

胆汁酸依存的に引き起こされる薬剤性肝障害に関する研究

2018年

大日本住友製薬株式会社

荻村 栄一郎

## 第一章

胆汁酸依存的な薬剤性肝毒性検出方法の確立

## 第二章

胆汁酸依存的肝毒性と薬物代謝に関する検討

## 第三章

胆汁酸抱合酵素阻害に着目した新たな肝毒性メカニズムの検討

2018年

大日本住友製薬株式会社

荻村 栄一郎

## 【目次】

略語	4
序論	5
第一章 胆汁酸依存的な薬剤性肝毒性検出方法の確立	
緒言	8
方法	10
結果	14
考察	19
小括	21
第二章 胆汁酸依存的肝毒性と薬物代謝に関する検討	
緒言	23
方法	25
結果	28
考察	35
小括	38
第三章 胆汁酸抱合酵素阻害に着目した新たな肝毒性メカニズムの検討	
緒言	40

方法	41
結果	46
考察	55
小括	59
総括	60
展望	63
引用文献	65
発表論文	74
謝辞	75
審査委員	76

**【略語】**

1-ABT: 1-aminobenzotriazole

BAL: bile acid-CoA ligase

BAT: bile acid-CoA: amino acid N-acyltransferase

BSEP: Bile salt export pump

CDCA: chenodeoxycholic acid

CYP : cytochrome P450

DCA: deoxycholic acid

DILI : drug-induced liver injury

GCDC: glycochenodeoxycholic acid

GDCA: glycodeoxycholic acid

LCA: lithocholic acid

LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LDH : lactate dehydrogenase

MRP: Multidrug resistance-associated protein

NAPQI : N-acetyl-p-benzoquinone imine

NTCP : Na<sup>+</sup>-dependent taurocholate cotransporting polypeptide

OATP: organic anion-transporting peptide

PFIC2: progressive familial intrahepatic cholestasis type 2

SCHs: Sandwich-cultured hepatocytes

## 【序論】

薬剤性肝障害 (drug-induced liver injury: DILI)は新薬候補化合物の開発中止要因となるだけでなく、薬剤の市場からの撤退につながる大きな原因として知られている。そのため、新たな毒性評価系の構築や毒性メカニズムの解明は新薬開発において重要である。

肝障害の誘発メカニズムには様々なものが報告されており、その中の一つには胆汁酸の肝臓内蓄積によるものがある。胆汁酸の中には毒性の高い胆汁酸が存在しており、胆汁酸が細胞内に蓄積することで肝細胞毒性を引き起こす。Bile salt export pump (BSEP) は肝胆管側膜に発現する胆汁酸トランスポーターの一つであり、肝臓内から胆汁中への胆汁酸排泄を担う生理的に重要なトランスポーターである。BSEP 機能障害は肝臓内胆汁酸蓄積を起こすことから、毒性標的分子として注目されている。しかしながら、薬剤による BSEP 機能障害が胆汁酸依存的に肝細胞毒性を示すのか検証した報告は無く、また胆汁酸依存的に引き起こされる肝毒性を定量的に評価出来る系も報告されていない。そこで本研究では、胆汁酸蓄積によって引き起こされる肝毒性に着目し、新たな毒性評価系の構築を行った。また、BSEP 阻害が疑われる薬物の中には、代謝物に強い BSEP 阻害作用を示すものがあり、胆汁酸依存毒性の一部に薬物代謝が深く関係していることも推測される。そのため、本評価系を用いて胆汁酸依存毒性の発現と薬物代謝の関係についてラット及びヒトの肝細胞を用いて検討を実施した。

胆汁酸蓄積に起因する肝毒性についてはBSEPなどの胆汁酸トランスポーターを介したメカニズムについて多くの研究が行われてきたが、トランスポーター以外の毒性メカニズムについては報告が少ない。トログリタゾンは最初のチアゾリジン系糖尿病治療薬であるが、重篤な特異体質性肝障害が問題となり、2000年に市場より撤退した。トログリタゾンは強いBSEP阻害作用を持つことが知られ、肝毒性発現メカニズムの一つとして知られている。一方、同じチアゾリジン系糖尿病治療薬であるピオグリ

タゾン は 1999 年に承認された後、世界中で使用されている薬剤である。興味深いことに、ピオグリタゾンはトログリタゾンと同様に **BSEP** を阻害し、その阻害活性はトログリタゾンより 10 倍程度強いことが知られている。しかし、ピオグリタゾン服用患者では重篤な肝障害は報告されておらず、現在も臨床で使用されている。このことから、胆汁酸蓄積による肝障害発現は **BSEP** 以外のメカニズムも関与していると考えられ、胆汁酸トランスポーター以外の検討も必要と考えられる。胆汁酸にはアミノ酸抱合を受けた抱合型と抱合を受けていない非抱合型が存在しているが、非抱合型胆汁酸は抱合型に比べ脂溶性が高く、毒性も強いことが知られている。そのため、薬物による胆汁酸のアミノ酸抱合阻害は脂溶性胆汁酸の増加につながり毒性要因になりうるのではないかと考えられた。そこで、本研究ではトログリタゾン及びピオグリタゾンをモデル化合物に用い、肝毒性と薬物によるアミノ酸抱合阻害の関係について検討を行った。

## 第一章

### 胆汁酸依存的な薬剤性肝毒性検出方法の確立

## 【緒言】

薬剤性肝障害 (drug-induced liver injury: DILI) は開発化合物の開発中止や市場からの撤退につながる主たる原因として知られている [1, 2]。そのため、DILI の誘発メカニズムの解明や DILI 評価系の構築は新薬開発において重要な課題である。

近年、DILI 誘発メカニズムの一つとして、胆汁酸トランスポーター阻害による肝臓内への胆汁酸蓄積が提唱されている [3, 4, 5, 6, 7]。肝臓でコレステロールから合成される胆汁酸は脂溶性ビタミンや脂質の吸収に関わり、種々の栄養素の消化・吸収に重要な物質として知られている。しかしながら、胆汁酸の中にはグリコケノデオキシコール酸 (glycochenodeoxycholic acid: GCDCA)、リトコール酸 (lithocholic acid: LCA)、デオキシコール酸 (deoxycholic acid: DCA) といった毒性の高い胆汁酸が存在し、アポトーシスやミトコンドリア毒性を引き起こす事で肝毒性を生じる事が報告されている [8, 9, 10, 11]。そのため、肝臓内の胆汁酸レベルは複数のメカニズムによって厳密に制御されている。肝細胞の胆管側膜に発現する Adenosine triphosphate -binding cassette transporter の一種である Bile salt export pump (BSEP) は肝細胞内から胆汁中への胆汁酸排泄を担い、肝臓内の胆汁酸レベルを制御する生理的に重要なトランスポーターである [12]。BSEP 遺伝子の変異は progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2) の発症と関係する事が知られており、PFIC2 患者では肝細胞内に胆汁酸が高度に蓄積し、生後早期に重篤な肝障害をきたす [13]。そのため、薬物等による BSEP 機能阻害は DILI 発症の要因になりうると考えられる。

Morgan らは数百の化合物について BSEP 阻害活性を評価し、そのうちの 25% が 100  $\mu\text{M}$  以下の  $\text{IC}_{50}$  にて BSEP を阻害したことを報告している [7]。トログリタゾン (糖尿病薬) やネファゾドン (抗うつ薬) は重篤な肝毒性を示し市場より撤退した薬物であるが、これらは強力な BSEP 阻害剤であることが知られている [6, 7, 14, 15]。化合物の BSEP 阻害活性を調べる手法として、これまでにいくつかの手法が報告されているが

(膜ベシクル法など)、薬物による BSEP 機能阻害が実際に肝毒性を引き起こす事、肝障害リスクとの関連性を示す報告はこれまでほとんどされていない。また、肝臓は様々な物質の取り込み、排泄、並びに代謝といった生理的に重要な機能を担っている。例えば、アセトアミノフェンの代謝物である N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) はアセトアミノフェン誘発性肝障害の原因の一つとして知られており [16]、肝毒性の評価はより生理的な肝臓に近い試験系で実施する必要があると考えられる。

Sandwich-cultured hepatocytes (SCHs) は通常培養条件化での肝細胞において消失している細胞の極性が認められるだけでなく、トランスポーターや薬物代謝酵素の発現も維持されていることから、毒性研究や薬物動態研究における有用な *in vitro* モデルと考えられている [17]。本研究では、このような特性を有する SCHs を用い胆汁酸依存的な薬剤性肝毒性評価系の構築に取り組み、薬物による BSEP 阻害が DILI の要因となりうるのかどうか検証を行った。また、胆汁酸依存的な薬剤性肝毒性における薬物代謝の影響についても検討した。

## 【方法】

### 試薬

胆汁酸及び被験物質は和光純薬(株), Sigma-Aldrich, Calbiochem より入手した。  
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 及び insulin は Sigma-Aldrich より、Matrigel および ITS+ premix は BD Biosciences より、Collagenase は和光純薬(株)より購入した。  
上記以外の試薬や溶媒については全て分析グレードの物を使用した。

### 動物

7-8 週齢の Sprague-Dawley 系(SD)雄性ラットを日本エスエルシー(株)より購入した。  
ラットはオリエンタル酵母工業(株)より購入した実験用動物飼料を与え、水及び飼料は自由に摂取させた。購入したラットは温度コントロール(25 ± 2 °C) の環境下にて 12 hr 明暗サイクルで飼育した。

### 初代培養肝細胞の調整および培養

SD 雄性ラット(7-8 週齢)をペントバルビタール(64.8mg/kg body weight, i.p)にて麻酔後、既に報告されている手法に従い [18]、二段階灌流法にて初代培養肝細胞を単離した。  
まず、門脈より 0.6mM EGTA を含む  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free Perfusion buffer を灌流後、4mM  $\text{CaCl}_2$  及び 0.3 mg/ml collagenase を含む Collagenase buffer を灌流した。その後、ナイロンメッシュにて遊離した細胞をろ過後、50g にて 3 分遠心、上清を捨て、isotonic 45% Percoll を含む DMEM に再懸濁後 50g にて 15min 遠心した。得られたペレットを DMEM 30mL で再懸濁、ナイロンメッシュでろ過後、50g にて 3min 遠心を行った。肝細胞の生存率は tripan blue exclusion 法にて求めた。全ての検討において生存率 > 88%のものをを用いた。

細胞を播種する plate には、あらかじめ type 1 collagen にて collagen coating を施した。  
1.5 mg/mL、pH 7.4 に調整した collagen を氷冷下にて各 well へ塗布した。その後ただち

に 37°C CO<sub>2</sub> incubator 内へ約 1 時間静置した。Collagen が gel 化したのを確認後、各 well へ 500  $\mu$ L (12 well plate) ずつ Plating 用 DMEM (5% fetal bovine serum、100 units/ml penicillin、100  $\mu$ g/ml streptomycin、1  $\mu$ M dexamethasone 及び 4 mg/l insulin を含む) を加え、細胞播種時まで 37 °C CO<sub>2</sub> incubator 内にて培養した。なお、collagen coating は細胞播種の少なくとも 1 日前に行った。

単離、精製を行った肝細胞を plating 用 DMEM 中に懸濁させ、collagen coating plate へ  $1.25 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度にて播種した。約 1.5 時間後、接着しなかった肝細胞を取り除くため、plating 用 DMEM にて培地交換を行った。播種後 24 時間にて plating 用 DMEM を除去、Culturing 用 DMEM (1% ITS+、0.1  $\mu$ M dexamethasone、100 units/ml penicillin 及び 100  $\mu$ g/ml streptomycin を含む) を用い 0.25 mg/mL になるように希釈した Matrigel を氷冷下で 0.75 mL (12 well plate) ずつ各 well へ加え、サンドイッチ培養を開始した。その後は実験を行う培養 5 日目まで 1 日に一度 Culturing 用 DMEM で培地交換を行った。播種後 5 日目まで肝細胞は 37 °C CO<sub>2</sub> incubator 内にて培養を行った。

### 胆汁酸組成及び被験物質の調製

胆汁酸依存的な肝毒性を評価するにあたり、Scherer らが報告するヒト血清中の胆汁酸組成 [19] を参考に 12 種類の胆汁酸を選んだ (Table1)。12 種類の胆汁酸は全て dimethyl sulfoxide (DMSO) へ溶解し stock 溶液とし、実験を行う際に所定濃度の胆汁酸含有培地を調製した。被検薬物も同様に全て DMSO へ溶解した後、胆汁酸含有培地へ添加し所定濃度となるよう調製した。なお、control 群には被験化合物処置群と同量の DMSO を添加した。被験物質の添加濃度は各化合物の BSEP 阻害活性を参考に決定し [7, 20, 21]、被験物質自身による細胞毒性を回避するため最大濃度は 50 $\mu$ M とした (Table 2)。

Table 1 Composition of standard bile acids mixture

Bile acid	× 1 concentration
	( $\mu\text{M}$ )
Chenodeoxycholic acid	0.34
Cholic acid	0.2
Deoxycholic acid	0.734
Glycochenodeoxycholic acid	1.71
Glycocholic acid	0.41
Glycodeoxycholic acid	0.38
Lithocholic acid	0.03
Taurochenodeoxycholic acid	0.21
Taurocholic acid	0.048
Taurolithocholic acid	0.087
Tauroursodeoxycholic acid	0.287
Ursodeoxycholic acid	0.11
Total	4.546

#### 胆汁酸依存的な毒性の評価

胆汁酸含有培地中もしくは胆汁酸非含有培地中に溶解させた各被験化合物を SCHs へ 24 時間曝露後、障害を受けた細胞より培地中に漏出した乳酸デヒドロゲナーゼ (lactate dehydrogenase: LDH) の活性を LDH-Cytotoxic Test (和光純薬(株)) を用い測定し毒性の指標とした。なお、LDH 活性は 0.25 % Triton X-100 を処置した SCHs より漏出した LDH 活性を 100 % とし、以下の式に従って求めた。

$$\text{Cell toxicity (\%)} = (\text{LDH}_{\text{sample}} - \text{LDH}_{\text{blank}}) / (\text{LDH}_{\text{Triton X-100}} - \text{LDH}_{\text{blank}}) \times 100$$

LDH blank は無処置の細胞での LDH 活性を示す。

#### 胆汁酸依存的な毒性に対する Cytochrome P450 (CYP) を介した薬物代謝の影響

被験物質および胆汁酸の曝露 30 分前より非選択的 CYP 阻害剤である 1-aminobenzotriazole (1-ABT, 500  $\mu\text{M}$ ) を SCHs へ処置し、CYP の不活化を行った。なお、それ以降は上記の手順に従った。

Table 2 Test compounds and potency of BSEP inhibition

Bile acid	Concentration	BSEP inhibition
	( $\mu\text{M}$ )	
Ritonavir	20	P
Cyclosporin A	10	P
Simvastatin	50	P
Ethinylestradiol	50	P
Verapamil	50	M
Rifampicin	50	P
Glybenclamide	50	P
Ketoconazole	20	P
Troglitazone	10	P
Indomethacin	50	M
Imipramine	50	N
Quinidine	50	N
Flutamide	50	M
Cimetidine	50	N
Valproic acid	50	N
Ticlopidine	50	N
Tolbutamide	50	N
Alloprinolol	50	N
Diclofenac	50	N
Colchicine	50	N
Carbamazepine	50	N
Doxycycline	50	N
Amoxicillin	50	N
Warfarin	50	N
Famotidine	50	N
Erythromycin	50	N
Amodiaquine	50	N

P: potent ( $\text{IC}_{50} \leq 25 \mu\text{M}$ ), M: moderate ( $25 \mu\text{M} < \text{IC}_{50} \leq 135 \mu\text{M}$ ), N: none ( $135 \mu\text{M} \leq \text{IC}_{50}$ )

#### 統計解析

The two-tailed t-test for multiple comparisons with Bonferroni correction following ANOVA もしくは Student's t-test を用いて統計解析を実施した。p 値  $< 0.05$  の場合有意な差有りと判定した。

## 【結果】

### 胆汁酸又は薬物単独によって引き起こされる毒性の評価

本研究で使用している胆汁酸には、肝細胞へ毒性を示すものが含まれている(例：GCDC A や LCA) [8, 9, 10, 11]。同じように、被験薬物の中には、高濃度では肝細胞へ毒性を示すものが存在している [22, 23, 24]。当研究では、胆汁酸もしくは薬物自体による直接的な毒性を評価する事が目的ではなく、両者共存下で初めて生じる毒性（すなわち胆汁酸依存的な毒性）を検出する試験系を構築する事が目的である。そこで、胆汁酸濃度条件の設定及び設定濃度条件下での被験薬物自体による毒性の有無を確認する事とした。

Table 1 に記載の胆汁酸組成を基準とし、0 - 400 倍濃度の胆汁酸を細胞へ曝露し 24 時間後の細胞毒性を評価した。その結果、基準濃度の 200 倍より胆汁酸単独曝露条件で細胞毒性を示す事が明らかとなった (Figure 1)。

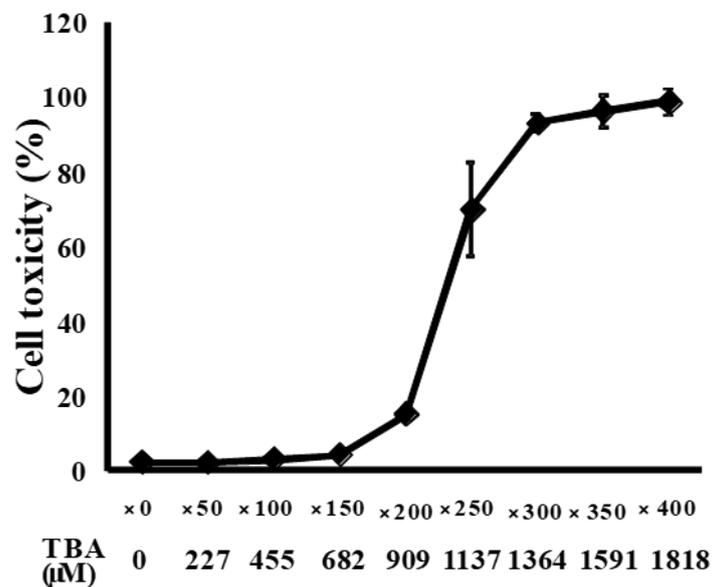


Figure. 1. Toxicity of BAs in hepatocytes. SCRHS were cultured for 5 days and then treated with a mixture of 12 BAs in various concentrations (50–400  $\mu\text{M}$   $\times$  the standard concentration of each BA) for 24 h. The BAs and standard concentrations are shown in Table 1. Cell toxicity was measured by LDH activity. Each data point is the mean  $\pm$  S.E. (n = 3, single preparation). TBA, total bile acid.

従い、以降の検討で使用する胆汁酸濃度は基準濃度の 150 倍とする事にした。次に、各被験薬物が table 2 に記載する濃度条件下で細胞毒性を示すか否か確認を行った。陽性対照として設定したアモジアキンを除き、全ての薬物が単独曝露条件下では細胞毒性を示さない事が示された (Figure 2A)。

### 胆汁酸依存的な薬剤性肝毒性の評価

遺伝的な要因又は薬剤性の BSEP 機能障害は肝細胞内への胆汁酸蓄積を生じ、肝障害を引き起こす [3, 4, 13, 21]。従い、BSEP 阻害作用を有する薬物は、胆汁酸存在下において細胞毒性を生じると想定される。本仮説を検証するため、薬物単独では毒性を示さない濃度条件にて各被験薬物を胆汁酸存在下もしくは非存在下にて肝細胞へ 24 時間曝露した。26 の被験薬物のうち 11 の薬物がコントロールに対し、有意な毒性の増加が認められた (Figure 2B)。なお、これら毒性の増加が認められた薬物のうち 9 の薬物は BSEP を阻害する事が知られている薬物であった。

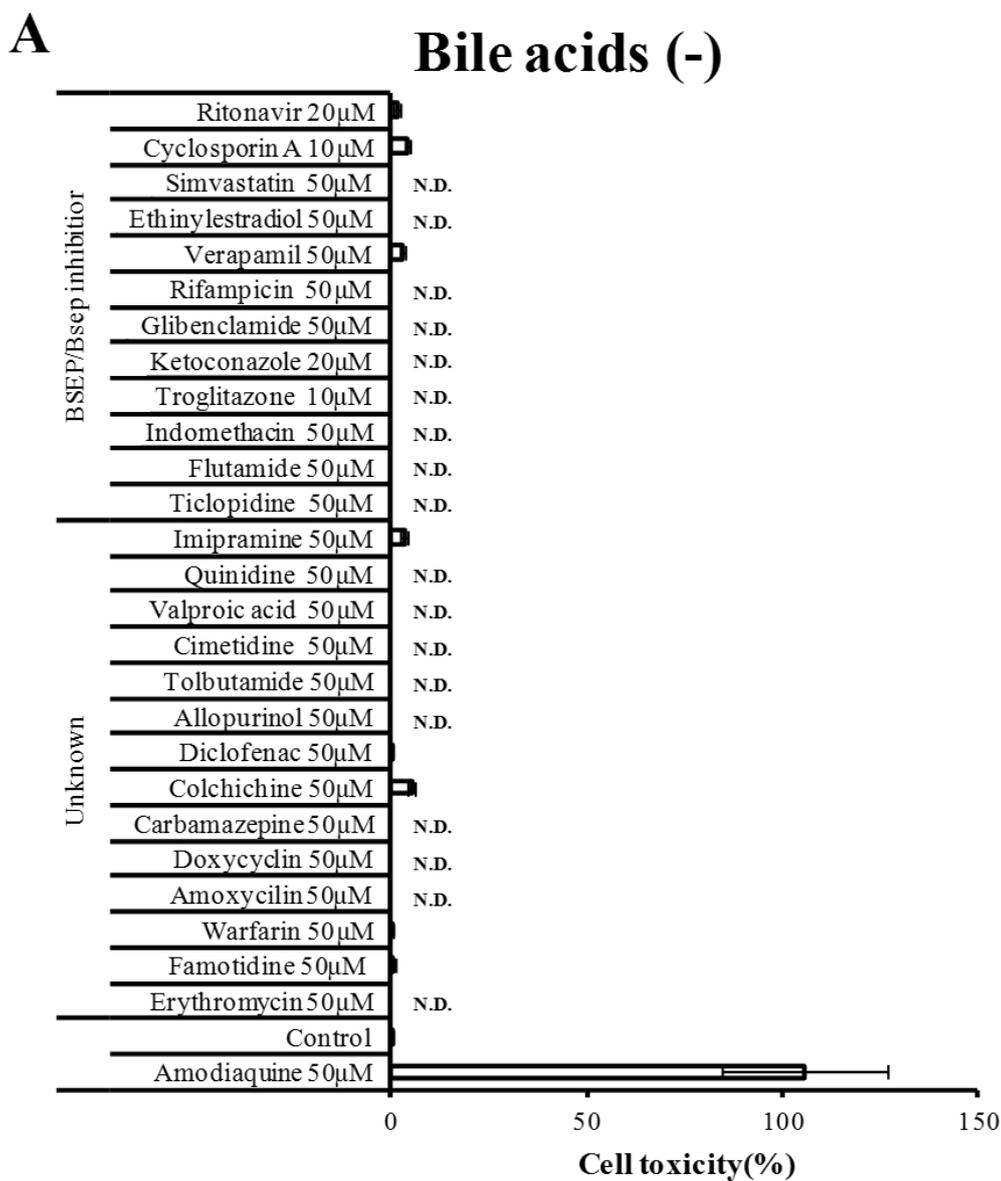


Figure 2A. Toxicity of test compounds in hepatocytes.

SCRHs were cultured for 5 days and then exposed to each test compound for 24 h. The concentration of each compound is shown in Table 2. Amodiaquine, a hepatotoxic compound, was used as the positive control. Data are the means  $\pm$  S.E. (n = 3 or 6; for n = 3, the experiment was performed with triplicate samples from a single preparation, and for n = 6, the experiment was performed with triplicate samples from two independent preparations). N.D. indicates not detected.

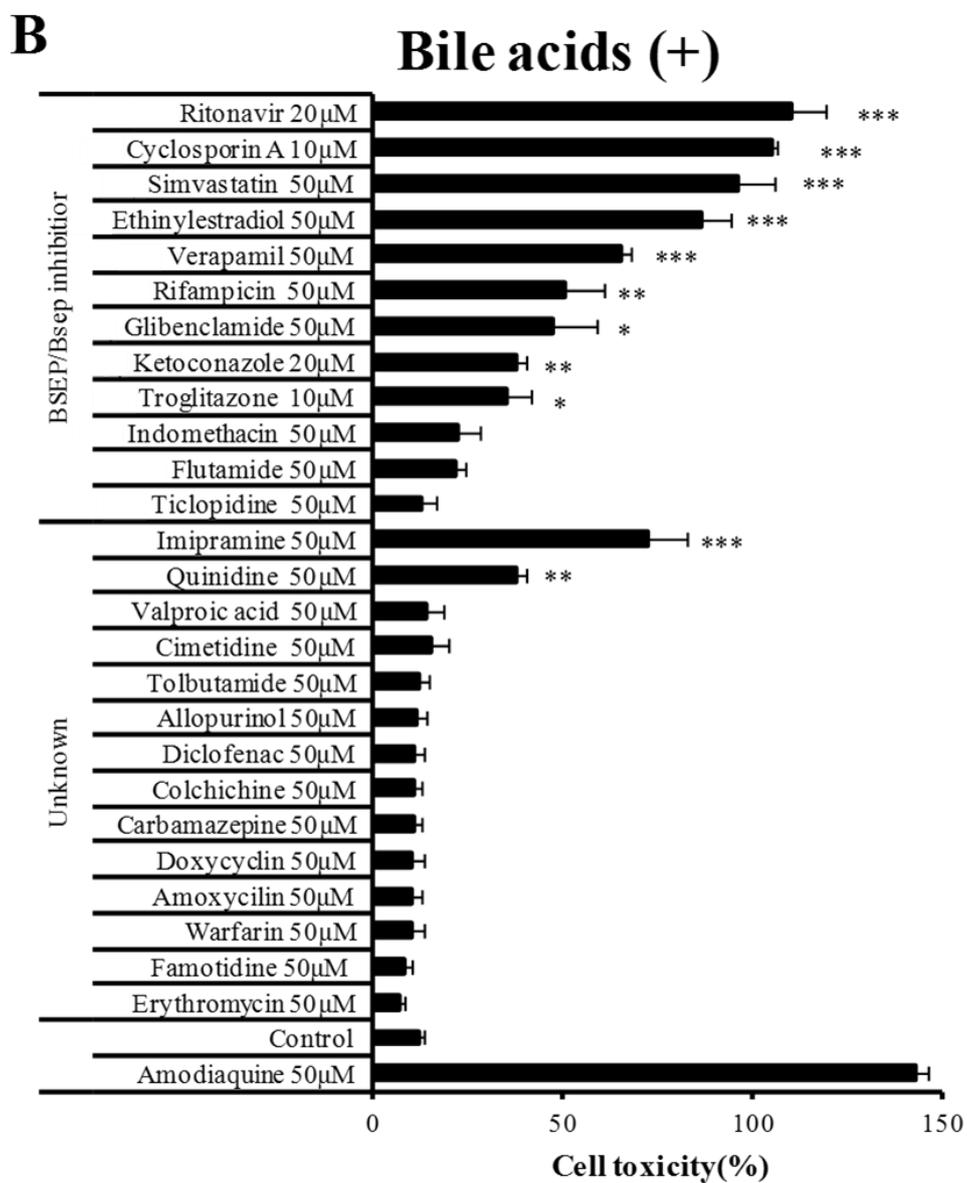


Figure 2B. The effect of co-treatment with each test compound and the BA mixture on hepatocyte toxicity.

SCRHs were cultured for 5 days and then treated with each test compound in the presence of BAs. Amdiaquine was used as the positive control. Data are the means  $\pm$  S.E. (n = 6 or 9; for n = 6, the experiment was performed with triplicate samples from two independent preparations, and for n = 9, the experiment was performed with triplicate samples from three independent preparations). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. control.

### 胆汁酸依存的な毒性における薬物代謝酵素 CYP の影響

アセトアミノフェンの代謝物である NAPQI はアセトアミノフェン誘発性肝障害の原因物質と知られており [16]、薬物代謝は薬剤性肝障害において重要と考えられる。本検討で用いた SCHs は薬物代謝機能を維持している事が知られ、代謝を加味した毒性評価が可能と推察される。そこで、非選択的 CYP 阻害剤である 1-ABT を用い [25]、胆汁酸依存的な毒性における CYP を介した薬物代謝の影響を評価する事とした。その結果、グリベンクラミド、ケトコナゾール、キニジン、フルタミドといった薬物が 1-ABT 処置によって有意な毒性の増強が認められた。なお、1-ABT のみを曝露した際には毒性は認められていない (data not shown)。

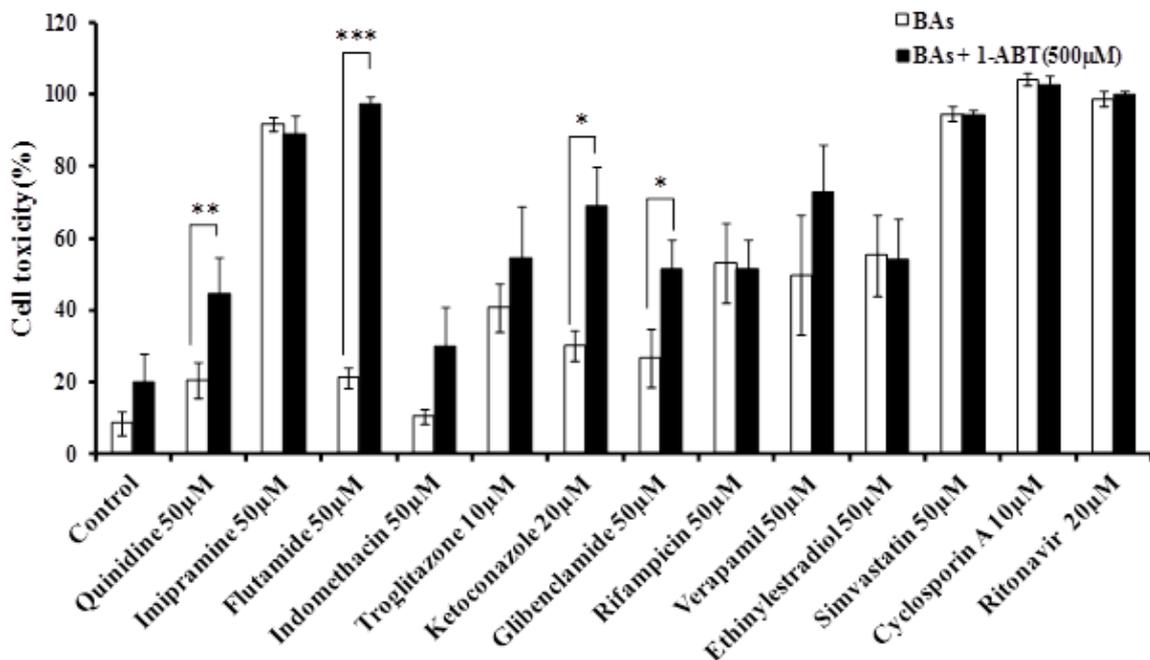


Figure 3. Effect of CYP-mediated drug metabolism on BA-dependent drug-induced hepatocyte toxicity.

Rat SCHs were exposed to each compound and the bile acid mixture with/without 30 minutes 1-ABT pretreatment (500 μM). White and black bars represent the absent and present of 1-ABT, respectively. Data are the mean ± S.E. (n=6, triplicate samples from 2 livers). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 vs. absence of 1-ABT.

## 【考察】

本検討ではリトナビル、シクロスポリン、シンバスタチン、トログリタゾンといった薬物を用いた。これら被験薬物は胆汁酸非存在下ではラット SCHs に対し細胞毒性を引き起こさなかった (Figure 2A)。その一方、胆汁酸存在下においては 11 の薬物がコントロールに対し有意な毒性を示し、それら薬物の多くが BSEP 阻害剤であった [7, 21]。これらの結果より、薬物による BSEP 阻害によって肝細胞内に胆汁酸が蓄積し、毒性を引き起こしたと考察される。

トランスポーター発現膜ベシクルは簡便かつスループット性良く薬物の BSEP 阻害活性を評価する手法として広く知られている。しかしながら、非細胞系であるため、薬物の細胞への取り込み/排泄過程や薬物代謝を考慮して評価を行う事が出来ない。中西ら [26] は BSEP と同様に胆管側膜に発現する multidrug resistance-associated protein 2 に対するリファンピシンの阻害作用を評価した結果、膜ベシクル法で算出された IC<sub>50</sub> 値がラット SCH での IC<sub>50</sub> と比べ 6.7 倍高い事を報告している。その要因としてリファンピシンが細胞内へ濃縮的に取り込まれ、細胞外と細胞内の濃度に大きな乖離があるためであると考察している。膜ベシクル法では細胞内への取り込み過程を考慮することが出来ず、BSEP 阻害を起因とする肝障害を正確に評価出来ていない可能性が考えられる。一方で、SCH は取り込みトランスポーター及び排泄トランスポーターの両者が発現しており方向性輸送の評価が可能である。興味深い事に、本研究において BSEP 阻害を起こさないイミプラミンが有意な胆汁酸依存的毒性を引き起こしている (Figure 2B)。また、ベラパミルやキニジンについても有意な胆汁酸依存的毒性を示しているが、BSEP に対する Ki 値はそれぞれ 93 及び 542 μM と報告されている [21]。本研究で認められた毒性は Ki 値より低い濃度から認められており、これら薬剤の胆汁酸依存毒性が BSEP 阻害によって生じているのであれば、リファンピシンのように細胞内へ濃縮的に取り込まれている可能性が考えられた。

本研究では、フルタミドやキニジンなどの薬物による胆汁酸依存毒性が 1-ABT 存在下において増強することが明らかとなった (Figure 3)。中でもフルタミドは 1-ABT による毒性の増強が顕著であった。フルタミドは BSEP 阻害を起こすことが知られているが、一方でその代謝物であるヒドロキシフルタミドは阻害しないことが報告されている [20]。このような知見より、本研究における 1-ABT による毒性増強は薬物代謝が 1-ABT によって阻害されることで親化合物濃度が増加し、その結果、より強く BSEP 阻害の影響が認められた可能性がある。

様々な種類の胆汁酸が血液、肝臓、胆汁中に存在している事が知られている [19, 27]。BSEP やその他の胆汁酸トランスポーターは個々の胆汁酸に対して一様の基質認識性を示すわけではなく、異なる輸送活性を示す [28, 29]。例えば、トログリタゾンによる細胞内分布及び輸送への影響はタウロコール酸 (taurocholic acid: TCA) とケノデオキシコール酸 (chenodeoxycholic acid: CDCA) で異なることが知られている [30]。本検討では、ヒト血中に存在する主要な 12 種類の胆汁酸を用いており [19]、薬物による細胞内蓄積の程度は各胆汁酸によって異なる可能性が考えられる。従い、どの胆汁酸が最も影響を受け、毒性発現に寄与しているのか考察するためにも細胞内の胆汁酸濃度を測定する事が今後の検討課題として考えられる。

体内の胆汁酸組成には大きな種差がある事が知られており、例えば、ラットにおいては約 98% の胆汁酸がタウリン抱合体として存在している一方で、ヒトにおいては 25% 程度である [27]。加えて、ラット SCH では TCA の細胞内取り込み活性は培養時間の経過とともに低下していくが、ヒト SCH ではそのような現象は認められない [31]。さらに、ラット SCH においては細胞内から培地中への排泄能がヒトに比べ大きい事も報告されている [32]。これらの報告より、ラットとヒトでは胆汁酸依存毒性への感受性が異なる事が示唆され、ヒトの肝細胞を用いた検討が必要と考えられる。一方で、通常非臨床安全性試験では肝毒性を示さなかったトログリタゾンの肝毒性ポテンシャルが

本評価系を用いる事で捉えられている事から [33]、本評価系は肝毒性化合物のスクリーニングに有用と考えられた。

### 【小括】

- ・本検討において、11 化合物が胆汁酸依存毒性を示し、その大部分が **BSEP** 阻害剤であった。

- ・ **BSEP** 阻害による胆汁酸の細胞内蓄積が毒性を引き起こしたと考えられる。

本評価系は創薬初期段階において肝毒性リスクを持つ化合物のスクリーニングに有用と考えられる。

## 第二章

### 胆汁酸依存的肝毒性と薬物代謝に関する検討

## 【緒言】

薬剤性肝障害は候補化合物が開発段階でドロップアウトする大きな原因であるだけでなく、上市後においても市場撤退の原因として知られている。そのため、予測性の高い評価方法が求められている。

薬剤性肝障害は肝細胞障害型、胆汁うっ滞型、混合型の三つに大別され、約 50%の薬剤性肝障害患者が胆汁うっ滞型および混合型に分類される [34]。薬物による胆汁酸トランスポーターの阻害は胆汁うっ滞型肝障害の代表的なメカニズムとしてよく知られており [35, 36, 7]、中でも bile salt export pump (BSEP)は肝臓からの胆汁酸排泄に大きく関与する。Progressive familial intrahepatic cholestasis type 2 (PFIC2) は重篤な肝疾患であるが、その原因は BSEP 遺伝子の変異である事が知られている [13]。PFIC2 患者では BSEP 機能障害により肝臓中に重度の胆汁酸蓄積が生じ、その結果、肝障害を引き起こすと考えられている。肝臓からの胆汁酸排泄の障害は胆汁うっ滞型肝毒性の原因として考えられており、薬物による BSEP を始めとした胆汁酸トランスポーターの阻害は薬剤性肝障害の発症原因として研究が行われている。

薬物の BSEP 阻害活性を評価するために、BSEP 発現膜ベシクルは一般的に用いられる手法である [35, 36, 7]。膜ベシクル法はハイスループットに化合物を評価できる方法であるが、必ずしも生理的な肝臓を反映した手法ではないことが課題として知られている。例えば、薬物は肝臓において代謝酵素によって代謝を受けるが、膜ベシクルは非細胞系であるため代謝を評価できない。そのため、膜ベシクル法での評価は実際の肝臓中での阻害活性を反映していない可能性が考えられる。

トルバプタンは鬱血性心不全、肝硬変などに用いられる薬剤であるが、臨床試験中特定の患者において肝逸脱酵素やビリルビン値の高値を示し、ヒトに肝毒性を持つ事が知られている [37]。トルバプタンは BSEP を含む胆汁酸トランスポーターを阻害する事が知られており、胆汁酸トランスポーター阻害がトルバプタン誘発性肝毒性のメカニズム

