

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31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790174

研究課題名（和文）薬物誘発性胆汁うっ滞の発症機構の解析

研究課題名（英文）Analyses of transporter-mediated mechanisms of drug-induced cholestasis

研究代表者

吉門 崇 (YOSHIKADO TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・杉山特別研究室・研究員

研究者番号：70535096

研究成果の概要（和文）

本研究では、胆汁分泌を担うトランスポーターを介した薬物誘発性胆汁うっ滞のリスクとなる薬物を見出し、メカニズムの解析を行った。胆汁うっ滞性薬物を用いた *in vivo* 実験により胆汁成分の変動を解析するとともに、*in vitro* でトランスポーターに対する影響を評価した。特にチクロピジンについては、グルタチオン抱合型代謝物の胆汁排泄がリン脂質の胆汁分泌に影響を与えることを明らかとした。さらに、トランスポーターの発現・局在変化や薬物代謝物が関わる複雑な薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズム解析に有用な、サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた評価系を構築した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, bile canalicular transporter-mediated mechanisms of drug-induced cholestasis were analyzed. Effects of cholestatic drugs on the bile composition and on the function of transporters were examined by *in vivo* and *in vitro* experiments. In the case of ticlopidine, transporter-mediated biliary excretions of its glutathione-conjugated metabolites affected the biliary secretion of phospholipids, which might lead to liver injury. In addition, further studies using sandwich-cultured human hepatocytes were performed to analyze complex mechanisms of drug-induced cholestasis: metabolisms of drugs and changes in expression/localization of transporters.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

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：薬物誘発性胆汁うっ滞、トランスポーター、薬剤性肝障害、胆汁酸依存性胆汁、胆汁酸非依存性胆汁、胆汁ミセル

1. 研究開始当初の背景

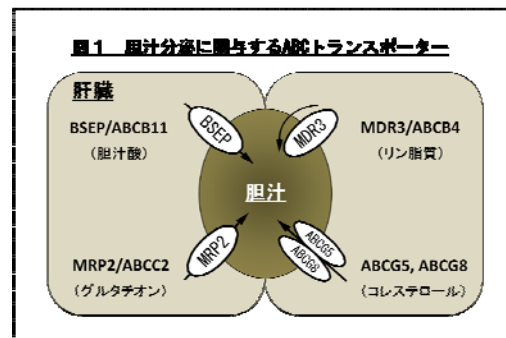
生体の恒常性を維持する肝臓の機能の一つとして胆汁分泌があり、肝細胞毛細胆管膜に発現する ATP-binding cassette (ABC) ト

ランスポーターが重要な役割を担っている（図1）。Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) は胆汁酸、multidrug resistance 3 P-glycoprotein (MDR3/ABCB4)

はリン脂質、ABCG5 と ABCG8 のヘテロ二量体はコレステロール、 multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2) はグルタチオン等有機アニオンの胆汁分泌を担うトランスポーターである。BSEP と MDR3 は重篤な進行性家族性肝内胆汁うっ滞 (PFIC) の原因遺伝子であることから、機能の維持が重要であると考えられている。

近年、臨床で問題となる副作用である薬物誘発性胆汁うっ滞とトランスポーターとの関連性が議論されている。薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズムとして、BSEP による胆汁酸分泌を薬物が阻害することで肝臓内への胆汁酸の蓄積をもたらす可能性と、MDR3 によるリン脂質分泌を阻害することで胆汁ミセルの形成に悪影響を与えて遊離胆汁酸の毒性を増加させる可能性が考えられる。BSEP を介した薬物誘発性胆汁うっ滞については、胆汁うっ滞性薬物による BSEP の阻害を *in vitro* で解析した例が報告されている。一方、胆汁うっ滞性薬物による MDR3 の阻害については報告されていなかったため、吉門らは MDR3 発現系を用いたリン脂質輸送の評価系を構築した。東京大学医学部附属病院において薬物誘発性胆汁うっ滞の起因薬とされた抗真菌薬イトラコナゾールは、*in vitro* において MDR3 によるリン脂質輸送を顕著に阻害した (Yoshikado T et al. Mol Pharmacol. 79(2):241-50, 2011)。また、*in vivo* においてラット胆汁中へのリン脂質分泌を顕著に減少させた。先に述べた東大病院の症例ではイトラコナゾールの血漿中濃度が平均的な治療濃度の約 3-4 倍に上昇していたことから、高濃度のイトラコナゾールによる MDR3 の阻害が胆汁中リン脂質の減少をきたし薬物誘発性胆汁うっ滞の要因となったことが示唆された。

