

日本財団補助金による 2000年度日中医学学术交流促進事業

③. 中国人研究者・医療技術者招聘助成事業

(4) 胆汁うっ滞の発生機構に関する分子生物学的研究

日本財団助成金による

2000年度日中医学学術交流促進事業報告書

－ 中国人研究者・医療技術者招聘助成－

財団法人 日 中 医 学 協 会

理事長 中 島 章 殿

平成13年3月15日

研究発表中の本人のスナップ写真、及び発表論文のコピーを添付

1. 招聘責任者

足 立 幸 彦



所属機関

三重大学医学部内科学第三講座

職名 教授

所在地

〒514-8507 三重県津市江戸橋2-174

電話059-231-5017

招聘研究者氏名 裴 秋 玲 (Pei, Qiu-Ling)

所属機関

中国山西医学院職業医学講座

職名 助教授

研究テーマ 胆汁うっ滞の発生機構に関する分子生物学的研究

2. 日本滞在日程

平成12年2月28日に来日され、それ以降は当大学にて研究を継続している。途中同年10月24日開催の第8回肝病態生理研究会（神戸）にて研究発表を行った。平成13年9月末まで滞在の予定としている。

3. 研究報告

別紙様式のとおり。

研究テーマ：胆汁うっ滞の発生機構に関する
分子生物学的研究

来日研究者氏名： 裴 秋 玲 (P e i, Q i u - L i n g)

中国での所属・役職： 山西医学院職業医学講座・助教授

招聘者氏名・所属・役職： 足 立 幸 彦・三重大学医学部内科学第三講座・教授

要旨

肝臓において、毛細管膜上に存在するATP 依存性の輸送蛋白である多剤耐性関連蛋白(mrp) ファミリーは抱合型有機物質などの胆汁中排泄に与かっている。この中でもmrp1とmrp2が同様の基質親和性を有する。mrp1の健常時及び胆汁うっ滞時の発現についての報告がないので、まずこれを明らかにする為に、下記の実験を行った。ラットの総胆管を結紮して閉塞性黄疸を作成し、経日的に肝と腎を摘出しmrp1の免疫組織化学的染色を行った。対照のラット肝細胞では、mrp1は細胞質内に弱く顆粒状に染色された。総胆管結紮術後には、細胞質内の染色性の増加と共に類洞側肝細胞膜上に帯状～顆粒状の染色が認められた。mrp1の染色性は経日的に増加した。ラット腎では、対照グループではmrp1の発現は無かったが、総胆管結紮術後にはかなりの尿細管上皮に発現が認められた。本研究では、ラットの閉塞性黄疸モデルの肝と腎におけるmrp1の変動から病態時の臓器相関を明らかにしたものである。

KEY WORDS: 胆汁うっ滞、mrp1、肝腎相関、免疫組織染色

(注：集大成を *Hepatology Research* に投稿中です。)

Research Report

Background and aims:

The liver and kidney play a major role in the elimination of a wide variety of endo-xenobiotic anionic substances into bile and urine [1, 2]. Biliary and urinary excretion of these anionic compounds is mediated by adenosine triphosphate (ATP)-dependent conjugate pumps that have been identified as members of the multidrug resistance-associated protein family. Two members of this family, MRP1/mrp1 and MRP2/mrp2 have been demonstrated to have similar substrate specificity and nucleotide sequence [3, 4]. MRP2/mrp2 is located on the canalicular membrane of hepatocytes as well as on the brush border membrane of renal proximal tubules [5, 6, 7, 8]. The activity of this transporter is absent in the mutant Groningen Yellow (GY/TR) rats and Eisai hyperbilirubinemic rats (EHBR) [9], which are rat models of Dubin-Johnson syndrome [10, 11, 12, 13]. In MRP1-transfected hepatic/renal cells and in various multidrug-resistant tumor cells, MRP1 has been found to be located on the basolateral membrane [2, 14, 15]. However, no exact localizations of hepatic and renal MRP1/mrp1 have been as yet demonstrated in cholestatic condition. In the present study, we evaluated immunohistochemically the intracellular localization of mrp1 in liver and kidney during acute biliary obstruction.

