

博士論文

トランスポーターに着目した
薬物誘発性胆汁うっ滞機構の解析

吉門 崇

-----目次-----

序論

p. 1

第一章

**MDR3/ABCB4 の阻害を介した胆汁中リン脂質の低下による
イトラコナゾール誘発性胆汁うっ滞機構の解析**

p. 9 ----- 概要

p. 10 ----- 方法

p. 17 ----- 結果

p. 23 ----- 考察

p. 29 ----- 図表

第二章

胆汁中リン脂質の低下を伴うチクロピジン誘発性胆汁うっ滞機構
の解析：胆汁中グルタチオン抱合型チクロピジン代謝物による
リン脂質低下作用の関与

p. 41 ----- 概要

p. 43 ----- 方法

p. 49 ----- 結果

p. 55 ----- 考察

p. 59 ----- 図表

総括

p. 75

参考文献

p. 79

【略記】

ABC, ATP-binding cassette; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; BSEP, bile salt export pump; CYP, cytochrome P-450; DILI, drug-induced liver injury; EGFP, enhanced green fluorescent protein; EHBR, Eisai hyperbilirubinemic rat; GSH, glutathione; γ -GTP, γ -glutamyl transpeptidase; HPLC, high performance liquid chromatography; ITZ, itraconazole; LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LDH, lactate dehydrogenase; LFTs, liver function tests; LLC-BSEP/NTCP, BSEP- and NTCP-expressing LLC-PK1 cell; LLC-EGFP, EGFP-expressing LLC-PK1 cell; LLC-EGFP/NTCP, EGFP- and NTCP-expressing LLC-PK1 cell; LLC-MDR3, MDR3-expressing LLC-PK1 cell; LPS, lipopolysaccharide; MDR3, multidrug resistance 3 P-glycoprotein; MOI, multiplicity of infection; MRP2, multidrug resistance-associated protein 2; NTCP, Na^+ /taurocholate cotransporting polypeptide; PC, phosphatidylcholine; PFIC, progressive familial intrahepatic cholestasis; TCA, taurocholate; TIC, ticlopidine; TIC-SG, GSH-conjugated TIC metabolite; TLC, thin-layer chromatography

序論

1) 胆汁形成におけるトランスポーターの役割

肝臓の生理機能である胆汁形成において、図 A に示すように、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 (Oude Elferink and Paulusma, 2007)。① Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) によって胆汁中に分泌された胆汁酸 (Gerloff et al., 1998) は、② Multidrug resistance 3 P-glycoprotein (MDR3/ABCB4) によって分泌されたリン脂質、ABCG5 と ABCG8 のヘテロ二量体によって分泌されるコレステロールを、③ 界面活性作用により細胞膜より引き抜き、胆汁中で混合ミセルを形成する (胆汁酸依存性胆汁)。この時、リン脂質は遊離胆汁酸から細胞膜を保護する働きをする (Oude Elferink and Paulusma, 2007)。一方、④ Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2) によって胆汁中に分泌されたグルタチオンおよびグルタチオン抱合体等の有機アニオンは、その浸透圧作用により胆汁酸非依存性胆汁を牽引する (Paulusma et al., 1996)。

BSEP および MDR3 の遺伝子変異による機能低下は、重篤な進行性家族性肝内胆汁うっ滞 (PFIC: Progressive familial intrahepatic cholestasis) の原因となることが知られていることから重要である (Oude Elferink et al., 2006)。BSEP の遺伝的な機能低下による PFIC2 では、肝臓内に胆汁酸が蓄積することで (Stieger et al., 2007) 肝細胞に障害を与えられている。一方、MDR3 の遺伝的な機能低下による PFIC3 では、胆汁中リン脂質の減少が生じ胆汁ミセル形成のバランスが崩れることで、遊離胆汁酸が増加し、胆管側膜の障害を誘発すると考えられている。MDR3 の関与する PFIC3 では BSEP の関与する PFIC2 と異なり、血中 γ -GTP が上昇することが特徴である。この理由として、PFIC3 においてはリン脂質と胆汁ミセルを形成できない遊離胆汁酸の増加が胆管側膜を障害し、 γ -GTP を遊離させる

と考えられる。

2) 薬物誘発性肝障害 (DILI: Drug-induced liver injury) について

薬物誘発性肝障害 (DILI: Drug-induced liver injury) は重篤になり得る副作用であり、最悪の場合は肝移植か死に至ることから臨床の現場、製薬企業および規制当局にとって重要な課題となっている。実際、米国における急性肝障害の約半分は DILI によって説明される (Kaplowitz, 2005)。さらに、DILI は薬物の用量依存的に起こる中毒性肝障害と、アレルギー性特異体質もしくは非アレルギー性特異体質によって生じる特異体質性 (idiosyncratic) 肝障害に大別される。中毒性肝障害の例としてはアセトアミノフェンが良く知られており、米国における多数の DILI 症例の原因 (意図的もしくは非意図的) となっているが、用量依存的に起こることから予測を行うことは可能である。一方、多くの薬物で報告されている肝障害は特異体質性肝障害であり、米国における DILI 症例の 10%以上はこちらで説明される。アレルギー性特異体質においては、薬物もしくは代謝物がハプテンとなり蛋白質と共有結合することで抗原性を獲得し、T 細胞依存性肝細胞障害を惹起することで肝障害の原因となる。一方、非アレルギー性特異体質においては、免疫機構の関与を完全に否定するものではないが、特徴の一つとして薬物投与開始から中長期は肝障害マーカーの変化が見られず、その後突然肝障害マーカーの上昇とともに肝障害を呈することが挙げられる (Kaplowitz et al., 2005)。薬物代謝酵素・トランスポーター等の個人差により毒性を有する代謝物が肝臓に蓄積することで非アレルギー性特異体質性肝障害を誘発するメカニズムが考えられているが、一例としてトログリタゾンが挙げられる。トログリタゾンは上市後に一万人に一人未満の症例で重篤な肝障害を引き起こし死者も出したことから、市場からの撤退を余儀なくされた。このように非常に低い確率で生じる重篤な副作用は、臨床試験のみから予測することは極めて難しく、メカニズムを解析することが重要である。トログリタゾンによる肝障害には複数の機構が挙げられているが、そ

の一つに BSEP 阻害を介した胆汁うっ滞誘発機構が提唱された (Funk et al., 2001)。

3) 薬物誘発性胆汁うっ滞～BSEP と MDR3 の関与～

一方、薬物誘発性肝障害は中毒性および特異体質性（アレルギー性・非アレルギー性）という分類以外に、肝障害マーカーである γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP)、alkaline phosphatase (ALP)、ビリルビンの上昇が観察される胆汁うっ滞型、alanine aminotransferase (ALT) と aspartate aminotransferase (AST) の上昇で特徴付けられる肝細胞障害型、および両者の混合型という分類がなされる (Takikawa, 2005)。図 B のように、PFIC の症状との類似性から、薬物誘発性胆汁うっ滞の原因として BSEP および MDR3 の阻害の可能性が考えられる。BSEP の阻害を介した薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズムは、BSEP および胆汁酸の肝取り込みトランスポーターである Na^+ /taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) の共発現細胞や細胞膜小胞 (ベシクル) を用いた *in vitro* 阻害実験の結果から提唱されてきた (Fattinger et al., 2001; Funk et al., 2001; Stieger et al., 2000)。しかしながら、多くの例では臨床で実際に到達し得る薬物濃度よりも高濃度で BSEP に対する阻害作用が検討されており、MDR3 の阻害については検討されてこなかった。また、薬物誘発性胆汁うっ滞および MDR3 機能低下による PFIC3 の病態では共通して γ -GTP の上昇が見られるのに対して、BSEP 機能低下による PFIC2 では見られないことから、薬物誘発性胆汁うっ滞における MDR3 の関与が示唆されてきた。

4) イトラコナゾールもしくはチクロピジンによるリン脂質胆汁分泌の低下を伴う薬物誘発性胆汁うっ滞

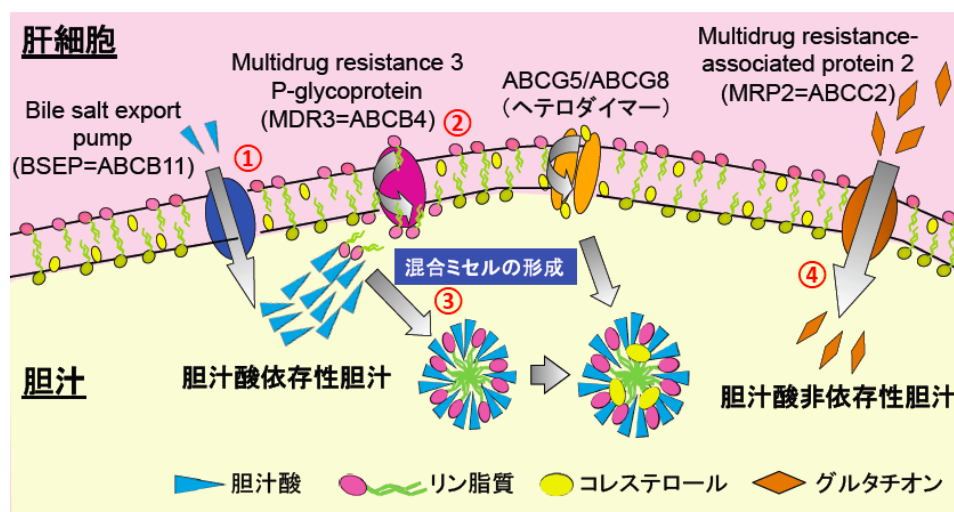
本論文では、はじめに、臨床において薬物誘発性胆汁うっ滞の症例が報告されていた抗真菌薬イトラコナゾール (ITZ) (Gallardo-Quesada et al., 1995; Hann et al., 1993; Lavrijsen et al., 1992; Srebrnik et al., 2005) に着目した。米国 FDA によると、ITZ の使用によると思われる少なくとも 24 症例 (11 人の死亡例を含む) が報告さ

れている (Song and Deresinski, 2005)。東京大学医学部附属病院においても、ITZ が起因薬とされる DILI の 3 症例が見出されるとともに、これらのうち 2 症例では ITZ の血漿中濃度が日本人における平均的な値 (Yamaguchi et al., 2006) に比べて顕著に上昇していた (Yoshikado et al., 2011)。これらの ITZ 血漿中濃度と同等になるように ITZ をラットに投与したところ、リン脂質の胆汁分泌が顕著に低下していたことから、ITZ が MDR3 を阻害する仮説を立てて *in vitro* で検討を行った。MDR3 はリン脂質の中でも特にホスファチジルコリン (PC) を基質とし、細胞膜の内側から外側へと PC を移行させる役割を担うことから (Smit et al., 1993; van Helvoort et al., 1996)、新たに構築した MDR3 発現細胞に PC のアクセプターとなるタウロコール酸を添加することで機能評価系とし、ITZ の濃度依存的な阻害メカニズムを明らかとした。

一方、抗血小板薬チクロピジン (TIC) も深刻な胆汁うっ滞型肝障害を引き起こし得ることが知られていた (Alberti and Alberti-Flor, 2002; Greany et al., 1993; Grimm and Litynski, 1994; Iqbal et al., 1998; Mambelli et al., 2007)。本邦においても、TIC は胆汁うっ滞型肝障害の頻度および症例が多いことが、厚生労働省の発行する「重篤副作用疾患別対応マニュアル薬物性肝障害」の情報より明らかとなった。TIC をラットに投与したところ、リン脂質の胆汁分泌が顕著に低下していたが、ITZ の場合とは異なり MDR3 に対する直接的な阻害は考えられず、胆汁中に過剰に排泄された TIC 代謝物によって胆汁組成が変化し、胆汁中リン脂質の低下を引き起こすメカニズムを示した (Yoshikado et al., 2013)。

図 A 胆汁形成の模式図

<胆汁形成のメカニズム(正常時)>



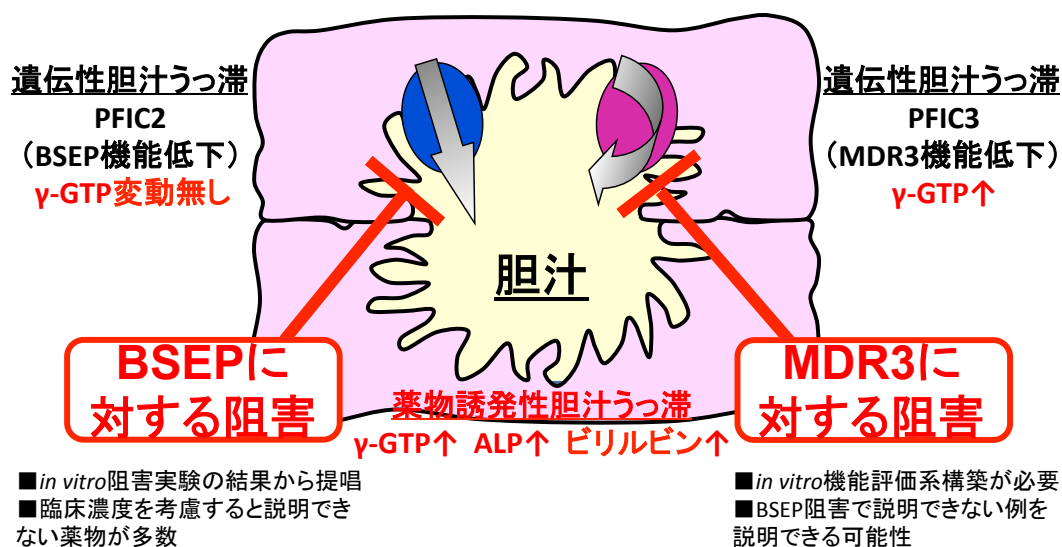
- ① BSEPによる胆汁酸の胆汁分泌
- ② MDR3によるリン脂質、ABCG5/ABCG8によるコレステロールの胆管側膜への移行(translocation)
- ③ 胆汁酸によるリン脂質・コレステロールの胆管側膜からの引き抜き→混合ミセルの形成(リン脂質は遊離胆汁酸から細胞膜保護)
- ④ MRP2によるグルタチオン・グルタチオン抱合体等の胆汁分泌(胆汁酸非依存性胆汁の牽引)

<病態時>

- BSEPの機能低下→ 肝臓内に胆汁酸が蓄積し、肝細胞を障害
- MDR3の機能低下→ 胆汁中リン脂質の減少により、胆汁ミセル形成のバランスが崩れ、遊離胆汁酸の増加が胆管側膜の破壊を誘発

➡ 遺伝性胆汁うっ滞、薬物誘発性胆汁うっ滞への関与

図B 遺伝性胆汁うっ滞（PFIC）と薬物誘発性胆汁うっ滞



< 遺伝性胆汁うっ滞：進行性家族性胆汁うっ滞（PFIC） >

- **BSEP**: 進行性家族性肝内胆汁うっ滞2型（PFIC2）の原因遺伝子
 γ -GTPの上昇は見られない。
- **MDR3**: 進行性家族性肝内胆汁うっ滞3型（PFIC3）の原因遺伝子
 γ -GTPの上昇が見られる。リン脂質と胆汁ミセルを形成できない遊離胆汁酸の増加が胆管側膜を障害し、 γ -GTPを遊離させる。

< 薬物誘発性胆汁うっ滞 >

- 薬物誘発性肝障害（DILI）のうち、胆汁うっ滞型肝障害
→ γ -GTP, ALP, ビリルビンの上昇により特徴付けられる。
- 薬物誘発性胆汁うっ滞の原因としてのトランスポーター阻害
→ BSEP阻害を介したメカニズムは *in vitro*阻害実験の結果から提唱されたが、臨床濃度を考慮すると説明できない薬物が多数あった。
→ MDR3阻害を介したメカニズムを示した例は無く、*in vitro*機能評価系の構築が切望されていた。

第一章

MDR3/ABCB4の阻害を介した胆汁中リン脂質の低下による

イトラコナゾール誘発性胆汁うっ滞機構の解析

【概要】

胆汁形成に不可欠な胆汁酸とリン脂質の分泌は BSEP と MDR3 が担っており、これらの遺伝的な機能低下は深刻な胆汁うっ滞を引き起こす。本研究では、血漿中のイトラコナゾール(ITZ)濃度が著しく増加するとともに、肝機能検査値(LFTs)の悪化が見られたことから、ITZ 誘発性胆汁うっ滞とされた2人の患者を見出した。*In vivo*においてITZが胆汁形成に与える影響を明らかにするために、ITZをラットに投与し胆汁中への胆汁酸とリン脂質の分泌を評価したところ、胆汁酸に比べてリン脂質の方がより顕著に減少していた。さらに、組換えアデノウイルスによりMDR3を発現させたLLC-PK1細胞を用いたMDR3機能評価系において、MDR3による $[^{14}\text{C}]$ ホスファチジルコリンの細胞外への排出は、ITZ存在下で顕著に阻害された。対照的に、BSEPによる $[^3\text{H}]$ タウロコール酸の輸送は、ITZ存在下では顕著に阻害されず、これは*in vivo*における観察と対応する結果であった。本研究の結果、MDR3によるリン脂質分泌の阻害を介したITZ誘発性胆汁うっ滞のメカニズムが提唱された。MDR3機能評価系を用いたアプローチは、薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズムを明らかにするとともに、臨床で用いられる薬剤および創薬における新薬候補の副作用を評価する上で有用と考えられた。

本研究内容は下記の原著論文に掲載済である。

Yoshikado T, Takada T, Yamamoto T, Yamaji H, Ito K, Santa T, Yokota H, Yatomi Y, Yoshida H, Goto J, Tsuji S, Suzuki H (2011) Itraconazole-induced cholestasis: involvement of the inhibition of bile canalicular phospholipid translocator MDR3/ABCB4. *Mol Pharmacol.* 79:241-50.

【方法】

1) 試薬類

イトリゾール注[®]は Janssen Pharmaceutical K.K. (Tokyo, Japan) から購入した。
[¹⁴C]-コリン (55 mCi/mmol) は American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, MO) から、[³H]-タウロコール酸 (4.6 Ci/mmol) は PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA) から購入した。LLC-PK1 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入し、Medium 199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) に 10% ウシ胎児血清 (GIBCO, Tokyo, Japan) と 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加して用い 37°C、5% CO₂ の条件で培養した。その他全ての試薬は市販の試薬グレードを購入した。

2) 患者情報

本臨床研究は、ヘルシンキ宣言の趣旨に基づき、東京大学の倫理審査委員会の承認後に実施された。2007年の10月から2008年の10月にかけて、東京大学医学部附属病院においてインフォームドコンセントを取った入院患者のうち、24人がDILIと診断された。これらの患者において、他の一般的な肝障害の原因（肝臓癌、ウイルス性肝炎、胆石および原発性胆汁性肝硬変）は除外された。その中で、67歳の女性(Patient 1)、43歳の男性(Patient 2)、36歳の女性(Patient 3)はITZ（イトリゾール内用液 200 mg/day）の投与期間中にLFTsの悪化が見られ、投与中止後に正常値に戻った。本研究では、日々の臨床検査で残余した血漿サンプルを用いて血漿中 ITZ 濃度を測定した。これらの患者のゲノムサンプルを用いた DNA マイクロアレイ解析は、DMET Plus Premier Pack (Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いてプロトコルに従い実施した。

3) 血漿中 ITZ 濃度の測定

血漿中 ITZ 濃度を測定するために、血漿サンプルに5倍量のメタノールを加え

て混和し、20,000-g で 15 min 遠心した。得られた上清を、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) に基づき、ACQUITY UPLC-Quattro Premier XE (Waters Corporation, Milford, MA)を用いたシステム(UPLC-MS/MS) による定量に供した。カラムとしては Waters UPLC BEH C18 Shield (3 μ m; 2 \cdot 100 mm) を用い、LC は移動相 A に 0.1% ギ酸水溶液と移動相 B に 0.1% ギ酸アセトニトリルを用いてグラジエント条件 (0.3 mL/min; 0-1.0 min 95:5 v/v, 1.0-7.0 min 95:5 v/v to 5:95 v/v, 7.0-9.0 min 5:95 v/v to 95:5 v/v, 9.0-10.0 min 95:5 v/v) のもとで実施した。ITZ の定量は、エレクトロスプレー陽イオン化 (ESI+) による多重反応モニタリング (MRM) モードにより行い (705.14 > 392.30; Cone 60 V, Collision 36 eV)、ロバスタチン (Lovastatin) を内部標準として用いた (405.25 > 173.10, Cone 20 V, Collision 22 eV)。

4) ラットへの ITZ 投与実験

本研究における動物試験は、東京大学動物実験委員会に承認された方法に基づいて実施した。本研究で用いられた全ての動物は、National Institute of Health (NIH) による “Guide for the Care and Use of Laboratory animals” (NIH publication 86-23 revised 1985) に記載のクライテリアに基づき飼育された。

体重 210-250 g の雄 Sprague-Dawley ラット (Japan SLC, Shizuoka, Japan) に標準的な餌と水を与えて飼育した。動物試験のための手術の直前に、ラットに 1.25 g/kg urethane (Sigma Aldrich) を腹腔内投与して全身麻酔をかけた。大腿動脈及び静脈を SP-31 ポリエチレンチューブ (0.5 mm) (Natsume, Tokyo, Japan) でカニキュレーションし、また、胆管を SP-8 (0.2 mm) ポリエチレンチューブ (Natsume) でカニキュレーションした。手術後のラットに、10 mg/mL としたイトリゾール注[®] (0.40 g/mL ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン (HP- β -CD) と 25 μ L/mL プロピレングリコールを含む) を 43 mg/kg でボーラス投与した後、3.3 mg/mL としたイトリゾール注[®] (0.13 g/mL HP- β -CD と 8.3 μ L/mL プロピレングリコール

を含む) を 7.3 mg/kg/hr で 2 hr 静注した (0.5 mL/hr)。その後、30 min おきに胆汁および血液サンプルを採取し、投与終了後の安楽死の後に肝臓サンプルを採取した。さらに、血液サンプルを 1,000-g で 15 min 遠心することで血漿サンプルを回収した。一方、コントロールとしては、ITZ を含まないが HP- β -CD およびプロピレングリコールを同様に投与した SD ラットを用いた。