イトラコナゾールの例で示したような、トランスポーターの直接的な阻害作用を介した薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズムに加えて、薬物がトランスポーターの発現・局在の制御に影響を与えることにより胆汁分泌が低下する間接的なメカニズムも考えられる。また、薬物代謝物がトランスポーターに影響を与える可能性もある。さらに、アレルギー性の薬物誘発性胆汁うっ滞においては、薬物が肝細胞毛細胆管膜を障害し二次的にトランスポーター機能が低下する可能性がある。従って、トランスポーターに対する胆汁うっ滞性薬物の直接的・間接的な作用を総合的に解析することが薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズムを明らかにする上で必要であると考えられた。



2. 研究の目的

本研究では、臨床において薬物誘発性胆汁うっ滞のリスクとなる薬物を見出し、そのメカニズム (トランスポーターの直接阻害および間接的な作用) を解析することを目的とした。具体的な内容を以下に述べる。

- ・胆汁うっ滞性薬物の *in vivo* における影響を明らかとするために、薬物を投与したラットにおける胆汁分泌変動の解析
- ・胆汁うっ滞性薬物の *in vitro* における阻害作用を明らかとするために、トランスポーターの機能評価系を用いた解析
- ・胆汁うっ滞性薬物によるトランスポーターの阻害に加えて、発現・局在への影響や毛細胆管の障害等を評価するために、サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた解析

以上の解析をもとに、個々の胆汁うっ滞性薬物を評価することによって、臨床における薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズムの一端を明らかにできると考えた。将来的には、トランスポーターの機能変動を *in vitro* で総合的に評価することで、臨床における薬物副作用の回避や創薬における候補化合物のリスク評価に発展させていきたいと考えている。

3. 研究の方法

- ・ラットへの胆汁うっ滞性薬物の投与・胆汁分泌の解析

Sprague-Dawley rat (SD rat) に胆汁うっ滞性薬物を投与し、胆汁分泌の変動 (胆汁流量、胆汁酸、リン脂質、グルタチオン等有機アニオン) を解析した。ラットの大腿静脈・大腿動脈・胆管の三か所にカニューレを施し、大腿静脈に薬物の投与、大腿動脈から採取した血液を用いて LC-MS/MS 法による薬物濃度の測定、胆管から採取した胆汁を用いて市販キットによる胆汁成分の測定を行った。薬物を単回静注後に定速静注を行うことで血漿中薬物濃度の定常状態を維持し、臨床濃度付近における胆汁分泌の変動を解析できる。また肝臓内の薬物濃度を LC-MS/MS 法で測定し、後述する *in vitro* での MDR3、BSEP に対する IC_{50} との比較を行った。

- ・トランスポーター発現系等を用いた胆汁う

胆汁うっ滞性薬物の評価

ヒト MDR3、BSEP の cDNA を挿入した組み換えアデノウイルスを作成し、ブタ腎尿管由来の極性細胞である LLC-PK1 細胞に感染させることで発現を確認した。また、胆汁酸取り込みトランスポーターである Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP/SLC10A1) の組み換えアデノウイルスも同時に作成し、MDR3 発現細胞における [¹⁴C]ホスファチジルコリンの輸送実験と BSEP/NTCP 共発現細胞における [³H]タウロコール酸の経細胞輸送実験を行うことで、薬物による MDR3、BSEP に対する IC₅₀ を検討した。本研究では、これらの細胞発現系を用いた検討に加えて、細胞膜ベシクルを用いた実験も並行して行った。

・サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた胆汁うっ滞性薬物の評価

サンドイッチ培養肝細胞では肝細胞の分化が維持されており、極性を保つことで閉じられた毛細胆管を形成することが知られている。また、トランスポーターの発現が維持されており、BSEP については基質である胆汁酸の輸送が報告されていることから、胆汁うっ滞性薬物によるトランスポーターの輸送・発現・局在に対する影響を評価する上で有用と考えられた。さらに、薬物代謝酵素の発現も比較的維持されていることから、代謝物による影響を評価することも可能と考えた。本実験では、まずサンドイッチ培養ヒト肝細胞における薬物の輸送・代謝を評価する系を構築した。サンドイッチ培養ヒト肝細胞への薬物の取り込み、毛細胆管への排出、代謝を明らかにすることで、その薬物の肝臓における動態特性を明らかにすることができる。続いて、肝細胞への取り込みが確認された薬物について、胆汁分泌トランスポーターへの影響を解析するための実験系を構築した。さらに、胆汁うっ滞性薬物の毛細胆管内への蓄積と細胞毒性との間に相関がある可能性を考え、LC-MS/MS を用いて毛細胆管内の薬物の定量も行った。

4. 研究成果

臨床において胆汁うっ滞を誘発する薬物を見出すために、厚生労働省の薬物性肝障害マニュアルに基づき、胆汁うっ滞型肝障害の症例が多く報告されている薬物の順位付けを行った。上位の薬物を SD rat に投与して胆汁成分の変動を解析した。この中で、抗血小板薬チクロピジンは胆汁中に必須の成分であるリン脂質の分泌を著しく減少させた。同時に、胆汁流量が増加する傾向が見られたが、グルタチオンとグルタチオン抱合型チクロピジン代謝物 (TIC-SGs) の著しい胆汁分泌が見られた。一方、チクロピジン投与に伴うこれらの現象は、MRP2 を欠損する Eisai

hyperbilirubinemic rat (EHBR) においては見られなかったことから、MRP2 の関与が示唆された。In vitro のベシクル実験系においては MRP2 による顕著な TIC-SGs の輸送が見られた。また、リン脂質の分泌を担う MDR3 の発現系を用いた実験系では、臨床濃度のチクロピジンおよび TIC-SGs による MDR3 の阻害作用が見られなかったこと、胆汁酸の一種であるタウロコール酸の SD rat への infusion により胆汁中リン脂質が回復したことから、MDR3 の直接阻害ではなく、MRP2 による TIC-SGs の胆汁排泄によって胆汁ミセルの形成が滞ったことがリン脂質減少の原因であることが示唆された。さらに、SD rat へのチクロピジン投与により肝障害マーカーである alanine transaminase (ALT) および直接ビリルビンの上昇が見られたが、EHBR では見られないことを確認した。本研究ではさらに、胆汁分泌を担うトランスポーターと薬物取り込みトランスポーターである organic anion transporting polypeptides (OATPs) との共発現系を構築し、極性が高く受動拡散では細胞内に入りにくい胆汁うっ滞性薬物の評価も行った。また、より生体に近いと考えられるサンドイッチ培養肝細胞を用いて薬物の輸送・代謝・毛細胆管への蓄積を評価する系を構築したことから、今後は薬物そのものでは阻害が見られなかった場合に代謝物による阻害の可能性を検討する等、より複雑な薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズム解析とリスク評価を進めていきたいと考えている。

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 2 件)

① Yoshikado T, Takada T, Yamamoto H, Tan JK, Ito K, Santa T, Suzuki H. Ticlopidine, a cholestatic liver injury-inducible drug, causes dysfunction of bile formation via diminished biliary secretion of phospholipids: involvement of biliary-excreted glutathione-conjugated ticlopidine metabolites. *Mol Pharmacol.* 83(2):552-62, 2013 (査読有)

② Ikebuchi Y, Shimizu H, Ito K, Yoshikado T, Yamanashi Y, Takada T, Suzuki H. Ursodeoxycholic acid stimulates the

formation of the bile canalicular network.
Biochem Pharmacol. 84(7):925-35, 2012 (査
読有)

〔学会発表〕(計2件)

①吉門崇、高田龍平、伊藤晃成、三田智文、
鈴木洋史 チクロヒ・シ・ン代謝物の胆汁排
泄による胆汁形成の変化 —MRP2/ABCC2の関
与— 第20回肝病態生理研究会 2012年6月6
日(金沢)

②吉門崇、高田龍平、伊藤晃成、三田智文、
鈴木洋史 Involvement of MRP2/ABCC2
-mediated bile flow in the
ticlopidine-induced alteration of bile
composition 日本薬物動態学会第26回年会
2011年11月16日~18日(広島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉門 崇 (YOSHIKADO TAKASHI)
独立行政法人理化学研究所・杉山特別研究
室・研究員
研究者番号：70535096

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし