

## 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17日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659076

研究課題名（和文）胆管側膜輸送体の定量的可視化法の樹立と薬物間相互作用評価系への展開

研究課題名（英文） Application of Sandwich-cultured hepatocytes for analysis of drug-drug interaction on bile canalicular transporters.

研究代表者

玉井 郁巳 (TAMAI IKUMI)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：20155237

研究成果の概要（和文）：本研究では肝細胞取り込み能動輸送、細胞内結合、及び肝細胞内生成代謝物の影響を含む薬物間相互作用予測手法の提案を行った。サンドイッチ培養した肝細胞が形成した胆管腔内への ABC 輸送体 MRP2 蛍光プローブ化合物 CDF の移行性を QTLI 法により定量化した。その結果 CDF の移行性は阻害薬添加時、ならびに生成代謝物が阻害する場合も再現できた。したがって、本手法は、胆管腔側膜輸送体上での、相互作用予測法として有用である。

研究成果の概要（英文）：Interplay of transporters and enzymes is essential to understand drug disposition in tissues such as liver and intestine. When we consider drug-drug interaction (DDI) on liver bile canalicular transporters, metabolites formed in the hepatocytes must be considered, since many of conjugated metabolites show higher affinity to those transporters like MRP2. We established a quantitative time-lapse imaging-based analysis (QTLI) to assess MRP2-mediated DDIs in sandwich-cultured hepatocytes (SCHs), utilizing fluorescent probe substrate of MRP2, (5,6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF). When estradiol (E2) was chosen as affecting compound, its metabolite estradiol-17 $\beta$ -glucuronide (E17G) but not E2 itself was confirmed to inhibit MRP2-mediated CDF transport. When SCHs were preincubated with E2, fluorescence accumulated in bile canaliculi formed in SCH was decreased depending upon both length of preincubation period and concentration of E2 given in extracellular medium. The decrease in accumulated fluorescence agreed with an increase in intracellular concentration of E17G generated in hepatocytes, suggesting that the phase II biotransformation is mirrored in MRP2-mediated transport by QTLI. Since SCHs well maintain hepatic uptake transport activity, intracellular binding and drug metabolizing activity as *in vitro* system, QTLI in SCHs provides a convenient platform to develop an evaluation system for transporter-based DDIs without identifying metabolites of drug candidates.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

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：輸送体、肝細胞、薬物間相互作用、副作用、胆汁排泄、可視化

### 1. 研究開始当初の背景

肝臓の胆管側膜に発現する MRP2 は薬物およびその代謝物の胆汁排泄に寄与する。したがって、MRP2 上での薬物間相互作用は薬物誘導性肝毒性発現の危険因子として重要である。従来の輸送体発現細胞由来膜ベシクルなどを用いた輸送活性評価では、肝細胞内環境が反映されないことが問題点であった。

この点を改善する新しい胆管腔輸送体機能評価法として、本研究開始時において、申請者らはサンドイッチ培養肝細胞内 (SCH) で MRP2 の蛍光基質を用いた定量的可視化法 quantitative time-lapse imaging (QTLI) 法を提唱し、本手法が被相互作用薬の細胞への移行過程および組織結合が MRP2 の輸送活性に加味される優れた手法であることを見出していた。本手法では、胆管腔側細胞膜上輸送体のみならず、血液側からの肝細胞内取り込みに働く輸送体 (Uptake)、細胞内で有効な非結合形濃度を定める細胞内結合 (Binding)、ならびに薬物代謝に働く酵素 (Metabolism) という重要因子を含んでいるメリットを利用したものである。

### 2. 研究の目的

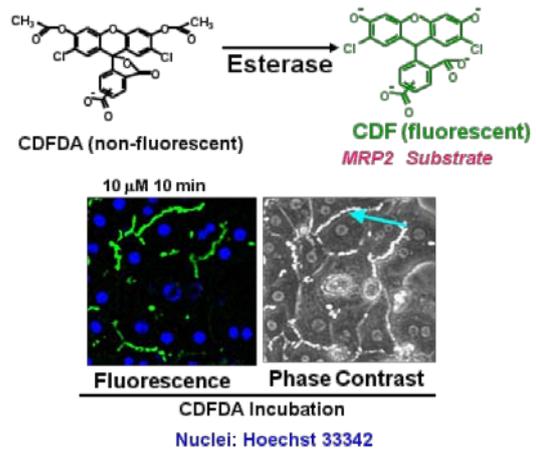
輸送体上での薬物間相互作用にはしばしば相互作用薬の代謝が関与する。薬物代謝物の同定は困難で、個々の生成代謝物毎に薬物輸送体への影響を分離表することは容易ではない。QTLI 法では、肝における薬物代謝酵素活性が維持されている SCH を用いるため、薬物 (相互作用薬) の肝臓における代謝を組み込んだ QTLI 法の樹立を目的に、ラット及びヒト SCH を用いて、本研究を遂行した。

### 3. 研究の方法

本検討において、輸送体のモデルとして胆管腔膜における活性に対して十分に知見が蓄積されており、黄疸などの病態の原因ともなる MRP2 (Multidrug Resistance associated protein 2) を対象とした。そして相互作用薬のモデル蛍光プローブ化合物として細胞内へ移行した後 MRP2 に特異的な蛍光基質へ変換される 5(and 6)-Carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDF) diacetate (CDFDA) を用いた。さらに、相互作用物質として肝細胞内で生成した代謝物が MRP2 の基質あるいは阻害薬となる estradiol-17 $\beta$ -glucuronide (E<sub>2</sub>17G) へと変換される estradiol (E<sub>2</sub>) を選択し、MRP2 輸送活性の変動を QTLI 法により評価した (図 1)。

相互作用薬の生成が MRP2 の輸送活性に定量的に反映されるか否かについては、SCH の E<sub>2</sub> に対する曝露時間および曝露濃度が

図 1



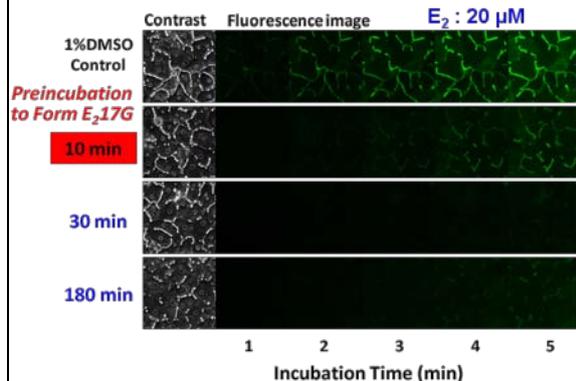
MRP2 輸送活性に与える影響および細胞内代謝物量と MRP2 輸送活性との定量的な関係を構築することにより評価した。さらに、代謝物による MRP2 阻害と肝毒性の発生との関係については、MRP2 により輸送される化学療法剤の毒性を LDH 酵素活性の程度で評価して、検討した。また、ヒト SCH を用いて同様な検討を行い、QTLI 法が、ヒトにおける体内動態予測を考慮し医薬品開発を進める上でも、有意義な手法であることを明らかにした。

### 4. 研究成果

膜ベシクル試験において、E<sub>2</sub> は Mrp2 を阻害しないが、E<sub>2</sub>17G は IC<sub>50</sub> が 59.8  $\mu$ M であった。QTLI による評価では、E<sub>2</sub> を曝露したラット SCH において結果的に CDF 輸送が阻害された (図 2)。

このとき細胞内からは E<sub>2</sub>17G が検出され、CDF の胆管腔内蓄積阻害の程度と細胞内

図 2 Effect of Preincubation Time of E<sub>2</sub> on CDF Accumulation in Bile Canaliculi of SCH

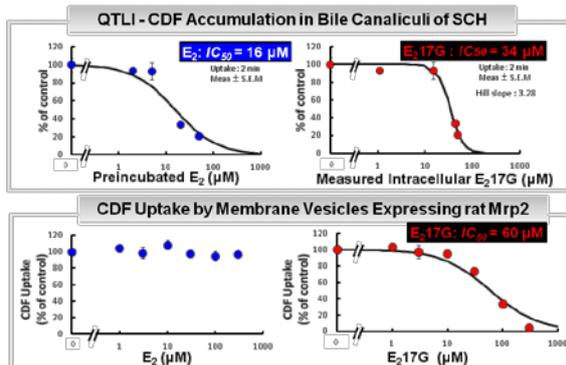


E<sub>2</sub>17G 濃度は相関し、曝露時間及び濃度依存性を示した。細胞外 E<sub>2</sub> 濃度を基準にして算出された Mrp2 阻害効果の IC<sub>50</sub> は 16  $\mu$ M であった。一方、E<sub>2</sub>17G の細胞内濃度に対する IC<sub>50</sub> (34.0  $\mu$ M) はベシクル試験から得られ

た値と近似していた。したがってラット SCH に対し QTLI における E<sub>2</sub> 代謝物による影響評価の可能性が示唆された(図 3)。

図 3

ヒト SCH における代謝物評価のモデルとして E<sub>2</sub> を用い、曝露による影響の特徴付けを行ったところ、ラットと異なり、いずれの条件においても E<sub>2</sub> 濃度に依存して細胞内に E<sub>2</sub>17G および E<sub>2</sub>3G が検出された。そこで、E<sub>2</sub>17G および E<sub>2</sub>3G の MRP2 発現膜ベンク



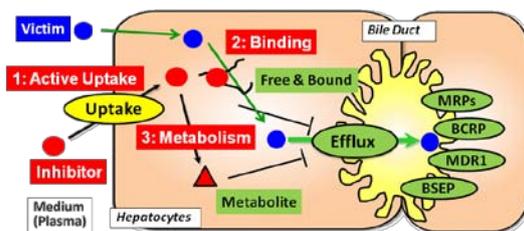
ルによる CDF 輸送に対する阻害効果を検討し、それぞれの阻害能を評価したところ、IC<sub>50</sub> はそれぞれ 138.4、55.2 μM であった。細胞内の両代謝物の濃度を E<sub>2</sub>3G の見かけの濃度で表したときその IC<sub>50</sub> は 38.7 μM と見積もられた。E<sub>2</sub> の MRP2 に対する阻害作用は極めて低いため、本 QTLI 法によって得られた阻害作用は細胞内で生成した代謝物によるものであり、阻害効果が定量的に評価できたといえる。さらに、細胞外 E<sub>2</sub> の濃度を基準にして算出された MRP2 阻害効果は IC<sub>50</sub> が 62.3 μM と見積もられた。今後ラットとヒトとの種差については更なる検討が必要であるが、このような種差も本 *in vitro* 試験系で再現できたことは、本手法の有用性を裏付けるものである。

以上より、本研究において樹立した、サンドイッチ培養肝細胞と輸送体選択的な蛍光プローブ基質化合物 CDF を用いた MRP2 上での相互作用を定量的に評価することを意図した QTLI 法は、下図に示すように、細胞内への取り込みを調整する能動的取り込み過程、細胞内タンパク質などとの結合による非結合形濃度、および細胞内で生成した代謝

物による相互作用など、本来の肝細胞が有する相互作用影響因子を含んだ *in vitro* 評価系として有用であることが示された。

本手法では、直接的な細胞内での結合や代謝、さらに相互作用する代謝物の同定を行うことなく、細胞外の親化合物の濃度から相互

### Difficulty to Analyze DDI on Bile Canalicular Efflux Transporters by Current Methods (Vesicles, Transfected Cultured Cells)



Prediction of DDI on bile canalicular transporters from *in vitro* needs consideration of indirect effects such as .....  
 1: Basolateral Active Uptake; 2: Intracellular Binding; 3: Intracellular Metabolism; Good model that retains function of hepato-biliary disposition are required.

作用を予測できるものである。細胞外濃度は *in vivo* では血漿中濃度に対応するものであり、本手法により極めて現実的な臨床情報により相互作用予測が可能になる。

さらに、MRP2 以外の胆管側膜に発現する各輸送体 (MDR1, BCRP, BSEP など) 上での相互作用についても、それぞれ CDF のような選択的蛍光プローブ基質化合物の選択によって応用可能である。本手法はこのような解析法の基盤となるものであり、さらにプローブ基質化合物の探索など展開を予定している。

### 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. Nakanishi T, Ikenaga M, Fukuda H, Matsunaga N, Tamai I. Application of quantitative time-lapse imaging (QTLI) for evaluation of MRP2-based drug-drug interaction induced by liver metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 査読有、263 (2):244-50. Epub 2012 Jul 2. PMID:22766462 [PubMed - in process] (2012)  
DOI: 10.1016/j.taap.
2. Nakanishi T., Shibue Y., Fukuyama Y., Yoshida K., Fukuda H., Shirasaka Y., Tamai I. Quantitative time-lapse imaging (QTLI)-based analysis of drug-drug interaction mediated by

hepatobiliary transporter, multidrug associated protein 2, in sandwich-cultured rat hepatocytes. Drug Metab. Dispos., 査読有、39(6): 984-991 (2011)、  
DOI: 10.1124/dmd.111.038059

[学会発表] (計4件)

1. Ikumi Tamai, Application of quantitative time-lapse imaging (QTLI) for evaluation of MRP2/MRP2-based drug-drug interaction in rat and human hepatocytes. The 27<sup>th</sup> JSSX Annual Meeting, 2012年11月20日、タワーホール船堀, 東京。
2. Ikumi Tamai, Interplay and difference of transporters and enzymes in drug absorption, disposition and action. 50<sup>th</sup> Anniversary Symposium on Cytochrome P450 in Fukuoka, Dec. 2th, 2012. Kyushu University, Fukuoka, Japan.
3. Ikumi Tamai, Analysis of Drug Interaction on Bile Canalicular Transporters. International Symposium on PPF Molecular Pharmacokinetics, January 17<sup>th</sup>, 2012. Hitotsubashi-Hall, Tokyo, Japan.
4. Ikumi Tamai, In vitro 蛍光イメージング(QTLI)法を用いたMRP2機能変動評価—肝代謝を考慮した薬物間相互作用予測への応用—、日本薬学会北陸支部第123回例会、2011年11月27日、金沢大学(石川県)。

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 分子イメージングにより代謝機能を測定するための検査薬  
発明者: 川井恵一、玉井郁巳、国嶋崇隆太、中西猛夫、小林正和  
権利者: 金沢大学  
種類: 特許権  
番号: 特願2012-44231  
出願年月日: 平成24年2月29日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/lab/douta>

i.html

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

玉井 郁巳 (TAMAI IKUMI)  
金沢大学・薬学系・教授  
研究者番号: 20155237

### (2) 研究分担者

中西 猛夫 (NAKANISHI TAKEO)  
金沢大学・薬学系・准教授  
研究者番号: 30541742

国嶋 崇隆 (KUNISHIMA MUNETAKA)  
金沢大学・薬学系・教授  
研究者番号: 10217975