

## 審査の結果の要旨

氏名 秋田 英 万

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が、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  $\text{Na}^+$ -dependent taurocholate transporting polypeptide (Ntcp) や Organic anion transporting polypeptide (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) が関与する事が示されている。一方で、Mrp2 のホモログとしてクローニングされたラット Mrp3 においては、黄疸あるいは胆汁うっ滞時において肝血管側膜上に誘導され、硫酸抱合胆汁酸や有機アニオンなどの Mrp2 基質と共に、Bsep 基質である一価胆汁酸も基質とする事が報告されており、血管側への排出トランスポーターとして機能するという仮説が挙げられている。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ている。

### 1. 胆管側膜を介した胆汁酸排出機構の解析

本研究では、まず、胆管側膜を介した胆汁酸の胆汁排泄機構に着目しており、肝硬変などに伴う胆汁うっ滞時において血中に上昇する硫酸抱合型胆汁酸が Bsep を阻害する事が胆汁うっ滞をさらに悪化させるという仮説のもと、硫酸抱合胆汁酸である taurochenodeoxycholate-sulfate (TCDC-S) 及び tauroolithocholate-sulfate (TLC-S) を阻害剤に用い、Bsep 機能への影響を観察している。具体的にはまず、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取り込み活性を評価する事で、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を確認し、本 *in vitro* 実験系の妥当性を示している。また、TCDC-S 及び TLC-S による Bsep を介した ATP 依存的な [ $^3\text{H}$ ]taurocholate (TC) の膜小胞への取込みに対する阻害効果を解析したところ、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  $\text{IC}_{50}$  値は、EHBR より調製した CMV 及び Bsep 発現 Sf9 細胞 (Sf9-Bsep) より調製した膜小胞における値と比較して有為に小さいことが観察され、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  $\text{IC}_{50}$  値は、SD ラットより調製

した CMV と同程度である事を示している。この現象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 メカニズムの存在を示唆しており、この仮説は生体内においては、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意味する。

## 2. 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

つづいて、本研究では肝血管側膜を介した胆汁酸輸送に着目し、胆汁うっ滞時に肝血管側膜上に誘導されるヒト及びラット Mrp3 の機能を解析する目的で、バキュロウイルスを用いて両タンパクの Sf9 発現系を作成し、検討を行っている。その結果、ヒト Mrp3 においてもグルクロン酸抱合体やグルタチオン抱合体などの有機アニオンの他に、硫酸抱合胆汁酸や一価胆汁酸を基質とする事が明かとし、また、ラットにおいては、 $[^3\text{H}]\text{TC}$  の方が $[^{14}\text{C}]\text{glycocholate}$  (GC)に比べ輸送活性が高いのに対して、ヒトにおいては、 $[^{14}\text{C}]\text{GC}$  の方が $[^3\text{H}]\text{TC}$  に比べ輸送活性が高いという、基質特異性における種差を見出している。

## 3. 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

さらに、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実証するため、本研究では 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い、肝細胞から血管側への真の排出クリアランス ( $\text{PS}_{\text{eff}}$ ) を評価している。本実験では、コントロールとして SD ラットを、また、Mrp3 誘導ラットとして EHBR、phenobarbital (PB) 処理ラットを解析に用いているが、その結果、Mrp3 の発現量と  $\text{PS}_{\text{eff}}$  の値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を示唆している。

以上、本研究において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ている。まず、胆汁排泄過程においては、胆汁うっ滞を悪化させるメカニズムの一つとして Mrp2 によって胆汁排泄を受けた硫酸抱合胆汁酸による Bsep 機能の *trans*-inhibition 機構を示唆している。また、血管側膜に注目し、胆汁うっ滞時に誘導させる Mrp3 の機能について検討したところ、ヒト Mrp3 においてもラット Mrp3 同様、硫酸抱合胆汁酸や一価胆汁酸を輸送する能力を有する事を明らかとしている。また、ラット肝灌流系を用いた解析の結果、肝臓から血中への $[^3\text{H}]\text{TC}$  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ており、Mrp3 が胆汁酸の血液中への flux の上昇に実際に関与する事を示唆している。胆汁酸の主なクリアランス臓器が肝臓である事を考えると、本研究で得られた知見は、胆汁うっ滞時の血中胆汁酸濃度の変動機構、および胆汁うっ滞の成因あるいは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。以上の結果から、本研究は博士（薬学）の学位を授与するに値すると認めた。