わらず、この条件下では Mrp2 量の増加は起こらないと考えられた。4-PB が LPS 投与により低下した TC の胆汁中排泄におよぼす影響をラットで検討したところ、TC の最大排泄量および胆汁流量は、4-PB 投与により回復した。以上から、4-PB は肝内胆汁うっ滞の治療に有効と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Biliary transport maximum of taurocholate, a substrate of bile salt export pump was increased by 4-phenylbutyrate in rats, suggesting further increase of the amount of bile salt export pump at the canalicular membrane. In contrast, biliary transport maximum of sulfobromophthalein, a substrate of multidrug resistance protein 2 was not increased by 4-phenylbutyrate. Bile flow and biliary taurocholate excretion inhibited by lipopolysaccharide was relieved by 4-phenylbutyrate. These data suggest that 4-phenylbutyrate is effective in the treatment of intrahepatic cholestasis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
23 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、胆汁うっ滞、トランスポーター、胆汁流量

1. 研究開始当初の背景  
近年になり、肝指向性物質の肝トランスポー

ターが同定され、これらの機能や制御機序、  
そして病態時の変化が明らかとなってきた。

毛細胆管膜トランスポーターはいずれも ATP binding cassette (ABC) トランスポーターファミリーに属する。この中でも胆汁酸のトランスポーターである bile salt export pump (Bsep; Abcb11) と有機アニオンのトランスポーターである multidrug resistance protein 2 (Mrp2; Abcc2) は生理的に重要で、これらの先天異常により進行性家族性肝内胆汁うっ滞 2 型および Dubin-Johnson 症候群が発症する。各種胆汁うっ滞モデルで、Bsep や Mrp2 の down regulation が起こり、さらにこれらのトランスポーターの毛細胆管膜への targeting が障害されることが報告されている。肝内胆汁うっ滞患者の肝臓でも、動物モデルでの検討と同様、BSEP と MRP2 の down regulation と毛細胆管膜への targeting の障害が起こっている。しかしながら、Bsep や Mrp2 減少の分子機構は未解明であり、肝内胆汁うっ滞患者の治療に難渋することも多い。4-Phenylbutyric acid (4PBA) は欧米で尿サイクル異常症治療薬として認可されている薬物であり、化学シャペロンとしても働くことが知られており、4PBA が毛細胆管膜の BSEP および MRP2 の発現量を増加させることが報告された。

## 2. 研究の目的

ラットにおける Bsep および Mrp2 の代表的基質であるタウロコール酸 (TC) および sulfobromophthalein (BSP) の胆汁中排泄におよぼす 4PB の影響と種々のラット胆汁うっ滞モデルで 4 PBA の有用性を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) TC および BSP の胆汁中最大排泄量におよぼす 4PBA の影響

実験はすべて一晩絶食させた体重 270 g の雄性 Sprague-Dawley 系 (SD) を用いて行う。

4PBA はラットに胃ゾンデにより 750 mg/kg を 2 回に分け 3 日間もしくは 1200 mg/kg を 2 回に分け 4 日間経口投与した。ラットをエーテル麻酔下に開腹して総胆管にカニューレーションを行い、胆汁を 10 分ごとに重量をあらかじめ測定したチューブに採取した。また、大腿静脈にもカニューレーションを行い、インフュージョンポンプを用いて 3% ヒト血清アルブミン、5% ブドウ糖液を 2 ml/時で持続注入した。引き続き、 $^{14}\text{C}$  標識 TC を  $2 \mu\text{mol}/\text{分}/100 \text{g}$  で大腿静脈より持続投与し、胆汁を 10 分ごとに採取し重量から胆汁流量を計算する。胆汁の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定して TC の胆汁中排泄を測定し、4PBA が TC の胆汁中排泄におよぼす影響を検討した。また、BSP を  $0.4 \mu\text{mol}/\text{分}/100 \text{g}$  で大腿静脈より持続投与し、胆汁を 10 分ごとに採取した。胆汁をアルカリ化して BSP を発色させ比色法で定量しての胆汁中排泄を測定し、4PBA が BSP の胆汁中排泄におよぼす影響を検討した。ここで用いる TC および BSP の投与量は、既報のラットの胆汁中最大排泄率である  $1 \mu\text{mol}/\text{分}/100 \text{g}$  および  $0.2 \mu\text{mol}/\text{分}/100 \text{g}$  の 2 倍であり、4PBA により最大排泄量が増加するとの予測に基づいた投与量である。

