

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5月14日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659073

研究課題名（和文） 薬剤によるBSEP阻害および局在変化に起因する肝毒性の定量的予測

研究課題名（英文） Quantitative analysis of drugs induced BSEP inhibition and cholestatic hepatotoxicity

研究代表者 堀江 利治 (HORIE TOSHIHARU)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：90120154

研究成果の概要（和文）：肝臓の毛細胆管側膜に発現するBSEPの阻害は、毒性の高い胆汁酸が肝細胞内に蓄積することで肝障害が惹起されるため、医薬品候補化合物のBSEP阻害能を評価するためのスクリーニング系が構築されている。しかし、既存の評価系では、輸送体の局在性の低下や代謝物が毒性の要因の場合にはその影響を評価し難い。そこで本研究では、ラット、ヒト遊離肝細胞を用いた、新たなBSEP機能評価系の構築を目的として、薬剤性肝障害を起こす薬物について、BSEPの局在性と輸送機能への影響の検討を行った。その結果、肝障害を誘発することが既知の化合物（25化合物）について、評価を行った結果、CyclosporinAに加えて胆汁うっ滞型肝障害を惹起する9化合物において、BSEP内在化という新規阻害機序により肝障害が惹起される可能性が明らかとなった。また、ヒト肝細胞においてMatrigelを重層することで肝細胞の極性を回復させた Sandwich cultured hepatocytesにおいて胆汁酸に依存した肝毒性が見られるかについて検討を加えた結果、先の検討においてBSEP阻害を示した11化合物のうちGlibenclamideにおいては、ヒト肝細胞内でのみ毒性を示さず、これは、代謝速度に起因することを明らかとした。以上、本研究からヒト Sandwich cultured hepatocytesを用いた手法が胆汁うっ滞型肝障害をスクローニングするための有用なツールとなることを示した。

研究成果の概要（英文）：Drug-induced liver injury (DILI) is a major reason for the dropout of candidate compounds from drug testing and the withdrawal of pharmaceuticals from clinical use. Among the various mechanisms of liver injury, the accumulation of bile acids (BAs) within hepatocytes is thought to be a primary mechanism for the development of DILI. Although bile salt export pump (BSEP) dysfunction is considered a susceptibility factor for DILI, little is known about the relationship between drug-induced BSEP dysfunction and BA-dependent hepatotoxicity. Furthermore, few methods are at hand for the systematic and quantitative evaluation of BA-dependent DILI. This study aimed to construct a model of DILI by employing sandwich-cultured hepatocytes (SCHs). SCHs can be used to assess functions of canalicular transporters such as BSEP and the activity of metabolic enzymes. Here, the impact of 25 test compounds was investigated on BA-dependent cytotoxicity in SCHs. As a result, BA-dependent toxicity was observed for 11 test compounds in SCHs treated in the presence of BAs, while no signs of toxicity were observed for SCHs treated in the absence of BAs. Of the 11 compounds, nine were known BSEP inhibitors. Moreover, for some compounds, an increase in the severity of BA-dependent toxicity was observed in SCHs that were co-treated with 1-aminobenzotriazole, a non-selective inhibitor of cytochrome P450 (CYP450)-mediated drug metabolism. These results indicate that the SCH-based model is likely to prove useful for the evaluation of BA-dependent DILI, including the effects of drug metabolism and BSEP inhibition on liver injury.

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	2,900,000	870,000	3,770,000

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：薬物動態、代謝学

1. 研究開始当初の背景

肝臓の毛細胆管側膜にはMRP2、BSEPが発現しており、ATPの加水分解エネルギーを利用して有機アニオン性薬物や胆汁酸等の内因性基質を濃縮的に胆汁中に排泄することで胆汁流の生成に寄与している。これら輸送体の胆管側膜から細胞内への内在化や膜への局在化のバランスが崩れるとMRP2、BSEPの膜発現の減少により胆汁うっ滞が誘発される。重篤な肝毒性が原因となり製造中止になったTroglitazoneの肝障害の機序の一つとしてその硫酸抱合体によるBSEPの機能阻害が報告されており、BSEPの阻害は肝障害と密接に関わることが知られている。近年、女性ホルモンやCyclosporinAによりMrp2、Bsepの内在化に伴った胆汁流の減少が報告されている。しかし、これら薬物等により惹起された輸送体の内在化に起因する胆汁酸の蓄積による肝障害は報告されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究は「BSEPの内在化を伴った機能低下による胆汁酸の蓄積が薬剤性肝障害の一因となる」という仮説を立て、薬剤性肝障害を起こす薬物について、BSEPの局在性と輸送機能への影響を検討し仮説を立証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では、ラット、ヒトより調製した

