

# 論文の内容の要旨

## 論文題目 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

氏名 吉門 崇

### 【序論】

#### 1) 胆汁形成におけるトランスポーターの役割

肝臓の重要な生理機能の一つである胆汁形成において、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主要な役割を担っている。Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) によって胆汁中に分泌される胆汁酸は界面活性作用を有しており、Multidrug resistance 3 P-glycoprotein (MDR3/ABCB4) によって分泌されるリン脂質、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とともに胆汁中で混合ミセルを形成する(胆汁酸依存性胆汁)。一方、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・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。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。BSEP の機能低下は肝臓内への胆汁酸の蓄積をもたらすことで肝細胞に障害を与えられ、また、MDR3 の機能低下は胆汁中リン脂質の減少を介して胆汁ミセルの形成を障害し、胆汁中遊離胆汁酸を増加させることで胆管側膜の破壊を誘発すると考えられている。

#### 2) 薬物誘発性胆汁うっ滞～BSEP と MDR3 の関与～

薬物誘発性肝障害 (DILI: Drug-induced liver injury) は臨床において重大な問題となり得る副作用であり、主に血中の  $\gamma$ -GTP、ALP、ビリルビンの上昇が観察される胆汁うっ滞型、ALT と 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に分類される。上述した PFIC 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 の障害の可能性が考えられる。BSEP の障害を介したメカニズムについては、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<sup>+</sup>/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* 障害実験の結果から提唱されてきた。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 に対する障害作用が検

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 PFIC type 3 (PFIC3) の病態では共通して  $\gamma$ -GTP の上昇が見られるのに対して、BSEP 機能低下による PFIC type 2 (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いた。

本研究では、臨床における薬物濃度を考慮し、MDR3 の阻害を介した胆汁うっ滞性薬物の候補について *in vitro* および *in vivo* で検討を行うことにより、薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズムを解析することを目的とした。

## 【研究内容】

### 1) イトラコナゾール (ITZ) 誘発性胆汁うっ滞機構の解析

**東大病院患者における ITZ 血漿中濃度および肝障害マーカーの上昇:** 東京大学医学部附属病院薬剤部では、同検査部・臨床ゲノム診断部・消化器内科と協力して DILI の発症症例を蓄積し、薬剤の血漿中濃度測定と遺伝子解析による原因薬剤の特定および遺伝的要因の推察とともに、薬剤を用いた基礎研究を実施することによって、DILI の発症メカニズムを解明し個別化薬物治療法を提唱することを目的として研究を行った。薬剤の投与期間および肝障害マーカー上昇のタイミングをもとに、抗真菌薬 ITZ が原因と考えられる胆汁うっ滞型肝障害の症例を3例見出した。このうち2例においては、肝障害発症前より ITZ の血漿中濃度(トラフ値)が日本人における平均的な濃度の約 3-4 倍に上昇しており、肝毒性との関連性が示唆された。

### **ITZ による胆汁中リン脂質低下メカニズムの解析 / 新規 MDR3 機能評価系の構築:**

ITZ を Sprague-Dawley (SD) ラットに投与し、胆汁分泌に与える影響を検討した。ITZ が原因と考えられる胆汁うっ滞型肝障害の症例における最大血漿中濃度( $C_{max}$ )は  $10 \mu M$  程度と予想され、これと同様になるように SD ラットに負荷静注・定速静注したところ、コントロール群に比べて ITZ 投与群では胆汁中へのリン脂質の分泌量が大きく減少していた。同時に、胆汁中へのコレステロール分泌量も大きく減少していたが、胆汁中におけるコレステロールの溶解には胆汁酸・リン脂質との混合ミセル形成が必要であることから、ITZ 投与によるリン脂質分泌の減少に起因するものと考えられた。

続いて、ヒト MDR3 の cDNA を組み込んだ組換えアデノウイルスを極性細胞であるブタ腎尿管由来 LLC-PK1 細胞に感染させて発現系を構築し、ITZ による阻害作用を検討した。MDR3 が基質とするホスファチジルコリン (PC) の前駆体となるコリンの RI 標識体 ( $[^{14}C]$ -コリン) を添加した後、細胞外に排出される  $[^{14}C]$ -PC を測定する新規 *in vitro* 機能評価系において、ITZ は MDR3 に対して  $0.2 \mu M$  という低濃度から阻害作用を示した。先の *in vivo* 実験におけるラット肝臓中の ITZ 非結合形濃度は約  $0.3 \mu M$  と計算されたことから、MDR3 阻害による胆汁中リン脂質減少の可能性を支持する結果となった。一方、胆汁酸の排泄トランスポーターである BSEP と取り込み側トランスポーターである  $Na^+$ /taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP/SLC10A1) の組換えアデノウイルスを用いて共発現系を構築し、胆汁酸 ( $[^3H]$ タ

ウロコール酸)の経細胞輸送を評価する実験において、ITZはBSEPに対して顕著な阻害作用を示さなかった。前述した東大病院の2症例ではITZの血漿中濃度が平均的な治療濃度の約3-4倍に上昇しており、この濃度条件をもとに *in vivo* および *in vitro* における解析を行ったことから、高濃度のITZによるMDR3の阻害が胆汁中リン脂質の減少をもたらし、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。