5) ラットへの ITZ 投与実験における分析手法

ラットにおける血漿中および肝臓中 ITZ 濃度は、UPLC-MS/MS システムを用いて測定した。肝臓サンプルについては、PBS 中でホモジナイズし 20%のホモジネートとしたものを血漿サンプルと同様の方法で LC-MS/MS による定量に供した。また、胆汁成分は、テストワコー 総胆汁酸、テストワコー リン脂質 C、テストワコー 総コレステロール (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) の各キットを用いた酵素反応法により定量を実施した。一方、胆汁サンプルは電子天秤により重量を測定し、比重を 1.0 g/mL と仮定して容積を計算した (Fouassier et al., 2002)。ラットにおける肝障害の評価は、ITZ 投与後 2 hr の血漿サンプルを用いて LFTs (AST, ALT, ALP, γ -GTP および総ビリルビン) を外注により測定 (SRL, Tokyo, Japan) することで行った。また、非特異的な肝障害の有無を判断するために、ITZ 投与後 2 hr の肝臓サンプルを用いて肝臓中アデノシン三リン酸 (ATP) レベルを市販のキットにより測定した (Tissue ATP Assay Kit, TOYO INK, Tokyo, Japan)。血漿サンプルの胆汁酸濃度は、胆汁サンプルの場合と同様に測定した。

6) 組換えアデノウイルスの構築

ヒト MDR3 の相補的 DNA (cDNA) クローニングは、我々の過去の報告に基づいて行った (Ikebuchi et al., 2009)。また、ヒト BSEP については、コード領域の 3 つの断片 (1-151 nt, 152-2,151 nt および 2,152-3,969 nt) を HepG2 のトータル RNA より増幅し、overlapping PCR 法によって繋げて full-length の BSEP 配列を得た後、

pEGFP-N1 ベクター (Clontech/Takara-Bio, Mountain View, CA) の Hind III / Kpn I サイトにクローニングを行った。一方、ヒトの Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP/SLC10A1) については、HepG2 のトータル RNA より増幅して full-length の NTCP 配列を得た後、pcDNA3.1/mycHis ベクター (Invitrogen, Carlsbad, CA) の Kpn I / Xba I サイトにクローニングを行った。

これらの方法により得られた cDNA は、続いて組換えアデノウイルスを用いた発現系を得るために、Adeno-X Tet-Off Expression System 1 Kit (Clontech/Takara-Bio) における pTRE-Shuttle2 ベクター (MDR3 の cDNA は Nhe I / EcoRV サイト、BSEP-EGFP は Nhe I / Not I サイト、NTCP-mycHis は Sac II / Nhe I サイト) にサブクローニングし、組換えアデノウイルス体を得た (Ad-MDR3, Ad-BSEP-EGFP および Ad-NTCP-mycHis)。また、モック感染用として、enhanced green fluorescence protein (EGFP) の配列を有する組換えアデノウイルスを作成した (Ad-EGFP)。Adeno-X Tet-Off Expression System においてターゲット蛋白質の発現に必要な Tet-regulatory アデノウイルス (Ad-Tet) はキットのものを用いた。以上のアデノウイルス体を HEK293 細胞に別々に感染させることで増幅させ、細胞を回収した後塩化セシウム (CsCl) を用いた密度勾配遠心法により精製した。ウイルスのタイターは Adeno-X Rapid Titer Kit (Clontech/Takara-Bio) を用いて測定し、各アデノウイルスについて multiplicity of infection (MOI) を最適化後に下記の *in vitro* 実験 (輸送実験、ウエスタンブロット、免疫細胞染色) を実施した。

7) MDR3 による PC 輸送の解析

LLC-PK1 細胞を 12-well plates (BD FALCON, Bedford, MA) に細胞密度 1.6×10^5 cells/well で播種し、48 hr 後に 5 MOI の Ad-MDR3 および 10 MOI の Ad-Tet に感染させて MDR3 発現細胞を作製した (LLC-MDR3)。モック細胞は、Ad-MDR3 を Ad-EGFP に置き換えることで作成した (LLC-EGFP)。さらに 24 hr 後に、それぞれのウェルを Krebs-Henseleit (KH) バッファー (118 mM NaCl, 23.8 mM NaHCO₃, 4.83

mM KCl, 0.96 mM KH₂PO₄, 1.20 mM MgSO₄, 12.5 mM HEPES, 5.0 mM glucose, 1.53 mM CaCl₂, pH 7.4) で洗い、[¹⁴C]-コリンと薬物 (ITZ もしくは MDR3 阻害剤であるベラパミル) を含む KH バッファーに置換して 37°C で 3 hr プレインキュベーションした (5% CO₂)。続いて KH バッファーで 2 回洗った後、リン脂質のアクセプターとして 3 mM タウロコール酸と、薬物 (ITZ もしくはベラパミル) を加えて 3 hr インキュベーションした。インキュベーション後のバッファーをそれぞれのウェルから回収し、凍結乾燥機を用いて凍結乾燥後にクロロホルムで溶解した (メディウムサンプル)。残った細胞を氷冷した KH バッファーで洗い、0.1 M NaOH および 0.1% SDS で細胞溶解した後、0.1 M HCl で中和した。細胞溶解液をそれぞれのウェルから回収し、凍結乾燥後にクロロホルムで溶解した (細胞ライセートサンプル)。

上記のメディウムサンプルおよび細胞ライセートサンプルについて、固相として Silica 60 plate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)、移動相としてクロロホルム : メタノール : 30% アンモニア水 = 65 : 35 : 8 を用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) によりホスファチジルコリン (PC) を分離した。TLC で分離後の RI 非標識 PC の位置は、コリン含有脂質に特異的に反応する Dragendorff 試薬を用いて明らかとした (Wagner et al., 1961)。TLC で分離後の [¹⁴C]-PC は、Cyclone Phosphor Imager (PerkinElmer, Waltham, MA) を用いて分析・定量し、細胞外への PC 排出能を以下の式に基づき計算した。

$$\text{PC 排出能} = \text{細胞外 PC} / (\text{細胞内 PC} + \text{細胞外 PC}) \times 100 (\%)$$

8) BSEP によるタウロコール酸輸送の解析

LLC-PK1 細胞を Transwell membrane inserts in 24-well plates (pore size: 3 μm, BD FALCON) に細胞密度 1.4 × 10⁵ cells/insert で播種し、24 hr 後に 10 MOI の Ad-BSEP-EGFP、10 MOI の Ad-NTCP-mycHis および 20 MOI の Ad-Tet に感染させて BSEP/NTCP 発現細胞を作製した (LLC-BSEP/NTCP)。モック細胞は、

Ad-BSEP-EGFP を Ad-EGFP に置き換えることで作成した (LLC-EGFP/NTCP)。さらに 48 hr 後に、それぞれのウェルの apical 側および basal 側を KH バッファーで洗い、ITZ を含む KH バッファーに置換して 37°C で 3 hr プレインキュベーションした (5% CO₂)。続いて、basal 側のみ [³H]-タウロコール酸と ITZ を含む KH バッファーで置換した。3 hr 後に apical 側からバッファーを採取し、Tri-Carb Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer) を用いて放射活性を測定した。実験終了後に、KH バッファーで二回洗い、0.1 M NaOH および 0.1% SDS で細胞溶解した後、0.1 M HCl で中和した。細胞溶解液の放射活性も同様に測定し、細胞の蛋白質量は Lowry 法を用いて測定した (Lowry et al., 1951)。

経細胞輸送の速度論パラメータは、以前の報告に基づき計算した (Mita et al., 2005)。本解析において、apical 側へのタウロコール酸の排出速度 (V_{apical} , pmol/hr/mg protein) を実験的に求めた。その後、basal 側から apical 側へのタウロコール酸の経細胞輸送クリアランス ($PS_{\text{b-a}}$, $\mu\text{L/hr/mg protein}$) は、 V_{apical} を basal 側のタウロコール酸濃度 (C_{med} , pmol/ μL) で除することで求めた。さらに、apical 側の細胞膜を介したタウロコール酸の排出クリアランス (PS_{apical} , $\mu\text{L/hr/mg protein}$) は、 V_{apical} を細胞内のタウロコール酸濃度 (C_{cell} , pmol/ μL) で除することで求めた。 C_{cell} については、細胞容積を 4 $\mu\text{L/mg protein}$ と仮定することで求めた (Mita et al., 2006)。

9) ウェスタンブロット

LLC-PK1 細胞を 60-mm dishes (BD FALCON) に細胞密度 1.0×10^6 cells/dish で播種し、上記 7) および 8) の各輸送実験の項で記載したのと同じ条件で組換えアデノウイルスを感染させた。これらの細胞より粗精製細胞膜分画を作成し、Lowry 法を用いて蛋白質量を測定した (Lowry et al., 1951)。粗精製細胞膜分画 (15 $\mu\text{g/lane}$) を、7% (MDR3 および BSEP-EGFP) もしくは 10% (NTCP-mycHis) の SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いてサイズ分離後に、Immobilon (Millipore, Billerica,

MA) メンブレンに転写した。蛋白質の分子量は、PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, Burlington, Canada) を用いて分析した。3% ウシ血清アルブミンでブロッキングした後に、一次抗体、すなわち MDR3 に対する mouse P3II26 antibody (MONOSAN, Uden, the Netherlands)、BSEP-EGFP に対する mouse anti-GFP antibody (Sigma-Aldrich)、NTCP-mycHis に対する mouse anti-c-myc antibody (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) で免疫ブロットを行った。続いて、二次抗体として anti-mouse IgG antibody labeled with horseradish peroxidase (GE Healthcare, Piscataway, NJ) を用いて免疫ブロットを行った。これらの免疫ブロット済のメンブレンを ECL Plus (GE Healthcare) で処理した後に、化学発光を Chemidoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) を用いて検出した。

10) 免疫細胞染色

LLC-PK1 細胞を 35-mm glass dishes (IWAKI, Chiba, Japan) に細胞密度 4.0×10^5 cells/dish で播種し、上記 7) および 8) の各輸送実験の項で記載した条件で組換えアデノウイルスを感染させた。LLC-MDR3 を 100% メタノールで固定した後に、一次抗体として anti-MDR3 antibody、二次抗体として anti-mouse IgG antibody labeled with Alexa Fluor 488 (Invitrogen) を用いて免疫染色した。LLC-BSEP/NTCP も同様に固定した後に、一次抗体として anti-c-myc antibody、二次抗体として anti-mouse IgG antibody labeled with Alexa Fluor 543 (Invitrogen) を用いて免疫染色した。それぞれのサンプルにおいて、核染色は TO-PRO-3 (Invitrogen)を用いて行い、FV1000 共焦点顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

【結果】

1. 血漿中 ITZ 濃度の上昇は LFTs の異常に關与する

Patient 1, 2 および 3 においては、(1) ITZ の投与期間中に LFTs の悪化が見られ ITZ の投与停止後に回復したこと、(2) 他の一般的な肝障害の可能性が除外されたことから、ITZ が薬物誘発性肝障害の起因薬と考えられた。さらに、Patient 1 および 2 においては、血漿中 ITZ 濃度が顕著に高く、肝毒性のリスクを増加させたと考えられた。Patient 1, 2 および 3 は、それぞれ ITZ 投与開始から 62 日、20 日および 2 日後に ITZ 誘発性肝障害を発症したが (Table 1-1)、過去の報告においても ITZ 投与後に LFTs が上昇するまでの日数は数日から数週間のばらつきがある (Gallardo-Quesada et al., 1995; Hann et al., 1993; Lavrijsen et al., 1992; Srebrnik et al., 2005)。本研究では、Patient 1 および 2 における Day 0 を ITZ 投与が開始された日と定義した。一方、Patient 3 においては、Day 0 を血漿サンプルが入手可能だった最初の日と定義し、ITZ 投与は Day 23 に開始された。また、併用薬のリストを Table 1-1 に示すが、これらと ITZ との薬物間相互作用は報告されていなかった。

Patient 1 においては、Day 70 に LFTs の上昇 (ALT 81 IU/L, AST 70 IU/L, ALP 312 IU/L, γ -GTP 80 IU/L, 総ビリルビン 0.8 mg/dL) が見られた (Figure 1-1, A-C)。Day 72 に、ITZ と他の薬物 (フロセミド、スピロノラクトン、ジメチルクロルテトラサイクリン) の投与が中止され、LFTs は正常値に戻っていった。治療上の必要性から、Day 86 から ITZ の投与が再開されたが、再び LFTs の上昇が観察された。Day 61 には血漿中 ITZ 濃度がトラフ値として $1.7 \mu\text{M}$ (1,238 ng/mL) に到達しており (Figure 1-1D)、同じ投与量を日本人のポピュレーションに投与した場合の平均的なトラフ値に比べて約 2.5 倍高かった (Yamaguchi et al., 2006)。血漿中 ITZ 濃度のピークと LFTs 上昇のピークは同じタイミング (Day 70) で観察されたことから、ITZ 濃度上昇が肝障害を誘発した可能性と、肝障害が ITZ 濃度上昇の原因となった可能性が考えられた。Day 86 からの ITZ 投与の再開により、血漿中 ITZ 濃度は再度上昇し、Day 110 には $3.0 \mu\text{M}$ (2,131 ng/mL) に到達した。

続いて、Patient 2 においては、LFTs の上昇は ITZ および併用薬であるファモチジンの投与開始から三週間後に観察された。Day 25 にこれらの投薬が中止されたにも関わらず、LFTs の上昇は継続し、Day 34 には ALT 874 IU/L, AST 432 IU/L, ALP 539 IU/L, γ -GTP 356 IU/L および総ビリルビン 1.4 mg/dL に到達したが、その後次第に正常値へと戻った (Figure 1-1, E-G)。血漿中 ITZ 濃度の上昇は LFTs の上昇より前に明らかに観察されており (Figure 1-1, E-G)、Day 20 にはトラフ濃度として $2.0 \mu\text{M}$ (1,365 ng/mL) に到達したが (Figure 1-1H)、これは同じ投与量を日本人のポピュレーションに投与した場合の平均的なトラフ値に比べて 2.7 倍高かった (Yamaguchi et al., 2006)。これらの結果から、Patient 2 においても ITZ 濃度の上昇が肝障害のきっかけとなったことが示唆された。対照的に、血漿中のファモチジン濃度は Day 25 において正常な範囲 (トラフ濃度として 10 ng/mL 未満) であったことから、肝障害との関連性は低いと考えられた。

さらに、Patient 3 においては、ITZ 投与期間中に LFTs の悪化が見られたことと ITZ 投与の中止後に正常値に戻っていったことから、ITZ が肝障害の起因薬として疑われたにも関わらず、血漿中 ITZ 濃度は一般的な治療濃度に比べて低かった。一方、他の併用薬については継続的に投与されており LFTs の動きと対応していなかったため、肝障害の起因薬とは考えられなかった。この患者においては、ITZ の投与前に、ブロチゾラムによる肝障害が誘発されており、LFTs 悪化の一度目のピークはブロチゾラム投与開始から二日後の Day 7 に観察されていた (ALT 269 IU/L, AST 153 IU/L, ALP 178 IU/L, γ -GTP 126 IU/L および総ビリルビン 4.3 mg/dL) (Figure 1-1, I-K)。そして、Day 9 にはブロチゾラム投与が中止され、結果として Day 17 には LFTs は正常値へと戻った。しかしながら Day 23 に ITZ 投与が開始されると、LFTs の上昇が再度見られるようになり、Day 35 には ALT 172 IU/L, AST 135 IU/L, ALP 343 IU/L, γ -GTP 524 IU/L および総ビリルビン 8.6 mg/dL に達した。測定された最大の血漿中 ITZ 濃度 (トラフ値) は $0.069 \mu\text{M}$ (48.9 ng/mL) であり (Figure 1-1L)、Patient 1 および 2 に比べるとはるかに低かった。従って、ITZ

投与前に起こったブロチゾラム誘発性肝障害が、ITZ の肝毒性に対する感受性を増強させた可能性が考えられた。

2. 胆汁流量および胆汁酸とリン脂質の胆汁分泌にもたらす ITZ の作用

ITZ は胆汁うっ滞性の肝障害を誘発することが知られており (Gallardo-Quesada et al., 1995; Hann et al., 1993; Lavrijsen et al., 1992; Srebrnik et al., 2005)、本研究においても、ALP, γ -GTP および直接ビリルビン (グルクロン酸抱合型ビリルビン) の上昇を伴う ITZ 誘発性胆汁うっ滞が示唆された (Figure 1-1)。 *in vivo* 実験により ITZ の作用を検討するために、血漿中 ITZ 濃度が $11 \mu\text{M}$ となるように投与したラットにおいて胆汁中脂質の分泌を検討した。この濃度は、Patient 1 および 2 における最大の血漿中濃度に対応している。すなわち、ITZ の一日一回投与で最大濃度 (C_{max}) はトラフ濃度の 3 から 4 倍になることが知られており (Yamaguchi et al., 2006)、Patient 1 および 2 において C_{max} は $11 \mu\text{M}$ 程度になると予想されたことから、同程度の濃度となるようにラットへの投与を行った。

ITZ 投与ラットを用いた *in vivo* 実験の結果から、胆汁流量は ITZ 投与開始から 30 分後に顕著に減少しており (ITZ 投与ラット vs. コントロールラット = $55.1 \pm 7.4\%$ vs. $81.2 \pm 5.4\%$ 、投与開始時との比較)、この減少は 2 hr の静注で持続した (Figure 1-2A)。同時に、リン脂質の分泌速度が ITZ 投与開始から 30 min 後に 50% 程度まで顕著に低下しており (ITZ 投与ラット vs. コントロールラット = $49.9 \pm 8.3\%$ vs. $102.8 \pm 3.2\%$)、胆汁酸の胆汁中分泌速度は 60%程度まで低下していたが (ITZ 投与ラット vs. コントロールラット = $60.6 \pm 14.8\%$ vs. $85.5 \pm 10.0\%$)、コレステロールの分泌速度も 45%程度まで顕著に低下していた (ITZ 投与ラット vs. コントロールラット = $44.8 \pm 8.2\%$ vs. $96.8 \pm 5.4\%$) (Figure 1-2, B-D)。これらの胆汁分泌機能の低下が、ITZ による急性肝障害後の二次的な現象である可能性を除外するために、ITZ 投与ラットにおいて LFTs (AST, ALT, ALP, γ -GTP および総ビリルビン) と肝臓内 ATP レベルを測定したところ、ITZ 投与による変化はいずれも見

られなかった (Supplemental Table S1-1 および Supplemental Figure S1-1)。

胆汁中への胆汁脂質の分泌は、毛細胆管膜上に発現する ABC トランスポーター群が担っていることが知られており、本 *in vivo* 実験の結果は ITZ によるこれらのトランスポーターに対する阻害作用を示唆するものであった。

3. *in vitro* における MDR3 依存性 PC 輸送への ITZ の作用

MDR3 と BSEP の遺伝的な機能低下は PFIC の原因となることが知られていることから、これらトランスポーターの薬物による阻害は胆汁うっ滞の原因となることが考えられる。MDR3 に対する ITZ の作用を明らかにするために、LLC-MDR3 における ITZ 存在下での PC の細胞外排出を解析した。ウエスタンブロットの結果より、MDR3 は分子量 140 kDa の蛋白質として発現しており、これは過去の報告にある成熟型（糖鎖結合型）と一致することが示唆された (Figure 1-3A) (Morita et al., 2007)。加えて、免疫細胞染色の結果は、LLC-PK1 細胞の apical 側に MDR3 が局在することを示すものであり (Figure 1-3B)、生理的な局在である胆管側膜側への発現と対応するものであった。*In vitro* において、MDR3 による PC の細胞外排出には胆汁酸・アルブミン等の脂質アクセプターの存在が必要であることから (Morita et al., 2007; Smith et al., 1994; van Helvoort et al., 1996)、アクセプターとしてタウロコール酸を用いて PC の細胞外排出実験を行った。Figure 1-3C に示されるように、LLC-MDR3 は LLC-EGFP に比べて約 2 倍の PC 排出を示し、MDR3 依存性の排出は MDR3 阻害剤として良く知られる 5 μ M ベラパミルの存在下でほぼ阻害された (Morita et al., 2007; van Helvoort et al., 1996)。さらに、0.04, 0.2, 1 および 5 μ M の ITZ 存在下で阻害作用の有無を検討したところ、0.2 μ M 以上で濃度依存的な MDR3 の阻害が観察された (Figure 1-3C)。このように、*in vitro* で ITZ による MDR3 の阻害が見られた濃度範囲は、*in vivo* 実験 (Figure 1-2) と対応するものである。すなわち、*in vivo* 実験におけるラット肝臓中の ITZ 総濃度 ($119 \pm 14 \mu$ M) に対して過去に報告のあるラット肝臓中の ITZ 非結合形分率 (0.0024)

(Yamano et al., 1999) をかけることにより、ラット肝臓中の ITZ 非結合形濃度は $0.29 \mu\text{M}$ と計算されるから、*in vitro* で MDR3 の阻害が見えた濃度範囲 ($0.2 \mu\text{M}$ ～) と対応していた。

以上の結果をまとめると、*in vitro* における MDR3 の阻害と *in vivo* における胆汁中リン脂質の減少は近い ITZ の濃度範囲で起こったことから、ITZ が MDR3 によるリン脂質の胆汁分泌を阻害することによって胆汁うっ滞型肝障害を誘発する可能性が示唆された。

4. *in vitro* における BSEP 依存性胆汁酸輸送への ITZ の作用

さらに、LLC-BSEP/NTCP を用いて BSEP に対する ITZ の阻害作用の有無を検討した。BSEP-EGFP (約 180 kDa) と、胆汁酸取り込みトランスポーターである NTCP (約 50 kDa) (Boyer et al., 1994) の発現を、ウエスタンブロットにより確認した (Figure 1-4A)。加えて、免疫細胞染色の結果により、BSEP と NTCP がそれぞれ LLC-BSEP/NTCP の apical 側および basal 側に発現していることが確認されたが、これは生理学的な条件と一致するものであった (Figure 1-4B)。タウロコール酸の経細胞輸送に対する ITZ の作用を LLC-BSEP/NTCP において検討する上で、同濃度の ITZ を添加した時に細胞内 ITZ 濃度が LLC-MDR3 と同程度であることを確認しておいた。続いて、basal 側から apical 側へのタウロコール酸の経細胞輸送クリアランス ($\text{PS}_{\text{b-a}}$) は ITZ によって顕著な影響を受けなかった (Figure 1-4C)。タウロコール酸の細胞内濃度 (C_{cell}) と、apical 側細胞膜を介した輸送クリアランス ($\text{PS}_{\text{apical}}$) が $0.04\text{--}5 \mu\text{M}$ の ITZ によって影響を受けなかったことを考えると (Figure 1-4, D-E)、BSEP による排出過程および NTCP による取り込み過程のいずれに対しても ITZ は顕著な阻害作用を持たないことが示された。

以上から、ITZ による MDR3 の阻害が顕著であったのに対して (Figure 1-3C)、BSEP の阻害は見られなかったことから (Figure 1-4E)、*in vivo* において ITZ 投与による胆汁酸分泌の減少よりも顕著な胆汁中リン脂質分泌の減少が生じたことと対

応すると考えられた。

【考察】

本研究では、血漿中 ITZ 濃度が臨床における通常の 3 ～ 4 倍に上昇するとともに ITZ 誘発性胆汁うっ滞型肝障害と診断された 2 人の患者を見出した (Figure 1-1D と H, Patient 1 と Patient 2) (Yamaguchi et al., 2006)。 *in vivo* において胆汁分泌に対する ITZ の作用を検討したところ、胆汁酸よりもリン脂質の胆汁分泌が ITZ 投与ラットにおいて顕著に減少していた (Figure 1-2)。さらに、 *in vitro* のアッセイでは、ITZ は MDR3 による PC 輸送を顕著に阻害したが (Figure 1-3)、 BSEP によるタウロコール酸の輸送に対しては顕著な影響を与えなかった (Figure 1-4)。

過去の報告によると、ITZ 誘発性肝障害は胆汁うっ滞型マーカーである ALP, γ -GTP および総ビリルビンの上昇を伴うことが知られていることから、主要なメカニズムとして胆汁うっ滞が考えられる (Gallardo-Quesada et al., 1995; Hann et al., 1993; Lavrijsen et al., 1992; Srebrnik et al., 2005)。加えて、ITZ 誘発性肝障害の患者より採取した肝臓の生検は、胆汁うっ滞の所見を示すことも報告されている (Adriaenssens et al., 2001)。本研究においても、Patient 1, 2 および 3 において、ITZ 投与期間中に ALP, γ -GTP および総ビリルビンの上昇が見られたことから (Figure 1-1)、ITZ による胆汁うっ滞が肝障害の悪化に寄与したことが推察された。しかしながら、特に Patient 2 においては肝細胞障害型マーカーである ALT および AST も上昇していたことから、胆汁うっ滞のメカニズムだけでなく、肝細胞内で障害が起こるメカニズムも関与することが示唆された。

Patient 1 および 2 における血漿中 ITZ 濃度は、日本人における平均的な血漿中濃度に比べて高かったことから (Yamaguchi et al., 2006)、肝消失の低下が推察された。ITZ は CYP3A4 によって代謝されるものの (Nivoix et al., 2008)、Patient 1 および 2 における併用薬による CYP3A4 の阻害作用は報告されておらず、ITZ と併用薬との代謝経路を介した相互作用は考えにくかった。加えて、胆汁排泄経路を介した相互作用についても、主たる ITZ の消失経路が代謝であることから考えにくく、何らかの遺伝的な要因により血漿中 ITZ 濃度の上昇が生じていたと考えられ

ていた。一方、Patient 3 における血漿中濃度のトラフ値は最大でも 50 ng/mL であり、同じ投与量を日本人のポピュレーションに投与した場合の平均的なトラフ値が約 500 ng/mL であることを考えると (Yamaguchi et al., 2006)、著しく低かった。この原因として、ITZ の体内動態に影響を与える Patient 3 の特異体質、もしくは LC-MS/MS 測定における何らかの問題（血漿に含まれる成分によるイオン化抑制等）が考えられる。

Patient 1, 2 および 3 において、ITZ による胆汁うっ滞のリスクを上昇させる *MDR3* 遺伝子の変異がある可能性を検討するために、各患者の血液から得られたゲノムサンプルを用いて、薬物代謝・トランスポーター遺伝子解析マイクロアレイ (DMET Plus) による解析を行った。この解析によると、アジア人ではマイナーな *MDR3* アリルが Patient 1 および 2 において複数見つかったが (rs2109505, rs2302387, rs4148808 and rs4148805) (Supplemental Table S1-2)、2 つの SNPs はコード領域のサイレント変異であり (rs2109505 および rs2302387)、他は上流域の変異であった (rs4148808 および rs4148805)。これら SNPs の影響を解析した報告は無いが、*MDR3* 蛋白質の発現量低下を介して ITZ による胆汁うっ滞への感受性を上昇させた可能性は考えられる。加えて、ITZ の血中濃度に影響を与える可能性がある *CYP3A4* 遺伝子の SNPs についても検討したが、全ての患者が野生型の *CYP3A4**1/*1 アリルを保有していた。

In vivo において ITZ の作用を検討するために、ラットに ITZ を投与したところ、胆汁酸よりもリン脂質の胆汁分泌が著しく減少した (Figure 1-2)。これらの *in vivo* 実験は Patient 1 および 2 における血漿中 ITZ 濃度と近い条件下で行われており (Figure 1-1)、ITZ 誘発性胆汁うっ滞型肝障害におけるリン脂質胆汁分泌の減少を示唆している。一方、ラットにおける 2 hr の ITZ 投与で LFTs (AST, ALT, ALP, γ -GTP および総ビリルビン) の上昇は見られなかったことから (Supplemental Table S1-1)、このような短時間の暴露では肝障害は生じていなかったと考えられる。Somchit らは、ラットに ITZ を反復投与すると LFTs の上昇および臨床所見の

変化（肝細胞のネクロシス、小房周囲および中間帯肝細胞の変性、胆管過形成、胆管硬変および巨細胞肉芽腫）が見られるが、ITZ の単回投与では見られないことを報告している (Somchit et al., 2004)。このことから、ITZ による MDR3 阻害が長時間起こることによる胆汁中リン脂質分泌の慢性的な減少が、肝障害を誘発する可能性が考えられる。

MDR3 によるリン脂質分泌に対する ITZ の阻害作用を明らかにするために、MDR3 発現細胞(LLC-MDR3)を用いた *in vitro* 実験を行ったところ (Figure 1-3C)、ITZ は $0.2 \mu\text{M}$ という低濃度で MDR3 による PC 排出を阻害したが、これは我々の *in vivo* 実験における肝臓内の非結合形 ITZ 濃度と近いものであった ($0.29 \mu\text{M}$, 計算過程は Results を参照のこと)。対照的に、*in vitro* において BSEP によるタウロコール酸輸送に対する ITZ の有意な阻害作用は見出されなかった (Figure 1-4E)。以上をまとめると、我々の *in vitro* データから、ITZ による MDR3 の阻害は BSEP の阻害よりも低濃度側で生じており、MDR3 の阻害を介したリン脂質胆汁分泌の低下が胆汁うっ滞の原因となる新規メカニズムが示唆された。

以上のように、ITZ 誘発性胆汁うっ滞型肝障害の臨床報告、*in vivo* におけるラット胆汁分泌の解析および *in vitro* におけるトランスポーター阻害の解析から、臨床濃度の ITZ による MDR3 の阻害がリン脂質胆汁分泌の低下をもたらし、胆管側膜の障害をもって胆汁うっ滞の誘発に関与することが示唆された。Patient 1 および 2 における LFTs の上昇は ITZ を投与開始して数週間経過後に観察されたが、このような遅延は、MDR3 阻害による胆管側膜の障害が長時間蓄積することによって肝障害を引き起こす一つの要因として働いたことによると考えられる。このような胆管側膜の直接的な障害に加えて、細胞ストレスや免疫システムの活性化 (Gunawan and Kaplowitz, 2007) も肝障害誘発の要因として働いていると考えられる。

MDR3 と BSEP は胆汁形成過程において重要な役割を担っているため、これらトランスポーターの阻害は ITZ のみならず、他の薬物による胆汁うっ滞にも関与

する可能性がある。現在までに、胆汁うっ滞性薬物による MDR3 の阻害については報告が無かったが、BSEP の阻害については多くの報告がなされている。具体例を挙げると、重篤な肝障害の副作用により市場から撤退したトログリタゾンは、ラットにおいて胆汁うっ滞を引き起こし、ラット肝臓内濃度に相当する濃度で *in vitro* においては親化合物と硫酸抱合体代謝物が Bsep を阻害することが報告されている (Funk et al., 2001)。さらに、シクロスポリン、リファンピシン、グリベク、クラミド、クロルプロマジンはいずれも胆汁うっ滞を引き起こしうる薬物として知られ、*in vitro* において BSEP に対する阻害作用を有することが報告されている (Byrne et al., 2002; Horikawa et al., 2003; Stieger et al., 2000; Wang et al., 2003)、報告されている K_i 値や IC_{50} 値は *in vivo* の条件に比べてずっと高いことから乖離がある。従って、これらの薬物が BSEP に対する K_i 値および IC_{50} 値よりも低濃度側で、MDR3 に対する阻害作用を示す可能性がある。実際に、胆汁うっ滞型肝障害マーカーである γ -GTP は、MDR3 機能低下による遺伝性胆汁うっ滞 PFIC3 では上昇するが、BSEP 機能低下による PFIC2 では上昇しないことから (Oude Elferink et al., 2006)、臨床で多く見られる γ -GTP が上昇するタイプの胆汁うっ滞においては MDR3 阻害によるメカニズムを考慮すべきと考えられる。

ABC トランスポーターファミリーの一つである MDR3/ABCB4 は MDR1/ABCB1 に対して最も高い相同性を有し、基質特異性も一部重複する (ジゴキシン、パクリタキセル、ビンブラスチン等) ことから (Smith et al., 2000)、MDR1 阻害剤として働く胆汁うっ滞性薬物は MDR3 も阻害しリン脂質胆汁分泌に影響を与える可能性がある。実際に、ITZ は MDR3 同様、MDR1 に対しても阻害剤として働くことが知られている (Gupta et al., 1991; Iida et al., 2001; Takara et al., 1999)。さらに、古いタイプのアルツハイマー病治療薬であるタクリンは高頻度で LFTs を上昇させることで知られるが、タクリンによる肝毒性のリスクは、MDR3 遺伝子の多型を有するヒトにおいて特に高いことが知られることから (Alfirevic et al., 2007)、MDR3 に対する阻害作用が関与する可能性がある。以上のような MDR3 阻害作用

を有する薬物を見出すために、本研究で用いた *in vitro* の MDR3 機能評価系は有用と考えられる。

まとめると、本研究では ITZ による MDR3 の阻害を介したリン脂質胆汁分泌の低下が、ITZ 誘発性胆汁うっ滞型肝障害の一つの要因として寄与することを示した。薬物誘発性胆汁うっ滞を予測する上では、臨床濃度を考慮のもと BSEP 阻害に加えて MDR3 阻害の可能性についても検討がなされるべきであり、本研究で構築した *in vitro* 機能評価系は、臨床で用いられる医薬品および創薬における候補化合物による胆汁うっ滞のリスクを予測する上で有用であると考えられる。

第一章

MDR3/ABCB4 の阻害を介した胆汁中リン脂質の低下による
イトラコナゾール誘発性胆汁うっ滞機構の解析

図表

Table 1-1 東大病院における DILI 患者の ITZ 投与期間と併用薬情報

患者番号	年齢/性別	* ITZの投与期間	* ITZ投与開始から肝障害 マーカー上昇までの日数	併用薬
1	67/F	Day 0-71, 86-110	62 days	furosemide, spironolactone, demethylchlortetracycline
2	43/M	Day 0-24	20 days	famotidine
3	36/F	** Day 23-36	** 2 days	cyclosporin A, omeprazole, zolpidem, sulfamethoxazole/tripethoprim, cefepime, vancomycin, ganciclovir, methylprednisolone

* Figure 1-1も参照のこと。

** ITZの投与前 (Day 5-8)に、Patient 3はBrotizolamを投与され肝障害マーカーの上昇を経験していた。

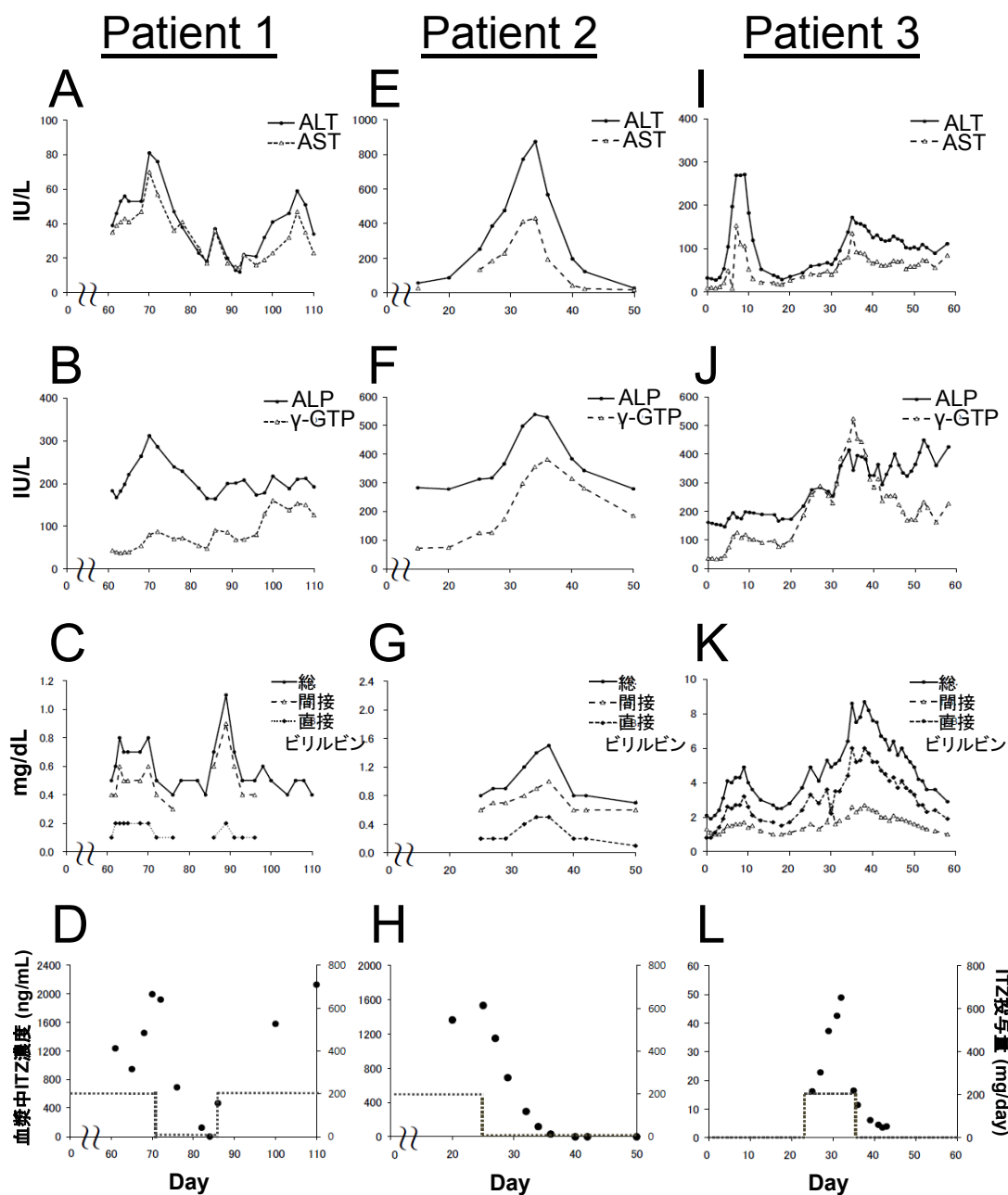


Figure 1-1 DILI 患者における肝障害マーカー（LFTs）と血漿中 ITZ 濃度の時間推移

Patient 1 (A-D), Patient 2 (E-H), Patient 3 (I-L) は ITZ 投与後に LFTs の上昇を呈した。(A), (E), (I), ALT および AST の推移を示す。(B), (F), (J), ALP および γ -GTP の推移を示す。(C), (G), (K), 総ビリルビン (T.B.), 間接ビリルビン (I.B., グルクロン酸非抱合型ビリルビン) および 直接ビリルビン (D.B., グルクロン酸抱合型ビリルビン) の推移を示す。(D), (H), (L), closed symbol は血漿中 ITZ 濃度を、点線は ITZ の一日投与量を示す。

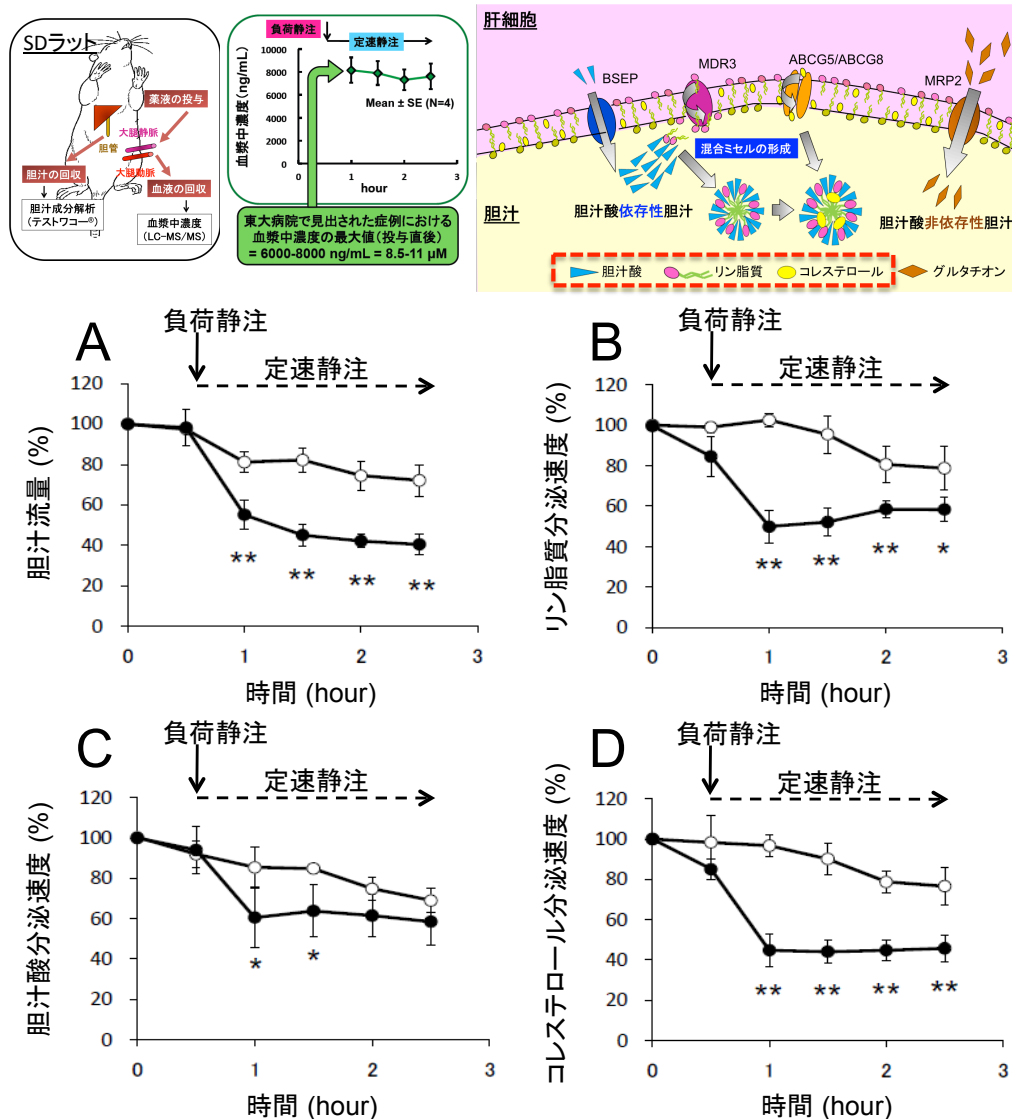


Figure 1-2 ラットにおける胆汁流量および胆汁酸とリン脂質の胆汁分泌に対する ITZ の作用

ラットの ITZ 投与群 (closed symbol) およびコントロール群 (open symbol) において、胆汁流量および胆汁酸・リン脂質・コレステロールの胆汁分泌速度を解析した。それぞれ投与開始 0.5 hr 前 (グラフ上の 0 hr) の値を初期値 (100%) とした。(A) 胆汁流量を示す。初期値は 2.45 ± 0.52 mL/hr/kg。(B) リン脂質の胆汁分泌速度を示す。初期値は 140 ± 52 nmol/min/kg。(C) 胆汁酸の胆汁分泌速度を示す。初期値は 0.62 ± 0.27 mmol/min/kg。(D) コレステロールの胆汁分泌速度を示す。初期値は 12.6 ± 3.9 nmol/min/kg。各データは mean \pm S.D. (N=4) **p < 0.01 and *p < 0.05, significantly different from control by Student's t-test

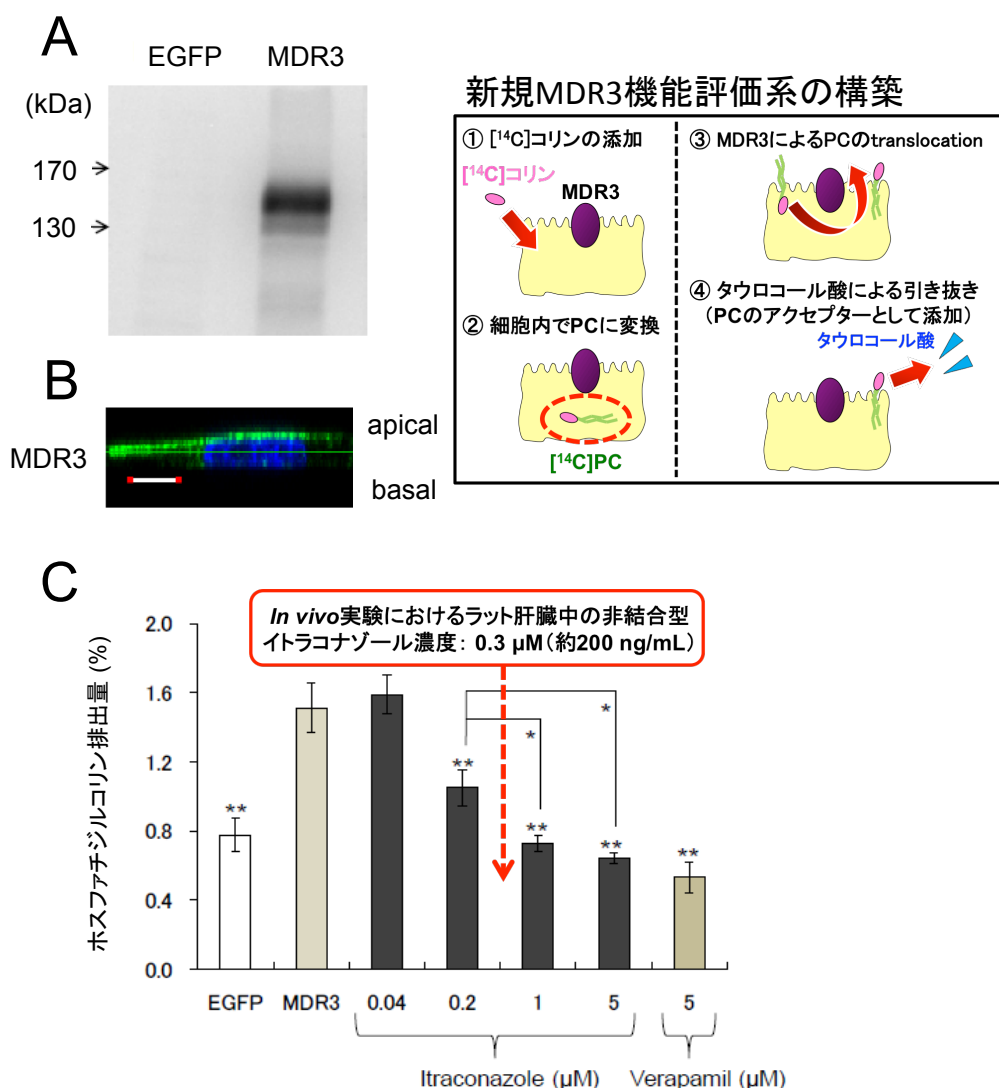


Figure 1-3 MDR3 依存性 PC 輸送に対する ITZ の作用

LLC-MDR3 細胞における MDR3 の発現および局在を確認するとともに、MDR3 依存性 PC 輸送に対する ITZ の作用を検討した。(A) MDR3 蛋白質の発現をウエスタンブロットにより確認した。(B) MDR3 蛋白質の細胞内局在を免疫細胞染色により確認した。Z 軸方向のイメージを示す。緑色および青色は、それぞれ MDR3 および核を示す。Bar = 10 μm (C) LLC-MDR3 細胞による [¹⁴C]-PC の排出を 37°C, 3 hr の条件で検討した。これらの細胞には、表記濃度の ITZ もしくはベラパミルを添加した。各データは mean ± S.E. (n = 6) **p < 0.01, significantly different from non-treated MDR3-expressing cells by ANOVA followed by Dunnett's test. *p < 0.05, significantly different from MDR3-expressing cells treated with 0.2 μM ITZ by ANOVA followed by SNK test.

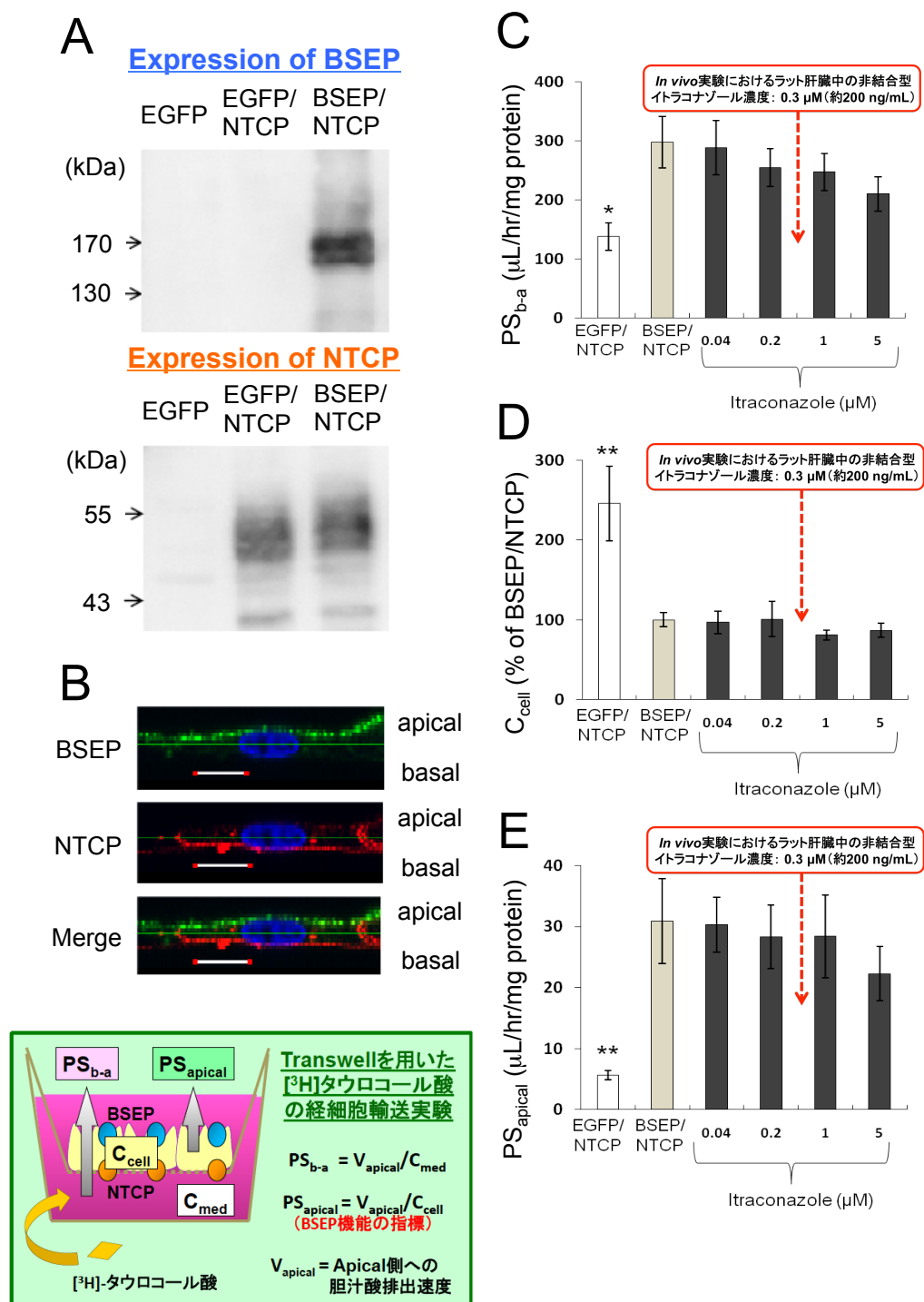


Figure 1-4 BSEP/NTCP による胆汁酸の経細胞輸送に対する ITZ の作用

LLC-BSEP/NTCP 細胞における BSEP/NTCP の発現および局在を確認するとともに、BSEP/NTCP 依存性タウロコール酸輸送に対する ITZ の作用を検討した。(A) BSEP および NTCP 蛋白質の発現をウェスタンブロットにより確認した。(B) BSEP および NTCP 蛋白質の細胞内局在を免疫細胞染色により確認した。Z 軸方向のイメージを示す。緑色、赤色およ

び青色は、それぞれ BSEP, NTCP および核を示す。Bar = 10 μ m (C)-(E) LLC-NTCP 細胞、もしくは LLC-BSEP/NTCP 細胞による [3 H]-タウロコール酸の経細胞輸送を 37°C, 3 hr の条件で検討した。これらの細胞には、表記濃度の ITZ を添加した。basal 側から apical 側への [3 H]-タウロコール酸の経細胞輸送クリアランス (PS_{b-a} , μ L/hr/mg protein) (Panel C), 細胞内濃度 (C_{cell} , pmol/ μ L) (Panel D) および apical 側の細胞膜を介したタウロコール酸の排出クリアランス (PS_{apical} , μ L/hr/mg protein) (Panel E) を示した。各データは mean \pm S.E. (n = 7) **p < 0.01 and *p < 0.05, significantly different from non-treated BSEP/NTCP-expressing cells by ANOVA followed by Dunnett's test.

Supplementary Table S1-1

イトラコナゾール (ITZ) 投与ラットにおける肝障害マーカー (LFTs)

	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	ALP (IU/L)	γ -GTP (IU/L)	Total bilirubin (mg/dL)
control	142 \pm 48	52 \pm 38	686 \pm 59	N.D.	0.043 \pm 0.010
ITZ	129 \pm 7	50 \pm 22	675 \pm 146	N.D.	0.065 \pm 0.017

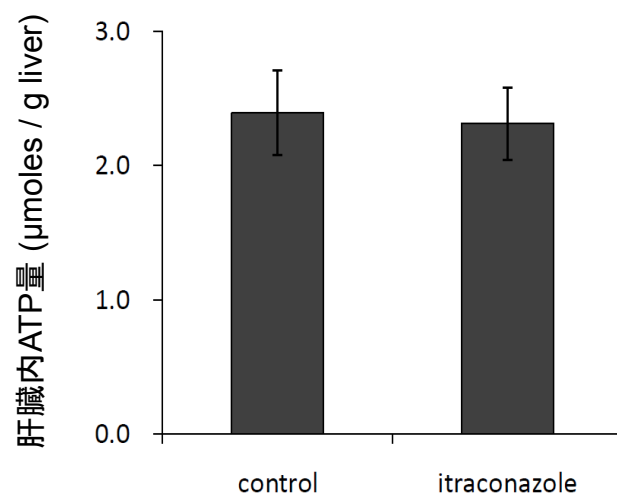
Values are mean \pm SD. N.D.: not detected (< 6IU/L).

Supplementary Table S1-2

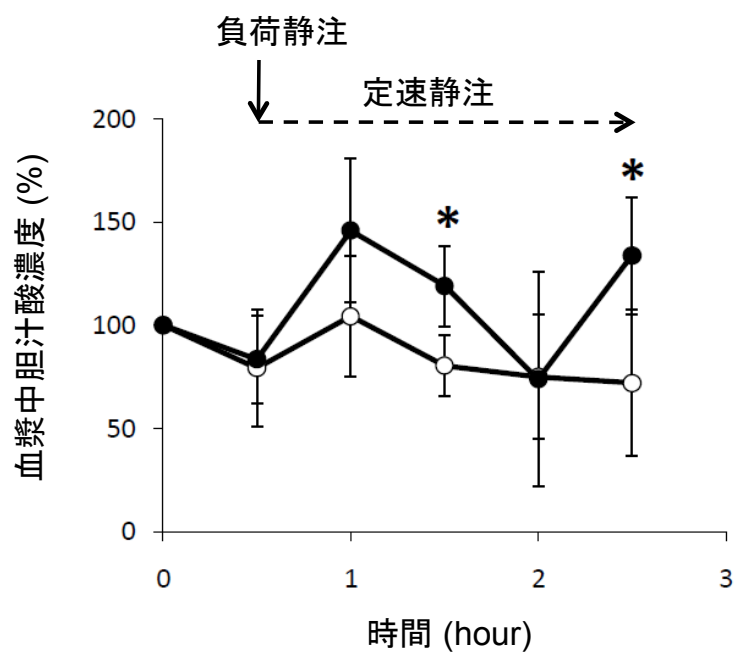
DMET Plus マイクロアレイによる *ABCB4*/*MDR3* 遺伝子のSNPs解析

Probe Set ID	Common Name	dbSNP ID	Allele (* Frequency)	Patient 1	Patient 2	Patient 3
AM_14530	ABCB4_68990G>A(A1107T)	rs31655	A // G (- // 1.000)	G/G	G/G	G/G
AM_14531	ABCB4_67294C>T(N1048N)	rs45549036	C // T (1.000 // -)	C/C	C/C	C/C
AM_14532	ABCB4_67261T>C(N1037N)	rs45508793	C // T	T/T	T/T	T/T
AM_14533	ABCB4_66101A>G(A937A)	rs45574932	G // A (- // 1.000)	A/A	A/A	A/A
AM_14535	ABCB4_58031T>G(G853G)	rs3761810	G // T	T/T	T/T	T/T
AM_14536	ABCB4_55437G>A(R788Q)	rs45595532	G // A (1.000 // -)	G/G	G/G	G/G
AM_14537	ABCB4_55399G>C(T775T)	rs45498393	C // G (- // 1.000)	G/G	G/G	G/G
AM_14539	ABCB4_(HCV33985762)		G // A	G/G	G/G	G/G
AM_14540	ABCB4_48606A>G(R652G)	rs8187799	G // A (0.022 // 0.978)	A/A	A/A	A/A
AM_14542	ABCB4_(hCV32371158)		C // T	C/C	C/C	C/C
AM_14546	ABCB4_35652G>C(E528D)	rs45524431	C // G (- // 1.000)	G/G	G/G	G/G
AM_14552	ABCB4_25377C>G(L238V)	rs45596335	C // G (- // 1.000)	C/C	C/C	C/C
AM_14553	ABCB4_25376A>T(I237I)	rs2109505	A // T (0.700 // 0.300)	A/T	A/T	A/A
AM_14554	ABCB4_23831C>T(A232A)	rs45505600	C // T (0.989 // 0.011)	C/C	NoCall	C/C
AM_14556	ABCB4_22490C>T(N168N)	rs1202283	T // C (0.456 // 0.544)	C/C	NoCall	C/C
AM_14558	ABCB4_(HCV29276095)		C // T	C/C	C/C	C/C
AM_14560	ABCB4_12662G>A(E80E)	rs45592837	A // G (- // 1.000)	G/G	G/G	G/G
AM_14561	ABCB4_12639C>G(L73V)	rs45483595	C // G (1.000 // -)	C/C	C/C	C/C
AM_14562	ABCB4_12597C>T(L59L)	rs2302387	T // C (0.273 // 0.727)	C/T	C/T	C/C
AM_14563	ABCB4_12569C>T(S49S)	rs8187789	C // T (1.000 // -)	C/C	C/C	C/C
AM_14567	ABCB4_-1014>(rs4148808)	rs4148808	G // A (0.229 // 0.771)	A/G	A/G	A/A
AM_14568	ABCB4_-1031>(rs4148807)	rs4148807	C // T (0.771 // 0.229)	C/C	C/C	C/C
AM_14569	ABCB4_-1484>(rs4148806)	rs4148806	C // T (0.042 // 0.958)	T/T	T/T	T/T
AM_14570	ABCB4_-1584>(rs4148805)	rs4148805	C // T (0.771 // 0.229)	C/T	C/T	C/C
AM_14572	ABCB4_-1921>(rs3747806)	rs3747806	C // T (- // 1.000)	T/T	T/T	T/T

* Frequencies in Asian population. Data from Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) in NCBI website.



Supplementary Figure S1-1 ----- イトラコナゾール(ITZ)投与ラットにおける肝臓内ATP量。 ITZ投与群およびコントロール群において、肝臓内ATP量を測定した。各データは mean ± S.D. (N = 4)。



Supplementary Figure S1-2 ----- イトラコナゾール(ITZ)投与ラットにおける血漿中胆汁酸濃度。 ITZ投与群 (closed symbol) および コントロール群 (open symbol) において、血漿中胆汁酸濃度を測定した。投与開始0.5 hr前(グラフ上の0 hr)の値を初期値(100%)とした。各データは mean \pm S.D. (N = 4)。 *p < 0.05, significantly different from control by Student's t-test.

第二章

胆汁中リン脂質の低下を伴うチクロピジン誘発性胆汁うっ滞機構 の解析：胆汁中グルタチオン抱合型チクロピジン代謝物による リン脂質低下作用の関与

【概要】

抗血小板薬チクロピジン(TIC)は胆汁うっ滞型肝障害の原因となり得ることで知られている。本研究において、TIC投与が胆汁形成にもたらす影響を検討したところ、TICを投与した Sprague-Dawley (SD) ラットにおいて胆汁中へのリン脂質分泌は顕著に減少した。しかしながら、SD ラットに cytochrome P-450 (CYP) の非特異的阻害剤である SKF-525A を前投与したところ、TIC 投与による胆汁中リン脂質分泌への影響は観察されなくなった。また、multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/ABCC2) を欠損する Eisai hyperbilirubinemic ラット (EHBR) でも、TIC 投与による胆汁中リン脂質分泌への影響は見られなかった。これらの結果から、肝臓において CYP 依存性代謝を受けた後に MRP2 によって胆汁中へと排泄されているグルタチオン (GSH) 抱合型 TIC 代謝物 (TIC-SGs) が、胆汁組成の変化を引き起こしたと考えられた。また、TIC の投与は SD ラットにおいて顕著な肝障害を引き起こしたが、EHBR では起こさなかった。TIC 投与下において、EHBR とは異なり SD ラットでは胆汁中リン脂質が顕著に減少していたことから、リン脂質による胆管側膜保護作用の有無が肝障害と関連していることが推察された。さらに、*in vitro* において、TIC-SGs は multidrug resistance 3 P-glycoprotein (MDR3/ABCB4) によるホスファチジルコリン輸送を直接阻害しなかったが、*in vivo* においては、TIC 投与 SD ラットで低下していた胆汁中リン脂質が胆汁酸の投与によって回復した。このことから、TIC のみを投与した SD ラットにおいては、TIC-SGs の胆汁排泄により駆動される胆汁酸非依存性胆汁の活性化によって、胆

汁中の胆汁酸濃度が低下し、間接的にリン脂質分泌が低下していたことが示唆された。以上の結果から、過剰に胆汁排泄された TIC-SGs がリン脂質の胆汁分泌を減少させることで、TIC 誘発性胆汁うっ滞型肝障害のリスクを増加させるメカニズムが考えられた。従って、胆汁うっ滞のメカニズムを考える際にはトランスポーターの直接阻害のみならず、薬物・代謝物の胆汁排泄による間接的な影響も考慮する必要があると考えられた。

本研究内容は下記の原著論文に掲載済である。

Yoshikado T, Takada T, Yamamoto H, Tan JK, Ito K, Santa T, Suzuki H (2013) 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.* 83:552-62.

【方法】

1) 試薬類

[¹⁴C]-コリン (55 mCi/mmol) は American Radiolabeled Chemicals Inc. (St. Louis, MO) から購入した。LLC-PK1 細胞と CaCo-2 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA) から購入し、それぞれ Medium 199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) と MEM (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) に 10% ウシ胎児血清 (GIBCO, Tokyo, Japan) と 1% ペニシリン/ストレプトマイシン (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加したものをを用いて 37°C、5% CO₂ の条件で培養した。その他全ての試薬は市販の試薬グレードを購入した。

2) *in vivo* 実験

本研究における動物試験は、東京大学動物実験委員会に承認された方法に基づいて実施した。本研究で用いられた全ての動物は、National Institute of Health (NIH) による “Guide for the Care and Use of Laboratory animals” (NIH publication 86-23 revised 1985) に記載のクライテリアに基づき飼育された。

体重 230-270 g の雄 Sprague-Dawley ラット (Japan SLC, Shizuoka, Japan) と体重 260-300 g の雄 Eisai hyperbilirubinemic ラット (EHBR; Japan SLC) に標準的な餌と水を与えて飼育した。動物試験のための手術の直前に、ラットに 1.25 g/kg urethane (Sigma Aldrich) を腹腔内投与して全身麻酔をかけた。大腿動脈及び静脈を SP-31 ポリエチレンチューブ (0.5 mm) (Natsume, Tokyo, Japan) でカニューレーションし、また、胆管を SP-8 (0.2 mm) ポリエチレンチューブ (Natsume) でカニューレーションした。胆汁形成に対する TIC の作用を検討するために、手術後のラットに、TIC (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を 48 mg/kg でボーラス投与した後、13 mg/kg/hr で 2 hr 静注した (0.5 mL/hr)。

ラットでのシトクロム P-450 (CYP) による TIC の代謝を阻害する実験系において、TIC 投与の 1 hr 前に、CYP の非特異的阻害剤である SKF-525A (Sigma Aldrich)

を 50 mg/kg で腹腔内投与した (Yang et al., 2009)。また、ラットに胆汁酸を負荷する実験系においては、TIC 投与の 1 hr 前からタウロコール酸 (TCA) (Sigma Aldrich) を 65 mg/kg/hr でインフュージョンした。これらの実験系において、TIC, SKF-525A および TCA は生理食塩水 (0.9% NaCl) に溶解した。また、コントロールでは TIC 投与液の代わりに、0.9% NaCl を投与した。

TIC 投与ラットにおいて、胆汁および血液サンプルを 30 min おきに採取した。血漿サンプルは血液サンプルを 1,000-g で 15 min 遠心することで回収した。また、胆汁流量を測定するために、電子天秤により胆汁サンプルの重量を測定し、比重を 1.0 g/mL と仮定して容積を計算した (Fouassier et al., 2002)。さらに、テストワコー 総胆汁酸、テストワコー リン脂質 C (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) の各キットを用いた酵素反応法により、胆汁成分の定量を実施した。胆汁中の GSH 濃度は、以前に報告されている酵素リサイクリング法によって測定を行った (Rahman et al., 2006)。

TIC 投与に伴う肝障害の誘発を検討するために、*in vivo* において薬物誘発性肝障害への感受性を増強することで知られる lipopolysaccharide (LPS) (Sigma Aldrich) を用いた (Deng et al., 2009)。ラットに LPS を 1 mg/kg で腹腔内投与し、18 hr 後に、TIC を 48 mg/kg でボーラス投与した後、13 mg/kg/hr で 4 hr 静注した (0.5 mL/hr)。肝障害の評価は、血漿サンプルを用いて ALT と直接ビリルビン (グルクロン酸抱合型ビリルビン) を外注により測定 (SRL, Tokyo, Japan) することで行った。

3) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に基づいた GSH 抱合型 TIC 代謝物の単離

2 種類の GSH 抱合型 TIC 代謝物、TIC-SG1 と TIC-SG2 (Supplemental Fig. S2-1) を、ラット胆汁より単離する実験を行った。まず、13 mg/kg/hr で TIC をインフュージョンした SD ラットより胆汁を採取し、固相抽出カラム (Mega Bond Elut C₁₈,

Varian Inc., Palo Alto, CA) に滴下した。カラムを 5% アセトニトリル-10 mM 酢酸アンモニウムで洗浄した後に、20% アセトニトリル-10 mM 酢酸アンモニウムを流すことによって粗精製胆汁サンプルを得た。L-4200 UV-VIS 検出器および L-6300 ポンプ (Hitachi, Tokyo, Japan) から成る Hitachi HPLC システムと、TSKgel ODS-100V 分離回収用カラム (TOSOH Bioscience, Tokyo, Japan) を用いて、粗精製胆汁サンプル中の TIC-SGs の単離を行った。この際に、移動相 A に 10 mM 酢酸アンモニウム、移動相 B にアセトニトリルを用いてグラジエント条件 (2.8 mL/min; 0–2 min 85:15 v/v, 2–18 min 85:15 to 50:50 v/v, 18–20 min 50:50 v/v, 20–23 min 50:50 to 85:15 v/v, 23–25 min 85:15 v/v) のもとで実施した。単離された TIC-SGs のそれぞれのフラクションは、凍結乾燥の後に重量を測定し、下記のように液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS/MS) による定量に供した。

4) LC-MS/MS による GSH 抱合型 TIC 代謝物の胆汁中濃度の測定

胆汁中の TIC-SGs 濃度は、LC-MS/MS に基づき、ACQUITY UPLC-Quattro Premier XE (Waters Corporation, Milford, MA)を用いたシステム (UPLC-MS/MS) によって測定した。カラムとしては Waters UPLC BEH C18 Shield (3 μ m; 2 \cdot 100 mm) を用い、LC は移動相 A に 0.1% ギ酸水溶液と移動相 B に 0.1% ギ酸アセトニトリルを用いてグラジエント条件 (0.3 mL/min; 0–1 min 95:5 v/v, 1–6 min 95:5 to 5:95 v/v, 6–7 min 5:95 to 95:5 v/v, and 7–8 min 95:5 v/v) のもとで実施した。TIC-SGs の定量は、エレクトロスプレー陽イオン化 (ESI+) による多重反応モニタリング (MRM) モードにより行い (587.20 > 257.10, Cone 22 V, Collision 32 eV for TIC-SG1; 587.20 > 183.90, Cone 20 V, and Collision 38 eV for TIC-SG2)、メトプロロールを内部標準として用いた (268.27 > 158.86, Cone 39 V, and Collision 22 eV)。

5) MRP 発現細胞膜ベシクルを用いた *in vitro* 輸送実験

ヒト MRP2 発現細胞膜小胞 (MRP2 ベシクル) およびコントロールベシクル

(Genomembrane, Kanagawa, Japan) への 50 μ M の TIC-SGs の取り込み実験は、製品に添付のプロトコルに基づいて行った。取り込み実験後のベシクルを含む反応液を 0.45 μ m HVLP filter (Millipore, Billerica, MA) に通し、5 mL の氷冷バッファーで 2 回洗浄した。続いて、メタノールによる抽出後、EC-57C3 遠心エバポレーター (SAKUMA, Tokyo, Japan) で濃縮し、TIC-SGs の濃度を LC-MS/MS で測定した。ATP 依存性の輸送は、10 mM ATP 存在下での活性から 10 mM AMP 存在下での活性を差し引くことで計算した。

6) *in vitro* における MDR3 依存性 PC 輸送の評価

MDR3 発現組換えアデノウイルス (Ad-MDR3) およびコントロールとして enhanced green fluorescent protein (EGFP) 発現組換えアデノウイルス (Ad-EGFP) は以前報告した方法で作成した (Ikebuchi et al., 2009)。Adeno-X Tet-Off Expression System (Clontech/Takara-Bio) においてターゲット蛋白質の発現に必要な Tet-regulatory アデノウイルス (Ad-Tet) は、キットのものを用いた。

MDR3 による PC 輸送の解析は、以前に報告した方法に基づき実施した (Yoshikado et al., 2011)。LLC-PK1 細胞を 24-well plates (BD FALCON, Bedford, MA) に細胞密度 0.8×10^5 cells/well で播種し、48 hr 後に 10 MOI の Ad-MDR3 および 20 MOI の Ad-Tet に感染させて MDR3 発現細胞を作製した (LLC-MDR3)。モック細胞は、Ad-MDR3 を Ad-EGFP に置き換えることで作成した (LLC-EGFP)。さらに 24 hr 後に、それぞれのウェルを Krebs-Henseleit (KH) バッファー (118 mM NaCl, 23.8 mM NaHCO₃, 4.83 mM KCl, 0.96 mM KH₂PO₄, 1.20 mM MgSO₄, 12.5 mM HEPES, 5.0 mM glucose, 1.53 mM CaCl₂, pH 7.4) で洗い、[¹⁴C]-コリンを含む KH バッファーに置換して 37°C で 3 hr プレインキュベーションした (5% CO₂)。続いて、リン脂質のアクセプターとして 3 mM TCA と、TIC-SGs (100 μ M および 1,000 μ M) を含む KH バッファーでさらに 3 hr インキュベーションした。インキュベーション後のバッファーをそれぞれのウェルから回収し、凍結乾燥機を用いて凍結乾燥後

にクロロホルムで溶解した（メディウムサンプル）。残った細胞を氷冷した KH バッファーで洗い、0.1 M NaOH および 0.1% SDS で細胞溶解した後、0.1 M HCl で中和した。細胞溶解液をそれぞれのウェルから回収し、凍結乾燥後にクロロホルムで溶解した（細胞ライセートサンプル）。

上記のメディウムサンプルおよび細胞ライセートサンプルについて、固相として Silica 60 plate (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)、移動相としてクロロホルム：メタノール：30% アンモニア水 = 65：35：8 を用いた薄層クロマトグラフィー（TLC）によりホスファチジルコリン（PC）を分離した。TLC で分離後の RI 非標識 PC の位置は、コリン含有脂質に特異的に反応する Dragendorff 試薬を用いて明らかとした (Wagner et al., 1961)。TLC で分離後の [^{14}C]-PC は、Cyclone Phosphor Imager (PerkinElmer, Waltham, MA) を用いて分析・定量し、細胞外への PC 排出能を以下の式に基づき計算した。

$$\text{PC 排出能} = \text{細胞外 PC} / (\text{細胞内 PC} + \text{細胞外 PC}) \times 100 (\%)$$

7) ウェスタンブロット

LLC-PK1 細胞を 60-mm dishes (IWAKI, Chiba, Japan) に細胞密度 4.0×10^5 cells/dish で播種し、上記 6) 輸送実験の項で記載した条件で組換えアデノウイルスを感染させた。これらの細胞より粗精製細胞膜分画を作成し、Lowry 法を用いて蛋白質量を測定した (Lowry et al., 1951)。粗精製細胞膜分画 (MDR3 を 10 μ g/lane、MRP2 を 2.5 μ g/lane) を、7%の SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いてサイズ分離後に、Immobilon (Millipore, Billerica, MA) メンブレンに転写した。蛋白質の分子量は、PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, Burlington, Canada) を用いて分析した。3% ウシ血清アルブミンでブロッキングした後に、以下の一次抗体で免疫ブロットを行った：MDR3 に対する mouse P3II26 antibody (MONOSAN, Uden, the Netherlands)、MRP2 に対する mouse M2III6 antibody (Abcam, Cambridge, UK)。続いて、二次抗体として anti-mouse IgG antibody labeled with

horseradish peroxidase (GE Healthcare, Piscataway, NJ) を用いて免疫ブロットを行った。これらの免疫ブロット済のメンブレンを ECL Plus (GE Healthcare) で処理した後に、化学発光を Chemidoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA)を用いて検出した。

【結果】

1. TIC 投与 SD ラットにおけるリン脂質胆汁分泌の減少

臨床において胆汁うっ滞を誘発する薬物を検索するために、厚生労働省の発行する「重篤副作用疾患別対応マニュアル薬物性肝障害」に基づき、日本において DILI の報告がある薬物を胆汁うっ滞型肝障害が多い順序で並べた (Supplemental Table S2-1)。このマニュアルにおいて、肝障害の型は過去に報告された DDW-J scale (Takikawa et al., 2005) の診断クライテリアに基づき分類された。その中で、TIC は胆汁うっ滞型と混合型を合わせた症例数および比率が最も高く、さらに今までの研究においても TIC 投与に伴う深刻な胆汁うっ滞型肝障害の症例が報告されていることから (Alberti and Alberti-Flor, 2002; Greany et al., 1993; Grimm and Litynski, 1994; Iqbal et al., 1998; Mambelli et al., 2007)、TIC 誘発性胆汁うっ滞のメカニズムを明らかにするための解析を行うこととした。

胆汁は胆汁酸依存性胆汁と非依存性胆汁で構成されるが、どちらも正常な胆汁バランスを維持する上で重要である。まず、胆汁酸依存性胆汁の重要な構成分子であるリン脂質と胆汁酸の胆汁分泌を、TIC 投与した SD ラットで検討した (Fig. 2-1)。TIC 投与開始後 0.5 hr で、胆汁流量はコントロール条件に比べて増加する傾向が見られたが、有意差はなかった (Fig. 2-1A)。続いて、リン脂質の胆汁分泌速度は TIC 投与ラットにおいて顕著に減少していたが (Fig. 2-1B)、胆汁酸の胆汁分泌速度についてはほとんど変化が見られなかった (Fig. 2-1C)。また、TIC 投与開始後 2 hr で TIC の血漿中濃度は $17.6 \pm 3.9 \mu\text{M}$ に達しており (Supplemental Fig. S2-2A)、これは臨床における条件と遠くないものであった。すなわち、TIC の錠剤を 500 mg で反復投与を受けた患者において血漿中濃度は $9.8 \pm 2.3 \mu\text{M}$ であり (Ebihara et al., 1978)、TIC 体内動態の 2 倍程度の個人差を考慮すれば、あり得る濃度と考えられた。

TIC の肝臓における主要な消失経路は代謝であり、親化合物の 1 %未満が尿中に見られることから (Shimizu et al., 2009)、胆汁組成の変化に対する TIC 代謝物の

関与を検討した。SD ラットに CYP の非特異的阻害剤である SKF-525A を前投与した後に TIC を投与したところ (Yang et al., 2009)、リン脂質の胆汁排泄速度は TIC を投与しないコントロール条件と顕著な差がなかった (Fig. 2-1B)。このことから、SKF-525A を投与せず TIC のみを投与したラットにおいては、TIC 親化合物よりもむしろ TIC 代謝物が胆汁中リン脂質の減少をもたらしたと考えられた。

2. TIC 投与 SD ラットにおける GSH および GSH 抱合型 TIC 代謝物の顕著な胆汁排泄

続いて、GSH や GSH 抱合体等の浸透圧性の溶質によって牽引される胆汁酸非依存性胆汁に対する TIC 投与の影響を検討した。SD ラットにおける胆汁解析の結果、TIC 投与開始後 0.5-1.0 hr の GSH 胆汁排泄量は $2\ \mu\text{mol/kg body weight (BW)}$ まで劇的に増加した (Fig. 2-2A)。

TIC 投与ラットにおいては、2 種類の GSH 抱合型 TIC 代謝物 (TIC-SG1 および TIC-SG2) が胆汁中に見られることが報告されていることから (Shimizu et al., 2009)、ラット胆汁よりこれらの代謝物を単離して LC-MS/MS を用いた定量法を構築した (Supplemental Fig. S2-1)。TIC 投与開始後 0.5-1.0 hr における TIC-SG1 および TIC-SG2 の胆汁排泄量は、それぞれ $20\ \mu\text{mol/kg BW}$ および $5\ \mu\text{mol/kg BW}$ であり (Fig. 2-2B)、GSH そのものよりも 10 倍および 2.5 倍も高かった。一方、SKF-525A を前投与したラットにおいては、TIC-SGs の胆汁排泄量はずっと少なかったが (Fig. 2-2B)、これは TIC が CYP によって代謝された後に TIC-SGs が生成するという過去の報告と一致するものであった (Shimizu et al., 2009)。

3. TIC の Mrp2 欠損ラット (EHBR) への投与は胆汁組成に影響を与えなかった

SD ラットへの TIC の投与は GSH および TIC-SGs の胆汁排泄を亢進させるとともに、胆汁中リン脂質を著しく減少させた。このような胆汁組成の変化が、GSH

や GSH 抱合体の胆汁排泄を担う MRP2 を欠損する EHBR で観察されるかどうかを検討した (Paulusma et al., 1996)。SD ラットと同条件で EHBR に TIC を投与したところ、血漿中 TIC 濃度は $19.2 \pm 8.4 \mu\text{M}$ であり SD ラットと有意な差は無かった (Supplemental Fig. S2-2A)。TIC 投与した EHBR において、胆汁流量、リン脂質・胆汁酸の胆汁分泌速度にはいずれも変化が見られなかった (Fig. 2-3, A-C)。また、EHBR における胆汁中の GSH は定量限界以下であり、TIC-SG1 および TIC-SG2 の胆汁排泄量は SD ラットの 1%未満であった (Fig. 2-3D)。これらの結果を併せて考えると、SD ラットにおいては MRP2 が TIC-SGs の胆汁排泄を担うとともに胆汁中リン脂質の減少にも関与しており、MRP2 を欠損する EHBR ではいずれの現象も見られなかった可能性が示唆された。

4. TIC 投与 SD ラットにおける肝障害の誘発

TIC 投与は SD ラットの胆汁組成に顕著な変化をもたらしたことから、TIC による肝障害誘発の可能性をラットで検討した。肝障害マーカーである ALT は、LPS を前投与した SD ラットにおいて TIC 投与開始後 4 hr で顕著に上昇していたが、LPS を前投与した EHBR においては TIC 投与後も変化しなかった (Fig. 2-4A)。さらに、胆汁うっ滞マーカーである直接ビリルビン（グルクロン酸抱合型ビリルビン）も、LPS を前投与した SD ラットにおいて TIC 投与開始後に劇的に増加していた (Fig. 2-4B)。これらの比較から、TIC 誘発性肝障害には Mrp2 の機能が必要であると考えられた。一方、TIC のみで処理した SD ラットでは肝毒性は見られなかったことから、LPS による前処理が TIC 誘発性肝障害への感受性を上昇させたと考えられた。

胆汁中のリン脂質は胆汁酸と混合ミセルを形成することで、遊離胆汁酸の界面活性作用から胆管側膜を保護する役割を担うため、TIC 投与 SD ラットで観察された胆汁中リン脂質の減少が遊離胆汁酸の増加をもたらす胆汁うっ滞型肝障害を誘発したと考えた。実際に、TIC 投与ラットにおいて胆汁中リン脂質濃度低下の程

度は (Supplemental Fig. S2-3A)、胆汁酸濃度低下の程度よりも大きく (Supplemental Fig. S2-3B)、リン脂質／胆汁酸の比 (mM／mM) を取ると TIC 投与後に SD ラットでは顕著に低下していた (Fig. 2-4C)。リン脂質-胆汁酸の混合ミセルにおけるリン脂質の細胞保護作用は以前に *in vitro* で報告されており (Moschetta et al., 2000)、本実験においても、リン脂質-胆汁酸の混合ミセルで処理した CaCo-2 細胞において、細胞膜障害のマーカーとなる乳酸脱水素酵素 (LDH) の放出は、ミセル中のリン脂質／胆汁酸比の上昇とは逆に減少した (unpublished observation)。

5. *in vitro* における MRP2 による GSH 抱合型 TIC 代謝物の輸送

Mrp2 を欠損する EHBR における TIC-SGs の胆汁排泄 (Fig. 2-3D) は、SD ラットに比べて遥かに低かったことから (Fig. 2-2B)、TIC-SGs は Mrp2 の基質となることで胆汁排泄されると考えた。この可能性を検討するために、MRP2 ベシクルを用いて TIC-SGs の輸送実験を行った (Fig. 2-5A)。MRP2 ベシクルにおける TIC-SG1 および TIC-SG2 の取り込みは、コントロールベシクルに比べて顕著に高かったことから (Fig. 2-5B, C)、TIC-SGs は MRP2 によって能動的に輸送されることが明らかとなった。

6. GSH 抱合型 TIC 代謝物は MDR3 依存性 PC 輸送に対して阻害作用を示さなかった

SD ラットにおいて、TIC 投与により生じた胆汁組成の変化（リン脂質の減少、TIC-SGs の胆汁排泄）は胆汁うっ滞型肝障害の要因となることが推察された。一方、EHBR においては、TIC 投与は胆汁中リン脂質分泌の減少をもたらさなかったことから (Fig. 2-3B)、Mrp2 による TIC-SGs の胆汁排泄がリン脂質分泌の減少に必要であることが示唆された。それゆえに、TIC-SGs が胆汁排泄された後に胆管側膜の外側（胆汁側）から MDR3 を阻害する可能性が考えられた。この可能性は、

EHBR において TIC-SG1 および TIC-SG2 の肝臓内濃度が SD ラットに比べて高かったにも関わらず (Supplemental Fig. S2-2B)、TIC-SGs によるリン脂質胆汁分泌の低下作用は見られなかったことから示唆される。

この可能性を検討するために、MDR3 を発現する LLC-PK1 細胞 (LLC-MDR3) を用いて (Fig. 2-6A)、TIC-SGs による MDR3 の阻害作用の有無を検討した。LLC-MDR3 からの [14 C]-PC の排出はコントロール細胞 (LLC-EGFP) よりも顕著であったが、TIC-SG1 および TIC-SG2 は MDR3 依存性の PC 排出を阻害しなかった (Fig. 2-6B)。一方、MDR3 の良く知られた阻害剤であるベラパミル (Morita et al., 2007; van Helvoort et al., 1996) は、MDR3 を顕著に阻害した (Fig. 2-6B)。以上から、TIC 投与 SD ラットで見られたリン脂質胆汁分泌の減少は、MDR3 の直接阻害によって引き起こされたものではなく、TIC-SGs の過剰な胆汁排泄に伴い正常な胆汁形成が抑制されるメカニズムが考えられた。

7. TIC 投与 SD ラットにおける胆汁中リン脂質の減少は TCA のインフュージョンにより回復した

GSH および TIC-SGs の顕著な胆汁排泄 (Fig. 2-2A, B) が胆汁酸非依存性胆汁流量を浸透圧作用により増加させ、結果として胆汁中の胆汁酸濃度を低下させたことから (Supplemental Fig. S2-3B)、胆汁中リン脂質-胆汁酸混合ミセルの形成が TIC 投与 SD ラットにおいては減弱するメカニズムが考えられた。この点を明らかにするために、胆汁酸の一種である TCA をインフュージョンによりラットに負荷した条件下で、TIC 投与によるリン脂質の胆汁分泌への影響を検討した (Fig. 2-7)。TIC 投与後も、TCA のインフュージョン条件下では胆汁中胆汁酸濃度は通常のレベルに保たれており (Supplemental Fig. S2-3D)、リン脂質の胆汁分泌量もコントロールと同じレベルに維持されていた (Fig. 2-7B)。このことから、TCA のインフュージョンにより胆汁中胆汁酸濃度を十分なレベルに維持することによって、リン脂質-胆汁酸混合ミセルの正常な形成が保たれたと考えた。

胆汁形成にもたらす TIC の作用を Figure 2-8 にまとめた。通常の条件下では、胆汁中に分泌された胆汁酸はリン脂質およびコレステロールと容易に混合ミセルを形成する (Fig. 2-8A)。SD ラットに TIC が投与されると (Fig. 2-8B)、TIC は CYP 依存性の代謝を受けた後に GSH 抱合を受けて TIC-SGs を生成し、GSH とともに MRP2 によって胆汁排泄される。TIC-SGs および GSH は浸透圧作用により胆汁酸非依存性胆汁を亢進させ (1)、胆汁中胆汁酸濃度の低下をもたらすが、このような胆汁組成の変化はリン脂質-胆汁酸の混合ミセル形成に影響を与え (2)、間接的にリン脂質の胆汁分泌を抑制すると考えられる (3)。さらに、胆汁中リン脂質の減少に伴い遊離胆汁酸が増加して胆管側膜に対する障害の蓄積に繋がることから (4)、TIC 誘発性胆汁うっ滞型肝障害のリスクとなると考えられる。一方、Mrp2 を欠損する EHBR に TIC を投与しても (Fig. 2-8C)、そもそも TIC-SGs の胆汁分泌量は SD ラットに比べてはるかに少ないことから、リン脂質分泌をはじめとする胆汁組成の変化が見られず、肝障害が生じなかったと推測された。

【考察】

本研究では、TIC 誘発性胆汁うっ滞のメカニズムを明らかにするために、胆汁形成に対する TIC の作用を解析した。胆汁酸の界面活性作用から胆管側膜を保護する役割を担うリン脂質の胆汁分泌量は、TIC 投与 SD ラットにおいて顕著に減少していたが (Fig. 2-1)、TIC を投与した Mrp2 欠損 EHBR では減少していなかった (Fig. 2-3)。さらに、TIC 投与 SD ラットにおける Mrp2 依存性の GSH および TIC-SGs の胆汁排泄により (Fig. 2-2)、胆汁中のリン脂質-胆汁酸の混合ミセルの形成が影響を受けて、間接的にリン脂質の胆汁分泌を阻害することを見出した。これらの作用により、胆管側膜の障害が蓄積され、SD ラットにおいて胆汁うっ滞型肝障害を誘発したと考えられた (Fig. 2-4)。

BSEP および MDR3 の遺伝的な機能欠損は PFIC2 および PFIC3 の原因となることが知られており、BSEP もしくは MDR3 の機能を阻害する薬物は胆汁うっ滞を誘発する可能性がある。BSEP が関与する薬物誘発性胆汁うっ滞については、複数の *in vitro* 試験から推察されているが (Fattinger et al., 2001; Funk et al., 2001; Horikawa et al., 2003; Stieger et al., 2000)、BSEP の阻害が見られた濃度は臨床で実際に観察される濃度と比較して高い例が多数あった。一方、最近になって、我々は MDR3 の直接阻害によって生じる薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズムを明らかにした (第一章) (Yoshikado et al., 2011)。この研究では、ITZ 誘発性胆汁うっ滞型肝障害が疑われた二人の患者において ITZ の血漿中濃度が顕著に高いことを見出し、同程度の血漿中濃度となるように ITZ を投与したラットにおいては胆汁中リン脂質が顕著に減少することを明らかとした。加えて、*in vitro* においても臨床濃度に近い濃度設定とした ITZ 存在下で、MDR3 依存性 PC 輸送が阻害されることを示した。このように、BSEP および MDR3 の直接阻害により誘発される胆汁うっ滞の例が明らかとなりつつある。

本研究において、SD ラットへの TIC の投与は胆汁中のリン脂質を顕著に減少させたが (Fig. 2-1B)、TCA のインフュージョンがリン脂質の胆汁分泌を回復させた

ことから、直接的な MDR3 の障害は胆汁中リン脂質減少の主要なメカニズムではないと考えられた (Fig. 2-7B)。一方、TIC 投与ラットにおいては MRP2 依存性の GSH および TIC-SGs の胆汁排泄が顕著に見られており (Fig. 2-2A, B)、GSH および TIC-SGs という浸透圧性基質が胆汁中に存在することにより胆汁酸非依存性胆汁が牽引され、結果として胆汁中の胆汁酸濃度を低下させたと考えられた (Supplemental Fig. S2-3B)。胆汁中胆汁酸濃度の維持は適切なリン脂質-胆汁酸ミセルの形成に必要であることから (Oude Elferink and Paulusma, 2007)、TIC 投与に伴う胆汁中胆汁酸濃度の低下がリン脂質分泌の減少をもたらしたと考えられた。