### (2) LPS による胆汁うっ滞におよぼす 4PBA の影響

ラットに 0127:B8 の LPS 2.5 mg/kg で投与した 18 時間後に上記と同様に胆管カニューレーションを行った。4PBA は 300 mg/kg を LPS 投与 3 時間後と 15 時間後に投与した。大腿静脈よりトレーサー量の  $^{14}\text{C}$  標識 TC および BSP  $1 \mu\text{mol}/100 \text{g}$  を投与し、これらの物質の胆汁中排泄におよぼす 4PBA の影響を検討した。

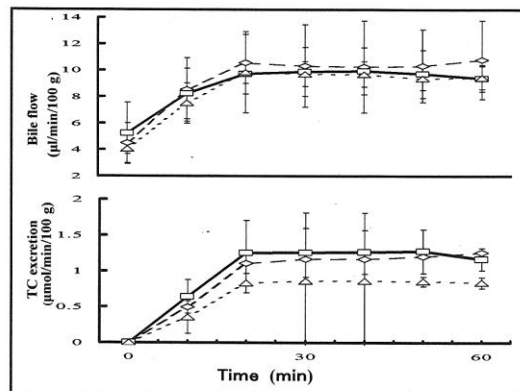
## 4. 研究成果

(1) TC の最大排泄量は対照の  $0.86 \pm 0.1 \mu$

mol/min/100g に比し、4PB 750 mg/kg 3 日間投与で  $1.17 \pm 0.28 \mu\text{mol/min/100g}$ 、4PB 1200 mg/kg 4 日間投与で  $1.26 \pm 0.34 \mu\text{mol/min/100g}$  と有意に増加した (図 1)。しかし BSP の最大排泄量は対照の  $87 \pm 9 \text{ nmol/min/100g}$  に比し、4PB 750 mg/kg 3 日間投与で  $87 \pm 24 \text{ nmol/min/100g}$ 、4PB 1200 mg/kg 4 日間投与で  $91 \pm 10 \text{ nmol/min/100g}$  と変化しなかった (図 2)。

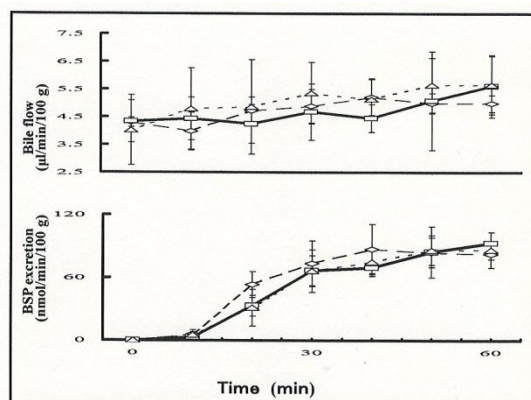
以上の結果から、今回用いた 4PB の投与量では、Bsep の代表的基質である TC の胆汁中最大排泄量が増加し、TC 投与により毛細胆管膜で増加した Bsep 量がさらに増加したと考えられた。これに対して、グルタチオン抱合体として胆汁中に排泄される BSP の胆汁中最大排泄量は変わらず、この条件下では Mrp2 量の増加は起こらないと考えられた。

