

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 吉門 崇

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ると考えられ、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。一方、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 の阻害の可能性が考えられる。BSEP の阻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 Na^+ /taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) の共発現細胞や細胞膜小胞を用いた *in vitro* 阻害実験の結果から提唱されてきたが、臨床で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いる例が多数であった。

このような背景のもと、申請者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誘発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新規メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

東京大学医学部附属病院において、薬剤の投与期間および肝障害マーカーの上昇時期をもとに、抗真菌薬イトラコナゾール (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。まず、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})と同等になるように SD ラットに静注したところ、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分泌が著しく減少することを見出した。

続いて、ヒト MDR3 に対する ITZ の阻害作用を検討するために、申請者は組換えアデノウイルスを用いた MDR3 発現系を作成し、MDR3 基質であ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 ($[^{14}\text{C}]$ -コリン) を添加した後、細胞外に排出される $[^{14}\text{C}]$ -PC を測定する新規 *in vitro* 機能評価系を構築した。結果として、ITZ は MDR3 に対して $0.2 \mu\text{M}$ という低濃度で阻害作用を示したが、*in vivo* 実験におけるラット肝臓中の ITZ 非結合形濃度は約 $0.3 \mu\text{M}$ 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を支持する結果となった。一方、BSEP と NTCP の共発現系を作成し、胆汁酸 ($[^3\text{H}]$ タウロコール酸) の経細胞輸送を評価したところ、ITZ は BSEP に対して顕著な阻害作用を示さなかった。以上から、東大病院の2症例で平均的な治療

濃度の約 3-4 倍に上昇した ITZ が、MDR3 の障害を介して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。

さらに申請者は、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抗血小板薬チクロピジン (TIC) に着目した。ヒトにおける血漿中濃度と対応する TIC を SD ラットに静注したところ、コントロール群に比べて TIC 投与群では胆汁流量が増加するとともに、胆汁中へのリン脂質分泌が著しく減少していた。一方、*in vitro* における MDR3 機能評価系を用いた検討では、臨床における TIC 血漿中非結合形濃度の約 100 倍で障害作用が見られたが、障害濃度の乖離を考慮すると主要なメカニズムではないと考えられた。TIC は肝臓において Cytochrome P-450 (CYP) による代謝と続くグルタチオン (GSH) 抱合により消失するため、CYP の非特異的障害剤である 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、代謝物が関与する可能性が示唆された。また、TIC 投与により SD ラットでは GSH および GSH 抱合型 TIC 代謝物 (TIC-SGs) の著しい胆汁排泄が観察されたことから、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 による胆汁形成の変化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。

TIC 投与に伴う胆汁中リン脂質減少の機構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 で精製して MDR3 機能評価系における障害実験を行ったが、TIC-SGs は MDR3 に対する障害作用を示さなかった。一方、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、SD ラットに胆汁酸の一種であるタウロコール酸を投与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 投与による胆汁中リン脂質減少は MDR3 の直接的障害によるものではなく、MRP2 による GSH と TIC-SGs の胆汁排泄亢進による胆汁酸-リン脂質混合ミセル形成への影響が考えられた。申請者はさらに、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) を投与後に TIC を投与する実験を行ったところ、SD ラットにおいては肝障害マーカー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 誘発性肝障害の要因の一つとして MRP2 による GSH および TIC-SGs の胆汁排泄を介したメカニズムが考えられた。

以上、申請者は ITZ および TIC という二種類の胆汁うっ滞誘発性薬物をモデルとして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障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示したことから、従来より知られている BSEP 障害を介したメカニズムと合わせて検討がなされるべきである。以上の成果は、トランスポーターの機能を実験系で評価した上で胆汁形成への影響を予測し、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応用可能な手法を提案するものであり、申請者の業績は博士(薬学)の授与にふさわしいものと判断する。