TIC 以外の複数の薬物が MRP2 による胆汁酸非依存性胆汁を亢進させる可能性が過去に報告されている。エンドセリン $ET_{A/B}$ 受容体アンタゴニストであるボセンタンは、いくつかの臨床症例において肝障害を誘発することが知られている。ボセンタン投与ラットにおいては、胆汁中への GSH 分泌が増加するとともに、リン脂質分泌は減少するが、これらの変化は *Mrp2* 欠損ラットでは見られなかった (Fouassier et al., 2002)。同様の現象は臨床より高用量のアंपシリン (Verkade et al., 1990)、セフメタゾール (Cava et al., 1991)、ブロモスルファフタレインおよびセフピラミド (Takikawa et al., 1993) を投与されたラットにおいても観察された。

多くの薬物誘発性肝障害の症例と同様に、TIC 誘発性胆汁うっ滞型肝障害はしばしば特異体質的 (idiosyncratic) に生じる。それゆえに、胆汁中リン脂質が減少することによる胆管側膜の障害に加えて、他の要因が TIC 誘発性胆汁うっ滞型肝障害の発症および悪化に影響を与えると考えられる。第一に、ヒト白血球抗原 (HLA) の遺伝子多型は、TIC 誘発性肝障害に関与することが示されている。*HLA-A*3303* アリルは日本人の TIC 誘発性肝障害症例の 68%で見つがっているが、TIC に耐性がある人ではわずかに 14%であった (Hirata et al., 2008)。*HLA-A*3303* のアリル頻度は他の人種に比べて日本人で高いことが報告されているため (Ariyoshi et al., 2010)、日本人における TIC 誘発性肝障害の頻度が高いことを一部説明できると考えられる。また、*HLA* の変異に加えて、MDR3 蛋白質の発現量・

活性の減弱に関わる *MDR3* 変異 (Oude Elferink and Paulusma, 2007) も TIC 誘発性胆汁うっ滞型肝障害への感受性を上昇させると考えられる。さらに、Dawson らは TIC によるヒト BSEP の阻害 (IC_{50} : 74 μ M) およびラット Bsep の阻害 (IC_{50} : 49 μ M) を示していることから (Dawson et al., 2012)、特に遺伝的な BSEP の機能低下が生じているヒトにおいては、TIC 誘発性胆汁うっ滞型肝障害の一要因として貢献する可能性がある。一方で、胆管側膜の脂質二重層の非対称性を維持する *MDR3* および *ATP8B1* の協調的機能は、高濃度の胆汁酸にさらされている胆管側膜の保護に重要と考えられている (Groen et al., 2011)。*ATP8B1* は *PFIC1* の原因遺伝子である P-type ATPase であり、胆管側膜の外側から内側へのホスファチジルセリンの移行を担っていることから、*ATP8B1* の機能低下が TIC 誘発性胆汁うっ滞型肝障害への感受性に影響を与える可能性がある。従って、胆管側膜に発現する *MDR3*, *BSEP*, *ATP8B1* および *MRP2* の遺伝子変異と薬物誘発性胆汁うっ滞との関係を明らかにすることは、臨床において胆汁うっ滞を引き起こしうる薬物の適切な使用に役立つと考えられる。

以上をまとめると、本研究では TIC 投与が GSH および TIC-SGs の胆汁排泄によって牽引される胆汁酸非依存性胆汁を亢進させ、胆汁組成バランスの変化によって、間接的にリン脂質の胆汁分泌を減少させる TIC 誘発性胆汁うっ滞型肝障害のメカニズムを示した。臨床で用いられる多種薬物によって引き起こされる胆汁うっ滞型肝障害のメカニズムを明らかにするためには、胆管側トランスポーター機能の直接的な阻害だけでなく、薬物および代謝物の顕著な胆汁排泄によって引き起こされる胆汁組成の変化についても考慮がなされるべきと考えられる。

第二章

胆汁中リン脂質の低下を伴うチクロピジン誘発性胆汁うっ滞機構
の解析：胆汁中グルタチオン抱合型チクロピジン代謝物による
リン脂質低下作用の関与

図表

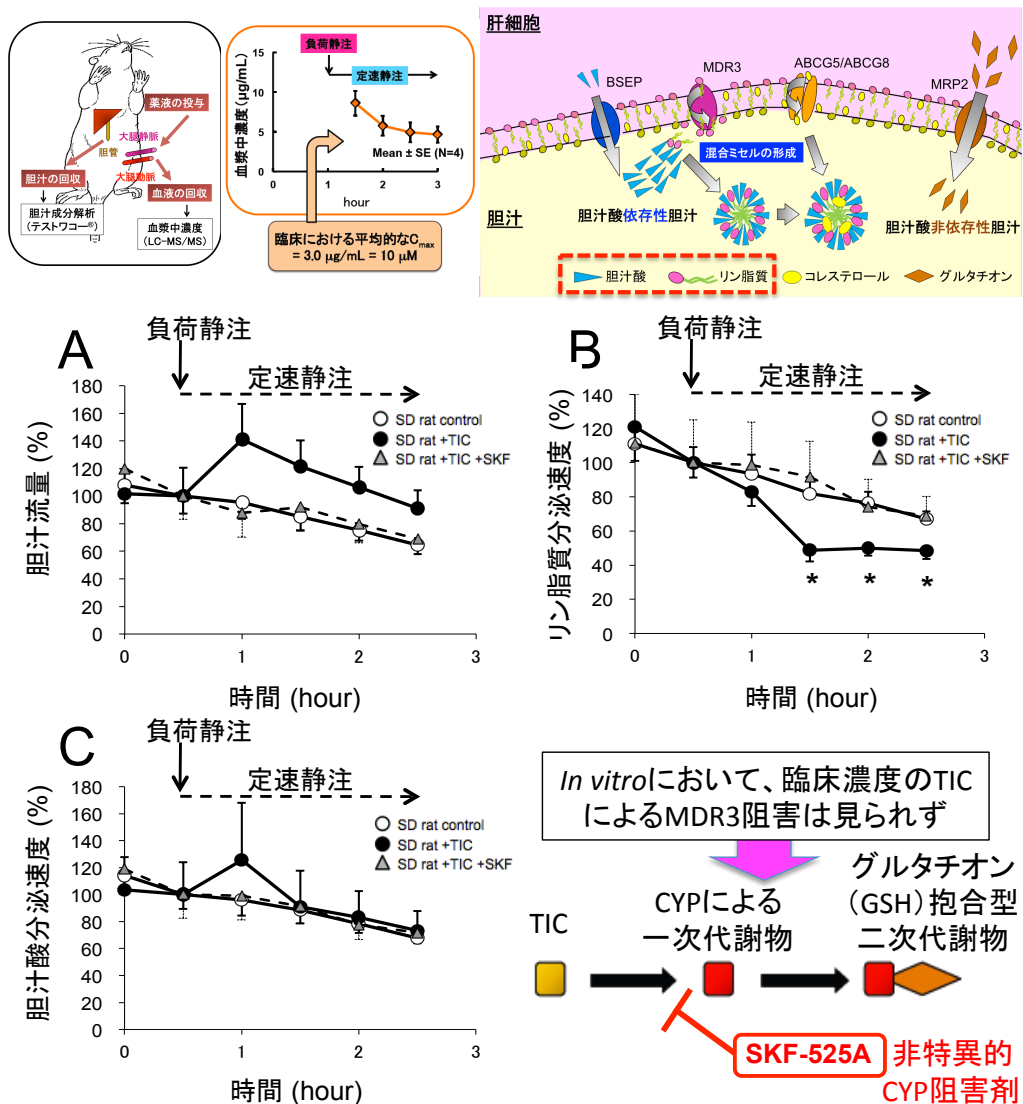


Figure 2-1 SD ラットにおける胆汁流量およびリン脂質と胆汁酸の胆汁分泌に与える TIC の作用

チクロピジン（TIC）投与群、SKF-525A 前処理下の TIC 投与群、およびコントロール群の SD ラットにおいて、胆汁流量および胆汁酸・リン脂質の胆汁分泌速度を解析した。それぞれ投与開始時（グラフ上の 0.5 hr）の値を初期値（100%）とした。（A）胆汁流量を示す。初期値は 2.03 ± 0.42 mL/h/kg（TIC 投与群）および 2.19 ± 0.28 mL/h/kg（コントロール群）。（B）リン脂質の胆汁分泌速度を示す。初期値は 118 ± 10 nmol/min/kg（TIC 投与群）および 107 ± 10 nmol/min/kg（コントロール群）。（C）胆汁酸の胆汁分泌速度を示す。初期値は 0.57 ± 0.14 μ mol/min/kg（TIC 投与群）および 0.39 ± 0.04 μ mol/min/kg（コントロール群）。各データは mean \pm S.E. (N = 4 or 5) * p < 0.05 vs. control by Student's t -test.

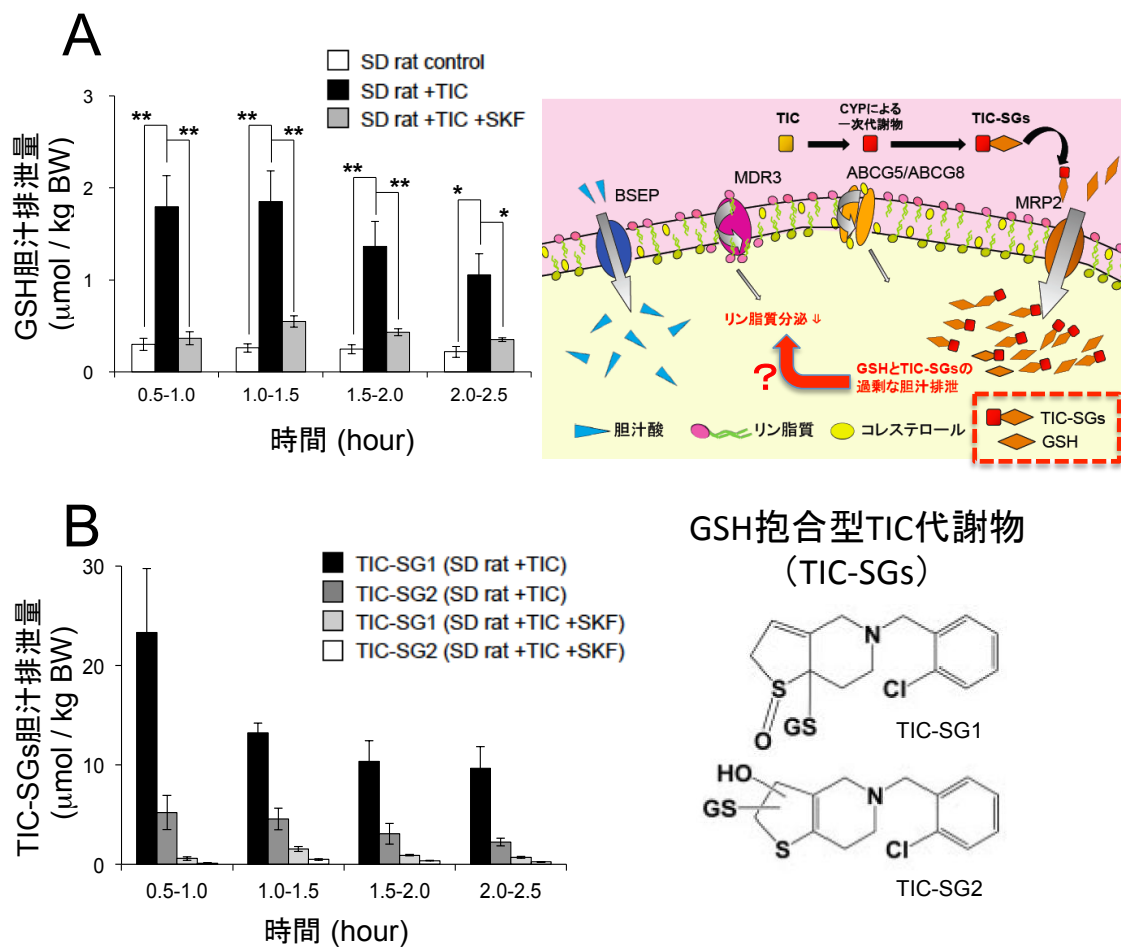


Figure 2-2 SD ラットにおける GSH および TIC-SGs の胆汁排泄

チクロピジン (TIC) を SD ラットに投与した。(A) 表記時間における GSH の胆汁排泄量を示す。(B) 表記時間における GSH 抱合型 TIC 代謝物 (TIC-SGs) の胆汁排泄量を示す。各データは mean \pm S.E. (N = 4 or 5) ** p < 0.01 and * p < 0.05 vs. TIC-administered SD rats by Student's t -test.

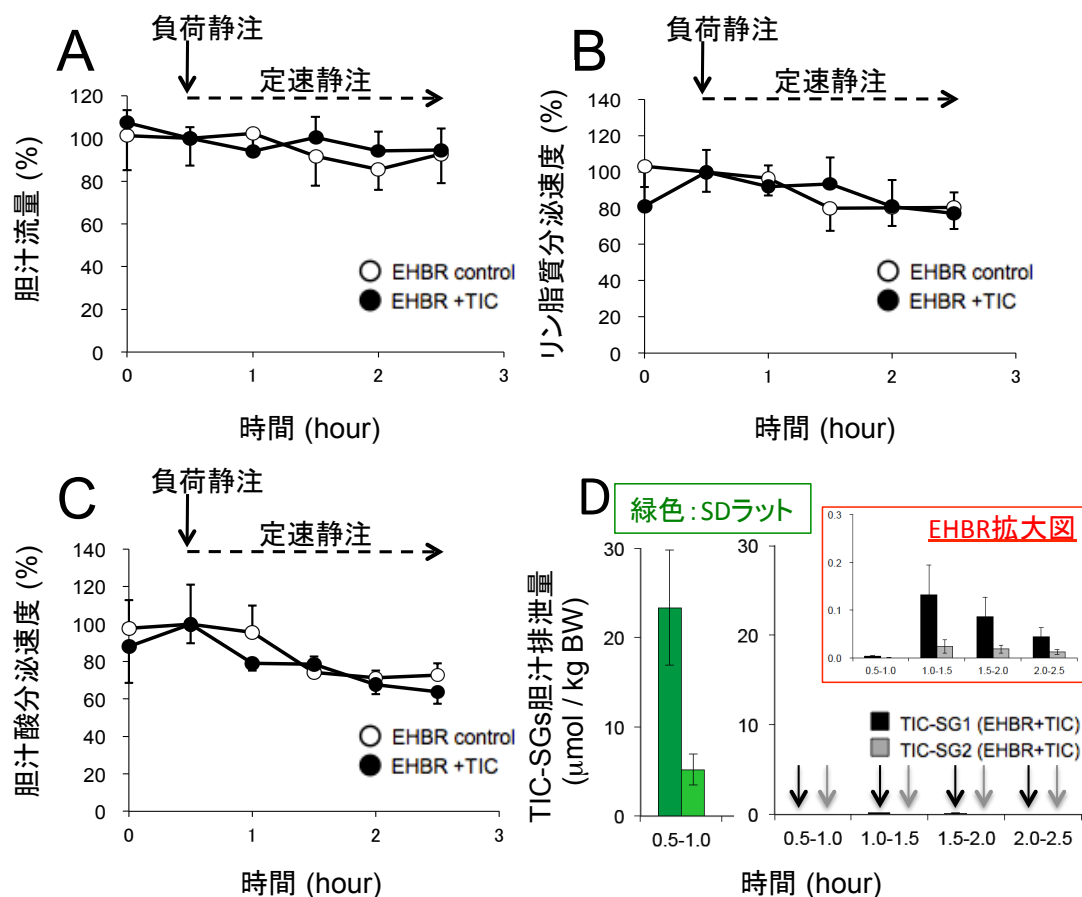


Figure 2-3 MRP2 欠損ラット（EHBR）の胆汁組成に与える TIC の作用

チクロピジン（TIC）を Eisai hyperbilirubinemic rat (EHBR) に投与した。(A)-(C) 胆汁流量および胆汁酸・リン脂質の胆汁分泌速度の解析結果を示す。それぞれ投与開始時（グラフ上の 0.5 hr）の値を初期値（100%）とした。(A) 胆汁流量を示す。初期値は 1.35 ± 0.07 mL/h/kg（TIC 投与群）および 1.54 ± 0.20 mL/h/kg（コントロール群）。(B) リン脂質の胆汁分泌速度を示す。初期値は 203 ± 25 nmol/min/kg（TIC 投与群）および 195 ± 22 nmol/min/kg（コントロール群）。(C) 胆汁酸の胆汁分泌速度を示す。初期値は 0.56 ± 0.06 μ mol/min/kg（TIC 投与群）および 0.53 ± 0.11 μ mol/min/kg（コントロール群）。(D) 表記時間における GSH 抱合型 TIC 代謝物（TIC-SGs）の胆汁排泄量を示す。各データは mean \pm S.E. (N = 4 or 5)

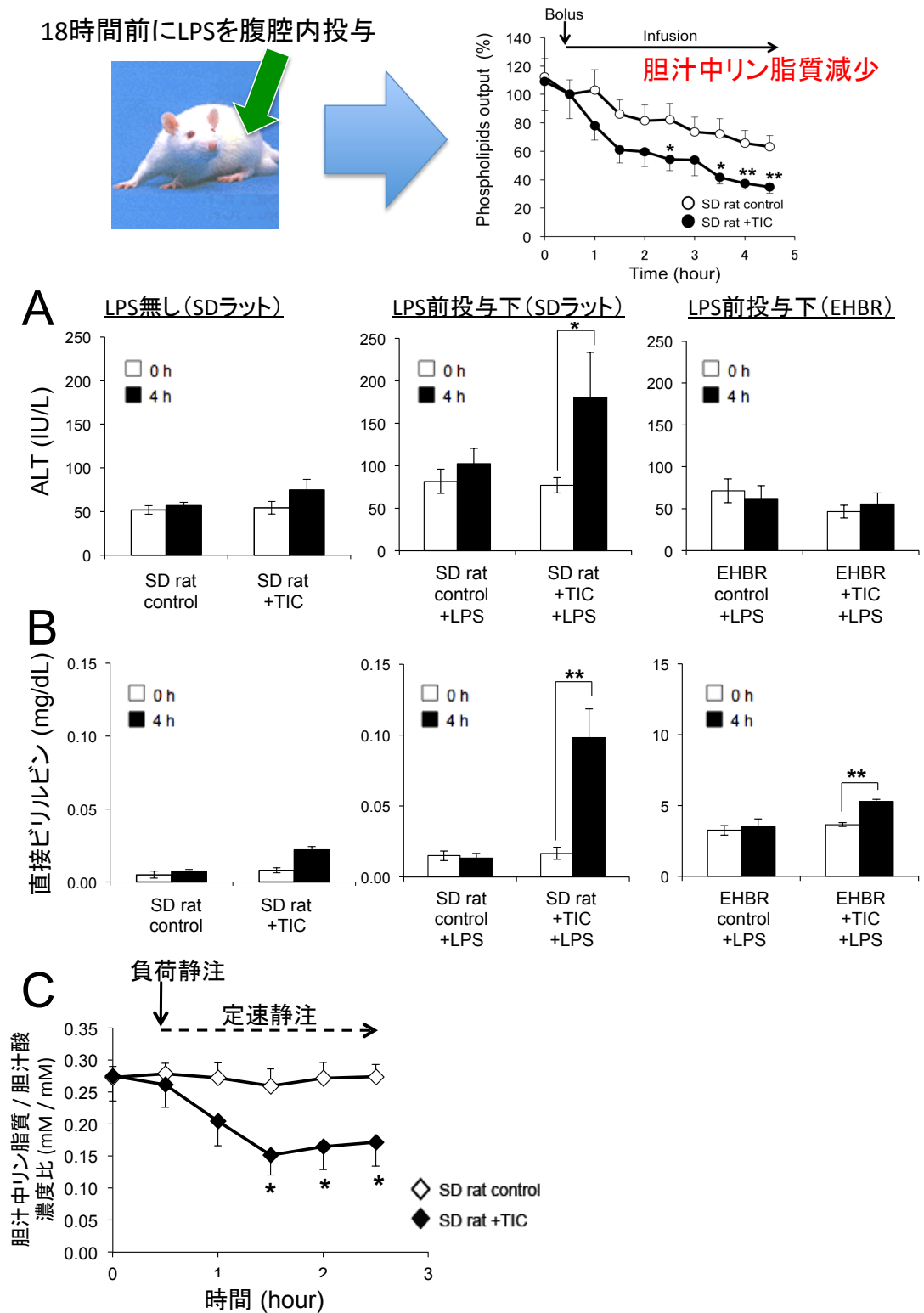


Figure 2-4 TIC による肝毒性の評価

チクロピジン (TIC) による肝毒性を、lipopolysaccharide (LPS) 処理条件下において SD ラットおよび Eisai hyperbilirubinemic rat (EHBR) で検討した。ラット血漿を用いて、alanine aminotransferase (ALT) (A) および直接ビリルビン (グルクロン酸抱合型ビリルビン) (B) を

測定した。各データは mean \pm S.E. (N = 4~6) ** p < 0.01 and * p < 0.05 vs. values at 0 h by Student's t -test (C) SD ラットの TIC 投与群もしくはコントロール群における胆汁中リン脂質 / 胆汁酸濃度比 (mM / mM)。各データは mean \pm S.E. (N = 4 or 5) * p < 0.05 vs. control by Student's t -test.

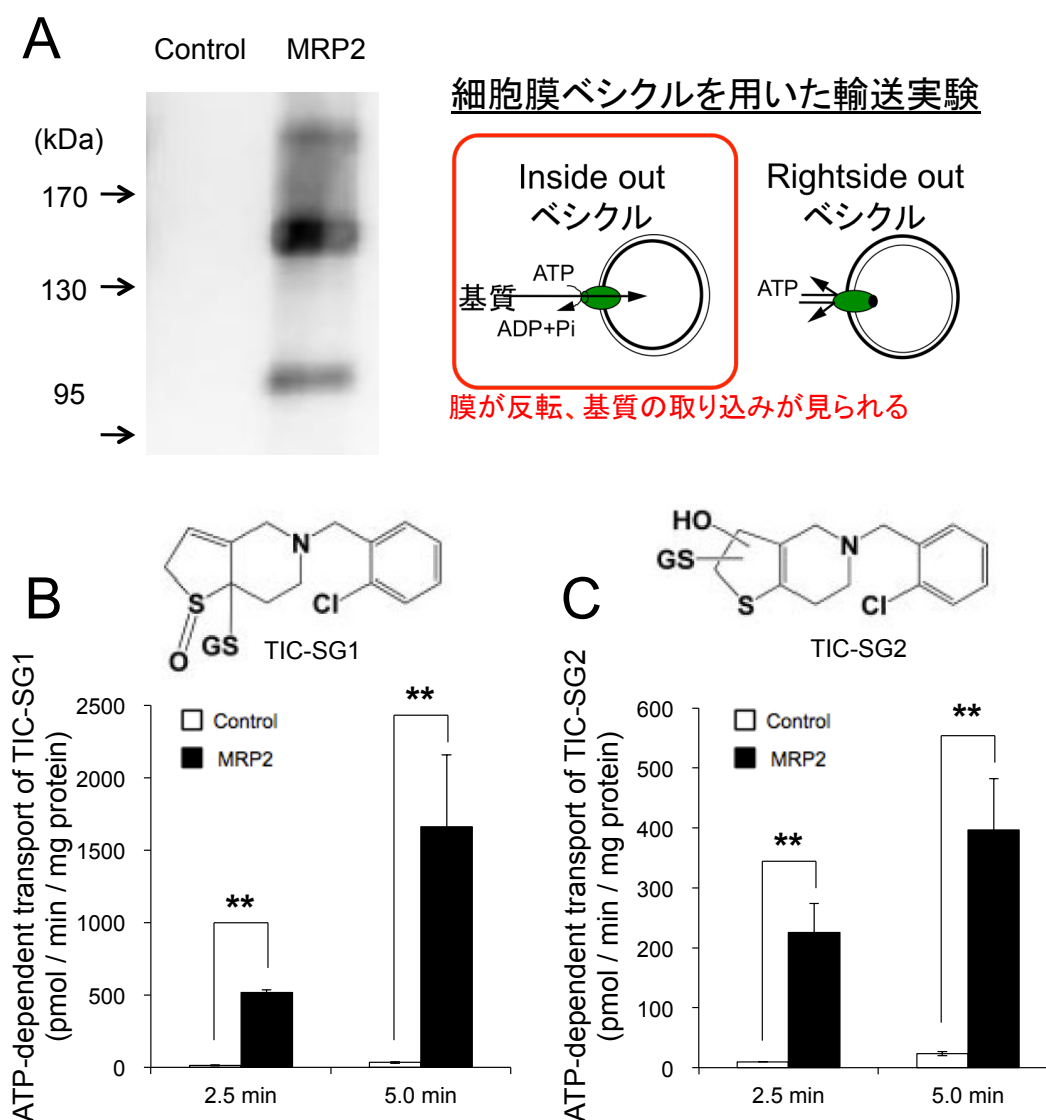


Figure 2-5 GSH 抱合型 TIC 代謝物の MRP2 による輸送

MRP2 発現細胞膜小胞 (MRP2 ベシクル) を用いて GSH 抱合型チクロピジン代謝物 (TIC-SGs) の輸送を検討した。(A) MRP2 蛋白質の発現を確認するためにウエスタンブロットを行った。(B) TIC-SG1 (50 μ M) の輸送および (C) TIC-SG2 (50 μ M) の輸送を MRP2 ベシクルで検討した。インキュベーションの条件は 37 $^{\circ}$ C で 2.5 min と 5.0 min。ATP 依存性の輸送は、10 mM ATP 存在下での活性から 10 mM AMP 存在下での活性を差し引くことで計算した。各データは mean \pm S.E. (N = 3) $^{**}p < 0.01$ vs. control vesicles by Student's *t*-test.

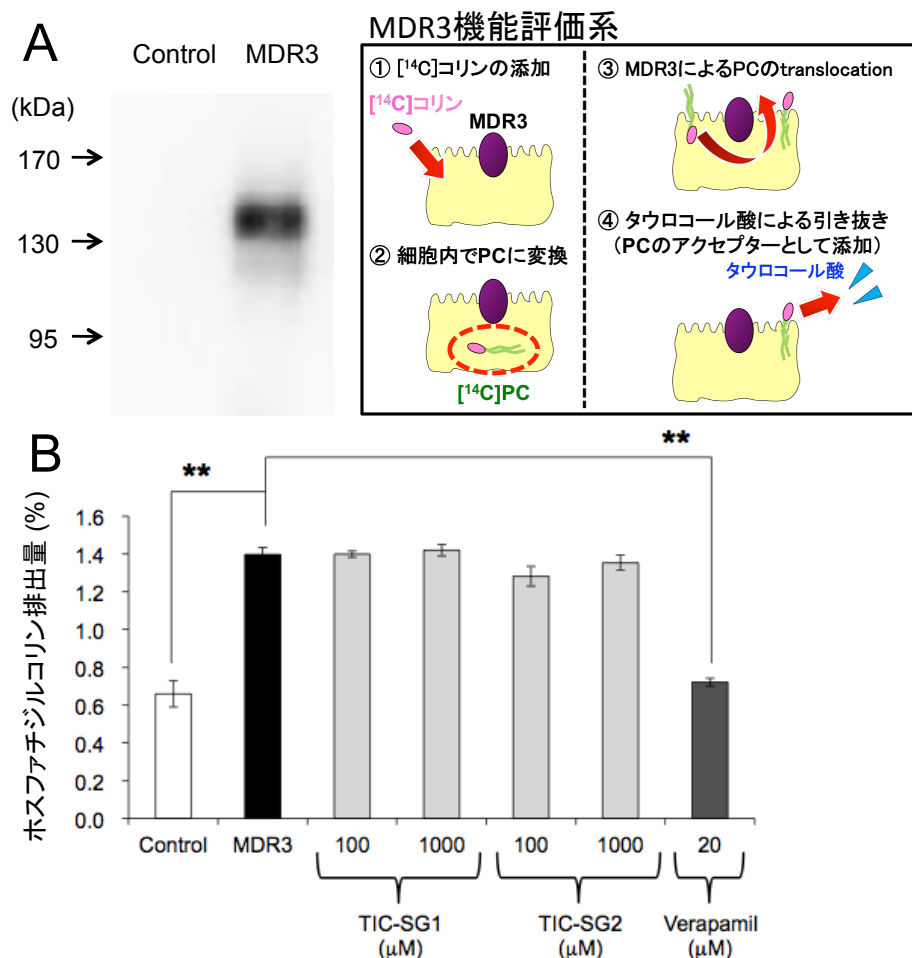


Figure 2-6 MDR3 依存性 PC 輸送に対する GSH 抱合型 TIC 代謝物の作用

LLC-MDR3 細胞において、MDR3 依存性 PC 輸送に対する GSH 抱合型チクロピジン代謝物 (TIC-SGs) の作用を検討した。(A) MDR3 蛋白質の発現をウエスタンブロットにより確認した。(B) LLC-MDR3 細胞による [¹⁴C]-PC の排出を 37°C, 3 hr の条件で検討した。これらの細胞には、表記濃度の TIC-SG1, TIC-SG2 もしくはベラパミルを添加した。各データは mean ± S.E. (N = 3 or 4) ***p* < 0.01 vs. untreated MDR3-expressing cells by ANOVA followed by Dunnett's test.

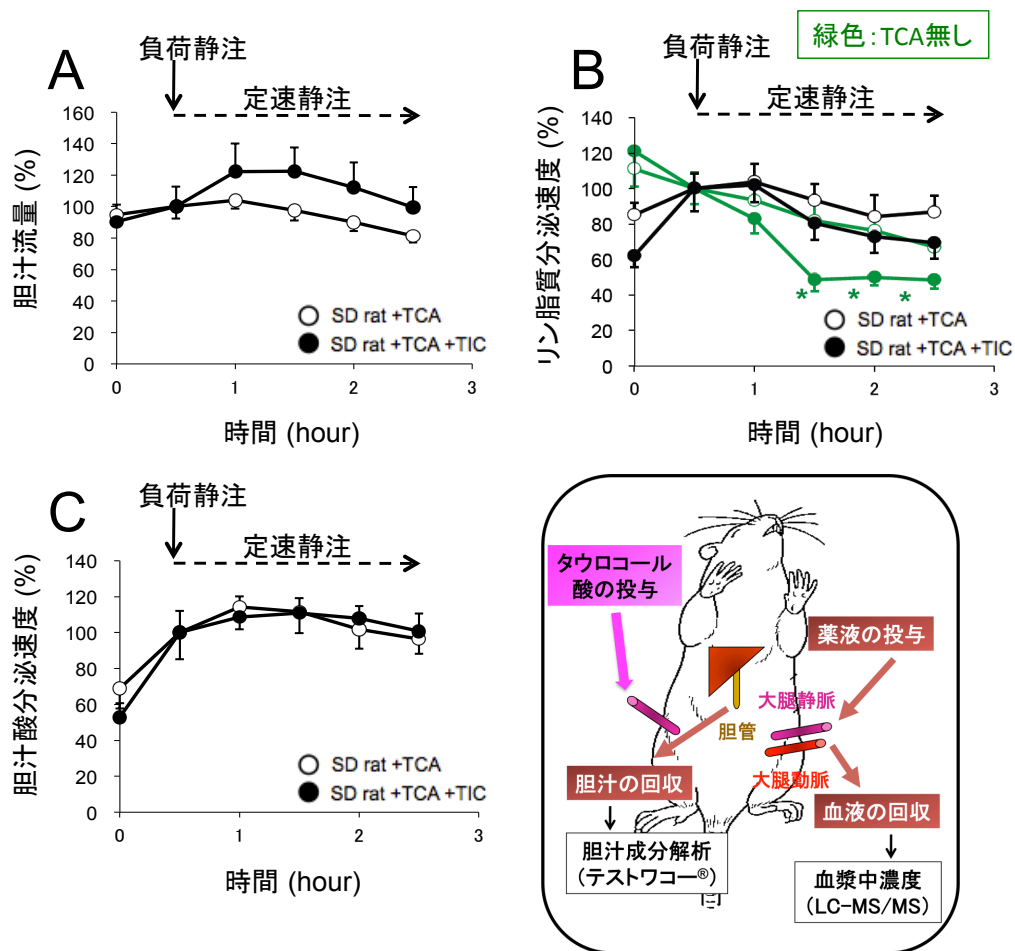


Figure 2-7 タウロコール酸インフュージョン条件下における SD ラットの胆汁組成に与える TIC の作用

インフュージョンによりタウロコール酸 (TCA) を負荷した条件下で、チクロピジン (TIC) を SD ラットに投与し、胆汁流量および胆汁酸・リン脂質の胆汁分泌速度を解析した。TCA のインフュージョンは TIC 投与の 1 hr 前より開始した。それぞれ TIC 投与開始時 (グラフ上の 0.5 hr) の値を初期値 (100%) とした。(A) 胆汁流量を示す。初期値は 2.63 ± 0.34 mL/h/kg (TIC 投与群) および 3.30 ± 0.25 mL/h/kg (コントロール群)。(B) リン脂質の胆汁分泌速度を示す。初期値は 299 ± 38 nmol/min/kg (TIC 投与群) および 330 ± 28 nmol/min/kg (コントロール群)。(C) 胆汁酸の胆汁分泌速度を示す。初期値は 1.98 ± 0.24 μ mol/min/kg (TIC 投与群) および 1.91 ± 0.28 μ mol/min/kg (コントロール群)。各データは mean \pm S.E. (N = 5)

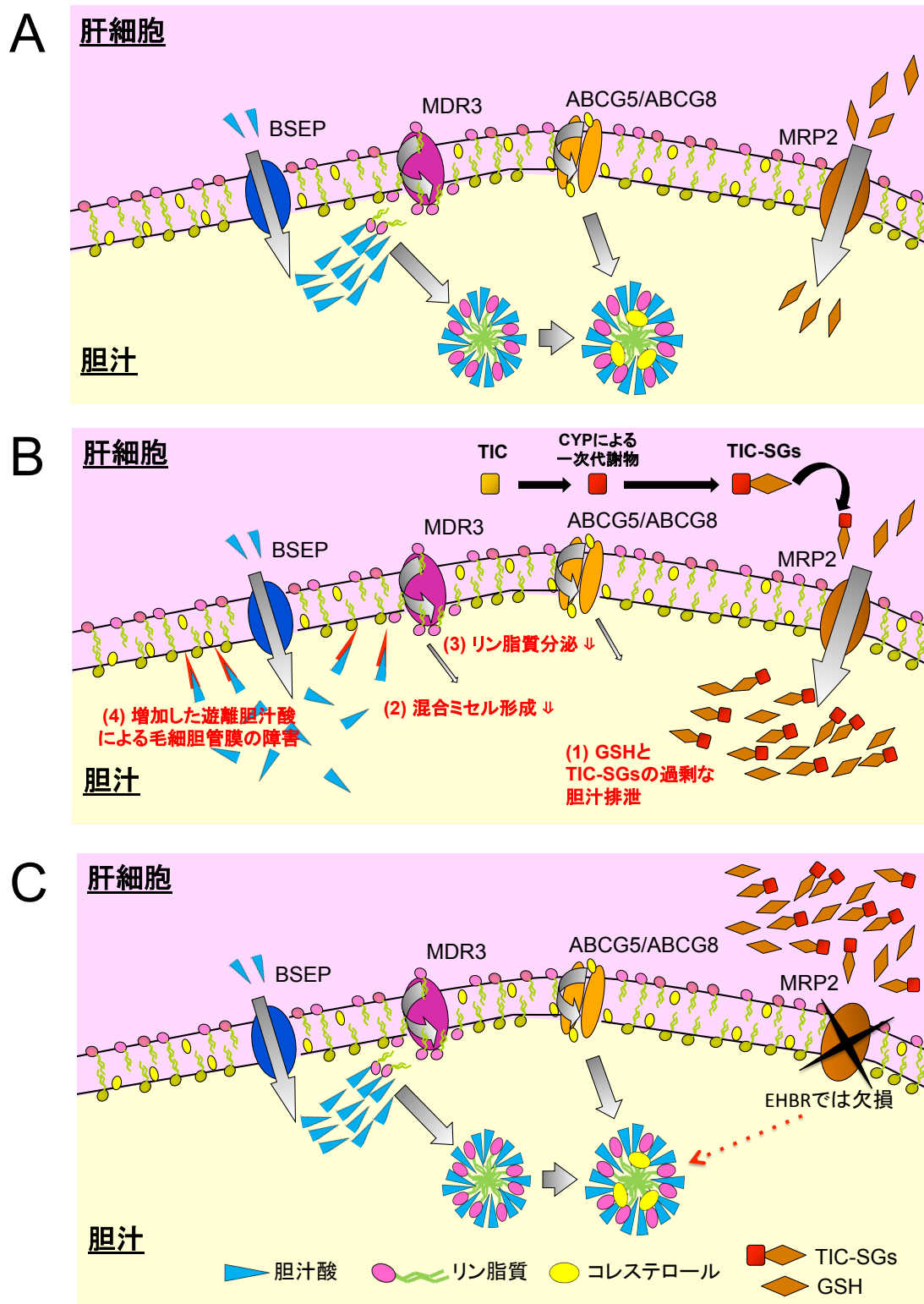


Figure 2-8 胆汁形成に与える TIC 作用の模式図

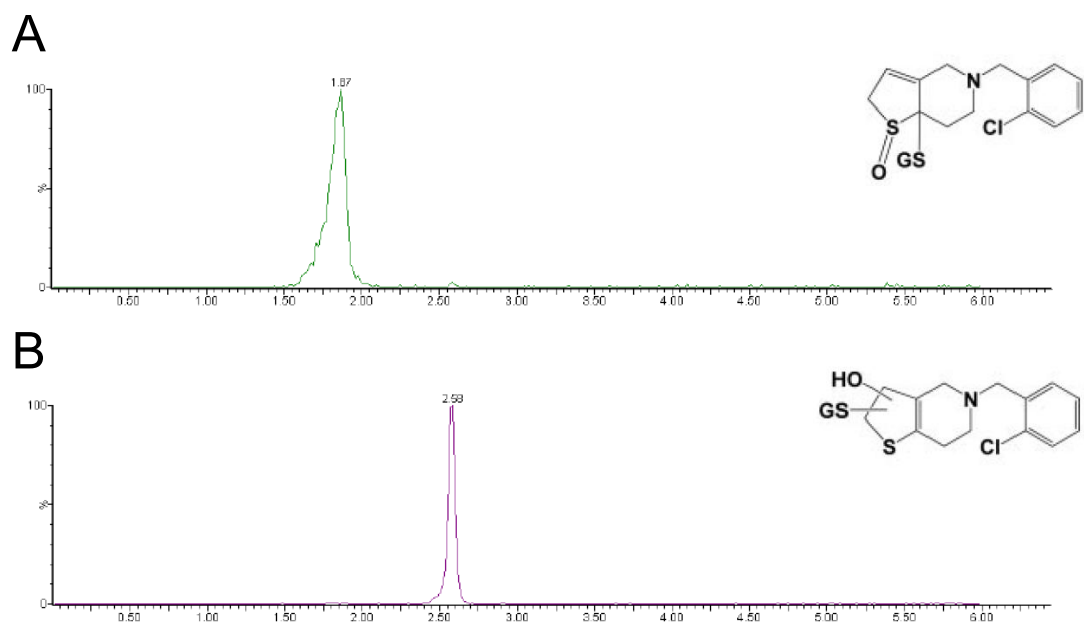
(A) チクロピジン (TIC) 非投与条件下での SD ラットの胆汁形成、(B) TIC 投与条件下での SD ラットの胆汁形成、および (C) TIC 投与条件下での Mrp2 欠損ラット (Eisai hyperbilirubinemic rat [EHBR]) の胆汁形成を模式図で示した。通常の条件下では、胆汁中に

分泌された胆汁酸はリン脂質およびコレステロールと容易に混合ミセルを形成する (A)。SD ラットに TIC が投与されると (B)、TIC は CYP 依存性の代謝を受けた後に GSH 抱合を受けて TIC-SGs を生成し、GSH とともに MRP2 によって胆汁排泄される。TIC-SGs および GSH は浸透圧作用により胆汁酸非依存性胆汁を亢進させ (1)、胆汁中胆汁酸濃度の低下をもたらすが、このような胆汁組成の変化はリン脂質-胆汁酸の混合ミセル形成に影響を与え (2)、間接的にリン脂質の胆汁分泌を抑制する (3)。さらに、胆汁中リン脂質の減少に伴い遊離胆汁酸が増加して胆管側膜に対する障害の蓄積に繋がることから (4)、TIC 誘発性胆汁うっ滞型肝障害のリスクとなると考えられる。一方、Mrp2 を欠損する EHBR に TIC を投与しても (C)、そもそも TIC-SGs の胆汁分泌量は SD ラットに比べてはるかに少ないことから、リン脂質分泌を始めとする胆汁組成の変化も見られなかった。

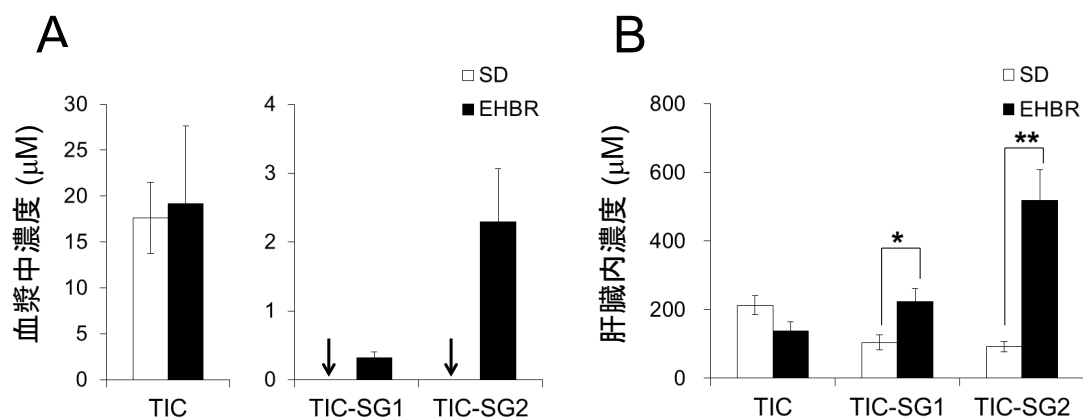
Supplemental Table S2-1

厚生労働省の発行する「重篤副作用疾患別対応マニュアル薬物性肝障害」に基づき、日本においてDILIの報告がある薬物を胆汁うっ滞型肝障害が多い順序で並べた。このマニュアルにおいて、肝障害の型は過去に報告されたDDW-J scale (Takikawa et al., 2005) の診断クライテリアに基づき分類された。

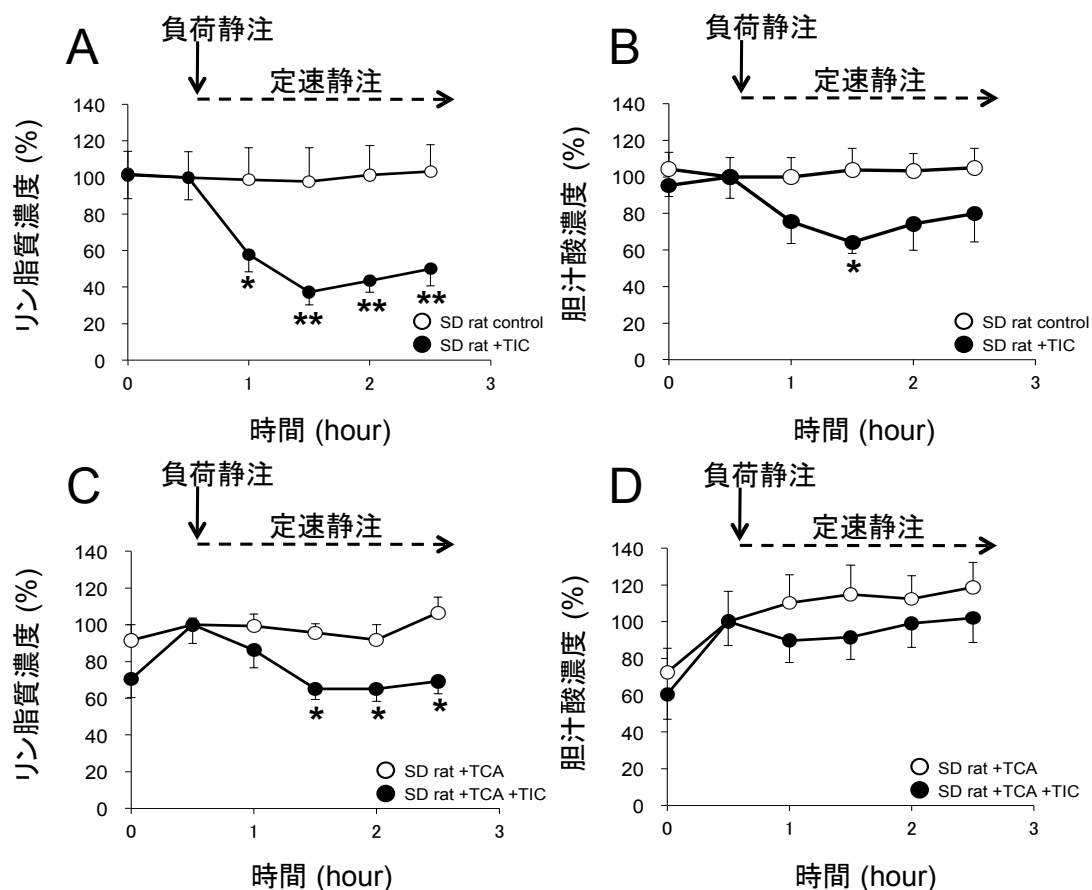
Drug	Number of cases				Cholestatic + Mixed (%)	Hepatocellular (%)
	All	Cholestatic	Mixed	Hepatocellular		
ticlopidine	52	19	19	14	73	27
tiopronin	44	19	13	12	73	27
diclofenac	41	9	16	16	61	39
thiamazole	21	8	6	7	67	33
oxatamide	20	7	9	4	80	20
aprindine	14	5	5	4	71	29
ajmaline	10	4	5	1	90	10
tranilast	19	4	10	5	74	26
famotidine	13	4	2	7	46	54
rifampicin	26	4	6	16	38	62
sulfamethoxazole	6	3	1	2	67	33
norfloxacin	8	3	2	3	63	38
ofloxacin	16	3	5	8	50	50
levofloxacin	16	3	4	7	44	44
chlorpromazine	10	2	6	2	80	20
indomethacin	8	2	3	3	63	38
nifedipine	8	2	3	3	63	38
carbamazepine	18	2	9	6	61	33
methyl dopa	5	2	1	2	60	40
glibenclamide	5	2	1	2	60	40
epalrestat	5	2	1	2	60	40
chlormadinone acetate	5	2	1	2	60	40
troglitazone	15	2	5	8	47	53
griseofulvin	5	1	2	2	60	40
valproic acid	9	1	4	4	56	44
isoniazid	17	1	7	9	47	53
acarbose	11	1	4	6	45	55
allopurinol	7	1	2	2	43	29
cimetidine	6	1	1	4	33	67
phenytoin	19	1	4	14	26	74



Supplemental Figure S2-1 ----- GSH抱合型チクロピジン代謝物(TIC-SG1, TIC-SG2)の LC-MS/MS チャート図。 (A) TIC-SG1 (587.20 > 257.10)、(B) TIC-SG2 (587.20 > 183.90)。



Supplemental Figure S2-2 ----- チクロピジン(TIC)およびGSH抱合型TIC代謝物(TIC-SG1, TIC-SG2)の血漿中濃度および肝臓内濃度。 TICをSDラットおよびEisai hyperbilirubinemic rats (EHBR) に投与した。(A) TIC投与開始後 2 hr における TIC, TIC-SG1 および TIC-SG2 の血漿中濃度。図の矢印はSDラットにおける TIC-SG1 と TIC-SG2 の濃度が定量限界以下であったことを示す ($< 0.1 \mu\text{M}$)。 (B) TIC, TIC-SG1 および TIC-SG2 の肝臓内濃度。 各データは mean \pm S.E. (N = 4)。 ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$ vs. SD rats by Student's t-test.



Supplemental Figure S2-3 ----- SDラットおよびタウロコール酸(TCA)インフュージョンSDラットにおける、胆汁中リン脂質濃度および胆汁酸濃度に対するチクロピジン(TIC)の作用。TICをSDラットに投与した。それぞれTICの投与開始時(グラフ上の0.5 hr)の値を初期値(100%)とした。(A) SDラットにおける胆汁中のリン脂質濃度。(B) SDラットにおける胆汁中の胆汁酸濃度。(C) タウロコール酸(TCA)インフュージョンSDラットにおける胆汁中のリン脂質濃度。(D)タウロコール酸(TCA)インフュージョンSDラットにおける胆汁中の胆汁酸濃度。各データは mean \pm S.E. (N = 4)。**p < 0.01 and *p < 0.05 vs. SD rats without TIC by Student's t-test.

総括

薬物誘発性肝障害は臨床において重篤になり得る副作用であり、トログリタゾンのように市場からの撤退を余儀なくされる場合もあることから、リスクの定量的評価が非常に重要である。多くは特異体質的 (idiosyncratic) に起こり遺伝的要因・免疫反応等の要因も複雑に関与するため解析は容易ではないが、本研究では胆汁うっ滞型肝障害の要因として考えられる胆汁形成に関与するトランスポーターの機能、特に PFIC2 および PFIC3 の原因遺伝子である BSEP および MDR3 に着目した。第一章では、イトラコナゾール (ITZ) による MDR3 の阻害が胆汁中リン脂質の減少をもたらし、胆汁うっ滞の重要な要因となることを示した。これは BSEP の阻害に加わる新しいメカニズムであり、構築した MDR3 機能評価系を BSEP 機能評価系とあわせて使用することは、胆汁うっ滞性薬物のリスクを予測する上で有用と考えられた。また第二章では、チクロピジン (TIC) 投与に伴う GSH および GSH 抱合型 TIC 代謝物 (TIC-SGs) の過剰な胆汁排泄によって胆汁ミセルの形成が抑制され、結果的に生じるリン脂質分泌の減少が胆汁うっ滞型肝障害の要因となるメカニズムを示した。従って、薬物誘発性胆汁うっ滞の解析においてはトランスポーターの直接阻害だけでなく、胆汁排泄された薬物・代謝物による胆汁形成の異常も考慮すべきと考えられた。

胆汁中では、胆汁酸の界面活性作用により胆管側膜からリン脂質が引き抜かれて混合ミセルを形成することから、MDR3 および BSEP の機能はクロストークしていると考えられる。また、MDR3 は細胞膜の重要な構成成分であるホスファチジルコリンの細胞膜内側から外側への移行を担うことから、機能の変動が他の細胞膜上に発現するトランスポーターの機能に影響を与える可能性もある。現在までの解析では、これらのトランスポーターを単独で発現させた *in vitro* 実験系で胆汁うっ滞性薬物の評価をおこなってきたが、本研究で構築した組換えアデノウイ

ルスは MDR3 および BSEP の共発現を可能とするため、胆汁うっ滞性薬物の臨床濃度を考慮した上で両トランスポーターの機能を統合的に解析することができる。同時に、PFIC1 の原因遺伝子であり細胞膜外側から内側へのホスファチジルセリンの移行を担う ATP8B1 についても、他の胆管側膜上トランスポーターとのクロストークを前提に胆汁うっ滞性薬物による影響を評価していくべきと考えられる。

また、薬物によるトランスポーター機能の障害を介した胆汁うっ滞のメカニズムに加えて、トランスポーターの発現量・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メカニズムも考えられる。このようなメカニズムが示唆される根拠として、エストロゲン代謝物が PI3 キナーゼ経路を介してラット Bsep および Mrp2 の内在化を引き起こすことが挙げられる (Boaglio et al., 2010)。さらに、特にアレルギー性の薬物誘発性胆汁うっ滞においては、薬物が胆管側膜を障害することで二次的にトランスポーター機能が低下する可能性が考えられ、クロルプロマジン等の薬物による胆汁うっ滞では胆管消失症候群 (Vanishing bile duct syndrome) が頻繁に見られることが報告されている (Reau and Jensen, 2008)。このようなトランスポーターに対する胆汁うっ滞性薬物の間接的な作用についても考慮がなされるべきであるが、サンドイッチ培養ヒト肝細胞においては極性が維持され毛細胆管も形成されることから胆管側膜トランスポーターの機能評価が可能であり (Liu et al., 1998)、BSEP および MDR3 の機能に対する胆汁うっ滞性薬物の作用を定量的に評価し、得られた結果と臨床における肝障害マーカー上昇との関連性を解析することが有用であると考えられる。

今後、多数の薬物の例で胆汁うっ滞に関する *in vitro* と *in vivo* の相関関係を見出すことにより、臨床濃度を考慮したリスクの定量的評価に関する方法論を示すことが可能となる。また、トランスポーター機能の個人差が薬物誘発性胆汁うっ滞への感受性に関与している可能性があり、本研究をもとに更なる解析を進めたいと考えている。さらに、本解析結果が薬物治療に役立つ可能性もあり、具体的には薬剤の選択 (トランスポーターの遺伝子診断をもとに、機能が低下している

患者に対しては胆汁うっ滞性薬物の投与を回避する等）や治療法の提唱（トランスポーターの機能を回復する治療薬等）が考えられる。将来的には、創薬における候補化合物のトランスポーターへの影響を実験系で評価することによって生理的な胆汁形成への影響を予測し、薬物副作用を回避できる候補化合物の選択に役立てていきたいと考えている。

参考文献

Adriaenssens B, Roskams T, Steger P and Van Steenberg W (2001) Hepatotoxicity related to itraconazole: report of three cases. *Acta Clin Belg* 56:364-369.

Alberti L and Alberti-Flor JJ (2002) Ticlopidine-induced cholestatic hepatitis successfully treated with corticosteroids. *Am J Gastroenterol* 97:1072.

Alfirevic A, Mills T, Carr D, Barratt BJ, Jawaid A, Sherwood J, Smith JC, Tugwood J, Hartkoorn R, Owen A, Park KB and Pirmohamed M (2007) Tacrine-induced liver damage: an analysis of 19 candidate genes. *Pharmacogenet Genomics* 17:1091-1100.

Ariyoshi N, Iga Y, Hirata K, Sato Y, Miura G, Ishii I, Nagamori S and Kitada M (2010) Enhanced susceptibility of HLA-mediated ticlopidine-induced idiosyncratic hepatotoxicity by CYP2B6 polymorphism in Japanese. *Drug Metab Pharmacokinet* 25:298-306.

Boaglio AC, Zucchetti AE, Sánchez Pozzi EJ, Pellegrino JM, Ochoa JE, Mottino AD, Vore M, Crocenzi FA, Roma MG (2010) Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway is involved in estradiol 17 β -D-glucuronide-induced cholestasis: complementarity with classical protein kinase C. *Hepatology* 52:1465-1476.

Boyer JL, Ng OC, Ananthanarayanan M, Hofmann AF, Schteingart CD, Hagenbuch B, Stieger B and Meier PJ (1994) Expression and characterization of a functional rat liver Na⁺ bile acid cotransport system in COS-7 cells. *Am J Physiol* 266:G382-387.

Byrne JA, Strautnieks SS, Mieli-Vergani G, Higgins CF, Linton KJ and Thompson RJ (2002) The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors. *Gastroenterology* 123:1649-1658.

Cava F, Gonzalez J, Gonzalez-Buitrago JM, Muriel C and Jimenez R (1991) Inhibition of biliary cholesterol and phospholipid secretion by cefmetazole. The role of vesicular transport and of canalicular events. *Biochem J* 275:591-595.

Deng X, Luyendyk JP, Ganey PE and Roth RA (2009) Inflammatory stress and idiosyncratic hepatotoxicity: hints from animal models. *Pharmacol Rev* 61:262-282.

Fattinger K, Funk C, Pantze M, Weber C, Reichen J, Stieger B and Meier PJ (2001) The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions. *Clin Pharmacol Ther* 69:223-231.

Fouassier L, Kinnman N, Lefevre G, Lasnier E, Rey C, Poupon R, Elferink RP and Housset C (2002) Contribution of mrp2 in alterations of canalicular bile formation by the endothelin antagonist bosentan. *J Hepatol* 37:184-191.

Funk C, Ponelle C, Scheuermann G and Pantze M (2001) Cholestatic potential of troglitazone as a possible factor contributing to troglitazone-induced hepatotoxicity: *in vivo* and *in vitro* interaction at the canalicular bile salt export pump (Bsep) in the rat. *Mol Pharmacol* 59:627-635.

Gallardo-Quesada S, Luelmo-Aguilar J and Guanyabens-Calvet C (1995) Hepatotoxicity associated with itraconazole. *Int J Dermatol* 34:589.

Gerloff T, Stieger B, Hagenbuch B, Madon J, Landmann L, Roth J, Hofmann AF and Meier PJ (1998) The sister of P-glycoprotein represents the canalicular bile salt export pump of mammalian liver. *J Biol Chem* 273:10046-10050.

Greany JJ, Jr., Hess DA and Mahoney CD (1993) Ticlopidine-induced cholestatic jaundice. *Clin Pharm* 12:398-399.

Groen A, Romero MR, Kunne C, Hoosdally SJ, Dixon PH, Wooding C, Williamson C, Seppen J, Van den Oever K, Mok KS, Paulusma CC, Linton KJ and Oude Elferink RP (2011) Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity. *Gastroenterology*

141:1927-1937.

Grimm IS and Litynski JJ (1994) Severe cholestasis associated with ticlopidine. *Am J Gastroenterol* 89:279-280.

Gunawan BK and Kaplowitz N (2007) Mechanisms of drug-induced liver disease. *Clin Liver Dis* 11:459-475, v.

Gupta S, Kim J and Gollapudi S (1991) Reversal of daunorubicin resistance in P388/ADR cells by itraconazole. *J Clin Invest* 87:1467-1469.

Hann SK, Kim JB, Im S, Han KH and Park YK (1993) Itraconazole-induced acute hepatitis. *Br J Dermatol* 129:500-501.

Hirata K, Takagi H, Yamamoto M, Matsumoto T, Nishiya T, Mori K, Shimizu S, Masumoto H and Okutani Y (2008) Ticlopidine-induced hepatotoxicity is associated with specific human leukocyte antigen genomic subtypes in Japanese patients: a preliminary case-control study. *Pharmacogenomics J* 8:29-33.

Horikawa M, Kato Y, Tyson CA and Sugiyama Y (2003) Potential cholestatic activity of various therapeutic agents assessed by bile canalicular membrane vesicles isolated from rats and humans. *Drug Metab Pharmacokinet* 18:16-22.

Iida N, Takara K, Ohmoto N, Nakamura T, Kimura T, Wada A, Hirai M, Sakaeda T and Okumura K (2001) Reversal effects of antifungal drugs on multidrug resistance in MDR1-overexpressing HeLa cells. *Biol Pharm Bull* 24:1032-1036.

Ikebuchi Y, Takada T, Ito K, Yoshikado T, Anzai N, Kanai Y and Suzuki H (2009) Receptor for activated C-kinase 1 regulates the cellular localization and function of ABCB4. *Hepatol Res* 39:1091-1107.

Iqbal M, Goenka P, Young MF, Thomas E and Borthwick TR (1998) Ticlopidine-induced cholestatic hepatitis: report of three cases and review of the literature. *Dig Dis Sci* 43:2223-2226.

Kaplowitz N (2005) Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov*

4:489-499.

Lavrijssen AP, Balmus KJ, Nugteren-Huying WM, Roldaan AC, van't Wout JW and Stricker BH (1992) Hepatic injury associated with itraconazole. *Lancet* 340:251-252.

Liu X1, Brouwer KL, Gan LS, Brouwer KR, Stieger B, Meier PJ, Audus KL, LeCluyse EL. Partial maintenance of taurocholate uptake by adult rat hepatocytes cultured in a collagen sandwich configuration. *Pharm Res* 15:1533-1539.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

Mambelli E, Mancini E, Casanova S, Di Felice A and Santoro A (2007) Severe ticlopidine-induced cholestatic syndrome. *Blood Purif* 25:441-445.

Mita S, Suzuki H, Akita H, Hayashi H, Onuki R, Hofmann AF and Sugiyama Y (2006) Inhibition of bile acid transport across Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide (SLC10A1) and bile salt export pump (ABCB 11)-coexpressing LLC-PK1 cells by cholestasis-inducing drugs. *Drug Metab Dispos* 34:1575-1581.

Mita S, Suzuki H, Akita H, Stieger B, Meier PJ, Hofmann AF and Sugiyama Y (2005) Vectorial transport of bile salts across MDCK cells expressing both rat Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide and rat bile salt export pump. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G159-167.

Morita SY, Kobayashi A, Takanezawa Y, Kioka N, Handa T, Arai H, Matsuo M and Ueda K (2007) Bile salt-dependent efflux of cellular phospholipids mediated by ATP binding cassette protein B4. *Hepatology* 46:188-199.

Moschetta A, vanBerge-Henegouwen GP, Portincasa P, Palasciano G, Groen AK and van Erpecum KJ (2000) Sphingomyelin exhibits greatly enhanced protection compared with egg yolk phosphatidylcholine against detergent bile salts. *J Lipid Res* 41:916-924.

Nivoix Y, Leveque D, Herbrecht R, Koffel JC, Beretz L and Ubeaud-Sequier G

(2008) The enzymatic basis of drug-drug interactions with systemic triazole antifungals. *Clin Pharmacokinet* 47:779-792.

Oude Elferink RP and Paulusma CC (2007) Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch* 453:601-610.

Oude Elferink RP, Paulusma CC and Groen AK (2006) Hepatocanalicular transport defects: pathophysiologic mechanisms of rare diseases. *Gastroenterology* 130:908-925.

Paulusma CC, Bosma PJ, Zaman GJ, Bakker CT, Otter M, Scheffer GL, Scheper RJ, Borst P and Oude Elferink RP (1996) Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science* 271:1126-1128.

Rahman I, Kode A and Biswas SK (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 1:3159-3165.

Reau NS, Jensen DM. Vanishing bile duct syndrome. *Clin Liver Dis* 12:203-217.

Shimizu S, Atsumi R, Nakazawa T, Fujimaki Y, Sudo K and Okazaki O (2009) Metabolism of ticlopidine in rats: identification of the main biliary metabolite as a glutathione conjugate of ticlopidine S-oxide. *Drug Metab Dispos* 37:1904-1915.

Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA and et al. (1993) Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75:451-462.

Smith AJ, Timmermans-Hereijgers JL, Roelofsen B, Wirtz KW, van Blitterswijk WJ, Smit JJ, Schinkel AH and Borst P (1994) The human MDR3 P-glycoprotein promotes translocation of phosphatidylcholine through the plasma membrane of fibroblasts from transgenic mice. *FEBS Lett* 354:263-266.

Smith AJ, van Helvoort A, van Meer G, Szabo K, Welker E, Szakacs G, Varadi A,

Sarkadi B and Borst P (2000) MDR3 P-glycoprotein, a phosphatidylcholine translocase, transports several cytotoxic drugs and directly interacts with drugs as judged by interference with nucleotide trapping. *J Biol Chem* 275:23530-23539.

Somchit N, Norshahida AR, Hasiah AH, Zuraini A, Sulaiman MR and Noordin MM (2004) Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and fluconazole in rats: a comparative *in vivo* study. *Hum Exp Toxicol* 23:519-525.

Song JC and Deresinski S (2005) Hepatotoxicity of antifungal agents. *Curr Opin Investig Drugs* 6:170-177.

Srebrnik A, Levto S, Ben-Ami R and Brenner S (2005) Liver failure and transplantation after itraconazole treatment for toenail onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 19:205-207.

Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick GA and Meier PJ (2000) Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver. *Gastroenterology* 118:422-430.

Stieger B, Meier Y and Meier PJ (2007) The bile salt export pump. *Pflugers Arch* 453:611-620.

Takara K, Tanigawara Y, Komada F, Nishiguchi K, Sakaeda T and Okumura K (1999) Cellular pharmacokinetic aspects of reversal effect of itraconazole on P-glycoprotein-mediated resistance of anticancer drugs. *Biol Pharm Bull* 22:1355-1359.

Takikawa H, Sano N, Wako Y and Yamanaka M (1993) Effects of organic anions and bile acids on biliary lipid excretion in hyperbilirubinemic mutant Sprague-Dawley rats. *J Hepatol* 17:247-252.

Takikawa H and Onji M (2005) A proposal of the diagnostic scale of drug-induced liver injury. *Hepatol Res* 2:250-251.

van Helvoort A, Smith AJ, Sprong H, Fritzsche I, Schinkel AH, Borst P and van Meer G (1996) MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while

MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87:507-517.

Verkade HJ, Wolbers MJ, Havinga R, Uges DR, Vonk RJ and Kuipers F (1990) The uncoupling of biliary lipid from bile acid secretion by organic anions in the rat. *Gastroenterology* 99:1485-1492.

Wagner H, Hoerhammer L and Wolff P (1961) Thin layer chromatography of phosphatides and glycolipids. *Biochem Z* 334:175-184.

Wang EJ, Casciano CN, Clement RP and Johnson WW (2003) Fluorescent substrates of sister-P-glycoprotein (BSEP) evaluated as markers of active transport and inhibition: evidence for contingent unequal binding sites. *Pharm Res* 20:537-544.

Yamaguchi H, Enomoto S, Kaku M, Sakamaki H, Tanaka K and Yoshida M (2006) An open randomized parallel-comparison study of itraconazole oral solution versus itraconazole capsules in treatment of patients with oropharyngeal candidiasis. *Jpn J Chemother* 54:18-31.

Yamano K, Yamamoto K, Kotaki H, Sawada Y and Iga T (1999) Quantitative prediction of metabolic inhibition of midazolam by itraconazole and ketoconazole in rats: implication of concentrative uptake of inhibitors into liver. *Drug Metab Dispos* 27:395-402.

Yang KH, Choi YH, Lee U, Lee JH and Lee MG (2009) Effects of cytochrome P450 inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous furosemide in rats: involvement of CYP2C11, 2E1, 3A1 and 3A2 in furosemide metabolism. *J Pharm Pharmacol* 61:47-54.

Yoshikado T, Takada T, Yamamoto T, Yamaji H, Ito K, Santa T, Yokota H, Yatomi Y, Yoshida H, Goto J, Tsuji S, Suzuki H (2011) Itraconazole-induced cholestasis: involvement of the inhibition of bile canalicular phospholipid translocator MDR3/ABCB4. *Mol Pharmacol*. 79:241-250.

Yoshikado T, Takada T, Yamamoto H, Tan JK, Ito K, Santa T, Suzuki H (2013)

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.* 83:552-562.

謝 辞

本学位論文執筆にあたり、直接指導をいただきました東京大学医学部附属病院薬剤部研究室の高田龍平先生と鈴木洋史先生に深謝致します。また、原著論文執筆の共著者である辻省次先生、後藤順先生、矢富裕先生、横田浩充先生、吉田晴彦先生に感謝致します。さらに、原著論文の共著者であり、博士過程中退後に特任助教として配属された教室でもお世話になりました三田智文先生に感謝致します。最後に、原著論文の共著者であるとともに、東京大学医学部附属病院薬剤部研究室においてご指導いただきました伊藤晃成先生と山本武人先生、実験等でお世話になりました山道寛子さん、山本英明さん、Tan Jeng Kae さんに感謝致します。