

機関番号：12501
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790141
 研究課題名（和文） 肝内胆汁酸イメージングによる BSEP 内在化に起因する薬剤性肝障害の解明
 研究課題名（英文） Detection of BSEP mediated hepatotoxicity by using the intrahepatic bile acid imaging technique
 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

研究成果の概要（和文）：

薬剤性肝障害を惹起する25化合物のうち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障害が惹起される可能性が明らかとなった。またラット細胞Sandwich培養肝細胞において、胆汁酸の蓄積に依存した肝毒性を評価するためのスクリーニング系の構築を行い、胆汁酸の蓄積に依存した肝障害の増悪が確認された。

研究成果の概要（英文）：

Among 25 hepatotoxic compounds, we could newly detect 9 compounds which caused BSEP internalization. And also, we could confirm the increase of hepatotoxicity caused by the BSEP internalization-induced accumulation of bile acid in sandwiched rat hepatocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療薬学

キーワード：薬学、薬剤反応性、蛋白質、放射線

1. 研究開始当初の背景

肝臓の毛細胆管側膜に発現する BSEP (Bile salt export pump) は胆汁酸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。BSEP の阻害は、毒性の高い胆汁酸が肝細胞内に蓄積することで肝障害が惹起されるため、医薬品候補化合物の BSEP 阻害能を評価するためのスクリーニング系が構築されている。しかし、既存の昆虫細胞に BSEP

を発現させたベシクルや発現細胞を用いた評価系では、輸送体の局在性の低下や代謝物が毒性の要因の場合にはその影響を評価し難い。

2. 研究の目的

そこで本研究では、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た。

3. 研究の方法

薬剤性肝障害を起こす薬物について、BSEPの局在性と輸送機能への影響の検討を行うため、BSEP-GFP発現MCARh7777細胞株において、Molecular Probe社の協力のもとハイコンテントスクリーニングを用いて、肝障害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。また、ラット肝臓より単離したSandwich培養肝細胞において、胆汁酸の蓄積に依存した肝毒性を評価するための肝障害性と胆汁酸輸送機能を評価するスクリーニング系の構築を行った。

4. 研究成果

BSEP-GFP発現MCARh7777細胞株においてハイコンテントスクリーニングを行った結果、これまでにBSEPを内在化させることが知られているCyclosporinAに加えて胆汁うっ滞型肝障害を惹起する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障害が惹起される可能性が明らかとなった。更に、ラット肝臓より単離したSandwich培養肝細胞において、胆汁酸の蓄積に依存した肝毒性を評価するためのスクリーニング系の構築を行い（特許出願準備中）、前検討において内在化を惹起する化合物において検討を追加した結果、胆汁酸の蓄積に依存した肝障害の増悪が確認され、内在化に伴う胆汁酸の蓄積が、肝障害の増悪因子となることが本研究の遂行により明らかとなり、今後に発展性のある研究成果が得られた。

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7件）

1. Saeki J, Sekine S, Yano K, Hashimoto N, Horie T. LPS-induced dissociation of multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) and radixin is associated with Mrp2 selective internalization in rats. **Biochem Pharmacol.** 81(1): 178-84. 2011（査読有り）
2. Sekine S, Yano K, Saeki J, Hashimoto N, Fuwa T, Horie T. Oxidative stress is a triggering factor for LPS-induced Mrp2 internalization in the cryopreserved rat and human liver slices. **Biochem Biophys Res Commun.** 399(2):279-85. 2010.（査読有り）
3. Yano K, Sekine S, Nemoto K, Fuwa T, Horie T. The effect of dimeric acid on LPS-induced downregulation of Mrp2 in the rat. **Biochem Pharmacol.** 80(4):533-9. 2010.（査読有り）
4. Hamada K, Shitara Y, Sekine S, Horie T. Zonula Occludens-1 alterations and enhanced intestinal permeability in methotrexate-treated rats. **Cancer Chemother Pharmacol.** 66(6):1031-8, 2010（査読有り）
5. Maeda T, Miyazono Y, Ito K, Hamada K, Sekine S, Horie T. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. **Cancer Chemother Pharmacol.** 65(6):1117-23, 2010（査読有り）
6. Nakano T, Sekine S, Ito K, Horie T. Correlation between apical localization of Abcc2/Mrp2 and phosphorylation status of ezrin in rat intestine. **Drug Metab Dispos.** 37(7):1521-7. 2009.（査読有り）

7. Minami S, Ito K, Honma M, Ikebuchi Y, Anzai N, Kanai Y, Nishida T, Tsukita S, **Sekine S**, Horie T, Suzuki H. Posttranslational regulation of Abcc2 expression by SUMOylation system. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.** 296(2):G406-13 2008. (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

1. 関根秀一、伊藤晃成、堀江利治、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、日本薬剤学会 第25年会、2010.5.12-14、徳島
2. 関根秀一、中埜貴文、伊藤晃成、堀江利治、小腸における Mrp2, Mdr1 発現部位差と ezrinの発現、リン酸化状態の部位差との関連、日本薬剤学会 第25年会 2010.5.12-14、徳島
3. Eiichiro Ogimura, Shuichi Sekine, Toshiharu Horie、Regulatory mechanism of drug-induced Bsep internalization by construction of screening system for Bsep internalization、日本薬物動態学会第25回年会、2010.11.16-18、大宮
4. Masahiro Ono, Shuichi Sekine, Toshiharu Horie、The role of Nrf2 on multidrug resistance、日本薬物動態学会第25回年会、2010.11.16-18、大宮
5. Shuichi Sekine, Kousei Ito, Toshiharu Horie、Canalicular Mrp2 localization is reversibly regulated by the phosphorylation status of its anchoring protein、9th International ISSX meeting、2010.9.4-8、イスタンブール

6. Shuichi Sekine, Kousei Ito, Takafumi, Nakano, Toshiharu Horie、Ezrin has a key role in the expression profile of MRP2 and MDR1 along intestinal tract、9th International ISSX meeting、2010.9.4-8、イスタンブール

7. 佐伯淳二郎、関根秀一、堀江利治、肝炎時の胆汁排泄輸送体 Mrp2 の内在化機構の解明、日本薬学会 第131年会、2011.3.28-31、静岡
8. Sekine, Shuichi., Ito, Kousei., Horie, Toshiharu., Intracellular redox status reversibly regulates the localization of Mrp2-radixin complex., 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、平成21年11月30日、12月1日、大阪
9. 本山碧、関根秀一、木村友映、堀江利治、薬剤性ミトコンドリア障害感受性における動物種差の検討、第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、平成22年11月29日、11月30日、富山
10. 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、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徹蓄積の関与、日本薬学会 第131年会、2011.3.28-31、静岡

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/yakuzai/index.html>

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