図 1. TC の胆汁中排泄におよぼす 4PB の影響



△ 対照、◇ 4PB 750 mg/kg 3 日投与、  
□ 4PB 1200 mg/kg 4 日投与

図 2. BSP の胆汁中排泄におよぼす 4PB の影響

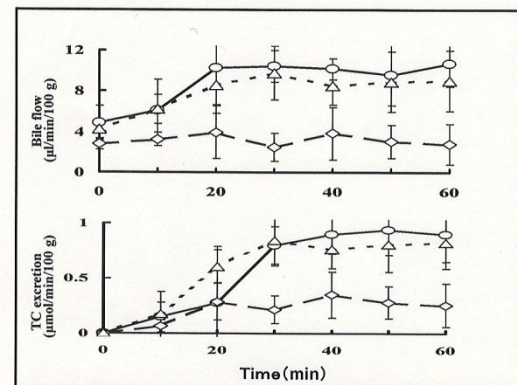


△ 対照、◇ 4PB 750 mg/kg 3 日投与、  
□ 4PB 1200 mg/kg 4 日投与

(2) TC の最大排泄量は LPS 投与により、対照の  $0.94 \pm 0.25 \mu\text{mol/min/100g}$  から  $0.35 \pm 0.21 \mu\text{mol/min/100g}$  に低下したが、4PB 投与により  $0.84 \pm 0.23 \mu\text{mol/min/100g}$  まで回復した。また投与 60 分後の胆汁流量は、対照の  $10.7 \pm 2.3 \mu\text{l/min/100g}$  から LPS 投与により  $2.8 \pm 2.0 \mu\text{l/min/100g}$  に低下したが、4PB 投与により  $9.0 \pm 3.0 \mu\text{l/min/100g}$  まで回復した (図 3)。

以上の結果から、4PB は Bsep の毛細胆管膜での発現増加により、LPS により低下した TC の胆汁中排泄を増加させたと推定された。これらの結果から、4PB は肝内胆汁うっ滞の治療に有効と考えられた。

図 3. TC の胆汁中排泄におよぼす 4PB の影響



◇ 対照、◇ LPS 投与、△ LPS+4PB 投与

## 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] (査読あり 計6件)

- ①H, Yabuki T, Takikawa H, Sugiyama Y. 4-Phenylbutyrate modulates ubiquitination of hepatocanalicular MRP2 and reduces serum total bilirubin concentration. *J Hepatol* 56, 1136-1144, 2012
- ②Mitamura K, Hori N, Iida T, Suzuki M, Shimizu T, Nittono H, Takaori K, Takikawa H, Hofmann AF, Ikegawa S. Identification of S-acyl glutathione conjugates of bile acids in human bile by means of LC/ESI-MS. *Steroids* 76, 1609-1614, 2011
- ③Fukami M, Tanaka A, Takikawa H. Effect of penicillin G on the biliary excretion of cholephilic compounds in rats. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 18, 684-688, 2011
- ④Goto H, Takikawa H. Effect of genipin on cholestasis induced by estradiol-17 $\beta$ -glucuronide and lithocholate-3-O-glucuronide in rats. *Hepatol Res* 40, 524-529, 2010
- ⑤Nagasaka H, Yorifuji T, Kobayashi K, Takikawa H, Komatsu H, Inui A, Fujisawa T, Miida T, Tsukahara H, Takatani T, Hayashi H. Favorable effect of 4-phenylacetate on liver functions attributable to enhanced bile salt export pump expression in ornithine transcarbamylase-deficient children. *Mol Gen Metab* 100, 123-128, 2010
- ⑥Morisawa Y, Takikawa H. Effect of bile acids on the biliary excretion of pravastatin in rats. *Hepatol Res* 39, 595-600, 2009

[学会発表] (計3件)

- ①Hisamitsu Hayashi, Tadahaya Mizuno, Reiko Horikawa, Hironori Nagasaka, Takashi Yabuki, Hajime Takikawa, Yuichi Sugiyama. 4-Phenylbutyrate increases the hepatocanalicular expression of MRP2/Mrp2 by modulating its ubiquitination and reduces serum total bilirubin concentration. 薬物動態学会 (2011. 11. 16~18, 広島)
- ②深水雅子、佐野直代、後藤英晃、根来真一郎、三浦 亮、埜 直子、相磯光彦、高森頼雪、田中 篤、滝川 一。Lipopolysaccharideにより低下したタウロコール酸の胆汁中排泄におよぼす 4-phenylbutyrate の影響。第46回日本肝臓学会総会 (2010. 5. 27, 山形)
- ③後藤英晃、佐野直代、森澤嘉彦、根来真一郎、深水雅子、三浦 亮、埜 直子、相磯光彦、高森頼雪、田中 篤、久山 泰、滝川 一。タウロコール酸およびスルプロモフタレインの胆汁中排泄におよぼす 4-フェニルブチレートの影響。第45回日本肝臓学会総会 (2009. 6. 4, 神戸)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

滝川 一 (TAKIKAWA HAJIME)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：70197226