培養肝細胞及び蛍光標識BSEP発現細胞株の構築を行い、薬剤性胆汁うっ滞に関わる胆汁酸輸送体BSEPの局在性の変動により生じる輸送機能の低下を評価する。また蛍光標識したBSEPを導入したMcARH7777細胞株を構築し、BSEP局在評価スクリーニング系として、正常なヒト肝細胞の代替実験法となりうるか検討を行う。

4. 研究成果

肝臓の毛細胆管側膜に発現するBSEPの阻害は、毒性の高い胆汁酸が肝細胞内に蓄積することで肝障害が惹起されるため、医薬品候補化合物のBSEP阻害能を評価するためのスクリーニング系が構築されている。しかし、既存の評価系では、輸送体の局在性の低下や代謝物が毒性の要因の場合にはその影響を評価し難い。そこで本研究では、ラット、ヒト遊離肝細胞を用いた、新たなBSEP機能評価系の構築を目的として、薬剤性肝障害を起こす薬物について、BSEPの局在性と輸送機能への影響の検討を行った。前年度において構築したBSEP-GFP発現MCARh7777細胞株において、Molecular Devise社の協力のもとハイコンテンツスクリーニングを用いて、肝障害を誘発することが既知の化合物(25化合物)について、評価を行った結果、CyclosporinAに加えて胆汁うっ滞型肝障害を惹起する9化合物において、BSEPの内在化を引き起こす事が新たに明らかとなり、BSEP内在化という新規阻害機序により肝障害が惹起される可能性が明らかとなった。

本化合物において、ヒト肝細胞において Matrigelを重層することで肝細胞の極性を回復させた Sandwich cultured hepatocytesにおいて胆汁酸に依存した肝毒性が見られるかについて検討を加えた結果、先の検討において BSEP阻害を示した9化合物のうち Glibenclamideにおいては、ヒト肝細胞に対して毒性を示さなかった。本化合物について、詳細な検討を行った結果、Glibenclamideはヒト肝細胞内で速やかに代謝による消失が起きていることが、毒性を示さない原因であることが明らかとなり、ヒト Sandwich cultured hepatocytesを用いた手法が胆汁うっ滞型肝障害をスクローニングするための有用なツールとなることを示した。

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 15 件)

1. Fujiyama N, Shitara Y, Horie T., The Mechanism of the Down-Regulation of Hepatic Transporters in Rats with Indomethacin-Induced Intestinal Injury. Dig Dis Sci. (査読有) 2013 [Epub ahead of print]
2. Shitara Y, Takeuchi K, Horie T., Long-lasting inhibitory effects of saquinavir and ritonavir on OATP1B1-mediated uptake. J Pharm Sci. (査読有) 2013 [Epub ahead of print]
3. Oga EF, Sekine S, Horie T., Ex vivo and in vivo investigations of the effects of extracts of Vernonia amygdalina, Carica papaya and Tapinanthus sessilifolius on digoxin transport and pharmacokinetics: Assessing the significance on rat intestinal P-glycoprotein efflux. Drug Metab Pharmacokinet. (査読有) 2013. [Epub ahead of print]
4. Shitara Y, Nakamichi N, Norioka M, Shima H, Kato Y, Horie T., Role of organic cation/carnitine transporter 1 in uptake of phenformin and inhibitory effect on complex I respiration in mitochondria. Toxicol Sci. (査読有) 2013;132(1):32-42.
5. Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, Sugiyama Y., Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. Biopharm Drug Dispos. (査読有) 2013;34(1):45-78.
6. Oga EF, Sekine S, Shitara Y, Horie T., P-glycoprotein mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of herbals on digoxin transport. J Ethnopharmacol. (査読有) 2012;144(3):612-7.
7. Ueda K, Higashi K, Limwikrant W, Sekine S, Horie T, Yamamoto K, Moribe K., Mechanistic differences in permeation behavior of supersaturated and solubilized solutions of carbamazepine revealed by nuclear magnetic resonance measurements. Mol Pharm. (査読有) 2012;9(11):3023-33.
8. Oga EF, Sekine S, Shitara Y, Horie T., Potential P-glycoprotein-mediated drug-drug interactions of antimalarial agents in Caco-2 cells. Am J Trop Med Hyg. (査読有) 2012;87(1):64-9.
9. Suzuki K, Shitara Y, Fukuda K, Horie T., Long-lasting inhibition of the intestinal absorption of fexofenadine by cyclosporin

- A in rats. J Pharm Sci. (査読有) 2012 Jul;101(7):2606-15.
10. Sekine S, Mitsuki K, Ito K, Kugioka S, Horie T., Sustained intrahepatic glutathione depletion causes proteasomal degradation of multidrug resistance-associated protein 2 in rat liver. Biochim Biophys Acta. (査読有) 2012;1822(6):980-7.
 11. Shitara Y, Takeuchi K, Nagamatsu Y, Wada S, Sugiyama Y, Horie T., Long-lasting inhibitory effects of cyclosporin A, but not tacrolimus, on OATP1B1- and OATP1B3-mediated uptake. Drug Metab Pharmacokinet. (査読有) 2012;27(4):368-78.
 12. Ogimura E, Sekine S, Horie T., Bile salt export pump inhibitors are associated with bile acid-dependent drug-induced toxicity in sandwich-cultured hepatocytes. Biochem Biophys Res Commun. (査読有) 2011;416(3-4):313-7.
 13. Sekine S, Ito K, Saeki J, Horie T., Interaction of Mrp2 with radixin causes reversible canalicular Mrp2 localization induced by intracellular redox status. Biochim Biophys Acta. (査読有) 2011;1812(11):1427-34.
 14. Tanii H, Shitara Y, Horie T., Population pharmacokinetic analysis of letrozole in Japanese postmenopausal women. Eur J Clin Pharmacol. (査読有) 2011;67(10):1017-25.
 15. Saeki J, Sekine S, Horie T., LPS-induced dissociation of multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) and radixin is associated with Mrp2 selective internalization in rats. Biochem Pharmacol. (査読有) 2011;81(1):178-84.
- [学会発表] (計 2 3 件)
1. 大久保江美、関根秀一、若林賢一、笠松俊夫、西山直宏、堀江利治 生体成分共存下におけるカテキンの安定性と ROS の生成 第 20 回年会 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 2012 年 8 月 25 日 仙台
 2. Shuichi Sekine, Eiichiro Ogimura, Toshiharu Horie Evaluation of bile acid dependent drug-induced liver injury in sandwich cultured rat hepatocytes MDO-ISSX 2012 年 6 月 17-21 日, Noordwijk aan Zee, The Netherlands
 3. 関根秀一、伊藤晃成、堀江利治 酸化ストレス誘発性胆汁停滞時における胆汁排泄輸送体の局在制御機構の解明 肝病態生理研究会 2012 年 6 月 6 日 金沢
 4. 伊藤好美, 関根秀一, 堀江利治, 小池和彦, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江肇, 堤武也, 三好秀征, 藤永秀剛, 新澤靖子, 藤江肇, 堤武也, 三好秀征, 藤永秀剛, 新澤 靖子 C 型肝炎の病態悪化に対するミトコンドリア鉄蓄積と鉄取り込み機構の関与 肝病態生理研究会 2012 年 6 月 6 日 金沢
 5. 関根秀一、薄田健史、荻村栄一郎、堀江利治 BSEP 阻害剤による胆汁酸依存的毒性のサンドイッチ培養肝細胞での評価法の確立 第 27 年会 日本薬剤学会 2012 年 5 月 24-26 日 神戸
 6. 伊藤好美, 関根秀一, 堀江利治, 小池和彦, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江肇, 堤武也, 三好秀征, 藤永秀剛, 新澤靖子, 藤江肇, 堤武也, 三好秀征, 藤永秀剛, 新澤 靖子 C 型肝炎ウイルスコア蛋白質と鉄により誘発される細胞障害増悪に