**マイクロアレイを用いた MDR3 遺伝子多型の解析：** ITZ 誘発性胆汁うっ滞の症例で MDR3 の発現量・活性に影響を与える遺伝子変異が存在する場合、ITZ による阻害の影響を受けやすい可能性があるため、東大病院の患者の血漿より DNA を採取し、薬物代謝・トランスポーター遺伝子解析マイクロアレイを実施した。ITZ の血漿中濃度が上昇した2人の患者に共通する MDR3の遺伝子多型が4つ見られたが、2つがコード領域のサイレント変異、残り2つは上流域の変異であった。また、ITZ の血漿中濃度を決定付ける要因である CYP3A4 の遺伝子多型についても注目したが、いずれの患者でも野生型 (CYP3A4\*1/\*1) が検出されたことから、ITZ 血漿中濃度上昇の原因とは考えられなかった。

**小括：** 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。

## 2) チクロピジン(TIC)誘発性胆汁うっ滞機構の解析

**TICによる胆汁うっ滞型肝障害の臨床報告と *in vivo* 実験における胆汁中リン脂質の低下：** 厚生労働省の薬物性肝障害マニュアルで報告のある症例数をもとに、胆汁うっ滞型肝障害の比率が高いと考えられる抗血小板薬チクロピジン(TIC)に着目した。ヒトにおけるTICの平均的な血漿中濃度は  $C_{max}$  として約  $10 \mu M$  (500 mg 投与)と報告されており、TICをSDラットに負荷静注・定速静注することにより血漿中濃度を  $18 \mu M$  とした実験において、コントロール群に比べてTIC投与群では胆汁中へのリン脂質の分泌量が著しく減少した。一方、*in vitro* におけるMDR3機能評価系を用いた検討では、臨床で予想されるTICの血漿中非結合形濃度が  $0.2 \mu M$  であるのに対し、 $20 \mu M$  という高濃度に設定しないと阻害作用が見られなかったことから、TIC親化合物によるMDR3阻害は主要なメカニズムではないと考えられた。

**TIC代謝物による胆汁形成変動メカニズムの解析：** TICは肝臓においてCYP代謝を受けた後にグルタチオン(GSH)抱合を受ける。CYPの非特異的阻害剤であるSKF-525Aを前投与したSDラットでTICの作用を検討したところ、TIC投与に伴うリン脂質分泌量の減少は見られなかったことから、TICの代謝物が関与する可能性が示唆された。また、先のTIC投与ラットにおいては胆汁流量の増加が観察されたが胆汁酸分泌量には変化が無かったことから、GSHおよびGSH抱合型TIC代謝物(TIC-SGs)の過剰な胆汁排泄に伴う胆汁酸非依存性胆汁の亢

進が示唆された。一方、MRP2 欠損ラット(EHBR)においては SD ラットで見られた TIC 投与に伴う胆汁分泌の変化(GSH および TIC-SGs 胆汁排泄の亢進と胆汁流量の増加、リン脂質分泌の減少)が見られなかったことから、MRP2 による過剰な GSH および TIC-SGs の胆汁排泄をきっかけとして、リン脂質の胆汁分泌が減少する可能性が示唆された。さらに、MRP2 発現細胞膜小胞(ベシクル)を用いた輸送実験により、TIC-SGs が MRP2 の基質となることを示した。

TIC 投与に伴う胆汁中リン脂質減少の原因を明らかにするために、ラット胆汁中から TIC-SGs を回収後に HPLC で精製したものをを用いて MDR3 機能評価系における阻害実験を行ったが、TIC-SGs は MDR3 に対する阻害作用を示さなかった。さらに、リン脂質の正常な胆汁分泌には MDR3 による輸送過程だけでなく、胆汁酸の界面活性作用によって胆管側膜から引き抜かれて混合ミセルを形成する過程も重要であることから、胆汁中に過剰排泄された GSH および TIC-SGs がミセル形成に影響を与える可能性を考えた。SD ラットに胆汁酸の一種であるタウロコール酸を定速静注し負荷する実験を行ったところ、TIC 投与に伴う胆汁中リン脂質の減少が緩和された。従って、TIC 投与ラットにおける胆汁中へのリン脂質分泌の減少は MDR3 の直接的な阻害を介したのではなく、MRP2 による GSH と TIC-SGs の胆汁排泄亢進により胆汁酸-リン脂質混合ミセルの形成が滞ったことが原因であることが示唆された。

**TIC 誘発性肝障害の検討:** SD ラットおよび EHBR における TIC 誘発性肝障害の発症を比較するために、肝障害誘発の下地となる炎症を誘発することで知られる lipopolysaccharide (LPS) で前処置した両ラット種に TIC を投与する実験を行ったところ、SD ラットにおいては TIC の投与後 4 時間で ALT および直接ビリルビンの顕著な上昇が見られたが、EHBR では見られなかった。このことから、TIC 誘発性肝障害の発症においても、MRP2 による GSH および TIC-SGs の胆汁排泄が関与していると考えられた。

**小括:** TIC 投与に伴う GSH および 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。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。

## 【総括】

ITZ と TIC という二種類の胆汁うっ滞性薬物をモデルとし解析を行うことによって、MDR3 による胆汁中へのリン脂質分泌の阻害を介したメカニズムと、胆汁排泄された代謝物による胆汁形成の異常というメカニズムを新たに示した。これらは、従来から考えられている BSEP の阻害によるメカニズムと合わせて考慮されるべきである。将来的にはトランスポーターの機能を実験系で評価した上で、生理的な胆汁形成を数理モデルにより予測し、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定量的なリスク評価に発展させていきたいと考えている。