の一つとして推察されている [37, 38]。トルバプタンは CYP3A4 によって生成するオキシブチル酸代謝物である DM-4103 や水酸化オキシブチル酸代謝物の DM-4107 を含むいくつかの代謝物に代謝される [39, 40]。この DM-4103 や DM-4107 は親化合物のトルバプタン同様に BSEP 阻害を起こすことが知られており、中でも DM-4103 はトルバプタンに比べ約 8 倍阻害活性が強く、トルバプタン誘発性肝毒性に大きく関与している可能性がある [37]。

代謝物に親化合物より強い BSEP 阻害活性が認められる場合、膜ベシクルを用いた親化合物の評価のみでは *in vivo* における阻害ポテンシャルを過小評価してしまう可能性がある。そのため、代謝物についても阻害活性の有無を評価した方が良いと考えられる。しかしながら、膜ベシクルを用いてすべての代謝物について阻害活性を評価する事は現実的には難しい。例えば反応性代謝物においては物質としての安定性が低く、単離・精製が難しいケースもあり、必ずしも全ての代謝物を入手・合成することが出来ないためである。加えて、創薬初期の段階では、開発候補化合物の代謝物は合成されていないこともある。従い、代謝物自体を用いることなく薬物代謝を含めた胆汁酸が関わる肝障害評価方法が必要と考えられる。

そこで第一章にて記載した胆汁酸依存的肝毒性評価系 [41]を用い、本評価系が上記のような薬物代謝の影響も加味したうえで評価が行えるのか検証を行った。

## 【方法】

### 試薬類

各種胆汁酸は和光純薬(株)、Sigma-Aldrich、Cosmo Bio より購入した。Cryopreserved hepatocyte recovery medium (CHRM)、William's E medium (WEM)、Insulin-Transferin-Selenium (ITS-G)、GlutaMAX™、penicillin-streptomycin 及び insulin は Life technologies より購入した。Fetal bovine serum (FBS) は MP Bio より購入した。Matrigel 及び collagen type 1 BioCoat plates は Corning より購入した。Pooled cryopreserved human hepatocytes は Sekisui Xenotech より購入し、その他の試薬・溶媒等は分析グレード以上の物を使用した。

### ヒト肝細胞の培養

凍結ヒト肝細胞は 37 °C に温めた CHRM を用いて融解・懸濁を行い 100g にて 10 分間遠心分離を行った。上清を取り除いた後、細胞塊は WEM (5%FBS、0.1 µmol/L dexamethasone、4 mg/L insulin、2 mmol/L GlutaMAX™、100 U/mL penicillin、100 mg/mL streptomycin を含む)を用いて再懸濁した。その後、ヒト肝細胞は BioCoat 96-well plate に  $0.48 \times 10^5$  cells/well の密度で播種した。播種後 4 時間にて氷冷した WEM (1% ITS-G、0.1 µM dexamethasone、2 mM GlutaMAX™、100 U/mL penicillin、100 mg/mL streptomycin を含む) 中に溶解させた 0.25 mg/mL matrigel を重層させる事でサンドイッチ培養を行った。なお、85%以上の生存率を示す肝細胞を本検討では用いた。その後、一日一回培地交換を行い、播種後 5 日の細胞を用いて検討を実施した。

### ラット肝細胞の培養

日本エスエルシー(株)より購入した 7-8 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを本検討では用いた。

少なくとも肝細胞の単離開始の1時間前に96 well plateへコラーゲンコートをした。ラット肝細胞は第一章に記載した方法に準じて単離を行い、コラーゲンコート済みの96 well plateへ $0.48 \times 10^5$  cells/wellの細胞密度で播種した。なお、播種用の培地はWEM (5%FBS、0.1  $\mu$ M dexamethasone、4 mg/L insulin、2 mM GlutaMAX<sup>TM</sup>、15 mM HEPES (pH 7.4)、100 U/mL penicillin、100  $\mu$ g/mL streptomycinを含む)を用いた。播種後1.5時間にて培地交換を行い、1晩培養した。播種後24時間にて氷冷したWEM (1% ITS-G、0.1  $\mu$ M dexamethasone、2 mM GlutaMAX<sup>TM</sup>、100 U/mL penicillin、100 mg/mL streptomycinを含む)中に溶解させた0.25 mg/mL matrigelを重層させる事でサンドイッチ培養を行った。その後、培地は一日一回交換を行い、播種後4日にすべての実験を行った。

### 細胞毒性試験

ヒトサンドイッチ培養肝細胞 (hSCH)およびラットサンドイッチ培養肝細胞 (rSCH)はtable 1に記載するヒト血清中に含まれる12種類の胆汁酸 [19]存在下もしくは非存在下で薬物に曝露させた。文献情報を参考に [42]、添加させる胆汁酸濃度はhSCH及びrSCHに対してtable 1に記載する濃度の120倍及び100倍に設定した。被験薬物はdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解させ、細胞曝露時のDMSO最終濃度は0.5%以下となるようにした。なお、薬物は5-8濃度(0-300  $\mu$ M)となるように調製しSCHへ曝露させた。曝露24時間後、培地中に漏出した乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)の活性を測定する事で、細胞毒性の指標とした。細胞毒性はTriton X-100を処置した細胞でのLDH活性を最大LDH活性 (LDH<sub>Triton X-100</sub>)として、以下の計算式にて算出した。

$$\text{Cell toxicity (\%)} = (\text{LDH}_{\text{sample}} - \text{LDH}_{\text{blank}}) / (\text{LDH}_{\text{Triton X-100}} - \text{LDH}_{\text{blank}}) \times 100$$

LDH<sub>blank</sub>は無処置の細胞でのLDH活性を示す。

また、非選択的 CYP 阻害剤の 1-aminobenzotriazole (1-ABT、ラット 250  $\mu\text{M}$ 、ヒト 500  $\mu\text{M}$ ) は薬物処置の 30 分前より曝露した。

Table 1 Composition of standard bile acids mixture

Bile acid	$\times 1$ concentration
	( $\mu\text{M}$ )
Chenodeoxycholic acid	0.34
Cholic acid	0.2
Deoxycholic acid	0.734
Glycochenodeoxycholic acid	1.71
Glycocholic acid	0.41
Glycodeoxycholic acid	0.38
Lithocholic acid	0.03
Taurochenodeoxycholic acid	0.21
Taurocholic acid	0.048
Taurolithocholic acid	0.087
Tauroursodeoxycholic acid	0.287
Ursodeoxycholic acid	0.11
Total	4.546

#### ヒトサンドイッチ培養肝細胞におけるトルバプタンの代謝

トルバプタン (1 及び 10  $\mu\text{M}$ ) を 1-ABT(500  $\mu\text{M}$ )存在下もしくは非存在下にて 24 時間 hSCH へ曝露した。なお、1-ABT はトルバプタン曝露の 30 分前より曝露させた。24 時間後、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ベザフィブラートを含むアセトニトリル 300  $\mu\text{L}$  を添加させる事で反応を停止させた。ピペッティングを行った後、チューブへ移し 990 g にて 5 分間遠心分離を行った。上清を適量分取し 50%アセトニトリルにて 20 倍希釈した後、トルバプタン及びその代謝物を Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS、QTRAP 5500、AB Sciex)にて測定を行った。なお、カラムは Inertsil ODS-3 column(50 $\times$ 2.1 mm、3  $\mu\text{m}$ 、ジーエルサイエンス)を用い、流速は 0.35 mL/min、またカラムオーブンは 40 $^{\circ}\text{C}$  に設定した。移動相には、移動相 A (0.1% ギ酸)及び移動相 B (0.1% ギ酸 アセトニトリル)を用い、以下のグラジエントパターンにて分析を行った。

0-0.5 min	0.5-2.5 min	2.5-4.5 min	4.5-5.5 min
移動相 A 90%	移動相 A 90% ⇒ 10%	移動相 A 10%	移動相 A 90% (平衡化)

モニターイオン (parent m/z > product m/z) は以下の物を測定した。

トルバプタン	DM-4103	DM-4107	ベザフィブラート
449.2 > 252.1	479.1 > 252.1	481.1 > 252.1	363.1 > 139.1

なお、トルバプタン代謝物のモニターイオンは文献値を基に設定した [40]。

## データ解析

50% lethal concentration (LC<sub>50</sub>) は以下の計算式にて算出した。

$$BA_{tox} (\%) = [C]^{Hill\ coefficient} / ([C]^{Hill\ coefficient} + LC_{50}^{Hill\ coefficient}) \times 100$$

なお、BA<sub>tox</sub> は BA-dependent hepatocyte toxicity (%), [C] は薬物濃度を示す。これらのパラメータは MULTI program を用いた iterative nonlinear least-squares model にて算出した [43]。

1-ABT を用いたトルバプタンの BA<sub>tox</sub> に関する検討について、Paired t-tests を用いて統計解析を実施した。なお、P 値 < 0.05 の場合に有意な差有と判断した。

## 【結果】

### トルバプタンの胆汁酸依存毒性及び 1-ABT 処置の影響

トルバプタン及びその代謝物は BSEP を阻害する事が知られている [37]。中でも DM-4103 はトルバプタンに比べ約 8 倍阻害活性が強く、これら代謝物はトルバプタン

誘発胆汁酸依存毒性に大きく関与している可能性がある。従い、トルバプタン代謝物の生成を阻害する事でトルバプタン誘発胆汁酸依存毒性が軽減する可能性が考えられた。この仮説を検証するために、CYP 阻害剤である 1-ABT を処置する事で、トルバプタン誘発胆汁酸依存毒性の変動が認められるか否かを評価した。

Figure 1a に示すように、トルバプタンは胆汁酸非存在下では毒性を示さないものの、胆汁酸存在下では強い細胞毒性を示した。しかし、1-ABT(500  $\mu$ M)の存在下では胆汁酸存在下においても細胞毒性が有意に減弱した。

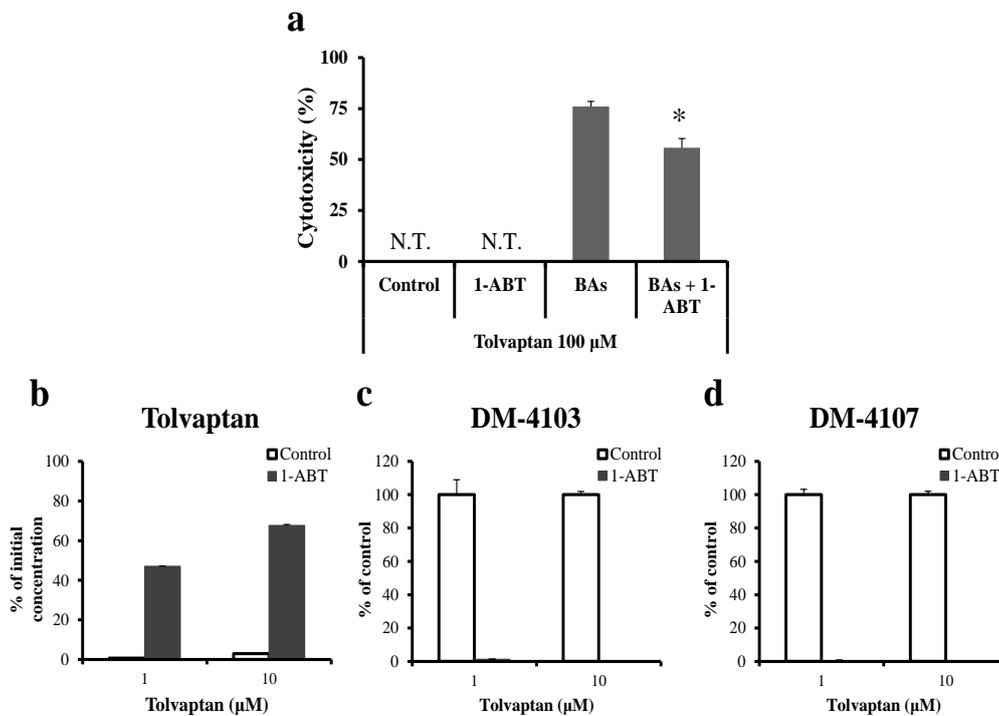


Figure 1. BAtox and metabolism of tolvaptan in hSCH.

hSCH was incubated with tolvaptan in the absence or presence of 500  $\mu$ M 1-ABT for 24 h. Cytotoxicity was measured after the 24-h incubation (a). The concentrations of tolvaptan, DM-4103, and DM-4107 in the medium were measured by LC-MS/MS (b, c, and d). Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. from three separate experiments (n=3). \* indicates significant difference from BAs group (\*  $p < 0.05$ ). N.T. is No Toxicity.

## ヒトサンドイッチ培養肝細胞におけるトルバプタン代謝

CYPによるトルバプタンの代謝を確認するために、hSCHにトルバプタンを24時間処置し、残存しているトルバプタンの量をLC-MS/MSを用いて測定した。同時に、代謝物についても測定を行い代謝物の生成を確認した。

24時間後に残存しているトルバプタンの量は1及び10 µM処置群ともに非常に少なかった (Figure 1b)。一方、1-ABTを処置する事で、トルバプタンの残存量は顕著に増加した。加えて、2つの代謝物の生成は1-ABTによってほぼ完全に阻害された (Figure 1c 及び 1d)。

## 1-ABT存在下及び非存在下における各種薬物の胆汁酸依存毒性の評価

BSEP阻害は胆汁酸依存毒性を引き起こす重要な因子である [41]。そのため、被験薬物については、BSEP阻害活性を予め評価し化合物選択の参考とした (Table 2)。また、試験に先立ち各薬物は本検討で設定した最高濃度において、胆汁酸非存在下では細胞毒性を示さない事を確認している (data not shown)。

Figure 2は本検討で使用した代表的なBSEP阻害剤のhSCH及びrSCHにおける胆汁酸依存毒性の結果を示す。hSCH及びrSCHにおいて、1-ABT処置によりネファゾドン誘発胆汁酸依存毒性は増強され、チクロピジン誘発胆汁酸依存毒性は減弱した。また、グリベンクラミド誘発胆汁酸依存毒性においては1-ABT処置によってhSCHでは減弱する一方で、rSCHでは増強した。

本検討で評価した被験薬物のLC<sub>50</sub>をtable 3に記載した。被験薬物のLC<sub>50</sub>はrSCHに比べhSCHにおいて低い傾向を示した。hSCHはrSCHに比べ胆汁酸依存毒性に感受性が高いように思われた。

Table 2 IC<sub>50</sub> value of each compound affecting BSEP activity

	BSEP IC <sub>50</sub> (μM)
Ritonavir	1.0
Everolimus	2 <sup>a</sup>
Nefazodone	2.3
Glibenclamide	2.4
Tacrolimus	7.2 <sup>a</sup>
Fusidic acid	7.5
Sitaxentan	12.6 <sup>a</sup>
Bosentan	19.2
Clopidogrel	24.1
Ticlopidine	33.2
Nicergoline	49.0
Flutamide	54.5
Clozapine	101.1
Leflunomide	N.D. <sup>b</sup>
TAK-875	N.D. <sup>b</sup>
Tolvaptane	31.6 <sup>c</sup>

Results are expressed as the mean from 2 separate experiments (n=2).

(a) Morgan RE, et al. Toxicol Sci. 2013 Nov;136(1):216-41.

(b) N.D. represents Not Determined.

(c) Slizgi JR, et al. Toxicol Sci. 2016 Jan;149(1):237-50.

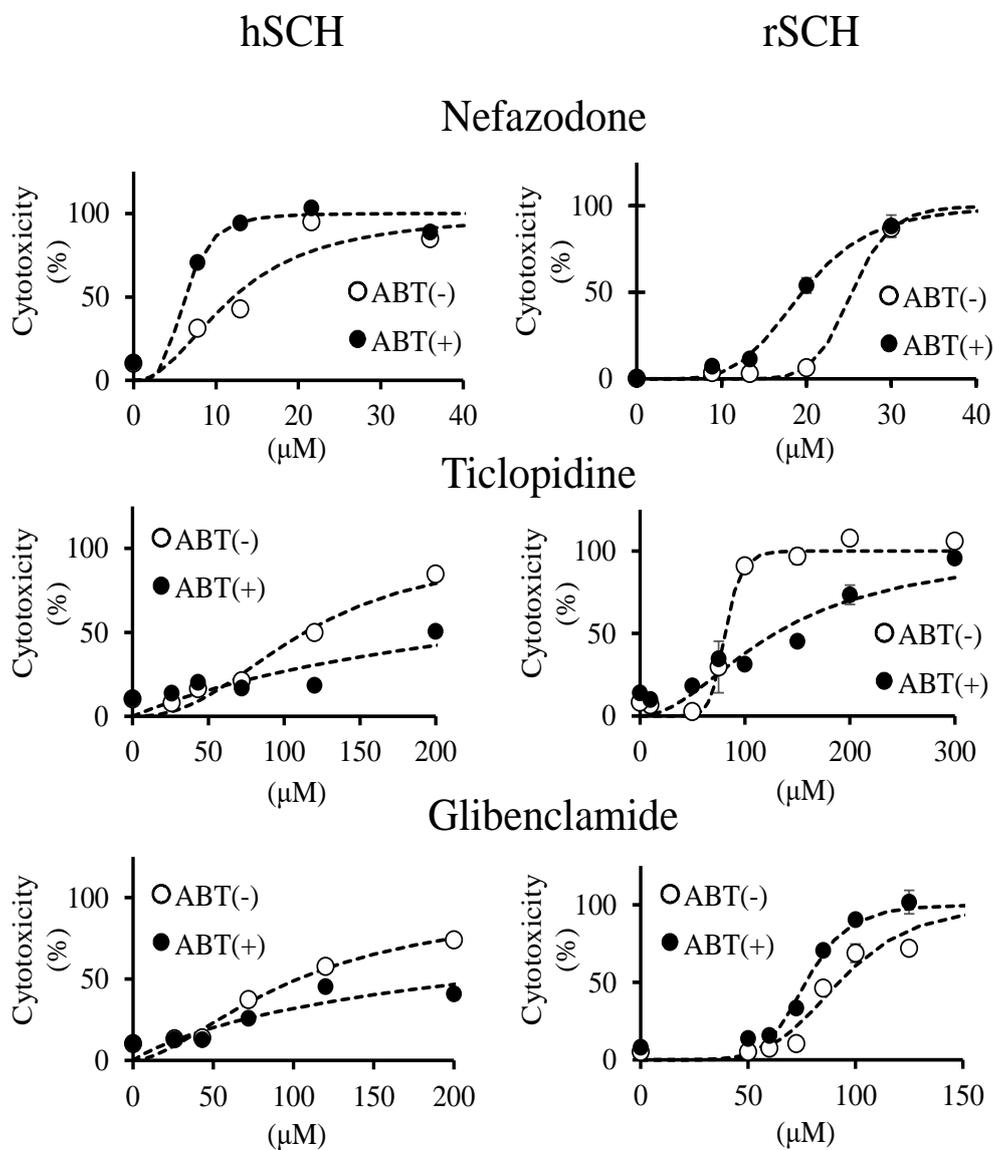


Figure 2. BAtox of nefazodone, ticlopidine, and glibenclamide in human and rat SCH.

SCH was incubated with test drug in the absence or presence of 1-ABT (hSCH; 500 μM, rSCH; 250 μM) for 24 h and then cytotoxicity was measured. Results are expressed as the mean from 2 separate experiments in hSCH (n=2) or the mean  $\pm$  S.E.M. from 3 separate experiments in rSCH (n=3).

Table 3 LC<sub>50</sub> of each compound in human and rat SCH.

	Human		Rat			
	LC <sub>50</sub> (-)	LC <sub>50</sub> (+)	LC <sub>50</sub> (-)		LC <sub>50</sub> (+)	
	(μM)		(μM)			
Bosentan	180.0	200.0	171.6 ± 6.1		147.7 ± 17.1	
Clopidogrel	126.5	200.0	80.7 ± 18.5		81.3 ± 15.2	
Clozapine	19.4	18.4	24.9 ± 3.7		22.2 ± 3.4	
Everolimus	1.4	2.5	15.9 ± 4.6		14.8 ± 5.1	
Flutamide	34.8	41.8	37.2 ± 2.6		29.8 ± 0.8	
Fusidic acid	69.9	68.6	124.4 ± 14.4		99.2 ± 13.7	
Glibenclamide	102.6	200.0	93.0 ± 17.7		79.5 ± 16.2	
Leflunomide	55.8	55.8	104.4 ± 12.1		85.1 ± 17.3	
Nefazodone	12.1	6.2	23.1 ± 1.9		14.8 ± 3.4	
Nicergoline	37.3	30.2	78.2 ± 22.0		60.1 ± 20.9	
Ritonavir	9.4	9.0	21.8 ± 5.3		13.6 ± 0.5	
Sitaxentan	56.5	68.2	73.2		67.0	
Tacrolimus	8.1	11.6	26.1 ± 6.0		21.5 ± 7.0	
TAK-875	12.8	17.6	29.2 ± 11.1		21.0 ± 4.6	
Ticlopidine	113.8	200.0	81.2		128.9	
Tolvaptan	21.5	31.2	N.T.		N.T.	

SCH was incubated with test drug in the absence or presence of 1-ABT (hSCH; 500 μM, rSCH; 250 μM) for 24 h, and then cytotoxicity was measured. LC<sub>50</sub>(+) and LC<sub>50</sub>(-) represent the LC<sub>50</sub> in the presence of 1-ABT and absence of 1-ABT, respectively. Results are expressed as the mean from 2 separate experiments in hSCH or the mean ± S.D. from 1–5 separate experiments in rSCH. N.T is Not Tested.

### ラット及びヒト肝細胞における薬物誘発性胆汁酸依存毒性の比較

1-ABT 処置の影響を評価するために、1-ABT 存在下及び非存在下における  $LC_{50}$  の比 ( $LC_{50}(+)/LC_{50}(-)$ ) を算出した。Figure 3 に示すように、多くの薬物は hSCH において  $LC_{50}(+)/LC_{50}(-)$  比が 1 以上を示した一方で、rSCH ではそのような薬物はチクロピジンのみであった。また、 $LC_{50}(+)/LC_{50}(-)$  比が 1 以下となった薬物は hSCH では少数の化合物 (ネファゾドン、ニセルゴリン) であるのに対し、rSCH ではクロピドグレル及びチクロピジンを除くほぼ全ての薬物が 1 以下を示した。これらの結果から、胆汁酸依存毒性に対する 1-ABT の影響は hSCH と rSCH の間で大きな差が存在する事が示された。

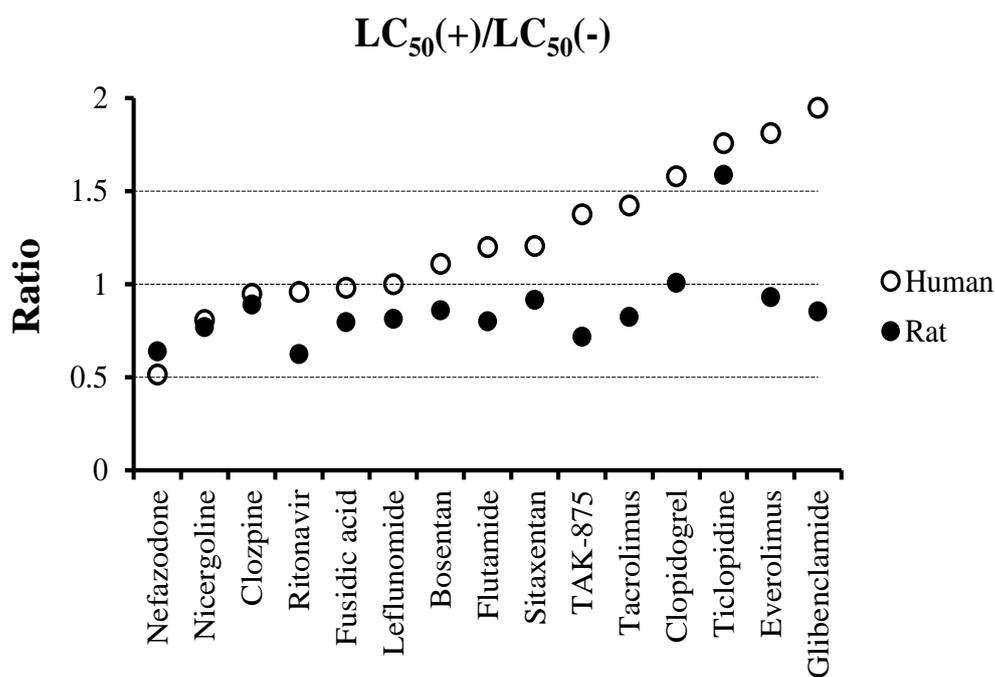


Figure 3. The ratio of  $LC_{50}$  in the presence of 1-ABT to  $LC_{50}$  in the absence of 1-ABT in human and rat SCH.

$LC_{50}(+)$  and  $LC_{50}(-)$  represent the  $LC_{50}$  in the presence of 1-ABT and absence of 1-ABT, respectively. Data are calculated using the mean of each  $LC_{50}$  value.

## 【考察】

トルバプタン及びDM-4103やDM-4107といった代謝物はBSEP阻害剤として知られており [37]、そのIC<sub>50</sub>は31.6、4.15、119 μMである。DM-4103は親化合物のトルバプタンより8倍強力にBSEPを阻害することから、胆汁酸依存毒性の発現における薬物代謝の関係を評価するにあたりトルバプタンは良いモデル化合物であると考えた。

Figure 1aに示すように、トルバプタン誘発胆汁酸依存毒性は1-ABTによって有意に減少した。トルバプタンはCYP3A4によって代謝を受け、DM-4103を含む複数の代謝物が生成する [39, 40]。本検討において、DM-4103及びDM-4107の生成はほぼ完全に1-ABT処置により阻害された (Figure 1c 及び 1d)。このことから、1-ABT処置によるトルバプタン誘発胆汁酸依存毒性の減弱はBSEP阻害を起こす代謝物の生成量が減少したことが要因の一つとして考えられた (Figure 1a)。DM-4103やDM-4107を被験物質とした胆汁酸依存毒性の評価がトルバプタン誘発胆汁酸依存毒性と代謝物の関係性を直接示すために必要と考えられるが、これら代謝物は市販されておらず評価が出来ない。今後、代謝物を用いた評価が必要と考えている。

胆汁酸組成はヒトとラット間で大きな種差が存在する [44]。ラットにおいては親水性胆汁酸の比率が高く、中でも、ヒトには認められないムリコール酸 (及びそのアミノ酸抱合体) が主な胆汁酸として知られている。その一方で、ヒトにおいては疎水性がより高く、毒性の高いケノデオキシコール酸やデオキシコール酸 (及びそのアミノ酸抱合体) が大きな比率を占める。本検討においては、薬物代謝の種差に焦点を当てるために、ラット肝細胞での検討においてもヒト組成の胆汁酸を用い検討を実施した。胆汁酸組成の種差に着目した検討は今後の課題として考えられる。

胆汁酸依存毒性の発生に薬物代謝がどれぐらい関与しているのか検討するために、15化合物の胆汁酸依存毒性を1-ABT存在下または非存在下で評価した。化合物はBSEP阻害活性 (IC<sub>50</sub>が1~100 μMのもの) を基に選抜した。LC<sub>50(+)</sub>/LC<sub>50(-)</sub>の比が1.5以上を

示した化合物はヒトではクロピドグレル、チクロピジン、エベロリムス及びグリベンクラミドであった一方ラットにおいてはチクロピジンのみであった。加えて、大部分の化合物がヒトにおいて  $LC_{50}(+)/LC_{50}(-)$  の比が 1 以上を示し、1-ABT 処置により毒性は減弱される傾向を示した。その一方でラットにおいては  $LC_{50}(+)/LC_{50}(-)$  の比は 1 以下となる化合物が多く、1-ABT によって毒性は増強される傾向を示した。なお、ネファゾドン及びニセルゴリンはラット及びヒトの両方で  $LC_{50}(+)/LC_{50}(-)$  の比が 0.8 以下であった。

薬物代謝が阻害された際、親化合物の曝露は増加する一方、代謝物の曝露は減少する事が想定される。実際に本検討においても 1-ABT 処置によって曝露 24 時間後の培地中親化合物濃度は増加傾向が認められた (data not shown)。従い、1-ABT によって胆汁酸依存毒性の増強が認められる場合、親化合物が胆汁酸依存毒性の発現に大きく寄与していると考えられる。一方で、1-ABT 処置によって胆汁酸依存毒性の減弱が認められる場合、代謝物による BSEP 阻害が毒性要因として関与していることが考えられる。

ボセンタンは CYP3A4 および 2C9 によって代謝を受け、Ro 47-8634 を含む複数の代謝物が生成する。Ro 47-8634 はラット Bsep に対し親化合物のボセンタンより強い阻害を示すことが知られている [4, 45]。本検討において、hSCH に対するボセンタンの胆汁酸依存毒性は 1-ABT 処置によって減弱傾向を示しており、トルバプタンのように代謝物が胆汁酸依存毒性の発現に寄与している可能性が示唆された。同様に、1-ABT 処置により胆汁酸依存毒性の減弱が認められた化合物については、その代謝物が BSEP 阻害活性を有し、胆汁酸依存毒性の発現に関与している可能性が考えられる。

ボセンタンは organic anion-transporting peptide (OATP) の基質になる事が知られている [46]。従い、もし 1-ABT が OATP によるボセンタンの取り込みを阻害した場合、胆汁酸依存毒性は減弱する可能性がある。Kimoto らは hSCH を用いた検討において 1-ABT はロスバスタチン、アトルバスタチン、ミダゾラムの細胞内取り込みを阻害しないことを報告している [47]。スタチンは OATPs の基質になる事が知られていることから [48]、

1-ABT はボセンタンの細胞内取り込みを阻害しないであろうと推測される。また、仮に 1-ABT が薬物の細胞内取り込みや胆汁酸の取り込みを阻害する場合、胆汁酸依存毒性は 1-ABT によって減弱する事が想定される。しかしながら、本検討で用いた取り込みトランスポーターの基質薬物（リトナビルやシタキセンタン等 [49, 50]）の LC<sub>50</sub> が変動していないことから、1-ABT の胆汁酸や薬物の取り込みに関与するトランスポーターへの影響はほとんど無いと考えられた。

本検討で使用した薬物の代謝物を単離したうえで BSEP 阻害活性の有無を評価すると、いった、詳細な検討は必要と考えられるものの、SCH を用いた本手法は薬物代謝を加味した上で胆汁酸依存毒性を評価可能であると考えられる。

Figure 3 に示すように、胆汁酸依存毒性に対する 1-ABT の作用は動物種に応じて異なる事が示された。ヒト肝細胞において、テストステロンは主に 6 $\beta$ -ヒドロキシテストステロンに代謝される。その一方で、ラット肝細胞では 16 $\alpha$ -ヒドロキシテストステロン及び 2 $\alpha$ -ヒドロキシテストステロンが主代謝物である [51]。テストステロンの主な代謝酵素はヒトでは CYP3A4 であるのに対し、ラット（雄）では CYP2C11 であり [52]、ヒトとラットにおいて種差が存在している。これらの事から、本検討で認められた胆汁酸依存毒性に対する 1-ABT の影響がヒトとラットで異なる要因の一つには代謝の種差が存在する事が推察された。

本検討では、胆汁酸依存毒性への CYP を介した薬物代謝の影響に焦点を当てているが、薬物の代謝には CYP 以外にも多くの代謝酵素が関与している [53]。抗糖尿病薬として市販されていたトログリタゾンは重篤な肝障害をヒトで起こし、市場より撤退した薬物であるが、その肝障害メカニズムの一つとして BSEP 阻害が考えられている [35, 7, 54]。Funk らはトログリタゾンの主代謝物である硫酸抱合体がラット BSEP を阻害する事を報告しており、その IC<sub>50</sub> 値はトログリタゾンに比べ約 10 倍低い事を報告している [55]。この事から、トログリタゾン硫酸抱合体も肝障害誘発に関与している事が推察さ

れる。

このように、硫酸抱合酵素を含む CYP 以外の酵素による薬物代謝についても検討が必要と考えられ、今後検証を進めていきたい。

### 【小括】

- ・ SCH を用いた胆汁酸依存毒性評価系は薬物代謝を加味して毒性評価が可能と考えられる。

- ・ 胆汁酸依存毒性に対する 1-ABT の作用はヒト及びラット間で種差が存在する事が示唆された。

薬物代謝は胆汁酸依存毒性評価に大きな影響を与える可能性がある。そのため、ヒトの毒性を評価する場合、ヒト代謝パターンに近い動物種での評価もしくはヒト肝細胞を用いて胆汁酸依存毒性の評価を実施する必要があると考えられた。

### 第三章

胆汁酸抱合酵素阻害に着目した新たな肝毒性メカニズムの検討

## 【緒言】

薬剤性肝障害 (drug-induced liver injury: DILI)は医薬品候補化合物のドロップアウト及び医薬品の市場からの撤退の大きな要因の一つとして知られている。そのため、薬剤性肝障害のメカニズム検討や新規評価系の構築は医薬品開発において重要な課題である。

トログリタゾン (troglitazone: TRO)は最初に承認されたチアゾリジンジオン系糖尿病治療薬であるが、重篤な特異体質性肝障害を引き起こし 2000 年に市場より撤退している。これまでに多くのグループがトログリタゾン誘発性肝障害メカニズムについて研究を行っており、反応性代謝物、ミトコンドリア毒性、酸化ストレス等のメカニズムがこれまでに提唱されているものの [56, 57, 58]、完全なメカニズム解明には至っていない。

Bile salt export pump (BSEP)は肝胆管側膜に発現し、肝臓から胆汁中への胆汁酸輸送を担う重要なトランスポーターの一種である [12]。そのため、BSEP 機能が阻害されると肝細胞内へ胆汁酸蓄積を引き起こし、その結果、肝障害を引き起こすと考えられている。TRO 誘発性肝障害には、このような胆汁酸を介したメカニズムも報告されており [54]、実際に TRO およびその主代謝物の硫酸抱合体は BSEP を阻害する事が知られている [35, 55, 59]。

TRO と同じチアゾリジンジオン系抗糖尿病薬であるピオグリタゾン (pioglitazone: PIO) は、1999 年に承認された後、世界中で使用されている。PIO は BSEP を阻害する事が知られており、その阻害活性は TRO に比べ 10 倍程度強い [35, 59]。しかし、PIO 治療患者において重篤な肝障害は報告されていない。このことから、TRO における胆汁酸を介した肝障害発現には BSEP 以外のメカニズムも関与していると考えられる。

ヒト血清中には、10 種類以上の胆汁酸が存在している [19]。また、胆汁酸は脂溶性が高いほど毒性が強い事も知られている。例えば、ケノデオキシコール酸

(chenodeoxycholic acid: CDCA) はそのグリシン抱合体であるグリコケノデオキシコール酸 (glycochenodeoxycholic acid: GCDCA) より脂溶性が高く [60]、HET-1A (a human

oesophageal squamous epithelial cell line)や Huh7 (a human hepatoma cell line)に対して強い細胞毒性を示すことが知られている [61]。非アミノ酸抱合型胆汁酸であるコール酸や CDCA は CYP7A1 を含む多数の酵素によってコレステロールから合成される。これらの非抱合型胆汁酸は肝臓内でグリシンやタウリン抱合を受け、より水溶性の高い胆汁酸に変換される [60]。この抱合反応を触媒するのが Bile acid-CoA ligase (BAL) 及び bile acid-CoA: amino acid N-acyltransferase (BAT) であるが [60, 62, 63]、これら抱合酵素が薬物によって阻害された場合、非抱合型胆汁酸の細胞内濃度が上昇し、その結果胆汁酸関連肝毒性の発症に関与する可能性が考えられる。

胆汁酸トランスポーターに対する薬物の作用及び DILI との関連性についてはよく研究が行われているが [35, 64, 59]、胆汁酸アミノ酸抱合への影響については研究が進んでいない。そこで、本検討では胆汁酸トランスポーターに加えて胆汁酸アミノ酸抱合が、胆汁酸が関与する肝障害の発症に重要な因子となるのではないかと仮説を立て、TRO 及び PIO を用い、両薬剤曝露時の肝細胞内の胆汁酸組成の変動及び胆汁酸アミノ酸抱合反応への影響について検討を行った。

## 【方法】

### 試薬

胆汁酸、TRO、PIO は和光純薬(株)、Sigma-Aldrich Japan、コスモバイオ(株)より購入した。Cryopreserved hepatocyte recovery medium (CHRM)、William's E medium (WEM)、L-glutamine、penicillin-streptomycin 及び Insulin は Life technologies より購入した。Fetal bovine serum (FBS) は MP Bio Japan より、Matrigel、BioCoat collagen type 1 plates は Corning より購入した。Pooled cryopreserved human hepatocytes 及び pooled human liver S9 は Sekisui Xenotech より、 $d_5$ -taurocholate sodium は Toronto Research Chemicals からそれ

ぞれ購入した。BSEP-expressing membrane vesicles は SOLVO Biotechnology から購入した。その他の試薬については全て分析グレードの物を使用した。

### 膜ベシクルアッセイ

BSEP を発現させた Sf9 細胞の膜分画より調製した BSEP 発現膜ベシクルを本検討では用いた。なお、実験手法は購入元の Solvo 社が推奨するプロトコールに従い実施しているが、以下に簡単な方法を記載する。

0.5  $\mu\text{mol/l}$  [ $^3\text{H}$ ] taurocholic acid (BSEP の基質) を膜ベシクルとともに 5 分間、薬物存在下でインキュベーションを行った後、96-well フィルタープレートによって吸引ろ過を行った。ベシクル内に取り込まれた放射能を TopCount NXT Scintillation Counter にて測定した。

### ヒト肝細胞の培養

凍結ヒト肝細胞は 37 °C に加温した CHRM 培地を用いて再懸濁した後、100g にて 10 分間室温で遠心分離を行った。そののち、ペレットを WEM (5% FBS、100 U/ml penicillin、100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin、4 mg/l insulin、1  $\mu\text{mol/l}$  dexamethasone 及び 2 mmol/l L-glutamine を含有) にて再懸濁させた。細胞生存率はトリパンブルーを用いて測定した。なお、本検討で使用した肝細胞は全て 90%以上の生存率を示した。肝細胞は 48-well もしくは 96-well BioCoat プレートへ  $2.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種した。

約 4 時間後、氷冷した WEM (100 U/ml penicillin、100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin、4 mg/l insulin、0.1  $\mu\text{mol/l}$  dexamethasone、及び 2 mmol/l L-glutamine を含有)に溶解させた Matrigel (0.3 mg/ml) を重層させることでサンドイッチ培養を開始した。その後、一日に一度培地交換を実施し、播種後 3 日目に各種検討を実施した。

なお、肝細胞は 37 °C 条件下の CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養した。

## ヒト肝細胞中への胆汁酸蓄積

培養 4 日目、各 well 中の培地を全て取り除き、TRO もしくは PIO (5 及び 50  $\mu\text{mol/l}$ ) 及び CDCA もしくはデオキシコール酸 (DCA, 5  $\mu\text{mol/l}$ ) を溶解させた培地を添加した。TRO 及び PIO は dimethylsulfoxide (DMSO) 中に溶解させた後、WEM 中(0.1% [v/v] DMSO) に所定濃度となるように調整した。なお、媒体のみを曝露させたものをコントロールとした。

薬物及び胆汁酸を処置し 37 °C で 0.5 もしくは 8 時間インキュベーションした後、氷冷した HBSS にて 3 度、Well 内を Wash した。その後は、Liquid-chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis を行うまで、細胞は冷凍庫にて保管した。

凍結保存しておいた細胞プレートを室温に戻した後、1N NaOH (100  $\mu\text{l/well}$ ) で 0.5 h 時間振盪し 1N HCl (100  $\mu\text{l/well}$ ) で中和を行った。各 well の細胞溶解液は 1.5ml チューブに移し、200  $\mu\text{l}$  のメタノール (15 ng/ml  $\text{d}_5$ -taurocholate sodium を内部標準物質として含む) を添加し約 30 秒間攪拌した。その後、20400 g で 10 分間遠心を行った。上清を Captiva 96-well 0.45- $\mu\text{m}$  polyvinylidene fluoride (PVDF) filter plates を用いてフィルター処理した後、CDCA、DCA、GCDCA、グリコデオキシコール酸 (GDCA) を LC-MS/MS にて定量した。無処置の肝細胞抽出液中には内因性の GCDCA が検出されたため、本検討では検量線用のブランクには生理食塩水を用いた。細胞溶解液中のタンパク濃度は Pierce BCA protein assay kit を用いて定量した。

## 胆汁酸アミノ酸抱合代謝阻害

アミノ酸抱合代謝実験は Shonsey らが報告している方法を参考に実施した [62, 63]。反応溶液 (50 mmol/l phosphate buffer (pH 7.4)、10 mmol/l glycine、50  $\mu\text{mol/l}$  coenzyme A、5 mmol/l ATP、5 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ 、5 mmol/l dithiothreitol、0–10  $\mu\text{mol/l}$  TRO もしくは PIO、

0.5 mg protein/ml ヒト肝 S9) は 5 分間 37 °C でプレインキュベーションを行った後、基質の CDCA もしくは DCA (1 μmol/l) を添加する事で反応を開始した。なお、媒体 (1% DMSO) のみを添加したものをコントロールとした。20 分間 37 °C でインキュベーションした後、50 μl の反応溶液を 200 μl のメタノール (15 ng/ml d<sub>5</sub>-taurocholate sodium を内部標準として含む) 中に添加する事で反応停止させた。その後、990g で 10 分間遠心分離を行い、上清 100 μl を 400 μl の初期移動相 (10 mmol/l 酢酸アンモニウム溶液/メタノール[1:1]) にて希釈した後、Captiva 96-well 0.45-μm PVDF フィルタープレートにてフィルター処理を行った。フィルター処理後の溶液を LC-MS/MS 分析に供した。

### LC-MS/MS 分析

Shimadzu LC 20A システムを接続した QTRAP 5500 質量分析計にて胆汁酸の定量を行った。カラムは Hydrosphere C18 column (75 × 2.0mm, 5 mm)を用いた。移動相 A として 10 mmol/l 酢酸アンモニウム、移動相 B としてメタノールを用い、グラジエントは以下の通り設定した。

0-0.5 min	0.5-1.0 min	1.0-3.5 min	3.6-4.5 min	4.6-5.5 min	5.6-6.5 min
移動相 A	移動相 A	移動相 A	移動相 A	移動相 A	移動相 A
50%	50%⇒30%	30%	20%	10%	50%

溶出時間及び各胆汁酸のモニターイオンは table 1 にまとめた。

Table 1 Transitions monitored for liquid-chromatography-tandem mass spectrometry analysis of bile acids

Bile acid	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MRM	IS	CE (V)	RT (min)
CDCA	391.3	391.3→391.3	d <sub>5</sub> -TCA	-50	4.04
DCA	391.3	391.3→345.1	d <sub>5</sub> -TCA	-44	4.31
GCDCA	448.3	448.3→74.0	d <sub>5</sub> -TCA	-86	3.45
GDCA	448.3	448.3→74.0	d <sub>5</sub> -TCA	-88	3.79
d <sub>5</sub> -TCA	519.2	519.2→79.9		-136	2.46

Abbreviations: CDCA = chenodeoxycholic acid; DCA = deoxycholic acid; GCDCA = glycochenodeoxycholic acid; GDCA = glycodeoxycholic acid; d<sub>5</sub>-TCA = taurocholic acid; MRM = multiple reaction monitoring; IS = internal standard; CE = collision energy; RT = retention time

### 細胞毒性

CDCA もしくは DCA (5-200 μmol/l) 存在下又は非存在下で TRO 及び PIO (25 μmol/l) を 24 時間処置した。その後、培地中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を指標に細胞毒性を評価した。なお、LDH 活性の測定は LDH-Cytotoxic Test (タカラバイオ(株))を用いた。

### データ解析

IC<sub>50</sub> 値は以下の計算式に従い、pharmacokinetic analysis software Phoenix WinNonlin (ver. 6.)を用いて算出した。

$$\% \text{ of control} = 100 \times (1 - (I^\gamma / (I^\gamma + IC_{50}^\gamma)))$$

I: TRO or PIO concentration (μmol/l), γ: Hill coefficient

なお、得られたデータは 1-way ANOVA followed by the Tukey's test にて統計解析を行い、P < 0.05 の場合有意差有と判断した。

## 【結果】

### トログリタゾン及びピオグリタゾンによる BSEP 阻害

TRO 及び PIO はともに BSEP 阻害剤として知られている [35, 59]。本検討においても、BSEP 発現膜ベシクルを用いて TRO 及び PIO の BSEP 阻害作用を確認する事とした。

Figure 1 に示すように、TRO 及び PIO はともに濃度依存的に BSEP 活性を阻害し、その IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 2.1 及び 0.12  $\mu\text{mol/l}$  であった。PIO の BSEP 阻害作用は TRO の約 20 倍強かった。

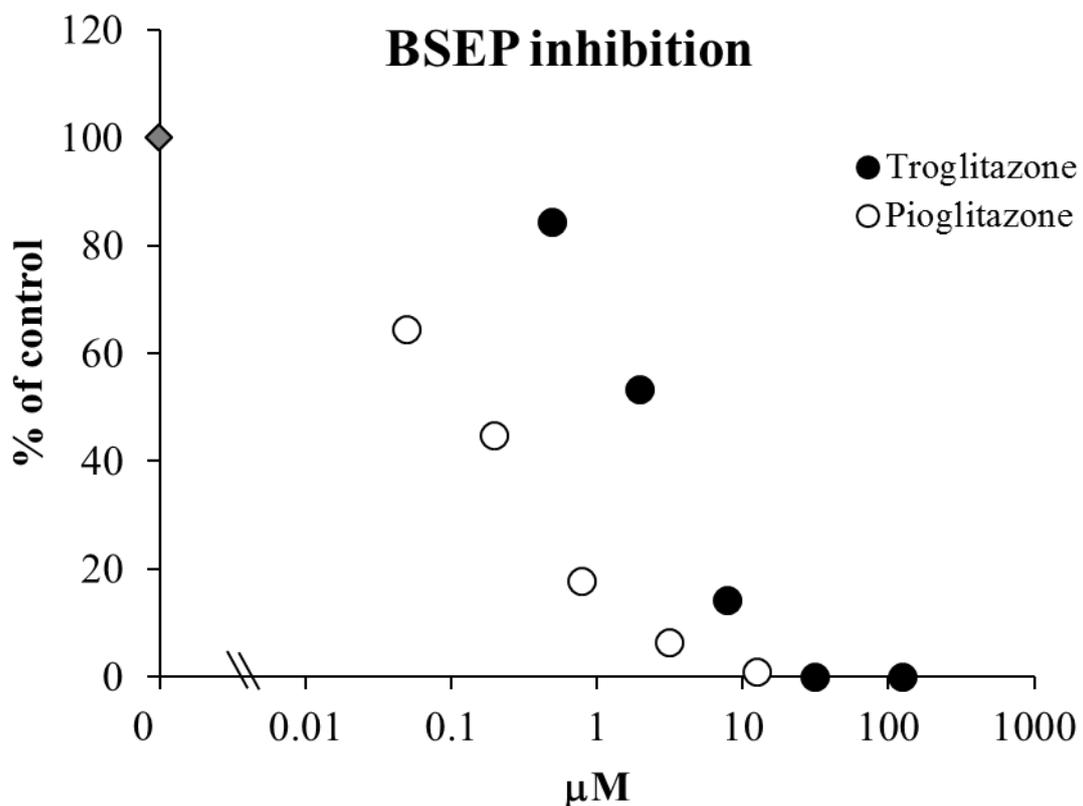


Figure 1. Inhibition of human BSEP transport activity by TRO and PIO.

The concentration-dependent inhibition of BSEP by troglitazone (●) and pioglitazone (○) is shown. BSEP-expressing Sf9 vesicles were incubated with 0.5  $\mu\text{mol/L}$  [<sup>3</sup>H] taurocholic acid for 5 min in the presence of test compounds. Results are expressed as the mean from two separate experiments (n=2).

## 肝細胞中の胆汁酸組成

サンドイッチ培養肝細胞(SCHs)は通常の培養条件で培養した肝細胞に比べ、細胞極性の回復、トランスポーターや薬物代謝活性が維持されているという点で優れていることから [17]、より生理的な肝臓を反映した *in vitro* モデルと考えられる。そのため、本検討においても SCHs を用いる事とした。

インキュベーション時間依存的な影響を評価するために、本評価では2時点(0.5 時間及び 8 時間)を設定した。また、タウリン抱合型胆汁酸の生成量がごくわずかであったことから、アミノ酸抱合型胆汁酸としてはグリシン抱合型のみを測定対象とした。なお、測定対象の4胆汁酸のうち、内因性胆汁酸として GCDCA のみが検出された。

0.5 時間インキュベーション条件において、細胞内の CDCA 量は 50  $\mu\text{mol/l}$  TRO 処置群を除き、全ての処置群で減少した(Figure 2a)。8 時間インキュベーション後には、50  $\mu\text{mol/l}$  TRO 処置群で CDCA 量が有意に増加を示し(Figure 2b)、細胞内 GCDCA 量は減少した(Figure 2d)。なお、DCA 及び GDCA(Figure 3)も同様の細胞内挙動を示した。

TRO 及び PIO の細胞内アミノ酸抱合型胆汁酸の生成量への影響を評価するために、アミノ酸抱合型胆汁酸生成量/非抱合型胆汁酸量の比を算出した。0.5 時間インキュベーション後のコントロール群における GCDCA/CDCA 比及び GDCA/DCA 比は 1.8 及び 8.8 であった(figure 4)。GCDCA/CDCA 比は 5  $\mu\text{mol/l}$  TRO 処置により 1.44 に 50  $\mu\text{mol/l}$  TRO 処置により 0.44 に低下した。また、GDCA/DCA 比は 5  $\mu\text{mol/l}$  TRO 処置により 5.25 に 50  $\mu\text{mol/l}$  TRO 処置により 0.88 に低下した。一方、PIO は 50  $\mu\text{mol/l}$  処置時のみ軽微な減少作用を示した (GCDCA/CDCA: 1.55 及び GDCA/DCA: 7.04)。

総じて、TRO 処置による影響は PIO に比べて大きいものであった。

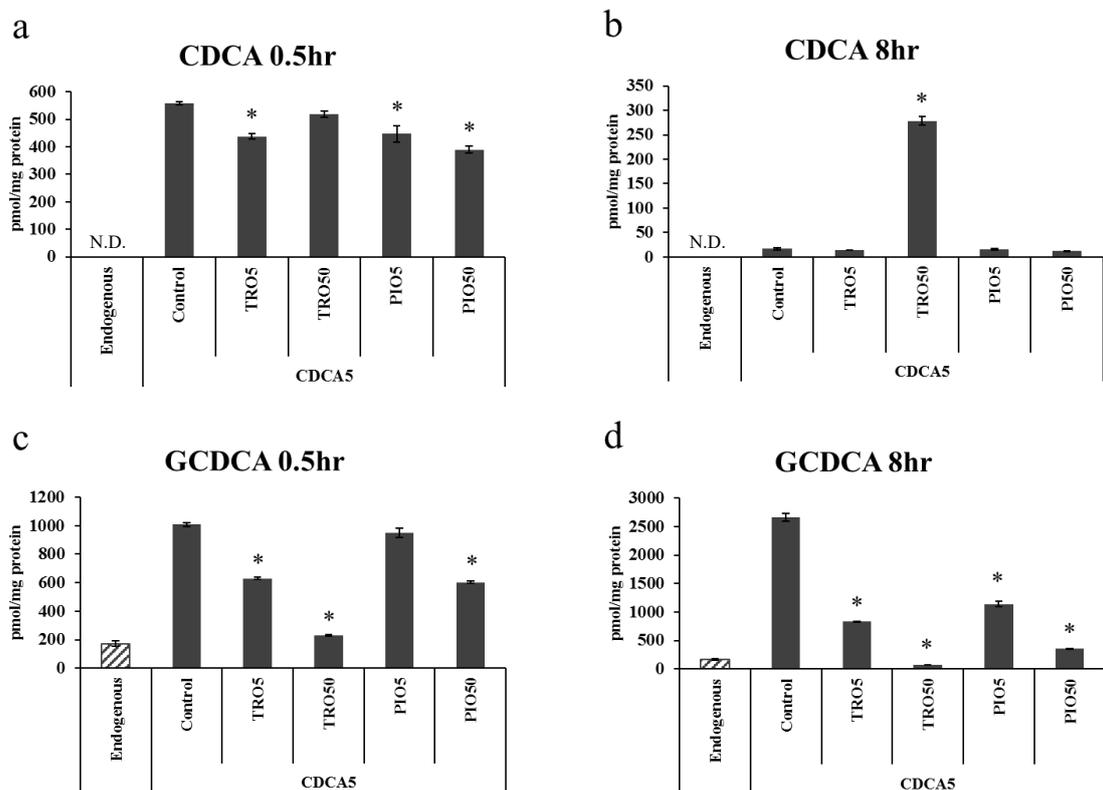


Figure 2. Intracellular amount of CDCA and GCDCA treated with TRO or PIO after 0.5 and 8 h of incubation.

Hepatocytes were cultured for 3 days and then treated with TRO or PIO in the presence of CDCA. After 0.5 and 8 h of incubation, the intracellular CDCA (a, b) and GCDCA (c, d) levels were measured by LC-MS/MS. Bars (described as control) show the amount of each BA in hepatocytes treated with CDCA but in the absence of TRO or PIO. Hatched bar represents the endogenous BA level in hepatocytes (not treated with CDCA). Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. from three separate experiments (n=3). \* indicates significant difference from control ( $p < 0.05$ ). N.D., not detected.

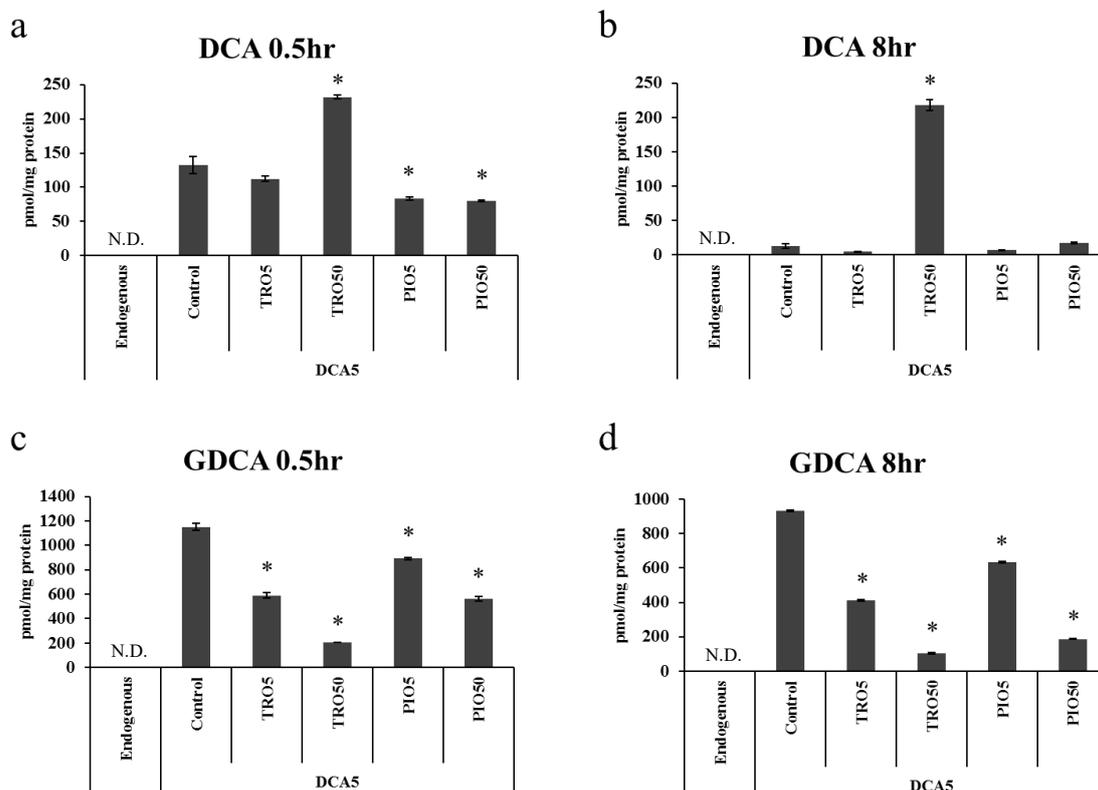


Figure 3. Intracellular amounts of DCA and GDCA after cell treatment with TRO or PIO for 0.5 and 8 h.

Hepatocytes were cultured for 3 days and then treated with TRO or PIO in the presence of DCA. After 0.5 and 8 h of incubation, the intracellular DCA (a, b) and GDCA (c, d) levels were measured by LC-MS/MS. Bars (described as control) show the amounts of each BA in hepatocytes treated with DCA but in the absence of TRO or PIO. Hatched bar represents the level of endogenous BA in hepatocytes (not treated with DCA). Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. from three separate experiments (n=3). \* indicates significant difference from control ( $p < 0.05$ ). N.D., not detected.

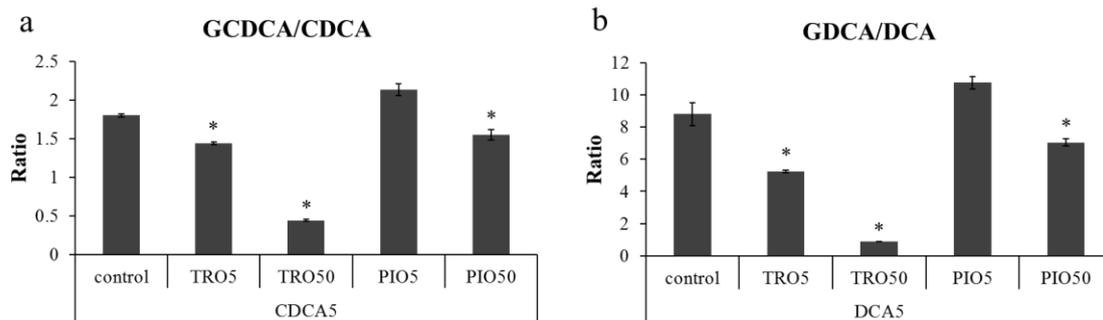


Figure 4. Ratio of intracellular levels of GCDCA to CDCA and GDCA to DCA after 0.5 h of incubation in the presence of CDCA or DCA.

GCDCA/CDCA ratio (a) and GDCA/DCA ratio (b) are shown. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. from three separate experiments (n=3). \* indicates significant difference from control (p < 0.05).

#### 胆汁酸アミノ酸抱合反応の阻害

体内に存在する大部分の胆汁酸はグリシンもしくはタウリン抱合型として存在している [65]。肝臓での胆汁酸アミノ酸抱合は BAL 及び BAT という 2 つの酵素によって行われることが知られている [60, 62, 63]。肝細胞内の非抱合型胆汁酸は肝ミクロソーム中の BAL によって coenzyme A thioester に変換され、引き続きサイトゾル中に存在する BAT によってアミノ酸抱合を受ける [66, 67, 68]。そこで、ヒト肝 S9 画分を用い、TRO 及び PIO のアミノ酸抱合反応への影響について検討を実施した。

Figure 5 に示すように、TRO は CDCA 及び DCA のアミノ酸抱合反応を濃度依存的に阻害する事が明らかとなった。一方、PIO はそのような作用は全く認められず、100  $\mu\text{mol/l}$  までアミノ酸抱合反応を阻害しなかった(data not shown)。

TRO によるアミノ酸抱合反応阻害に対する IC<sub>50</sub> 値は CDCA 及び DCA に対し、それぞれ 5.4 及び 3.2  $\mu\text{mol/l}$  であった。

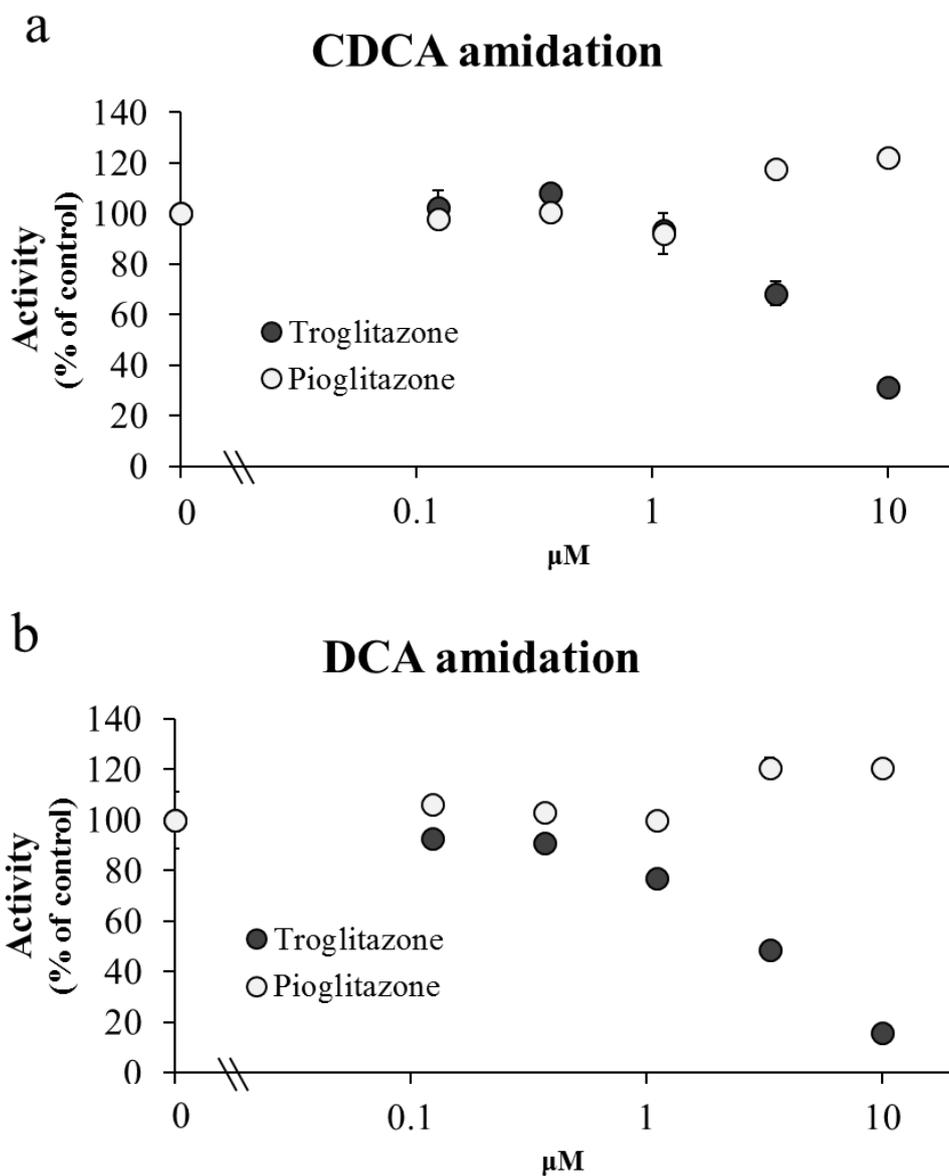


Figure 5. Inhibition of CDCA and DCA amidation activity by TRO.

Concentration-dependent inhibition of CDCA and DCA amidation by troglitazone (●) and pioglitazone (○) is shown. CDCA or DCA was incubated with human liver S9 fraction for 20 min in the presence of TRO or PIO. The amounts of amidated CDCA and DCA, i.e., GCDCA (a) and GDCA (b), were measured by LC-MS/MS. Results are expressed as the mean ± S.E.M. from three separate experiments (n=3).

## 胆汁酸依存的な細胞毒性の評価

肝細胞中への胆汁酸蓄積によって引き起こされる毒性は SCH へ薬物と胆汁酸を同時に曝露する事で評価が可能である事を第一章で示している [41]。そこで、この実験手法を用い TRO もしくは PIO が胆汁酸依存的細胞毒性作用を示すか否か検討を実施した。

添加する胆汁酸の最大濃度は BAL や BAT を発現していない HET-1A 細胞に対する  $CC_{50}$ (half maximal cytotoxic concentration)を基に 200  $\mu\text{mol/l}$  に設定した [61]。

Figure 6 に示すように、CDCA 及び DCA 非存在下では TRO 及び PIO は細胞毒性を示さなかった。また、PIO は CDCA もしくは DCA 存在下においても細胞毒性を示さなかった。一方で、TRO は CDCA もしくは DCA の存在下では添加する胆汁酸の濃度依存的に細胞毒性の増強が認められた。中でも、CDCA もしくは DCA の濃度が最低濃度の 5  $\mu\text{mol/l}$  条件下においても、TRO は有意な細胞毒性を示した。

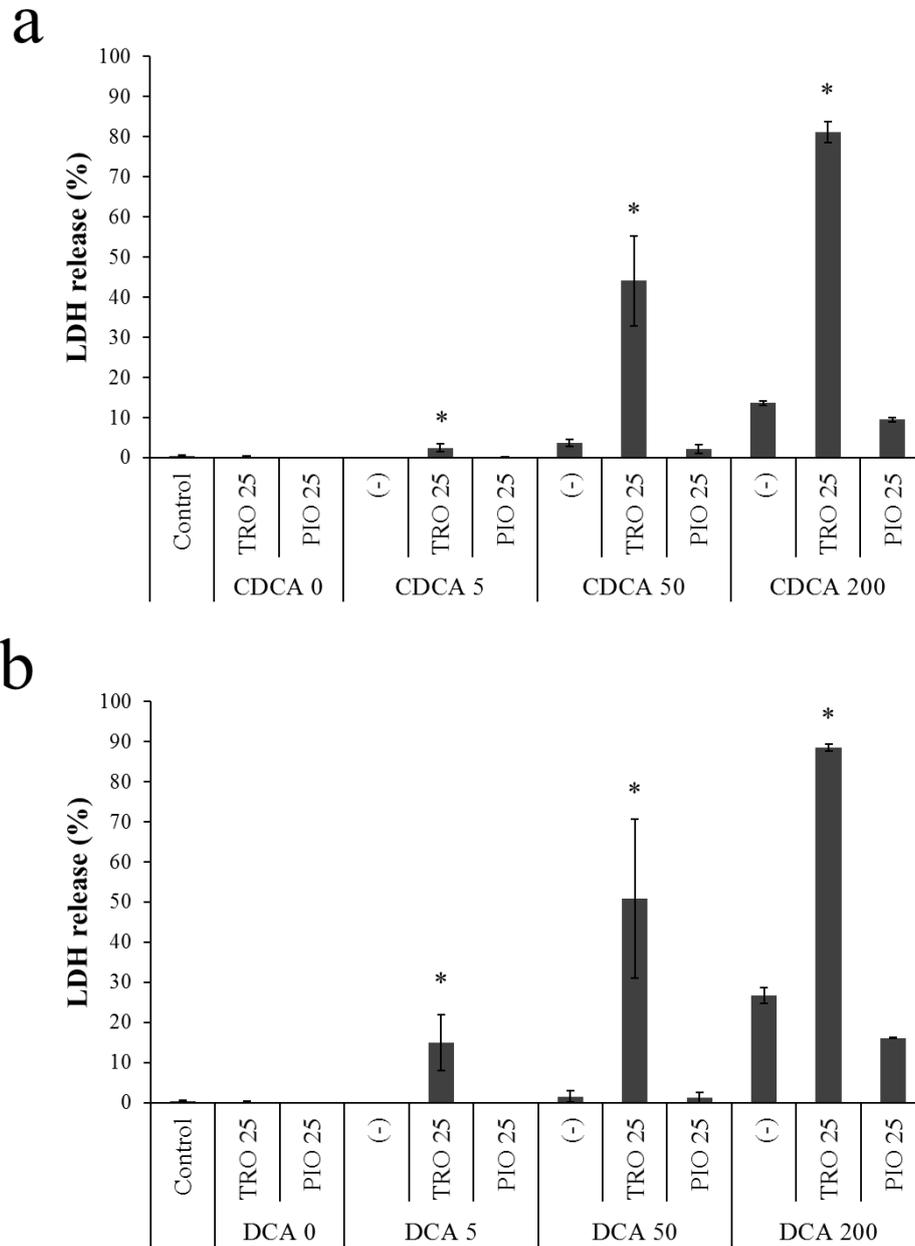


Figure 6. The effect of co-treatment with TRO or PIO and CDCA or DCA on hepatocyte toxicity. Hepatocytes were cultured for 3 days and then incubated with TRO or PIO (25  $\mu\text{mol/L}$ ) in the absence (a) or presence of CDCA (b) or DCA (c) for 24 h. Cytotoxicity was measured after 24 h of incubation. Results are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. from three separate experiments (n=3). \*indicates significant difference from the (-) group (CDCA/DCA treatment without TRO/PIO,  $p < 0.05$ ). The control represents no drug treatment (vehicle).

Table 2 IC<sub>50</sub> for bile acid transporters, and the C<sub>max</sub> and protein binding rate for troglitazone and pioglitazone

		Troglitazone	Pioglitazone	
μmol/L	IC <sub>50</sub>	BSEP	2.1	0.12
		NTCP	0.33 <sup>(a)</sup>	4.04 (K <sub>i</sub> ) <sup>(b)</sup>
		MRP3	31 <sup>(c)</sup>	133 <sup>(c)</sup>
		MRP4	61 <sup>(c)</sup>	49.5 <sup>(c)</sup>
	C <sub>max</sub>	3.17 <sup>(d)</sup>	5.33 <sup>(e)</sup>	
Protein binding rate		> 0.99 <sup>(f)</sup>	> 0.98 <sup>(e)</sup>	

Abbreviations: BSEP = bile salt export pump; NTCP = Na<sup>+</sup>-dependent taurocholate cotransporting polypeptide; MRP = multidrug resistance-associated protein; IC<sub>50</sub> = concentration of inhibitor at which binding is reduced by half; C<sub>max</sub> = maximum concentration

(a) (Marion et al., 2007)

(b) (Dong et al., 2014)

(c) (Morgan et al., 2013)

(d) (Prueksaritanont et al., 2001)

(e) Japanese interview form

(f) (Parker JC, 2002)

## 【考察】

本検討において、TRO 及び PIO の BSEP 阻害作用を確認した結果、IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 2.1 及び 0.12 µmol/l であった。これらの数値は過去の報告値と同等であった [35, 59]。Funk らは TRO の主要代謝物である TRO 硫酸抱合体が BSEP を阻害する事を報告しており、その IC<sub>50</sub> 値は 0.4-0.6 µmol/l であり TRO より約 10 倍阻害活性が強い事を示している [55]。

TRO、TRO 硫酸抱合体及び PIO のヒト循環血中最大濃度(C<sub>max</sub>)はそれぞれ 3.17、9.78 及び 5.33 µmol/l と報告されている [69, 70, Japanese interview form]。トランスポーターを介した薬物間相互作用評価において、C<sub>max</sub> と IC<sub>50</sub> の比(C<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub>)が一つの指標として用いられている [71]。すなわち C<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub> の比が大きいものほど相互作用リスクが高いと考えられている。TRO、TRO 硫酸抱合体及び PIO の C<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub> 比はそれぞれ、1.51、24.5 及び 44.4 となり(TRO 硫酸抱合体の値はラット Bsep に対する値を代用)、BSEP に対する in vivo 阻害ポテンシャルは PIO が最も強い事が示唆される。しかしながら、本検討において PIO の胆汁酸存在下における細胞毒性は TRO に比べ弱いものであった。これらの事象より、TRO 誘発性胆汁酸関連肝障害は BSEP 阻害作用のみによって引き起こされるのではなく、胆汁酸蓄積に関わる BSEP 阻害以外のメカニズムも関与しているのではないかと考えられた。

CDCA もしくは DCA 存在下の肝細胞へ TRO 及び PIO を処置し、細胞内胆汁酸組成への影響について検討を行った。Table 2 に記載する通り、TRO 及び PIO は共に BSEP だけでなくその他の胆汁酸トランスポーターを阻害する事が知られており、これら薬物による細胞内の抱合型及び非抱合型の胆汁酸濃度への影響を単純に考えることは難しい。

TRO 及び PIO は Na<sup>+</sup>-dependent taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)を阻害する事が知られている [72, 73]。本検討で用いた TRO 及び PIO の濃度条件下では、その

IC<sub>50</sub> 値から考える限り NTCP は強力に阻害されると考えられる。しかしながら、本検討において 0.5 時間インキュベーション後の細胞内 CDCA もしくは DCA 量はあまり減少をしていない(Figure 2a 及び 3a)。これは、CDCA や DCA などの脂溶性の高い胆汁酸においては受動拡散や NTCP 以外の取り込みトランスポーターが細胞内移行の主要なメカニズムとして寄与しているため、TRO 及び PIO による影響が小さかった可能性が考えられる。

また、Figure 2b 及び 3b に示すように、TRO によって細胞内 CDCA もしくは DCA の蓄積が認められている。水溶性の高い胆汁酸（すなわち GCDCA や GDCA）と比べ、脂溶性の高い胆汁酸（すなわち CDCA や DCA）の細胞内移行における受動輸送の寄与率は高いと考えられ、table 2 に示すようなトランスポーターの阻害によってのみこのような現象が引き起こされていると考えにくい。CDCA 及び DCA は細胞内に取り込まれた後、アミノ酸抱合もしくはトランスポーターによる排泄を受けると考えられる。

Multidrug resistance associated protein 3 (MRP3) 及び MRP4 は血管側へ発現しており、肝臓から血中への胆汁酸排泄を行う事で細胞内胆汁酸濃度の低下に関わっている [64, 74]。すなわち、細胞内の抱合型胆汁酸は培地中にも排泄されていると考えられる。TRO 及び PIO は MRP3 及び MRP4 に対し、弱いながら阻害作用を持つことが報告されている (Table 2)。本検討において、TRO 50 µmol/l の処置により曝露 8 時間後の時点で CDCA 及び DCA が有意に肝細胞内へ蓄積している(Figure 2b 及び 3b)。一方で、GCDCA 及び GDCA 量は TRO 及び PIO によって減少している(Figure 2d 及び 3d)。もし MRP3、4 が TRO もしくは PIO によって阻害されていた場合、GCDCA 及び GDCA も CDCA や DCA と同様に細胞内へ蓄積すると考えられる。しかし、GCDCA 及び GDCA の細胞内蓄積は認められていない事から、TRO による CDCA 及び DCA の細胞内蓄積について MRP3 や MRP4 が関与している可能性は低いと考えられた。

MRP3 もしくは MRP4 により培地中へ排泄された GCDCA 及び GDCA は NTCP によ

って再取り込みを受けると考えられる。上述の通り、本検討で用いた PIO の濃度条件において NTCP は阻害されていると考えられ、細胞内 GCDCA 及び GDCA の減少は一度培地中へ排泄された GCDCA/GDCA の再取り込み阻害が原因の一つとして考察される。

胆汁酸アミノ酸抱合は BAL 及び BAT の 2 つの酵素を介した 2 段階反応で行われる [60, 62, 63]。なお、遺伝子変異による BAL や BAT 機能障害は胆汁うっ滞、脂溶性ビタミンの吸収障害や成長遅延を起こすことが知られている [75, 76]。

Figure 5 に示すように、TRO は濃度依存的に CDCA 及び DCA のアミノ酸抱合を阻害し、その IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 5.4 及び 3.2 µmol/l であった。Vessey 及び Kelley [77] はシクロスポリンが胆汁酸アミノ酸抱合の律速酵素である BAL [66] を阻害する事を報告している。BAL は 1 段階目の反応を触媒するという事もあり、胆汁酸アミノ酸抱合阻害に重要な酵素であると考えられるが、薬物による胆汁酸アミノ酸抱合阻害に関する情報は非常に限られており、今後さらなる研究が必要である。

HET-1A 細胞を用いた検討において、CDCA (CC<sub>50</sub>: 216 µmol/l) 及び DCA (CC<sub>50</sub>: 257 µmol/l) は GCDCA (CC<sub>50</sub>: > 500 µmol/l) 及び GDCA (CC<sub>50</sub>: > 500 µmol/l) に比べ強い細胞毒性を示すことが知られている [61]。予備検討において、CDCA 及び DCA の毒性を検討したところ、肝細胞への毒性はこれら文献値から考えられる濃度より高い濃度で認められた (data not shown)。Figure 2 及び 3 に示すように、CDCA 及び DCA は肝細胞内において速やかに GCDCA 及び GDCA に変換される。すなわち、CDCA や DCA といった毒性の高い脂溶性胆汁酸は肝細胞ではアミノ酸抱合によって解毒されていると推察される。肝細胞を用いて CDCA 及び DCA の細胞毒性を評価した場合、アミノ酸抱合されてしまう事から GCDCA (GDCA) と CDCA (DCA) を分離して評価する事が難しい。そのため、細胞毒性の検討 (Figure 6) を実施するにあたり、BAL や BAT が発現していない非肝細胞系で評価されたデータを参考に CDCA 及び DCA の濃度条件を設定した。

本検討において、TRO は胆汁酸存在下においてのみ有意な肝細胞毒性を示した。一

方で、PIOについては胆汁酸の有無にかかわらず細胞毒性を示さなかった。胆汁酸は活性酸素種やミトコンドリア毒性等を引き起こし、アポトーシス/ネクローシスを経て細胞毒性を引き起こすことが報告されている [78]。従い、本検討で認められたTROによる胆汁酸依存的な毒性についても同様なメカニズムで毒性が引き起こされたと推察される。

Figure 6に示すように、TROはCDCA及びDCAによる肝細胞毒性を有意に増強した。TROの毒性増強作用は胆汁酸濃度が5  $\mu\text{mol/l}$  という低濃度条件下でも認められており、このような胆汁酸濃度は生理的な濃度と比較しても大きくかけ離れているものではない。健常人の血清中総胆汁酸濃度は2-5  $\mu\text{mol/l}$  である事が知られている一方で、肝疾患患者においては6-600  $\mu\text{mol/l}$  にまで変動する [79, 80, 19, 81]。すなわち、特に肝疾患を保有する患者において、体内の胆汁酸濃度はダイナミックに変動している事が推察される。また個々の胆汁酸においても、肝疾患患者においてCDCAは80  $\mu\text{mol/l}$  にまで上昇する事が知られている [81]。組織間においても胆汁酸濃度は変動する事が知られ、Lindbladらは肝機能に異常の無いヒトにおいて循環血中、門脈血中、肝臓中、胆汁中の胆汁酸濃度比は1:3:80:2600となる事を報告している [82]。このように、ヒトの胆汁酸濃度は個人間だけでなく、体内の組織間においても大きく変動している事から、TROのような胆汁酸アミノ酸抱合阻害作用を持つような薬物によって、特定の患者において肝障害が引き起こされる可能性は十分あり得ると考えられた。

TROによってCDCA及びDCAのアミノ酸抱合は阻害される( $\text{IC}_{50}$ :3-5  $\mu\text{mol/l}$ )一方で、PIOは全く阻害作用を示さなかった(Figure 5)。BSEPは非抱合型胆汁酸より抱合型胆汁酸に高い基質認識性を示すことが知られている [28]。従い、BSEPはCDCAやDCAの肝細胞からのクリアランスにあまり寄与していない可能性がある。これらの点を考慮すると、TROの胆汁酸アミノ酸抱合阻害によってCDCAやDCAの胆汁酸蓄積が促進され、その結果細胞毒性が引き起こされた可能性が考えられる(Figure 7)。一方で、PIOは強い

BSEP 阻害作用を示すもののアミノ酸抱合は阻害しない。この違いが PIO ではこれまで重篤な肝障害が報告されていない理由の一つとして考えられた。

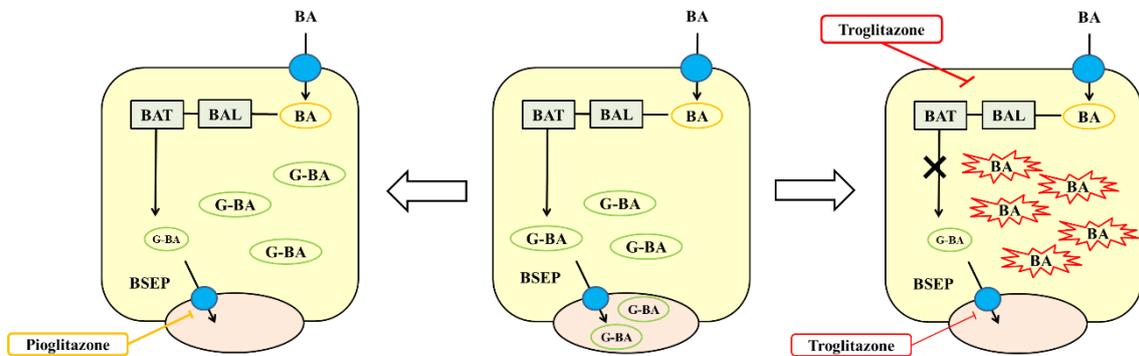


Figure 7. Schema showing the potential mechanisms of troglitazone-mediated accumulation of non-amidated bile acids in hepatocytes.

### 【小括】

- ・ TRO は胆汁酸のアミノ酸抱合阻害を引き起こし、TRO による胆汁酸関連肝障害の新たなメカニズムとして考えられた。
- ・ TRO が胆汁酸アミノ酸抱合阻害を起こす事を初めて明らかにした初めての検討である。

BSEP 阻害作用に加え胆汁酸アミノ酸抱合阻害作用を合わせて評価する事は胆汁酸関連肝障害のリスク評価に有用と考えられる。

## 【総括】

本研究では、胆汁酸蓄積に起因する肝毒性に関する検討を実施した。

### 第一章 胆汁酸依存的な薬剤性肝毒性検出方法の確立

胆汁酸蓄積を起因とする肝毒性発現を評価するために、SCH を用いて新たな肝毒性評価系の構築に取り組んだ。すなわち、薬物を処置した際、胆汁酸存在下でのみ認められる毒性を胆汁酸依存的な毒性とし、このような毒性を検出できる評価系の構築を行った。ヒト血清中に含まれる主要胆汁酸 12 種類を選定し、培地中に添加する胆汁酸濃度の設定を行った後、胆汁酸を培地中に添加した条件で、複数の被験化合物（リトナビルやトログリタゾン等）を SCH へ 24 時間曝露し、培地中に漏出した LDH 活性を評価する事で毒性を評価した。その結果、胆汁酸依存的な毒性を示した 11 化合物のうち 9 化合物が BSEP 阻害作用を持つものであり、胆汁酸の細胞内蓄積が毒性発現の要因として推察される。胆汁酸蓄積に起因する肝毒性を検出可能な評価系を構築する事が出来たと考えられる。

### 第二章 胆汁酸依存的肝毒性と薬物代謝に関する検討

BSEP 阻害を起こす薬物の中には、代謝物が親化合物より強い BSEP 阻害作用を示すものがあり、胆汁酸依存毒性には薬物代謝が深く関係していると推測される。そのため、第一章で構築した評価系を用いて胆汁酸依存毒性の発現と薬物代謝の関係についてラット及びヒトの肝細胞を用いて検討を行った。代謝物による BSEP 阻害が報告されているトルバプタンでは、1-ABT 処置によってヒト SCH の胆汁酸依存毒性が有意に減弱した。このとき、代謝物の生成はほぼ完全に阻害されていたことから、代謝物による BSEP 阻害作用の減弱が毒性を弱くさせた要因の一つとして考えられた。また複数の化合物（クロピドグレルやチクロピジン等）についてヒト肝細胞では 1-ABT 処置によって胆

胆汁酸依存毒性の減弱が認められる一方で、ラットではチクロピジンのみで毒性の減弱が認められただけであった。総じて、ヒト肝細胞では 1-ABT 処置により薬物による胆汁酸依存毒性は減弱される傾向がみられた。このことから、ラットとヒトの間では胆汁酸依存毒性に及ぼす 1-ABT の作用に種差が存在する事が示された。ラットとヒトでは代謝パターンが異なる可能性を示唆しており、胆汁酸依存毒性評価において薬物代謝が大きな影響を与える可能性が考えられる。そのため、ヒト代謝パターンに近い動物種での評価もしくはヒト肝細胞を用いて胆汁酸依存毒性の評価を実施する必要があると考えられた。

### 第三章 胆汁酸抱合酵素阻害に着目した新たな肝毒性メカニズムの検討

胆汁酸蓄積に起因する肝毒性について BSEP などの胆汁酸トランスポーターを介したメカニズムについては広く研究が行われてきたが、トランスポーター以外の毒性メカニズムについては報告が少なく研究が進んでいない。そこで、TRO 及び PIO を被験物質として用い、胆汁酸抱合阻害と肝毒性との関係について検討を実施した。

ヒト肝 S9 画分中の胆汁酸アミノ酸抱合反応に対し、TRO は顕著な阻害作用を示した (IC<sub>50</sub>: 3-5 μmol/l)。また、TRO 処置によってヒト肝細胞中の非抱合型胆汁酸 (CDCA 及び DCA) 濃度の増加、並びに抱合型胆汁酸 (GCDCA 及び GDCA) の減少が認められた。さらに、胆汁酸のアミノ酸抱合阻害と肝毒性との関係について検討したところ、TRO は CDCA 及び DCA 存在下で、いずれの胆汁酸濃度 (5-200 μmol/l) においても有意な毒性を示した。一方で、PIO は同条件下では、TRO で認められたような毒性は示さなかった。非アミノ酸抱合型胆汁酸は抱合型に比べ脂溶性が高く、毒性が強い事が知られている。BSEP は非抱合型胆汁酸より抱合型胆汁酸に高い基質認識性を示すことが知られていることから、BSEP は CDCA や DCA の肝細胞内からの排泄にあまり寄与していない可能性がある。これらの点を考慮すると、TRO の胆汁酸アミノ酸抱合阻害によっ

て CDCA や DCA の蓄積が促進され、その結果細胞毒性が引き起こされたと考えられる。胆汁酸のアミノ酸抱合阻害は胆汁酸関連肝障害の新たなメカニズムとして考えられた。

本研究を下記の通り総括する。

胆汁酸依存的に引き起こされる細胞毒性を検出可能とする新たな評価系を構築した。本評価系では、薬物による肝臓内胆汁酸動態の変動によって生じる胆汁酸蓄積を起因とした肝毒性を検出する事が可能であり、開発化合物の肝毒性ポテンシャルの評価に有用と考えられる。

薬物によって引き起こされる胆汁酸依存毒性は薬物代謝とも深く関連し、ヒトと異なる代謝パターンを示す動物種ではヒトの胆汁酸依存毒性を反映していない可能性があるため、使用する肝細胞の種に注意が必要である。

胆汁酸のアミノ酸抱合代謝は胆汁酸の解毒に働いており、薬物によるアミノ酸抱合阻害は DILI 発現リスクを高める要因になりうると考えられる。BSEP を始めとした胆汁酸トランスポーター阻害と胆汁酸アミノ酸抱合阻害作用を合わせて評価することは胆汁酸関連肝障害のリスク評価に有用と考えられる。

## 【展望】

BSEP は胆汁酸の体内動態に非常に重要なトランスポーターであることは複数の報告より明らかである。しかしながら、胆汁酸動態には BSEP 以外にも複数の因子が関わることが知られており、様々な視点から胆汁酸が絡む肝毒性を評価していく必要がある。本研究では、肝細胞を用い毒性をエンドポイントにした毒性評価手法を構築した。このことにより、本来肝臓で見られる胆汁酸の取り込み～排泄という方向性輸送を含めた評価が可能となるだけでなく、薬物代謝による影響も含めて肝毒性予測を行えるようになると考えられる。また、肝細胞を用いることで第三章にて示したような胆汁酸のアミノ酸抱合阻害による毒性発現も含めた評価が可能と考えられ、従来の BSEP 阻害のみからの肝毒性予測に比べより精度の高い肝毒性予測が可能になると考えられる。

Rodrigues らは [83]、BSEP は胆汁酸の絡む肝毒性発現の主メカニズムであるのか、という観点に立ち、胆汁酸動態に関わる様々な因子について調査・報告している。その中には、本研究での検討項目である代謝物によるトランスポーター阻害や胆汁酸のアミノ酸抱合阻害といったメカニズムについても言及されている。

彼らの報告のうち、以下に記載する 3 点については興味深く、今後の検討項目として考えられる。

### ① 核内受容体への影響

胆汁酸動態に関わるトランスポーターや各種酵素は farnesoid X receptor や pregnane X receptor といった核内受容体によってその発現量の調節を受けている [84]。例えば、薬物が核内受容体を不活化させることで、BSEP 発現量が低下し肝臓内への胆汁酸蓄積が生じ、肝毒性が引き起こされる可能性が考えられる。

### ② 胆汁中のリン脂質輸送に関する影響

胆汁酸はその強い界面活性作用により、細胞毒性を示す。そのため、高濃度に濃縮

された胆汁中ではリン脂質とミセルを形成し、毒性を回避している。このリン脂質の胆汁中への分泌に関わるタンパク質が **multidrug resistance 3** と **ATPase-aminophospholipid transporter** であるが [85]、これらタンパク質の機能阻害は胆汁中のリン脂質濃度の低下を引き起こし、その結果ミセルを形成していない胆汁酸により細胞膜が障害され肝毒性の要因になると考えられる。

### ③ 腸内細菌への影響

胆汁酸は腸内細菌によって脱水酸化及び脱抱合を受けることが知られている [86, 87]。例えば、脂溶性が高く毒性も強い **LCA** は腸内細菌により **CDCA** より脱水酸化を受け生成する。また、腸に発現する一部の胆汁酸トランスポーターは腸内細菌によって発現調節を受けるということも報告されている [88, 89]。これらのことから、薬物による腸内細菌叢の変動はヒトの胆汁酸組成の変動要因になりうると考えられ、胆汁酸関連肝毒性への関与が推察される。

このように、精度の高い肝毒性予測には従来から報告されている **BSEP** 阻害に加え、様々な角度からの検討が必要と考えられ、各推定メカニズムと肝毒性との関連性について明らかにされることが望まれる。

## 【引用文献】

- [1] Kaplowitz, N., "Drug-induced liver disorders: implications for drug development and regulation," vol. 24, p. 483–490, 2001.
- [2] Schuster D, Laggner C, Langer T, "Why drugs fail – A study on side effects in new chemical entities," vol. Des 11, p. 3545–3559, 2005.
- [3] Stieger B, Fattinger K, Madon J, Kullak-Ublick G.A., Meier P.J., "Drug- and estrogen-induced cholestasis through inhibition of the hepatocellular bile salt export pump (Bsep) of rat liver," *Gastroenterology*, vol. 118, pp. 422-430, 2000.
- [4] Fattinger K, Funk C, Pantze M, Weber C, Reichen J, Stieger B, Meier P.J., "The endothelin antagonist bosentan inhibits the canalicular bile salt export pump: a potential mechanism for hepatic adverse reactions," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 69, no. 4, pp. 223-231, 2001.
- [5] Byrne J.A., Strautnieks S.S., Mieli-Vergani G, Higgins C.F., Linton K.J., Thompson R.J., "The human bile salt export pump: characterization of substrate specificity and identification of inhibitors," *Gastroenterology*, vol. 123, pp. 1649-1658, 2002.
- [6] Kostrubsky S.E. , Strom S.C., Kalgutkar A.S., Kulkarni S., Atherton J, Mireles R, Feng B, Kubik R, Hanson J, Urda E, Mutlib A.E., "Inhibition of hepatobiliary transport as a predictive method for clinical hepatotoxicity of nefazodone," *Toxicol. Sci.*, vol. 90, pp. 451-459, 2006.
- [7] Morgan R.E., Trauner M., Van Staden C.J., Lee P.H., Ramachandran B, Eschenberg M, Afshari C.A., Qualls Jr. C.W., Lightfoot-Dunn R, Hamadeh H.K., "Interference with bile salt export pump function is a susceptibility factor for human liver injury in drug development," *Toxicol. Sci.*, vol. 118, pp. 485-500, 2010.
- [8] Fickert P, Fuchsbichler A, Marschall H.U., Wagner M, Zollner G, Krause R, Zatloukal K, Jaeschke H, Denk H, Trauner M., "Lithocholic acid feeding induces segmental bile duct obstruction and destructive cholangitis in mice," vol. 168, pp. 410-422, 2006.
- [9] Zucchini-Pascal N, De Sousa G, Pizzol J, Rahmani R, "Pregnane X receptor activation protects rat hepatocytes against deoxycholic acid-induced," vol. 30, pp. 284-297, 2009.
- [10] Spivey J.R., Bronk S.F., Gores G.J., "Glycochenodeoxycholate-induced lethal hepatocellular injury in rat hepatocytes. Role of ATP depletion and cytosolic free calcium," *J. Clin. Invest.*, vol. 92, pp. 17-24, 1993.

- [11] Reinehr R, Graf D, Haussinger D, "Bile salt-induced hepatocyte apoptosis involves epidermal growth factor receptor-dependent CD95 tyrosine phosphorylation," vol. 125, pp. 839-853, 2003.
- [12] Meier P.J., Stieger B, "Bile salt transporters," vol. 64, pp. 635-661, 2002.
- [13] Strautnieks SS, Bull LN, Knisely AS, Kocoshis SA, Dahl N, Arnell H, Sokal E, Dahan K, Childs S, Ling V, Tanner MS, Kagalwalla AF, Németh A, Pawlowska J, Baker A, Mieli-Vergani G, Freimer NB, Gardiner RM, Thompson RJ., "A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis," vol. 20, no. 3, pp. 233-8, 1998.
- [14] Choi S., "Nefazodone (Serzone) withdrawn because of hepatotoxicity," vol. 169, no. 11, p. 1187, 2003.
- [15] Gitlin N, Julie NL, Spurr CL, Lim KN, Juarbe HM, "Two cases of severe clinical and histologic hepatotoxicity associated with troglitazone.," vol. 129, no. 1, pp. 36-8, 1998.
- [16] Tang W, "Drug metabolite profiling and elucidation of drug-induced hepatotoxicity.," vol. 3, no. 3, pp. 407-20, 2007.
- [17] Swift B, Pfeifer ND, Brouwer KL., "Sandwich-cultured hepatocytes: an in vitro model to evaluate hepatobiliary transporter-based drug interactions and hepatotoxicity.," vol. 42, no. 3, pp. 446-71, 2010.
- [18] Liu X, Chism JP, LeCluyse EL, Brouwer KR, Brouwer KL., "Correlation of biliary excretion in sandwich-cultured rat hepatocytes and in vivo in rats.," vol. 27, no. 6, pp. 637-44, 1999.
- [19] Scherer M, Gnewuch C, Schmitz G, Liebisch G., "Rapid quantification of bile acids and their conjugates in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.," vol. 877, no. 30, pp. 3920-5, 2009.
- [20] Iwanaga T, Nakakariya M, Yabuuchi H, Maeda T, Tamai I., "Involvement of bile salt export pump in flutamide-induced cholestatic hepatitis.," vol. 30, no. 4, pp. 739-44, 2007.
- [21] Stieger B, "Role of the bile salt export pump, BSEP, in acquired forms of cholestasis.," vol. 42, no. 3, pp. 437-45, 2010.
- [22] Fujimoto K, Kishino H, Yamoto T, Manabe S, Sanbuissho A., "In vitro cytotoxicity assay to evaluate the toxicity of an electrophilic reactive metabolite using glutathione-depleted rat primary cultured hepatocytes.," vol. 188, no. 3, pp. 404-11, 2010.

- [23] Kemp DC, Brouwer KL., "Viability assessment in sandwich-cultured rat hepatocytes after xenobiotic exposure.," vol. 18, no. 6, pp. 869-77, 2004.
- [24] Grub S, Persohn E, Trommer WE, Wolf A., "Mechanisms of cyclosporine A-induced apoptosis in rat hepatocyte primary cultures.," vol. 163, no. 3, pp. 209-20, 2000.
- [25] Ortiz de Montellano PR, Mathews JM., "Autocatalytic alkylation of the cytochrome P-450 prosthetic haem group by 1-aminobenzotriazole. Isolation of an NN-bridged benzyne-protoporphyrin IX adduct.," vol. 195, no. 3, pp. 761-4, 1981.
- [26] Nakanishi T, Shibue Y, Fukuyama Y, Yoshida K, Fukuda H, Shirasaka Y, Tamai I., "Quantitative time-lapse imaging-based analysis of drug-drug interaction mediated by hepatobiliary transporter, multidrug resistance-associated protein 2, in sandwich-cultured rat hepatocytes.," vol. 39, no. 6, pp. 984-91, 2011.
- [27] Alvaro D, Cantafora A, Attili AF, Ginanni Corradini S, De Luca C, Minervini G, Di Biase A, Angelico M., "Relationships between bile salts hydrophilicity and phospholipid composition in bile of various animal species.," vol. 83, no. 3, pp. 551-4, 1986.
- [28] Hayashi H, Takada T, Suzuki H, Onuki R, Hofmann AF, Sugiyama Y., "Transport by vesicles of glycine- and taurine-conjugated bile salts and tauro lithocholate 3-sulfate: a comparison of human BSEP with rat Bsep.," vol. 1738, no. 1-3, pp. 54-62, 2005.
- [29] Schroeder A, Eckhardt U, Stieger B, Tynes R, Schteingart CD, Hofmann AF, Meier PJ, Hagenbuch B, "Substrate specificity of the rat liver Na(+)-bile salt cotransporter in *Xenopus laevis* oocytes and in CHO cells.," vol. 274, no. 2 Pt 1, pp. G370-5, 1998.
- [30] Marion TL, Perry CH, St Claire RL 3rd, Yue W, Brouwer KL., "Differential disposition of chenodeoxycholic acid versus taurocholic acid in response to acute troglitazone exposure in rat hepatocytes.," vol. 120, no. 2, pp. 371-80, 2011.
- [31] Kotani N, Maeda K, Watanabe T, Hiramatsu M, Gong LK, Bi YA, Takezawa T, Kusahara H, Sugiyama Y., "Culture period-dependent changes in the uptake of transporter substrates in sandwich-cultured rat and human hepatocytes.," vol. 39, no. 9, pp. 1503-10, 2011.
- [32] Jemnitz K, Veres Z, Vereczkey L., "Contribution of high basolateral bile salt efflux to the lack of hepatotoxicity in rat in response to drugs inducing cholestasis in human.," vol. 115, no. 1, pp. 80-8, 2010.
- [33] Yokoi T, "Troglitazone.," no. 196, pp. 419-35, 2010.

- [34] Björnsson E, Olsson R, "Outcome and prognostic markers in severe drug-induced liver disease.," vol. 42, no. 2, pp. 481-9, 2005.
- [35] Dawson S, Stahl S, Paul N, Barber J, Kenna JG, "In vitro inhibition of the bile salt export pump correlates with risk of cholestatic drug-induced liver injury in humans.," vol. 40, no. 1, pp. 130-8, 2012.
- [36] Kis E, Ioja E, Rajnai Z, Jani M, Méhn D, Herédi-Szabó K, Krajcsi P, "BSEP inhibition: in vitro screens to assess cholestatic potential of drugs.," vol. 26, no. 8, pp. 1264-9, 2012.
- [37] Slizgi JR, Lu Y, Brouwer KR, St Claire RL, Freeman KM, Pan M, Brock WJ, Brouwer KL, "Inhibition of Human Hepatic Bile Acid Transporters by Tolvaptan and Metabolites: Contributing Factors to Drug-Induced Liver Injury?," vol. 149, no. 1, pp. 237-50, 2016.
- [38] Woodhead JL, Brock WJ, Roth SE, Shoaf SE, Brouwer KL, Church R, Grammatopoulos TN, Stiles L, Siler SQ, Howell BA, Mosedale M, Watkins PB, Shoda LK, "Application of a Mechanistic Model to Evaluate Putative Mechanisms of Tolvaptan Drug-Induced Liver Injury and Identify Patient Susceptibility Factors.," vol. 155, no. 1, pp. 61-74, 2017.
- [39] Shoaf SE, Bricmont P, Mallikaarjun S, "Effects of CYP3A4 inhibition and induction on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolvaptan, a non-peptide AVP antagonist in healthy subjects.," vol. 73, no. 4, pp. 579-87, 2012.
- [40] Furukawa M, Miyata K, Kawasome C, Himeda Y, Takeuchi K, Koga T, Hirao Y, Umehara K., "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determining tolvaptan and its nine metabolites in rat serum: application to a pharmacokinetic study.," vol. 37, no. 12, pp. 1578-87, 2014.
- [41] Ogimura E, Sekine S, Horie T, "Bile salt export pump inhibitors are associated with bile acid-dependent drug-induced toxicity in sandwich-cultured hepatocytes.," vol. 416, no. 3-4, pp. 313-7, 2011.
- [42] Susukida T, Sekine S, Nozaki M, Tokizono M, Ito K., "Prediction of the Clinical Risk of Drug-Induced Cholestatic Liver Injury Using an In Vitro Sandwich Cultured Hepatocyte Assay.," vol. 43, no. 11, pp. 1760-8, 2015.
- [43] Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T., "A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer.," vol. 4, no. 11, pp. 879-85, 1981.
- [44] García-Cañaveras JC, Donato MT, Castell JV, Lahoz A., "Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a

- UPLC-MRM-MS-validated method.," vol. 53, no. 10, pp. 2231-41, 2012.
- [45] Matsunaga N, Kaneko N, Staub AY, Nakanishi T, Nunoya K, Imawaka H, Tamai I., "Analysis of the Metabolic Pathway of Bosentan and of the Cytotoxicity of Bosentan Metabolites Based on a Quantitative Modeling of Metabolism and Transport in Sandwich-Cultured Human Hepatocytes.," vol. 44, no. 1, pp. 16-27, 2016.
- [46] Han KM, Ahn SY, Seo H, Yun J, Cha HJ, Shin JS, Kim YH, Kim H, Park HK, Lee YM, "Bosentan and Rifampin Interactions Modulate Influx Transporter and Cytochrome P450 Expression and Activities in Primary Human Hepatocytes.," vol. 25, no. 3, pp. 288-295, 2017.
- [47] Kimoto E, Walsky R, Zhang H, Bi YA, Whalen KM, Yang YS, Linder C, Xiao Y, Iseki K, Fenner KS, El-Kattan AF, Lai Y., "Differential modulation of cytochrome P450 activity and the effect of 1-aminobenzotriazole on hepatic transport in sandwich-cultured human hepatocytes.," vol. 40, no. 2, pp. 407-11, 2012.
- [48] Maeda K, "Organic anion transporting polypeptide (OATP)1B1 and OATP1B3 as important regulators of the pharmacokinetics of substrate drugs.," vol. 38, no. 2, pp. 155-68, 2015.
- [49] De Bruyn T, Stieger B, Augustijns PF, Annaert PP., "Clearance Prediction of HIV Protease Inhibitors in Man: Role of Hepatic Uptake.," vol. 105, no. 2, pp. 854-863, 2016.
- [50] Hartman JC, Brouwer K, Mandagere A, Melvin L, Gorczynski R., "Evaluation of the endothelin receptor antagonists ambrisentan, darusentan, bosentan, and sitaxsentan as substrates and inhibitors of hepatobiliary transporters in sandwich-cultured human hepatocytes.," vol. 88, no. 6, pp. 682-91, 2010.
- [51] Langsch A, Giri S, Acikgöz A, Jasmund I, Frericks B, Bader A., "Interspecies difference in liver-specific functions and biotransformation of testosterone of primary rat, porcine and human hepatocyte in an organotypical sandwich culture.," vol. 188, no. 3, pp. 173-9, 2009.
- [52] Kern A, Bader A, Pichlmayr R, Sewing KF., "Drug metabolism in hepatocyte sandwich cultures of rats and humans.," vol. 54, no. 7, pp. 761-72, 1997.
- [53] Argikar UA, Potter PM, Hutzler JM, Marathe PH., "Challenges and Opportunities with Non-CYP Enzymes Aldehyde Oxidase, Carboxylesterase, and UDP-Glucuronosyltransferase: Focus on Reaction Phenotyping and Prediction of Human Clearance.," vol. 18, no. 6, 2016.
- [54] Funk C, Ponelle C, Scheuermann G, Pantze M., "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.," vol. 59, no. 3, pp. 627-35, 2001.
- [55] Funk C, Pantze M, Jehle L, Ponelle C, Scheuermann G, Lazendic M, Gasser R., "Troglitazone-induced intrahepatic cholestasis by an interference with the hepatobiliary export of bile acids in male and female rats. Correlation with the gender difference in troglitazone sulfate formation and the inhibition of the canalicular bile salt," vol. 167, no. 1, pp. 83-98, 2001.
- [56] Bova MP, Tam D, McMahon G, Mattson MN., "Troglitazone induces a rapid drop of mitochondrial membrane potential in liver HepG2 cells.," vol. 155, no. 1, pp. 41-50, 2005.
- [57] Kassahun K, Pearson PG, Tang W, McIntosh I, Leung K, Elmore C, Dean D, Wang R, Doss G, Baillie TA., "Studies on the metabolism of troglitazone to reactive intermediates in vitro and in vivo. Evidence for novel biotransformation pathways involving quinone methide formation and thiazolidinedione ring scission.," vol. 14, no. 1, pp. 62-70, 2001.
- [58] Narayanan PK, Hart T, Elcock F, Zhang C, Hahn L, McFarland D, Schwartz L, Morgan DG, Bugelski P., "Troglitazone-induced intracellular oxidative stress in rat hepatoma cells: a flow cytometric assessment.," vol. 52, no. 1, pp. 28-35, 2003.
- [59] Morgan RE, van Staden CJ, Chen Y, Kalyanaraman N, Kalanzi J, Dunn RT 2nd, Afshari CA, Hamadeh HK., "A multifactorial approach to hepatobiliary transporter assessment enables improved therapeutic compound development.," vol. 136, no. 1, pp. 216-41, 2013.
- [60] Chiang JY, "Bile acids: regulation of synthesis.," vol. 50, no. 10, pp. 1955-66, 2009.
- [61] Sharma R, Majer F, Peta VK, Wang J, Keaveney R, Kelleher D, Long A, Gilmer JF., "Bile acid toxicity structure-activity relationships: correlations between cell viability and lipophilicity in a panel of new and known bile acids using an oesophageal cell line (HET-1A).," vol. 18, no. 18, pp. 6886-95, 2010.
- [62] Shonsey EM, Sfakianos M, Johnson M, He D, Falany CN, Falany J, Merkler DJ, Barnes S., "Bile acid coenzyme A: amino acid N-acyltransferase in the amino acid conjugation of bile acids.," vol. 400, pp. 374-94, 2005.
- [63] Shonsey EM, Wheeler J, Johnson M, He D, Falany CN, Falany J, Barnes S., "Synthesis of bile acid coenzyme a thioesters in the amino acid conjugation of bile acids.," vol. 400, pp. 360-73, 2005.

- [64] Köck K, Ferslew BC, Netterberg I, Yang K, Urban TJ, Swaan PW, Stewart PW, Brouwer KL., "Risk factors for development of cholestatic drug-induced liver injury: inhibition of hepatic basolateral bile acid transporters multidrug resistance-associated proteins 3 and 4.," vol. 42, no. 4, pp. 665-74, 2014.
- [65] Baptissart M, Vega A, Maqdasy S, Caira F, Baron S, Lobaccaro JM, Volle DH., "Bile acids: from digestion to cancers.," vol. 95, no. 3, pp. 504-17, 2013.
- [66] Solaas K, Ulvestad A, Söreide O, Kase BF., "Subcellular organization of bile acid amidation in human liver: a key issue in regulating the biosynthesis of bile salts.," vol. 41, no. 7, pp. 1154-62, 2000.
- [67] Styles NA, Falany JL, Barnes S, Falany CN, "Quantification and regulation of the subcellular distribution of bile acid coenzyme A:amino acid N-acyltransferase activity in rat liver.," vol. 48, no. 6, pp. 1305-15, 2007.
- [68] Wheeler JB, Shaw DR, Barnes S., "Purification and characterization of a rat liver bile acid coenzyme A ligase from rat liver microsomes.," vol. 348, no. 1, pp. 15-24, 1997.
- [69] Prueksaritanont T, Vega JM, Zhao J, Gagliano K, Kuznetsova O, Musser B, Amin RD, Liu L, Roadcap BA, Dilzer S, Lasseter KC, Rogers JD., "Interactions between simvastatin and troglitazone or pioglitazone in healthy subjects.," vol. 41, no. 5, pp. 573-81, 2001.
- [70] Young MA, Lettis S, Eastmond R., "Coadministration of acetaminophen and troglitazone: pharmacokinetics and safety.," vol. 38, no. 9, pp. 819-24, 1998.
- [71] US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), "Guidance for Industry. Drug Interaction Studies- Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling Recommendations draft guidance.," 2012.
- [72] Dong Z, Ekins S, Polli JE., "Quantitative NTCP pharmacophore and lack of association between DILI and NTCP Inhibition.," vol. 66, pp. 1-9.
- [73] Marion TL, Leslie EM, Brouwer KL., "Use of sandwich-cultured hepatocytes to evaluate impaired bile acid transport as a mechanism of drug-induced hepatotoxicity.," vol. 4, no. 6, pp. 911-8, 2007.
- [74] Rius M, Hummel-Eisenbeiss J, Hofmann AF, Keppler D., "Substrate specificity of human ABCC4 (MRP4)-mediated cotransport of bile acids and reduced glutathione.," vol. 290, no. 4, pp. G640-9, 2006.
- [75] Chong CP, Mills PB, McClean P, Gissen P, Bruce C, Stahlschmidt J, Knisely AS,

- Clayton PT., "Bile acid-CoA ligase deficiency--a new inborn error of bile acid metabolism.," vol. 35, no. 3, pp. 521-30, 2012.
- [76] Hadžić N, Bull LN, Clayton PT, Knisely AS., "Diagnosis in bile acid-CoA: amino acid N-acyltransferase deficiency.," vol. 18, no. 25, pp. 3322-6, 2012.
- [77] Vessey DA, Kelley M., "Inhibition of bile acid conjugation by cyclosporin A.," vol. 1272, no. 1, pp. 49-52, 1995.
- [78] Perez MJ, Briz O., "Bile-acid-induced cell injury and protection.," vol. 15, no. 14, pp. 1677-89, 2009.
- [79] Davit-Spraul A, Fabre M, Branchereau S, Baussan C, Gonzales E, Stieger B, Bernard O, Jacquemin E., "ATP8B1 and ABCB11 analysis in 62 children with normal gamma-glutamyl transferase progressive familial intrahepatic cholestasis (PFIC): phenotypic differences between PFIC1 and PFIC2 and natural history.," vol. 51, no. 5, pp. 1645-55, 2010.
- [80] Keitel V, Burdelski M, Warskulat U, Kühlkamp T, Keppler D, Häussinger D, Kubitz R., "Expression and localization of hepatobiliary transport proteins in progressive familial intrahepatic cholestasis.," vol. 41, no. 5, pp. 1160-72, 2005.
- [81] Taegtmeier AB, Haschke M, Tehambaz L, Buylaert M, Tschöpl M, Beuers U, Drewe J, Krähenbühl S, "A study of the relationship between serum bile acids and propranolol pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with liver cirrhosis and in healthy controls.," vol. 9, no. 6, p. e97885, 2014.
- [82] Lindblad L, Lundholm K, Schersten T, "Bile acid concentrations in systemic and portal serum in presumably normal man and in cholestatic and cirrhotic conditions.," vol. 124, no. 4, pp. 395-400, 1977.
- [83] Rodrigues AD, Lai Y, Cvijic ME, Elkin LL, Zvyaga T, Soars MG, "Drug-induced perturbations of the bile acid pool, cholestasis, and hepatotoxicity: mechanistic considerations beyond the direct inhibition of the bile salt export pump.," vol. 42, no. 4, pp. 566-74, 2014.
- [84] Stahl S, Davies MR, Cook DI, Graham MJ., "Nuclear hormone receptor-dependent regulation of hepatic transporters and their role in the adaptive response in cholestasis.," vol. 38, no. 7-8, pp. 725-77, 2008.
- [85] 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, Oude Elferink RP., "Complementary functions of the flippase ATP8B1 and the floppase ABCB4 in maintaining canalicular membrane integrity.," vol. 141, no. 5, pp. 1927-1937, 2011.

- [86] Robben J, Janssen G, Merckx R, Eyssen H., "Formation of delta 2- and delta 3-cholenic acids from bile acid 3-sulfates by a human intestinal *Fusobacterium* strain.," vol. 55, no. 11, pp. 2954-2959, 1989.
- [87] Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB., "Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria.," vol. 47, no. 2, pp. 241-59, 2005.
- [88] Miyata M, Yamakawa H, Hamatsu M, Kuribayashi H, Takamatsu Y, Yamazoe Y., "Enterobacteria modulate intestinal bile acid transport and homeostasis through apical sodium-dependent bile acid transporter (SLC10A2) expression.," vol. 336, no. 1, pp. 188-196, 2011.
- [89] Mercado-Lubo R, McCormick BA., "The interaction of gut microbes with host ABC transporters.," vol. 1, no. 5, pp. 301-306, 2010.

## 【論文目録】

本学位論文内容は下記の発表論文による。

Ogimura E, Sekine S, Horie T. Bile salt export pump inhibitors are associated with bile acid-dependent drug-induced toxicity in sandwich-cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 416(3-4):313-7. (2011)

Ogimura E, Tokizono M, Sekine S, Nakagawa T, Bando K, Ito K. Metabolic Activation of Cholestatic Drug-induced Bile Acid-dependent Toxicity in Human Sandwich-Cultured Hepatocytes. *J Pharm Sci.* 106(9):2509-2514. (2017)

Ogimura E, Nakagawa T, Deguchi J, Sekine S, Ito K, Bando K. Troglitazone inhibits bile acid amidation: a possible risk factor for liver injury. *Toxicol Sci.* 158(2):347-355. (2017)

## 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室 伊藤 晃成教授に心より厚く御礼申し上げます。

本論文を御校閲賜りました千葉大学大学院薬学研究院 秋田 英万教授、小椋 康光教授、樋坂 章博教授に謹んで深謝いたします。

本研究の遂行に際し、御懇切なる御指導と、御助言を賜りました千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室 関根 秀一講師に深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始温かい御支援と御協力を賜りました大日本住友製薬株式会社 前臨床研究ユニット 坂東 清子 ユニット長に謹んで深謝いたします。

本研究に際し、終始有益な御助言と御支援、御協力を賜りました大日本住友製薬株式会社 前臨床研究ユニット 薬物動態第2グループ 中川 徹也 グループマネージャーに謹んで深謝いたします。

本研究を実施するにあたり、終始深い御理解と御協力をいただきました大日本住友製薬株式会社 前臨床研究ユニットの皆様我心から感謝いたします。

最後に、今日まで御指導、御支援を頂きました数多くの方々と良き友人達、そして終始温かく見守り、支えて頂いた家族の皆様我心より御礼申し上げます。

2018年3月吉日 荻村 栄一朗

### 【審査委員】

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 伊藤 晃成

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 秋田 英万

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 小椋 康光

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 樋坂 章博