- 対するミトコンドリア鉄取り込み機構の関与 第 132 年会 日本薬学会 2012 年 03 月 28-31 日 札幌
7. 小澤口尚子, 関根秀一, 堀江利治 薬物誘発性肝障害発生機序における肝ミトコンドリア内グルタチオン量の関与 第 132 年会 日本薬学会 2012 年 03 月 28-31 日 札幌
 8. Shuichi Sekine, Eiichiro Ogimura, Toshiharu Horie Sandwich-cultured hepatocytes enable a predictive evaluation of BSEP/Bsep dysfunction-mediated, drug-induced hepatotoxicity SOT 2012 年 3 月 11-15 日 San Francisco, USA
 9. 小澤口尚子, 関根秀一, 堀江利治 肝障害誘発性薬物による肝毒性に対する肝ミトコンドリア中のグルタチオン量の関与 第 19 年会 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会 2011 年 12 月 17 日 仙台
 10. 堀江利治, 関根秀一, 伊藤晃成 酸化ストレス誘発性胆汁鬱滞における MRP2 の局在制御機構の解明 第 33 回 生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 2011 年 11 月 24-25 日 岡山
 11. Enoche F.Oga, 関根秀一, 設楽悦久, 堀江利治 POTENTIAL P-GLYCOPROTEIN MEDIATED DRUG-DRUG INTERACTIONS OF SOME ANTI-MALARIALS 第 26 回 日本薬物動態学会 2011 年 11 月 16-18 日 広島
 12. 菊田奈津子, 設楽悦久, 則岡美咲, 中道範孝, 加藤将夫, 堀江利治 フェンホルミンによって引き起こされるミトコンドリア障害に対する OCTN1/Octn1 の関与 第 26 回 日本薬物動態学会 2011 年 11 月 16-18 日 広島
 13. 荻村 栄一郎, 関根秀一, 堀江利治 Sandwich cultured rat hepatocytes を用いた胆汁酸依存性薬剤肝障害の定量的評価法 第 26 回 日本薬物動態学会 2011 年 11 月 16-18 日 広島
 14. 関根秀一, 木村 友映, 本山 碧, 堀江利治 薬物誘発性ミトコンドリア感受性の動物間種差における Cyclophilin D の関与 第 38 回 日本トキシコロジー学会学術年会 2011 年 7 月 11-13 日 横浜
 15. 荻村 栄一郎, 関根秀一, 堀江利治 Sandwich cultured rat hepatocytes を用いた胆汁酸依存性薬剤性肝障害の定量的評価 第 38 回 日本トキシコロジー学会学術年会 2011 年 7 月 11-13 日 横浜
 16. 堀江利治, 関根秀一, 伊藤晃成 細胞内レドックス状態の変化による Mrp2-radixin 複合体の局在制御機構の解明 第 26 年会 日本薬剤学会 2011 年 5 月 29 日-31 日 東京
 17. 釘岡里恵, 関根秀一, 三ツ木香織, 伊藤晃成, 堀江利治 酸化ストレス時における Mrp2 タンパク分解に対するユビキチン様修飾因子の関与 第 26 年会 日本薬剤学会 2011 年 5 月 29 日-31 日 東京
 18. 書川尚子, 関根秀一, 浅田千晶, 前田智子, 堀江利治 メトトレキサート誘発性消化管バリア機能障害における好中球浸潤の関与 第 26 年会 日本薬剤学会 2011 年 5 月 29 日-31 日 東京
 19. 長里美希, 関根秀一, 日比野 翔, 堀江利治 癌細胞の多剤耐性における PDZ タンパク質の関与 第 26 年会 日本薬剤学会 2011 年 5 月 29 日-31 日 東京
 20. 佐伯淳二郎, 関根秀一, 堀江利治 肝炎症時の胆汁排泄輸送体 Mrp2 の内在化機構解明 第 131 年会 日本薬学会 2011

年 3 月 28-31 日 静岡

21. 則岡美咲, 設楽悦久, 中道範隆, 加藤将夫, 堀江利治 Phenformin による毒性に対するミトコンドリア輸送担体の関与の解明 第 131 年会 日本薬学会 2011 年 3 月 28-31 日 静岡
22. 鈴木敬, 設楽悦久, 堀江利治 Fexofenadine と cyclosporin A の消化管吸収過程で生じるトランスポーターを介した薬物間相互作用 第 131 年会 日本薬学会 2011 年 3 月 28-31 日 静岡
23. 伊藤好美, 関根秀一, 堀江利治, 小池和彦, 森屋恭爾, 新谷良澄, 藤江肇, 堤武也, 三好秀征, 藤永秀剛, 新澤靖子, 藤江肇, 堤武也, 三好秀征, 藤永秀剛, 新澤 靖子 C 型肝炎ウイルスコア蛋白質により誘発されるミトコンドリア障害に対する鉄蓄積の関与 第 131 年会 日本薬学会 2011 年 3 月 28-31 日 静岡

[図書] (計 4 件)

1. 堀江利治 薬物の分布 pp. 175-187 (分担執筆)「最新薬剤学 第 10 版」、林正弘、尾関哲也、乾賢一編、廣川書店 2012
2. 堀江利治 薬物代謝 pp. 313-344 (分担執筆)「新有機医薬品合成化学」、田口武夫、小林進、東山公男編、廣川書店 2012
3. Kato M, Shitara Y, Kitajima M, Tachibana T, Igarashi M, Horie T, Sugiyama Y., 2010, Extrapolation of In vitro Metabolic and P-Glycoprotein-mediated Transport data to In vivo by Modeling and Simulations, in “Enzyme- and Transporter-Based drug-drug interactions” pp299-315, Springer, NY, USA
4. Maeda K, Shitara Y, Horie T,

Sugiyama Y., 2010 Web-Based Database as a Tool to examine drug-drug interactions involving transporters in Enzyme- and Transporter-Based drug-drug interactions” pp387-412, Springer, NY, USA

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

発明者: 関根秀一, 堀江利治

権利者: 千葉大学

番号: 2011-152087 号

出願年月日: 2011 年 7 月 23 日

国内外の別: 国内

○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

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/yakuzai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉大学・大学院薬学研究院・教授 堀江 利治 (HORIE TOSHIHARU)

研究者番号: 90120154

(2) 研究分担者

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授 設楽 悦久 (SHITARA YOSHIHISA)

研究者番号: 00306656

千葉大学・大学院薬学研究院・助教 関根秀一 (SEKINE SHUICHI)

研究者番号: 70401007

(3) 連携研究者

()

研究者番号: