

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月19日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792026

研究課題名（和文）肝内胆汁鬱滞に対する新たな治療アプローチの開発

研究課題名（英文）The metabolism of cholesterol after bile duct degeneration in lamprey

## 研究代表者

森井 真也子 (MAYAKO MORII)

秋田大学・医学部・助教

研究者番号：10375280

## 研究成果の概要（和文）：

ヒトの胆汁酸生合成に重要な CYP7A1、CYP27A1 に相同な遺伝子をヤツメウナギの肝臓からクローニングした。ヒト遺伝子と比較しアミノ酸の相同性はそれぞれ 58.2%、55.7%であり、主なモチーフ構造は保たれていた。発現タンパクの細胞内での局在、幼生および雌雄成体における各臓器の発現量を評価した。本遺伝子はヒト胆汁酸合成酵素である CYP7A1、CYP27A1 に相当な遺伝子であると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Lampreys are unique vertebrates in that they lose biliary trees entirely during the metamorphosis. Despite the biliary atresia, lampreys do not develop either biliary cirrhosis or liver dysfunction. In other vertebrates, obstruction of bile ducts results in fatality because of the cytotoxicity of bile salts. It means that lampreys have evolved to use another metabolic pathway of bile juice in order to avoid the cholestasis. However, molecular mechanism of this pathway is still unknown. The aim of this study is to investigate the way how the lamprey avoids the pathological consequence of cholestasis. We have cloned the cDNA sequences of two kinds of P450, which show high degree of homology with mammalian CYP7A1 and CYP27A1, respectively. We are now evaluating the expression levels of the mRNA for these genes in liver, gonad, gill, heart and intestine along with the temporal expression profiles from larva to adult. The present study suggests how and where bile acids are detoxified in adult lampreys. Understanding how lampreys avoid cholestasis could be valuable for progress in the treatment of human obstructive cholangiopathy.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：ヤツメウナギ、胆汁酸、肝線維化、コレステロール代謝

### 1. 研究開始当初の背景

幼生期には形態的にヒトと類似した胆道系を有し、肝細胞にて産生した胆汁を腸管へ排出しているが、変態期に胆道は完全に消失する。しかし、胆管消失後のヤツメウナギ肝臓組織には炎症所見や肝細胞障害、肝線維化といった胆汁鬱滞性肝障害の所見は認められない。ヤツメウナギ成体の胆汁酸処理経路を明らかにすることは、ヒト胆汁鬱滞性肝障害治療新たな標的分子を見出す一助となり得るとされているが、ヤツメウナギ胆汁酸代謝経路に関する知見はいまだ少ない背景があった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヤツメウナギ成体における胆汁酸排泄機構の解明であるが、最終的にはこの **alternative pathway** をヒト胆汁鬱滞性疾患の治療にも応用しようとするものである。

### 3. 研究の方法

(1) 幼生の肝臓よりヒト胆汁酸代謝酵素である **CYP7A1, 27A1** と相同の部分配列を得たのち、**RACE** の手法を用いて **mRNA** 全長の配列をクローニングした。

(2) 統計学的手法により本遺伝子の相同性や、**P450** に特徴的なモチーフ配列についてヒト、マウス、ゼブラフィッシュと比較した。さらに、近縁と考えられる他の **P450** 酵素も交えて系統樹を作成した。

(3) ノザンブロットイングおよびリアルタイム **PCR** にて幼生および雌雄成体間の **mRNA** 発現量を評価した。また、臓器ごとの発現量について比較した。

(4) 本遺伝子をヒト胎児腎由来 **cell line**、**HEK293T** 細胞にトランスフェクションし、発現タンパクの細胞内での局在を検討した。

### 4. 研究成果

(1) ヒト **CYP7A1** および **27A1** に相同な配列をヤツメウナギ幼生の肝臓より得た。本遺伝子の **mRNA** はそれぞれ約 **4kbp**、**3kbp** であり、そのうちタンパク質をコードする領域は **1857bp** および **1623bp** であった。ヒト **CYP7A1** および **27A1** とのアミノ酸相同性はそれぞれ **58.2%**、**55.7%** であった。ヘム結合領域や、**conserved Thr**、**K-region**、**aromatic region** などの主なモチーフ構造は保た

れていた。CYP7A1 のアミノ末端に位置する proline- rich region は小胞体局在を示す配列を保持しており、ヒトやマウス、ゼブラフィッシュの配列に一致した。CYP27A1 のアミノ末端に位置する proline- rich region はミトコンドリア局在を示す配列であったが、ヒトやマウス、ゼブラフィッシュの配列とは一致しなかった。

- (2) CYP7A1 の発現臓器は肝臓および腸管であり幼生において mRNA の発現量は多い傾向にあった。CYP27A1 の発現に臓器特異性はみられず、各ステージ、雌雄においても差はみられなかった。
- (3) 強制発現させたタンパク質の細胞内局在は CYP7A1 において小胞体であり、CYP27A1 においてはミトコンドリアであった。

#### 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)

- ① Mezaki Y, Morii M, Yoshikawa K, Yamaguchi N, Miura M, Imai K, Yoshino H, Senoo H. (2012) Characterization of a cellular retinol-binding protein from lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 161(3), 233-239.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 第 118 回日本解剖学会

2013.3.30 香川 ヤツメウナギにおける胆汁排泄機構 森井真也子、目崎喜弘、吉川究、山口典子、三浦光隆、今井克幸、蛇口琢、渡部亮、妹尾春樹、吉野祐顕

- ② 第 117 回日本解剖学会  
2012.3.28 山梨 The metabolism of cholesterol after bile duct degeneration in lamprey 森井真也子、目崎喜弘、吉川究、山口典子、三浦光隆、今井克幸、蛇口琢、渡部亮、妹尾春樹、吉野祐顕

- ③ 16th ISHSR International Meeting , Italy, 2011.9.23 Reversibility of periductal fibrosis during biliary atresia in the lamprey Mayako Morii, Yoshihiro Mezaki, Noriko Yamaguchi, Kiwamu Yoshikawa, Mitsutaka Miura, Katsuyuki Imai, Taku Hebuguchi, Ryo Watanabe, Hiroaki Yoshino, and Haruki Senoo

[図書] (計 1 件)

- ① Morii M, Mezaki Y, Yoshikawa K, Miura M, Imai K, Hebuguchi T, Watanabe R, Asanuma Y, Yoshino H, and Senoo H. How do lampreys avoid cholestasis after bile duct degeneration. *Cholestasis*. ed. Tripodi V. INTECH, Rijeka, Croatia, 2011

ISBN 979-953-307-187-8, pp.  
81-98.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森井 真也子 (MAYAKO MORII)  
秋田大学 医学部 助教  
研究者番号：10375280

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：