

論文内容の要旨

Analysis of the mechanisms for the altered hepatic disposition of bile acids under cholestatic conditions

(肝臓における一次性能動輸送担体を介した胆汁酸挙動変動機構の解析)

秋田 英万

【序】

胆汁酸の腸肝循環を維持する上で、血液から胆汁への肝実質細胞を介した胆汁酸の極性輸送は重要な役割を果たす。胆汁酸はタウリンあるいはグリシンなどのアミノ酸により抱合を受けた一価胆汁酸と、さらに硫酸あるいはグルクロン酸抱合を受けた二価胆汁酸に大きく分類される。これら胆汁酸の経細胞輸送には、肝血管側膜上に存在する取込みトランスポーターとして Na⁺-dependent taurocholate transporting polypeptide (Ntcp)や Organic anion transporting polypeptides (Oatp)が、また、胆管側膜上の排出トランスポーターとして、一価胆汁酸に対しては Bile salt export pump (Bsep)が、二価の胆汁酸に対しては Multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2)が関与している事が示唆されてきた。Bsep を介した胆汁排泄は胆汁酸依存性の胆汁流形成に重要であるが、その一方で胆汁うっ滞時には胆汁酸動態の変動が報告されている。本研究では、胆汁うっ滞時における胆汁酸の肝胆系移行変動機構を、特に Bsep/Mrp2 および肝血管側膜上に誘導される Mrp3 に焦点をあてて解析を行った。

【胆管側膜を介した胆汁酸排出機構の解析】

Sprague-Dawley (SD)ラットおよび Mrp2 を遺伝的に欠損した Eisai hyperbilirubinemic rat (EHBR)より調製した胆管側膜小胞 (canalicular membrane vesicle: CMV)および、ラット Mrp2、Bsep の cDNA をバキュロウイルスを用いて感染させた Sf9 発現細胞より調製した膜小胞における各種胆汁酸の ATP 依存的な取り込みを評価した。なお、ATP 依存性の膜小胞への取り込みは inside-out 膜小胞において観察される事から、この取込みは生理的条件下では、細胞からの排出に対応している。その結果、一価の胆汁酸は Bsep、硫酸抱合胆汁酸は Mrp2 によってそれぞれ厳密に振り分けられて胆汁排泄を受ける事が確認され、本 *in vitro* 実験系の妥当性が示された。

一方、肝硬変などに伴う胆汁うっ滞時においては、血中硫酸抱合型胆汁酸濃度の 10 倍程度の上昇が認められているが、この上昇は肝内濃度上昇を反映するものと考えられる。そこで、硫酸抱合胆汁酸による Bsep 機能に対する阻害効果について解析を加えた。硫酸抱合胆汁酸である taurochenodeoxycholate-sulfate (TCDC-S)及び tauroolithocholate-sulfate (TLC-S)は、Bsep を介した ATP 依存的な [³H]taurocholate(TC)の膜小胞への取込みを濃度依存的に阻害するものの、その阻害の程度は用いた膜によって異なり、SD ラットより調製した CMV における IC₅₀ 値(TCDC-S: 4.6 μM、TLC-S: 1.2 μM) は EHBR より調製した CMV (TCDC-S: 68 μM、TLC-S: 66 μM) 及び Bsep 発現 Sf9 細胞(Sf9-Bsep)より調製した膜小胞 (TCDC-S: 59 μM、TLC-S: 62 μM) における値に比較して有為に小さいことが示された。また、Bsep と Mrp2 を共発現させた Sf9 細胞(Sf9-Bsep/Mrp2)より調製した膜小胞における IC₅₀ 値は、SD ラットより調製した CMV と同程度であった (TCDC-S: 3.5 μM、TLC-S: 1.0 μM) (図 1)。このことを説明しうる一つの可能性として、これら硫酸抱合体が Bsep の機能を *cis* 側 (基質認識ドメイン側) からのみでなく、Mrp2 によって小胞内に濃縮された後に *trans* 側 (細胞外ドメイン側) からも阻害をかける、*trans*-inhibition のメカニズムが考えられる(図 2)。また、Bsep 発現 Sf9 細胞及び Bsep/Mrp2 の共発現 Sf9 細胞から調製した膜小胞に対してあらかじめ TCDC-S 及び TLC-S を ATP と共にプレインキュベーションすると、