Materials and Methods

Animals.

Male Wistar rats weighing 240~260g were purchased from Nihon SLC (Shizuoka, Japan). All animals were kept according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (the National Institutes of Health Publication 86-23, revised 1985). Animals were housed in a temperature and humidity controlled room under a constant light and dark cycle and allowed free access to feed and water. Animals were anaesthetized with pentobarbital. All surgical procedures were performed under sterile condition. The common bile duct was ligated at 2 points and cut between distal and proximal ligatures as described previously [16]. The liver and kidneys were removed on 0 (control group; n=4), 1 (n=3), 3 (n=3), and 5 (n=3) days after BDL. For immunohistochemistry, liver or kidneys were immediately embedded in OCT

embedding medium (Miles Inc, Elkhart, IN, USA) on dry ice and then stored at -80 °C until use. Blood and urinary samples were collected from animals, and their bilirubin levels were determined using a standard assay.

Antibodies.

Mrp1 (m-20), an affinity-purified goat polyclonal antibody raised against a peptide mapping near the carboxy terminus of mouse mrp1 was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). The mouse monoclonal antibody CD26, raised against rat dipeptidylpeptidase IV (DPPIV), a canalicular marker enzyme, was purchased from Serotec Ltd (Oxford, England). Alexa fluor goat anti-rabbit/mouse and donkey anti-goat IgG (H+L) conjugates were obtained from Molecular Probes Europe BV (Leiden, Netherlands). Other reagents were of high quality commercially available.

Immunofluorescence staining.

Tissue sections were cut into 8 μ m-thickness with a cryostat and placed on poly-L-lysine-coated glass microscope slide. After air-drying for 2 hours, the tissue sections were fixed in acetone at -20 °C for 10 min and then rehydrated with Tris buffer solution (TBS), pH 7.6. Nonspecific binding sites were blocked with 2 % bovine serum albumin (BSA) in TBS pH 7.6 for 30 min at room temperature. Thereafter, the tissue sections were incubated overnight at 4 °C with mrp1 (m-20) antibody or CD26 antibody at 1:100 or 1:50, respectively. Unbound antibody was washed from the tissue with TBS (pH 7.6). Then, the tissue sections were incubated with donkey anti-goat or goat anti-mouse IgG-Alexa in 2% BSA-TBS at 1:400 for 3 hours at room temperature. After appropriate washing with TBS (pH 7.6), the tissue specimens were mounted with SlowFade (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Netherlands). Finally, the sections were observed by epifluorescence microscopy (Nikon UFX, Tokyo, Japan) and confocal laser scanning microscopy (Lsm410, Carl Zeiss, Jena, Germany) using the excitation wavelength of argon (488 nm) or helium (543 nm). Negative staining was performed by incubating the medium without the primary antibody.

Results

Plasma bilirubin level and liver histological changes

Compared to controls, the serum level of total bilirubin increased 8, 12, and 10 times on days 1, 3, and 5 after BDL, respectively. Urinary excretion of bilirubin also increased in parallel with serum bilirubin after BDL.

Immunofluorescence staining of hepatic mrp1

Weak granular staining of mrp1 was mainly observed in hepatocyte cytoplasm of control rats. The green staining with belt- and granule-like appearance gradually increased in hepatocyte plasma membrane after BDL. Double staining with antibodies against mrp1 (green) and DPPIV (red) revealed that the distribution of belt- and granule-like staining of mrp1 5 days after BDL was absent in the canalicular membrane of hepatocytes.

Immunofluorescence staining of renal mrp1

In the present study, no specific immunofluorescence of mrp1 was detected in control rat kidney. The expression of renal mrp1 was not significantly different from the control 1 day after BDL. However, mrp1-positive staining was detected in epithelia of some tubules in the kidney 3 days after BDL. Similar staining patterns were essentially observed in some renal tubules 5 days after BDL.

Discussion

Although mrp1 has been reported to increase in membrane fractions of isolated hepatocytes in experimental cholestasis [17], subcellular localization of the protein has not been as yet reported. In our study, weak immunostaining of mrp1 was observed at least in hepatocyte cytoplasm of control rats. In agreement with this, previous reports [18, 19] have shown that mrp1 is predominantly found in the intracellular vesicles of normal hepatocytes. However, the granular staining of mrp1 was observed in both basolateral membrane and cytoplasm of hepatocytes after BDL. It is inferred from the staining that the newly synthesized mrp1 was being shipped through transcytotic vesicles from the endoplasmic reticulum to the basolateral membrane. Immunocytochemical studies have shown that mrp1 is located in the plasma membrane of mrp1-transfected carcinoma cells [15] and drug-resistant tumor cells [20]. Our data, together with previous reports, indicate that changes in the localization of mrp1 may depend on the pathophysiological condition of hepatocytes.

The substrate specificity of mrp1 appears to be very similar to that of mrp2, also known as canalicular multispecific organic anion transporter (cmoat) [21, 22]. In addition, mrp1 knockout mice are hypersensitive to inflammatory stimuli [23]. Thus, the expression of mrp1 may be associated with the cytosolic concentration of both cholephilic compounds and mediators of inflammatory reaction during cholestasis.

Furthermore, the number of mrp1-positive basolateral membranes of hepatocytes increased concomitantly with the duration of ligation, suggesting the occurrence of increased efflux of conjugated organic anions into the systemic circulation.

Elevation of serum bilirubin was consistent with a steady increase in urinary bilirubin, suggesting that the kidneys may play a significant role in the elimination of conjugated bilirubin and other organic anions from blood into urine. Mrp2 is expressed in the apical membrane of renal proximal epithelia where it may function as a pump of amphiphilic anionic compounds across the luminal membrane [10, 24]. BDL induces high expression of mrp2 in renal proximal epithelial cells (Kobayashi Y et al. *Hepatology* 2000;32: 429a [abstract]), This mechanism may facilitate elimination of anionic constituents into urine. In the present study, we also demonstrated that the location of mrp1, different from that of mrp2 (date not shown), was in some renal tubules after BDL. These tubules might be distal ones. Under normal conditions, distal tubules participate in the transport of ions and H₂O. On the other hand, the distal tubules may be easily exposed to high concentrations of excretory compounds during the course of water reabsorption [25]. Induction of mrp1 might protect distal tubules from these putative nephrotoxic compounds. Polyuria occurring in mrp1 knockout mice caused by some drugs such as etoposide [25] is consistent with this hypothesis.

In brief, the present study demonstrated that granular staining of mrp1 is over-expressed in basolateral membrane and cytoplasm of rat hepatocytes after BDL. Mrp1 was also detected in some tubules of kidneys. The induction of mrp1 may be the results of an adaptive or protective response to impairment of hepato-biliary organic anion transport during obstructive cholestasis.

References

- [1] Van Aubel RA, Masereeuw R, Russel FG. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol* 2000; 279:216-232.
- [2] Roelofsen H, Müller M and Jansen PLM. Regulation of organic anion transport in the liver. *Yale J Biol Med* 1997a; 70:435-445.
- [3] Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1999; 146:347-357.
- [4] Hipfner DR, Deeley RG, Cole SPC. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1461:359-376.

- [5] Büchler M, König J, Brom M et al. cDNA cloning of the hepatocyte canalicular isoform of the multidrug resistance protein, cMrp, reveals a novel conjugate export pump deficient in hyperbilirubinemic mutant rats. *J Biol Chem* 1996; 271:15091-15098.
- [6] Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ et al. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance -associated protein gene. *Science* 1996;271:1126-1128.
- [7] Keppler D, König J. Expression and localization of the conjugate export pump encoded by the MRP2 (cMRP/cMOAT) gene in liver. *FASEB J* 1997;11:509-516.
- [8] Schaub TP, Kartenbeck J, König J et al. Expression of the conjugate export pump encoded by the mrp2 gene in the apical membrane of kidney proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1213-1221.
- [9] Mayer R, Kartenbeck J, Büchler M, Jedlitschky G, Leier I, Keppler D. Expression of the MRP gene-encoded conjugate export pump in liver and its selective absence from the canalicular membrane in transport-deficient mutant hepatocytes. *J Cell Biol* 1995; 131:137-150.
- [10] Schaub TP, Kartenbeck J, König J et al. Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:1159-1169.
- [11] Kartenbeck J, Leuschner U, Mayer R, Keppler D. Absence of the canalicular isoform of the MRP gene encoded conjugate export pump from the hepatocytes in Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 1996;23:1061-1066.
- [12] Paulusma CC, Kool M, Bosma PJ et al. A mutation in the human canalicular multispecific organic anion transporter gene causes the Dubin-Johnson syndrome. *Hepatology* 1997;25:1539-1542.
- [13] Tsujii H, König J, Rost D, Stockel B, Leuschner U, Keppler D. Exon-intron organization of the human multidrug resistance protein 2 (MRP2) gene mutated in Dubin-Johnson syndrome. *Gastroenterology* 1999; 117:653-660.
- [14] Roelofsen H, Vos T. A, Schippers JJ et al. Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-derived cells. *Gastroenterology* 1997b; 112:511-521.
- [15] Evers R, Zaman GJR, van Deemter L et al. Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig

- kidney cells. *J Clin Invest* 1996; 97:1211-1218.
- [16] Gartung C, Ananthanarayanan M, Rahman MA et al. Down-regulation of expression and function of the rat liver Na⁺ / bile acid cotransporter in extrahepatic cholestasis. *Gastroenterology* 1996; 110:199-209.
- [17] Vos TA, Hooiveld GJEJ, Koning H, Childs S, Meijer DKF, Moshage H, Jansen PLM, and Müller M. Up-regulation of the multidrug resistance genes, mrp1 and mdr1b, and down-regulation of the organic anion transporter, mrp2, and the bile salt transporter, spgp, in endotoxemic rat liver. *Hepatology* 1998; 28: 1637-1644.
- [18] Roelofsen H, Hooiveld GJEJ, Koning H, Havinga R, Jansen PLM, and Müller M. Glutathione s-conjugate transport in hepatocytes entering the cell cycle is preserved by a switch in expression from the apical MRP2 to the basolateral MRP1 transporting protein. *J Cell Science* 1999; 112:1395-1404.
- [19] Flens MJ, Zaman GJR, van der Valk P et al. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. *Am J Pathol* 1996; 148:1237-1247.
- [20] Roelofsen H, Vos TA, Schippers IJ et al. Increased levels of the multidrug resistance protein in lateral membranes of proliferating hepatocyte-derived cells. *Gastroenterology*. 1997 Feb; 112(2): 511-21.
- [21] Müller M, Meijer C, Zaman GJR et al. Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione s-conjugate transport, *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:13033-13037.
- [22] Jedlitschky G, Leier I, Buchholz U, Center M, and Keppler D. ATP-dependent transport of glutathione s-conjugates by the multidrug resistance-associated protein. *Cancer Res* 1994; 54:4833-4836.
- [23] Renes J, De Vries EE, Hooiveld GJ, Krikken I, Jansen PL, Muller M. Multidrug resistance protein MRP1 protects against the toxicity of the major lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal *Biochem J* 2000 Sep 1; 350 Pt 2:555-61.
- [24] Leier I, Hummel-Eisenbeiss J, Cui Y, Keppler D. ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. *Kidney Int* 2000; 57:1636-1642.
- [25] Wijnholds J, Scheffer GL, van der Valk M et al. Multidrug resistance protein 1 protects the oropharyngeal mucosal layer and the testicular tubules against drug-induced damage *J Clin Invest* 1998; 188:797-808.

第8回肝病態生理研究会プログラム・抄録集

The Japanese Study Group for the Pathophysiology of the Liver: (JGPL)

●会長●

順天堂大学 名誉教授

浪久利彦

●顧問●

近畿大学 名誉教授

金沢医科大学 名誉教授

北里大学 客員教授

奈良県立医科大学 名誉教授

三重大学 名誉教授

順天堂大学 名誉教授

鳥取大学 第二内科 教授

旭川医科大学 第二内科 教授

三楽病院 副院長

日本医科大学 第一内科 教授

山本俊夫
高田久昭
柴田久雄
辻井正二
水本龍二
南部勝司
川崎寛中
牧野勲
神坂和明
荒牧琢己

●世話人●

岡山済生会総合病院 副院長

北海道大学 薬学部代謝分析学 教授

三重大学 第三内科 教授

旭川医科大学 第二外科 教授

東京都情報サービス産業健康保健組合 東中野検診センター 所長

東京警察病院 内科 部長

大阪市立大学 生化学 教授

東京大学 製剤学 教授

三重大学 医学部看護学科 教授

奈良県立医科大学 第三内科 教授

鳥取大学 第二内科 講師

秋田大学 第一内科 教授

帝京大学 内科 教授

福岡大学 第三内科 教授

広島大学 第一内科 講師

東京大学 消化器内科

信州大学 第一外科 教授

北里大学東病院 消化器内科 講師

糸島達也
鎌滝哲也
足立幸彦
葛西眞一
北見啓一
平野正憲
井上正康
杉山雄一
野口孝博
福井博和
村脇義夫
渡辺純夫
滝川一
向坂彰太郎
田妻進
吉田晴彦
川崎誠治
國分茂博

日時 平成12年10月24日(火) 13:30~17:50

場所 ホテルオークラ神戸 平安の間

住所 神戸市中央区波止場町2-1

TEL. 078(333)0111

会費 2,000円

19. 肝細胞血管側膜を介した胆汁酸排出機構の解析：正常およびMRP2-欠損ラットにおける比較検討

東京大学大学院 薬学系研究科 鈴木 洋史、秋田 英万、杉山 雄一

〈セッション6〉 16:22~

座長：東京大学大学院 薬学系研究科 製剤設計学教室 助教授 鈴木 洋史

20. 閉塞性黄疸モデルラットにおけるmultidrug resistance-associated protein 2 (mrp2) 発現の肝腎相関

三重大学 医学部 第三内科 田中 裕滋、小林 由直、樋口 国博、裴 秋玲、
竹内 圭介、垣内 雅彦、足立 幸彦

近畿大学 医学部 消化器内科 上裕 俊法

21. Intracellular localization of multidrug resistance-associated protein 1 (mrp1) and mrp2 in hepatocytes and renal tubular epithelial cells after bile duct ligation in rats

三重大学 医学部 第三内科 裴 秋玲、小林 由直、樋口 国博、田中 裕滋、
竹内 圭介、垣内 雅彦、足立 幸彦

近畿大学 医学部 消化器内科 上裕 俊法

22. ヒト肝小胞体内へのUDP-glucuronic acidの取り込み機構の解析

東京大学大学院 薬学系研究科 守屋 優、鈴木 洋史、杉山 雄一

23. 肝細胞癌患者とALDH2、CYP2E1の遺伝子多型

鳥取大学 医学部 第二内科 岡本 欣也、村脇 義和、孝田 雅彦、川崎 寛中

特別講演 17:00~17:45

座長：大阪市立大学 生化学 井上 正康

「ポストゲノム時代における肝構成細胞の分子解析」

大阪市立大学 医学部 第三内科 河田 則文

17:50 閉会の辞

大阪市立大学 生化学 教授 井上 正康

21. Intracellular localization of multidrug resistance-associated protein 1 (mrp1) and mrp2 in hepatocytes and renal tubular epithelial cells after bile duct ligation in rats

三重大学 医学部 第三内科 裴 秋玲、小林 由直、樋口 国博、
田中 裕滋、竹内 圭介、垣内 雅彦、
足立 幸彦

近畿大学 医学部 消化器内科 上裕 俊法

【目的】 mrp1およびmrp2は、抱合ビリルビンを始め多くの有機アニオンを細胞内から外に排泄するATP依存性トランスポーターの一つである。我々は閉塞性黄疸モデルラットにおいて肝細胞及び腎尿細管上皮細胞のmrp1およびmrp2蛋白発現とその細胞内局在について蛍光免疫組織染色を用いて検討した。【方法】 Male Wistar ratに総胆管結紮 (Bile Duct Ligation ; BDL) を施行し、BDL前後に肝臓および腎臓を摘出した。それぞれ凍結切片を作成した後、mrp1およびmrp2に対するポリクローナル抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行い、レーザー顕微鏡にて観察した。【成績】 肝細胞においては、BDL前にはmrp1蛋白は明らかな発現を認めなかったが、BDL施行120時間後には、mrp1蛋白は肝細胞毛細胆管側膜上に弱いながらも発現が認められた。mrp2蛋白はBDL前には肝細胞毛細胆管側の膜上に発現が認められたが、BDL施行後には肝細胞膜上に存在したmrp2蛋白は著明に減少し、細胞膜近傍の細胞質内にmrp2蛋白が不明瞭なシグナルとして認められた。腎臓においては、BDL施行前にはmrp2蛋白は近位尿細管上皮のbrush border上に発現していた。BDL施行後にはbrush border上及び細胞質内ともに発現の増強が認められた。mrp1蛋白の腎臓における発現は現在検討中である。【結論】 閉塞性黄疸モデルラットにおいて、mrp1の肝細胞毛細胆管側膜上への発現が弱いながらも認められた。また、肝細胞毛細胆管側膜上のmrp2蛋白は著明に減少し、腎尿細管上皮brush border膜上のmrp2蛋白は増加していた。

日中医学協会助成事業—日本財団助成金による

総胆管結紮ラットの肝および腎における multidrug resistance-associated protein 1 (mrp1) および mrp2 の組織内分布と細胞内局在に関する検討

裴 秋玲、小林由直、田中裕滋、田口由紀子、樋口国博、垣内雅彦、馬 寧 (*), 仙波礼治 (*), 足立幸彦、上碓俊法 (**)

三重大大学第3内科、三重大大学第2解剖学 (*), 近畿大学消化器内科 (**)

Distribution and intracellular localization of multidrug resistance-associated proteins 1 (mrp 1) and 2 (mrp2) in rat liver and kidney after bile duct ligation

Qiu-Ling Pei,
Yoshinao Kobayashi,
Yuji Tanaka, Yukiko,
Taguchi, Kunihiro,
Higuchi, Ning Ma (*),
Reiji Semba (*),
Yukihiko Adachi and Toshinori Kamisako (**)

Third Department of Internal Medicine,
Mie University
School of Medicine,
(*) Second Department of Anatomy, Mie
University School
of Medicine, and (**) Department of
Gastroenterology and Hepatology, Kinki
University School of Medicine

SUMMARY

The liver and kidney play a major role in the elimination of a wide variety of endo-xenobiotic anionic substrates into bile and urine. They are mediated by adenosine triphosphate (ATP)-dependent conjugate export pumps, multidrug resistance-associated proteins. In this report, chronological regulations and localization of mrp1 and mrp2 in rat liver and kidney during bile duct ligation were examined using immunofluorescence staining. BDL induced down-regulation and fuzzy pericanalicular localization of mrp2 in rat liver. This change was accompanied by the corresponding increase in hepatorenal mrp1, increase in renal mrp2. Reciprocal changes of these transporters in liver and kidney are probably the results of an adaptation to impaired hepatic excretion of conjugated organic anions.

始めに

肝や腎では多くの物質を血中から摂取し、胆汁や尿中に排泄している (1, 2)。これらの物質のうち、有機アニオンの排泄には細胞膜上に存在する multidrug resistance-associated proteins (mrp) とよばれるATP依存性のトランスポーターが関与している。mrpのうち mrp1 と mrp2 は輸送する基質、アミノ酸配列が類似している。しかし mrp1 は mrp2 に較べて生理的な状態での発現量が著明に少ないことが報告されており、肝や腎における局在が十分に検討されていない。我々は総胆管結紮 (bile duct ligation: BDL) によりラットの胆汁うっ滞モデルを作製し、肝および腎における mrp1 および mrp2 の発現の変化を蛍光免疫染色により検討した。

対象と方法

雄性SDラット (体重 240~260 g) に BDLを施行した。BDL前 (=コントロール、n=4)、1日後 (n=3)、3日後 (n=3) および5日後 (n=3) に肝及び腎を摘出した。又、臓器摘出時に血液を採取し、血清ビリルビンを測定した。

免疫組織染色：ラット mrp2 に対する抗体としてはドイツ癌研究センターの Keppler 教授より供与された EAG15 ウサギポリクローナル抗体を使用した。ラット mrp1 に対する抗体としては、Mrp (m-20) ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA) を使用した。これらの一次抗体と蛍光標識した2次抗体を用いて組織免疫染色を行った。

結果

血清ビリルビン濃度：

血清ビリルビン濃度は、BDL 1日、3日および5日後にはコントロールと較べてそれぞれ約8, 12, 10倍に上昇した (Fig. 1)。血清ビリルビンはBDL 3日後に最も上昇し、5日後にはやや下降した。

mrp 2の免疫組織染色：

コントロール肝では、mrp 2 蛋白は肝細胞毛細胆管側に限局して存在した (Fig. 2)。BDL 1日後には、mrp 2 の染色性はコントロールと比較して弱くなり、BDL 3日後には毛細胆管側膜に近い肝細胞質内に不明瞭な mrp 2 が染色された。BDL 5日後には毛細胆管側肝細胞膜上の明瞭な mrp 2 染色が門脈域周辺を中心に認められた。

一方、腎において BDL後は、近位尿細管内腔側および内腔に近い細胞質に mrp 2 蛋白の増加が認められた。

mrp 1の免疫組織染色：

コントロール肝では、mrp 1 は主に肝細胞内ベシクルとして染色された (Fig. 3)。BDLにより肝細胞膜上の mrp 1 は徐々に増加し、肝細胞毛細胆管側膜および外側膜 (lateral membrane) に多く認められた。一方、今回の検討では、コントロール腎においては mrp 1 の明らかな存在は確認できなかった (Fig. 4)。しかしBDL 3日から5日後では、mrp 1 蛋白はいくつかの遠位尿細管において発現が認められた。

考察

BDLにより、肝細胞毛細胆管側膜上におけるmrp 2蛋白の down-regulation が観察された。肝細胞膜および細胞質内における形態的な特徴は従来の報告と一致した (5~7)。興味深いことにBDL 5日後においてmrp 2蛋白の肝細胞毛細胆管側膜への復帰はまず門脈域周辺に起こり、次第に中心静脈周囲にまで進行していく傾向が認められ、門脈域から開始する何らかの回復機序の存在が示唆された。

mrp 1はコントロールではわずかに肝細胞質内に認められるのみであったが、BDLにより毛細胆管側膜および外側膜に発現が認められた。このことは、閉塞性黄疸においてmrp 2を介して行われる有機アニオン輸送の障害をmrp 1が協調して調節している可能性を示唆した。さらに腎においては、閉塞性黄疸時には、これらのトランスポーターがビリルビンや他の有機アニオンを代償的に尿中に排泄

していると思われた。

文献

1. Van Aubel RA et al. Molecular pharmacology of renal organic anion transporters. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:216-232
2. Roelofsen H et al. Regulation of organic anion transport in the liver. *Yale J. Biol. Med.* 1997a; 70:435-445.
3. Borst P et al. The multidrug resistance protein family. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999;1461:347-357.
4. Hipfner D et al. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999;1461:359-376.
5. Trauner M et al. The rat canalicular conjugate export pump (mrp2) is downregulated in intrahepatic and obstructive cholestasis. *Gastroenterology* 1997; 113:255-264.
6. Accatino L et al. Modulation of hepatic content and biliary excretion of p-glycoproteins in hepatocellular and obstructive cholestasis in the rat. *J Hepatology* 1996;25:349-361
7. Ogawa K et al. Characterization of inducible nature of mrp3 in rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;278:G438-G446.

図表の解説

Fig.1. Time course of plasma bilirubin after BDL.

Fig.2. Immunofluorescence staining of mrp2 in the control rat liver .

Mrp2 was localized on the canalicular membrane in control rat liver. (original magnification: × 75)

Fig.3. Immunofluorescence staining of mrp1 in the liver of control rats.

Weak staining of mrp1 diffused in hepatic cytoplasm in the absence of clear membrane domains in control rat liver. (original magnification: ×150)

Fig.4. Immunofluorescence staining of mrp1 in the kidney of control rats.

No specific staining was recognized in the control kidney.