

機関番号：12601
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790146
 研究課題名（和文） 新規疾病治療法の確立を指向したトランスポーターの細胞膜上発現量制御機構の解析
 研究課題名（英文） New drug therapy of the transporter-related diseases through the modulation of membrane trafficking
 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

研究成果の概要（和文）：

肝細胞の細胞膜に発現する輸送タンパク質である Bile salt export pump(BSEP)の細胞膜発現量の低下は、肝内胆汁うっ滞を惹起する。BSEP の細胞膜発現量制御の分子機構が不明であるため、当該疾患に対しては有効な治療薬は存在せず、その開発が切望されている。本研究では、①Ub 化という翻訳後修飾が BSEP の内在化シグナルとなること、②AP2 というアダプタータンパク質が BSEP の細胞膜からの内在化に働くことを見出し、上記の分子機構の一端を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Bile salt export pump (BSEP) localizes on canalicular membrane of hepatocytes and mediates biliary excretion of bile salts. BSEP dysfunction attributed to its internalization from hepatocanalicular membrane and subsequent degradation causes intrahepatic cholestasis. At present, no medical therapy for this disease state has been established, because the regulatory mechanism of cell surface expression of BSEP remains to be elucidated. In this study, we explored it focusing on posttranslational machinery and demonstrated that ubiquitination, a posttranslational modification, is an internalization signal of BSEP and that AP2, an adaptor protein for clathrin-mediated endocytosis, is associated with BSEP internalization through its direct interaction with BSEP.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 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・医療系薬学

キーワード：トランスポーター、肝内胆汁うっ滞、細胞内ソーティング、胆汁酸、フェニルブチレート、コレステロール

1. 研究開始当初の背景

胆汁酸、ビリルビン、グルクロノイドの肝細胞から胆汁中への排泄は、それぞれ BSEP,

MRP2 という肝細胞毛細胆管側膜に局在するトランスポーター(TP)を介して行われ、遺伝的ならびにストレス要因に付随した BSEP,

MRP2の毛細胆管側膜上からの減少は、それぞれ胆汁酸、ビリルビングルクロナイドの胆汁排泄の低下を招く結果、肝内胆汁うっ滞、黄疸として顕在化し、最終的には重篤な肝機能障害の発症につながる事が明らかにされている。しかしながら、当該疾患において両TPの細胞膜発現量が低下する分子機序に関しては未解明であり、肝内胆汁うっ滞、胆道ドレナージ減黄不応例および黄疸のある肝硬変などは、総計で年間5,000~10,000例の患者がいるにも関わらず、有効な内科的療法の開発が進んでいないのが現状であり、現行の利胆薬を用いて症状の改善が見られない場合には、唯一の治療法は肝移植である。肝移植は生着するかどうかは確実ではなくリスクが高いこと、高額な手術費がかかること、さらに免疫抑制剤を一生服用し続けなくてはならないことなどから、患者に多大な負担を強いる治療法である。また現状では、肝移植の需要に対して施術例数が追いついていない。これらの問題点を解決するために、新規肝機能障害改善薬の開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

肝細胞毛細胆管側膜上に局在し、胆汁酸、ビリルビングルクロナイドの肝細胞から胆汁中への排泄を担うトランスポーター(TP)であるBSEP, MRP2を対象とし、両TPの細胞膜上発現量制御の分子機構を解明することにより、両TPが関連する疾患である肝内胆汁うっ滞、黄疸を伴う肝機能障害の新たな創薬標的を提唱することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)膜タンパク質の細胞膜からの内在化/分解シグナルの1つとして、ユビキチン(Ub)化が知られている。Ub化されたタンパク質は、細胞膜から内在化し、初期エンドソームにおいてリソソーム分解経路へと選別を受ける。これまでに我々は、4PBAが細胞膜上に存在するBSEPの分解抑制作用を有すること(Hayashi H, Sugiyama Y. Hepatology. 2007 45(6):1506-16.)、さらには、4PBAが細胞膜上BSEPのUb化を低下させること(Hayashi H, Sugiyama Y. Mol Pharmacol. 2009 75(1):143-50.)を見出している。本研究では、Ubのドミナントネガティブ体を発現させた培養細胞において、biotinylation法を用いて細胞膜上BSEPの分解速度、内在化速度、内在化後の分解速度を測定することにより、BSEPの細胞膜からの内在化/分解プロセスに対するUb化の関与を検討した。

(2)これまでの報告からBSEPはclathrin依存的な内在化をすることが推測されたこと(Ortiz DF et al, J Biol Chem. 2004

30;279(31):32761-70.)、clathrin-mediated endocytosisのアダプタータンパク質であるAP2 adaptor complex (AP2)の認識配列がBSEPの細胞内ドメインに存在すること、さらにはマイクロアレイ解析の結果、4PBA投与時にAP2のサブユニットの1つであるAP2 α の発現量の顕著な変化が認められたことから、BSEPの内在化に対するAP2の寄与を検討した。RNAi法を用い、BSEPの内在化速度、発現量、輸送機能に対するAP2の影響を評価するとともに、site-directed mutagenesis法、GST pull-down法など種々の分子生物学的手法を用いてBSEPとAP2の相互作用部位について解析を進めた。

4. 研究成果

(1) Ub化はBSEPの内在化シグナルとして働くことにより、細胞膜上に発現しているBSEPの分解促進に働くことが示唆された。

(2) AP2はBSEPのC末端に存在するチロシンモチーフに結合し、BSEPの細胞膜からの内在化に働いていることが明らかとなった。

以上の成果は、BSEPの細胞膜からの内在化経路、細胞膜発現量制御の分子機構を初めて明らかにしたものであり、肝臓学領域において重要な研究成果であるとともに、今後の難治性肝疾患の内科的治療法の開発に貢献するものである。

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4件)

① *Mizuno T, *Hayashi H, Naoi S, Sugiyama Y. Ubiquitination is associated with lysosomal degradation of cell surface-resident ABCA1 through the ESCRT pathway. Hepatology. in press
*:equally contributed

② *Hori N, *Hayashi H, Sugiyama Y. Calpain-mediated cleavage negatively regulates the expression level of ABCG1. Atherosclerosis. 2011 215(2):383-91.
*:equally contributed

③ *Kato T, *Hayashi H, Sugiyama Y. Short- and medium-chain fatty acids enhance the cell surface expression and transport capacity of the bile salt export pump (BSEP/ABCB11). Biochim Biophys Acta. 2010 1801(9):1005-12.
*:equally contributed

④ Nagasaka 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 Genet Metab.* 2010 100(2):123-8.

[学会発表] (計14件)

① Hisamitsu Hayashi, Kaori Inamura, Kensuke Aida, and Yuichi Sugiyama. Clathrin Adaptor Protein Complex 2 (AP2) Regulates The Internalization Of Bile Salt Export Pump (BSEP/ABCB11). 9th ISSX international meetings 2010/9/4-9/8 Istanbul, Turkey

② Hisamitsu Hayashi, Kaori Inamura, Kensuke Aida, and Yuichi Sugiyama. Clathrin Adaptor Protein Complex 2 (AP2)-Dependent Internalization Of Bile Salt Export Pump (BSEP/ABCB11). Falk symposium 175, XXI International Bile Acid Meeting 2010/10/7-10/8 Freiburg, Germany

③ 林 久允, 稲村 香央里, 杉山 雄一 胆汁酸トランスポーターBSEPの内在化機構の解析 第25回日本薬剤学会 2010/5/12-5/14 徳島

④ 林 久允, 杉山 雄一 胆汁酸トランスポーター Bile salt export pump (BSEP/ABCB11)の細胞膜からの分解過程における短鎖ユビキチン化の役割 第18回肝病態生理研究会 2010/5/26 山形

⑤ 林 久允, 稲村 香央里, 相田 健佑, 直井 壮太郎, 杉山 雄一 胆汁酸トランスポーター Bile salt export pump (BSEP/ABCB11)の内在化機構の解析 第32回胆汁酸研究会 2010/11/6 仙台

⑥ Hisamitsu Hayashi, Kaori Inamura, Kensuke Aida, Sotaro Naoi, and Yuichi Sugiyama Association of Clathrin Adaptor Protein Complex 2 (AP2) with Bile Salt Export Pump (BSEP/ABCB11) internalization 第4回次代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2010/11/27-11/28 東京

⑦ 林 久允, 稲村 香央里, 相田 健佑, 直井 壮太郎, 杉山 雄一 肝機能障害改善薬の開発を指向した胆汁酸トランスポーターBile salt export pump (BSEP/ABCB11)の内在化制御機構の解析 第32回生体膜と薬

物の相互作用シンポジウム 2010/11/29-11/30 富山

⑧ Hisamitsu Hayashi Regulation of cell surface expression of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) through its interaction with PDZ-adaptor proteins 第88回日本生理学会大会/第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会 2010/3/28-3/30 横浜

⑨ Hisamitsu Hayashi, Yuichi Sugiyama. Choleric effect of 4-phenylbutyrate (4PBA) induced by an increase in Bile Salt Export Pump (BSEP/ABCB11) expression at the cell surface 第5回武田科学振興財団薬科学シンポジウム 2009/5/2 東京

⑩ Hisamitsu Hayashi, Yuichi Sugiyama Development of a therapeutic method to combat cholestasis by regulation of the cell-surface expression of Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) 日本薬剤学会 Global Education Seminar East 2009-1st 2009/6/23 東京

⑪ 林 久允, 杉山 雄一 胆汁酸トランスポーター Bile salt export pump (BSEP/ABCB11)の細胞膜からの分解過程におけるユビキチン化の関与の検討 第82回生化学大会 2009/10/22 神戸

⑫ 林 久允, 杉山 雄一 短鎖ユビキチン化がBile salt export pump (BSEP/ABCB11)の細胞膜からの分解過程に及ぼす影響 第31回胆汁酸研究会 2009/11/7 東京

⑬ Hisamitsu Hayashi, Yuichi Sugiyama Development of new choleric drugs targeting the regulation of Bile Salt Export Pump (BSEP/ABCB11) expression at the cell surface 第31回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2009/12/1 大阪

⑭ 林 久允 胆汁酸トランスポーターBile salt export pump (BSEP/ABCB11)の細胞膜発現制御を標的とした新規肝内胆汁うっ滞治療法の開発 第19回日本小児胆汁酸研究会 2010/2/20 東京

[図書] (計1件)

① 林 久允, 杉山 雄一 株式会社 メディカルドゥ、トランスポートソーム 生体膜輸送機構の全体像に迫る 基礎, 臨床, 創薬応用研究の最新成果 237 - 242

〔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

なし

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

(3) 連携研究者

なし