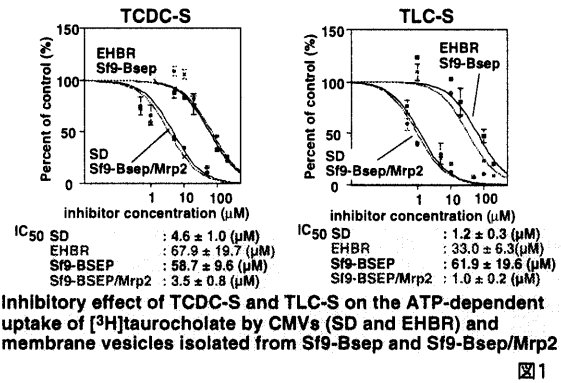
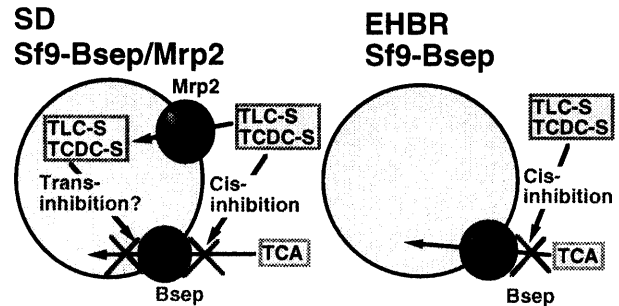


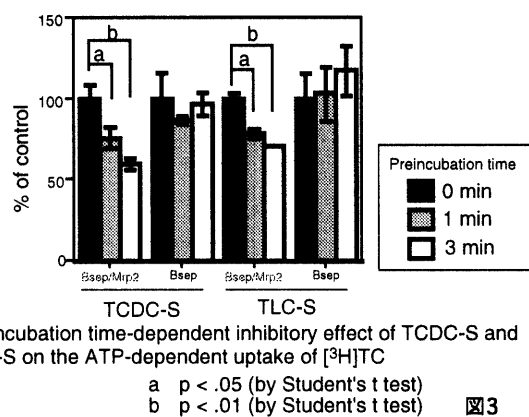
図1



Schematic diagram illustrating the possible hypothesis for the inhibitory effect of sulfate conjugates on the function of Bsep

図2

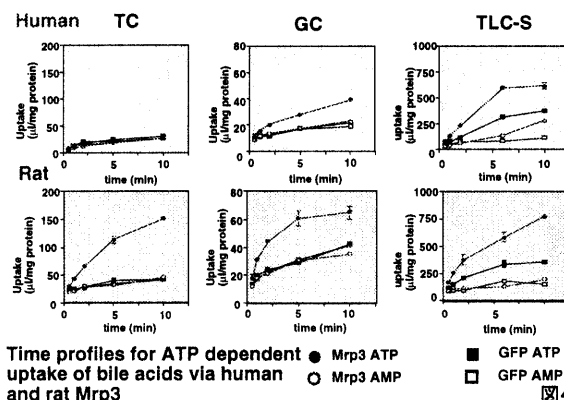
Bsep/Mrp2 の共発現系においてのみ、Bsep を介した^[3H]TC の取り込み活性の低下が認められ、また、この阻害効果はプレインキュベーション時間依存的である事が示された (図3)。これらの結果は、硫酸抱合胆汁酸による *trans*-inhibition の仮説を支持するものであり、生体内においては、硫酸抱合胆汁酸は Mrp2 により胆汁中に排泄後、胆管側からも Bsep 機能を阻害する事を示唆する。これまで胆汁うっ滞時においては、Bsep の肝臓における発現低下、細胞内小胞への内在化による胆管側膜上の Bsep 発現量の低下などが報告されているが、本結果からさらに、硫酸抱合胆汁酸による *trans*-inhibition により Bsep 機能の低下を引き起こされる事が示唆された。このような Bsep の機能低下がさらに胆汁うっ滞を悪化させる因子である可能性が示唆された。



Preincubation time-dependent inhibitory effect of TCDC-S and TLC-S on the ATP-dependent uptake of ^[3H]TC
 a p < .05 (by Student's t test)
 b p < .01 (by Student's t test) 図3

【バキュロウイルス発現系を用いたヒト及びラット Mrp3 の機能比較】

上記のように、胆汁うっ滞時において Bsep 機能の低下が認められるが、それと共にヒト及びラットにおいて、肝実質細胞の血管側膜上への Mrp3 の誘導が報告されている。ここで、ラット Mrp3 は、硫酸抱合胆汁酸などの Mrp2 基質と共に、Bsep 基質である一価胆汁酸も基質とする事から、Mrp3 は肝細胞から血管に胆汁酸を排出することにより肝細胞の保護に寄与するという仮説が挙げられた。本研究ではまず、バキュロウイルス発現系を用いてヒトの Mrp3 の機能解析



Time profiles for ATP dependent uptake of bile acids via human and rat Mrp3
 ● Mrp3 ATP ○ Mrp3 AMP ■ GFP ATP □ GFP AMP 図4

を行い、ラット Mrp3 の機能との比較検討を行った。その結果、ヒト Mrp3 はラット同様、硫酸抱合胆汁酸のみでなく、一価の胆汁酸についても輸送する事が明らかとなったが、ラットにおいては、^[3H]TCの方が^[14C]glucocholate(GC)に比べ輸送活性が高いのに対して、ヒトにおいては、^[14C]GCの方が^[3H]TCに比べ輸送活性が高いという、基質特異性における種差が観察された (図4)。この事は、生理的な胆汁酸組成が、ヒトにおいてはグリシン抱合体が主であるのに対し、ラットにおいてはタウリン抱合体が主である事を考えると合理的である。また、さらにグルクロン酸抱合体やグルタチオン抱合体などの5種のアニオン性化合物を用いた解析を行った結果、ヒト、ラット共にこれ

ら抱合体を基質とし、また、両者の輸送特性は上記の $[^3\text{H}]\text{TC}$ 及び $[^{14}\text{C}]\text{GC}$ に対する輸送以外は類似する事が示された。

【肝灌流系を用いた Mrp3 誘導ラットにおける胆汁酸の血管側排出クリアランスの評価】

Mrp3 が実際に生体内で血中への胆汁酸排出輸送担体として機能する事を示すため、rat において顕著な輸送活性が見られた $[^3\text{H}]\text{TC}$ を基質に用いて肝灌流実験を行った。本実験では、SD ラットおよび EHBR、phenobarbital (PB) 処理ラットを解析に用いた。これは、SD ラットと比較して、EHBR や phenobarbital (PB) 処理ラットにおいては

Mrp3 が誘導されているのに対し、Ntcp や Oatp などの胆汁酸取り込みトランスポーターについてはこれらラット間で発現レベルが同程度であり、Mrp3 の機能を評価しやすいためである。

最初に $[^3\text{H}]\text{TC}$ を 40 分間灌流して肝内にプレロードを行い、その後、胆汁及び灌流液より回収される $[^3\text{H}]\text{TC}$ 量を評価した。灌流液中より回収される $[^3\text{H}]\text{TC}$ 量は SD ラットに対し EHBR において有意に多く、灌流液中への蓄積分量を肝内 AUC で除する事で算出された見かけの排出クリアランス ($\text{PS}_{\text{net,eff}}$) は EHBR で 2.5 倍に有為に上昇している事が示された。このク

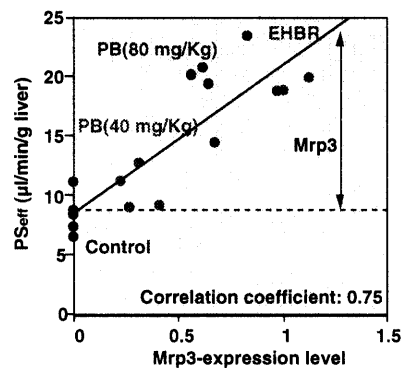
リアランスは真の血管側排出クリアランス (PS_{eff}) と、肝への取り込みクリアランス (PS_{inf}) のハイブリッドパラメーターであり、得られた $\text{PS}_{\text{net,eff}}$ の上昇は PS_{inf} の減少によっても説明が可能となる。そこで、 PS_{inf} を SD、EHBR 間で比較評価するため、multiple indicator dilution 法を用いて解析を行った。その結果、 PS_{inf} に EHBR と SD 間で差は認められず、この値を用いて算出された PS_{eff} は EHBR で有為に高い事が示された (表 1)。同様な解析を PB 処理ラットについても行い、得られた結果を整理することにより、Mrp3 の発現量と PS_{eff} に良好な相関が認められた事から、Mrp3 が胆汁酸の血管側膜を介した輸送に関与することが示唆された (図 5)。

【まとめ】

本研究では肝臓における一次性能動輸送担体を介した胆汁酸輸送について解析を行い、以下の事を明らかにした。すなわち、胆汁うっ滞を悪化させるメカニズムの一つとして、Mrp2 によって胆汁

表 1 Kinetic parameters for taurocholate determined in the washout experiment

	SD	EHBR
F_{outflow} (%)	8.3 ± 1.7	27.5 ± 2.9**
F_{bile} (%)	91.6 ± 1.7	72.5 ± 2.9**
$\text{PS}_{\text{net,eff}}$ ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ liver)	6.1 ± 1.3	16.6 ± 1.7**
PS_{bile} ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ liver)	67.3 ± 5.0	40.0 ± 4.0**
PS_{inf} ($\text{ml}/\text{min}/\text{g}$ liver)	11.5 ± 1.3	10.4 ± 0.7**
PS_{eff} ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ liver)	10.4 ± 1.0	23.3 ± 1.7**



Correlation between the PS_{eff} value and hepatic expression of Mrp3 図5

排泄を受けた硫酸抱合胆汁酸による Bsep 機能の trans-inhibition が示唆された。また、胆汁うっ滞時に血管側に誘導させる Mrp3 の機能について検討したところ、ヒト、ラット間で Mrp3 の機能は類似しているものの、ラットにおいては³H]TCの方が¹⁴C]GCに比べて輸送活性が高いのに対し、ヒトにおいては¹⁴C]GCの方が³H]TCに比べ輸送活性が高い事が示された。さらにラットを用いた解析の結果、肝臓から血中への³H]TCの排出クリアランスに Mrp3 の発現量との良好な相関が認められ、Mrp3 が胆汁酸の血液中への flux の上昇に実際に関与する事が示唆された。近年、胆汁うっ滞時には取り込み側トランスポーターである Ntcp や Oatp あるいは胆汁酸合成の律速段階を触媒する cytochrome P450 7a の発現低下が報告されており、これらの協調的な発現調節により肝内胆汁酸濃度の維持が行われていると考えられる。本研究結果は胆汁うっ滞の成因およびその治療法を考える上で重要な知見を与えるものと考えられる。

【参考文献】 1) Akita H et al., *Biochim. Biophys. Acta.* **1511**: 7-16 (2001). 2) Akita H et al., *Pharm. Res.* **18**: 1119-1125 (2001). 3) Akita H et al., *Pharm. Res.* **19**: In press. (2002)