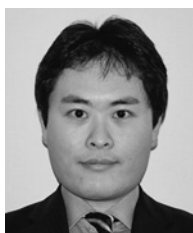


《若手研究者紹介》



薬剤学, トランスポーターとの切っても切れぬ縁

吉 門 崇* Takashi Yoshikado

国立研究開発法人理化学研究所 イノベーション推進センター 杉山特別研究室

1. はじめに

筆者は、大学4年次に東京大学大学院薬学系研究科臨床薬物動態学教室 (= 同医学部附属病院薬剤部試験研究室) に配属され、薬剤学と向き合い始めた。現在は理化学研究所杉山特別研究室で研究に携わっている。今回、本コラムの執筆機会をいただいたので、もちろん研究の話を中心にしながらではあるが研究生活における人や物との出会い、思考やエピソードを交えながら固い文章にならないよう書いていきたいと思う。

2. 研究生活のスタート

～トランスポーターとの関わり

高校生活を適度に楽しんだ後、大学に入学したのはかれこれ15年前になる。小学校の時に天文学者になりたいと文集に書いていた少年は、大学入学時には工学系を志向していた。最初の1, 2年(教養課程)を過ごすうちに「自分の取り組んだことが身近に戻ってくると感じられる分野に進みたい」と考え、辿り着いたのが薬学であった。これは本当に運命としか言いようがなく、それ以来自分の選択を後悔したことは一度もない。勿論、創薬・臨床に貢献することで患者さんを救えると簡単に言うてはいけないと今では思っているが、研究を続ける動機とし

てはシンプルで分かり易かったと思う。進学振り分けで薬学部に進学した後は、3年次の幅広い授業・実習(実験)を経て研究室配属を迎えた。やはりシンプルな考え方の自分は「臨床で問題点を見出し、それを落とし込んで研究し、それをもう一度臨床に応用したい」ということで薬剤部試験研究室を選出した。いわゆる translational research/reverse translational research であるが、当時はそんな言葉も知らず只の直感であった。晴れて同期3名と配属され、4月から研究生活がスタートした。

鈴木洋史先生が薬剤部の教授・薬剤部長として着任されてすぐだったこともあり、高田龍平先生(現薬剤部講師・副部長)、山本武人先生(現東京大学大学院薬学系研究科医療薬学教育センター講師)と先輩方3名、4年生4名という少人数で最初の1年間を過ごした。最初の実験手技を身につけるためにいただいたテーマが ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターの発現系構築であった。指導教官である高田先生のもと実験手技のみならず論理的思考と議論の方法(毎週行われる濃いディスカッションは本当に貴重であった)を学び、8月の大学院試験後に復帰した際には ABC トランスポーターの一つである multidrug resistance 3 P-glycoprotein (MDR3/ABCB4) の変異体解析のテーマをいただいた。肝臓の重要な生理機能の一つである胆汁形成において(図1)、肝細胞毛細胆管膜に発現する 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、MDR3 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

*2007年東京大学大学院薬学系研究科修士課程を修了、2008年同博士後期課程を中退後に同研究科臨床分子解析学教室特任助教。2012年理化学研究所イノベーション推進センター杉山特別研究室研究員、薬学博士。趣味: 楽器演奏(ヴァイオリン)、旅行。連絡先: 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22
E-mail: tyoshikado@riken.jp

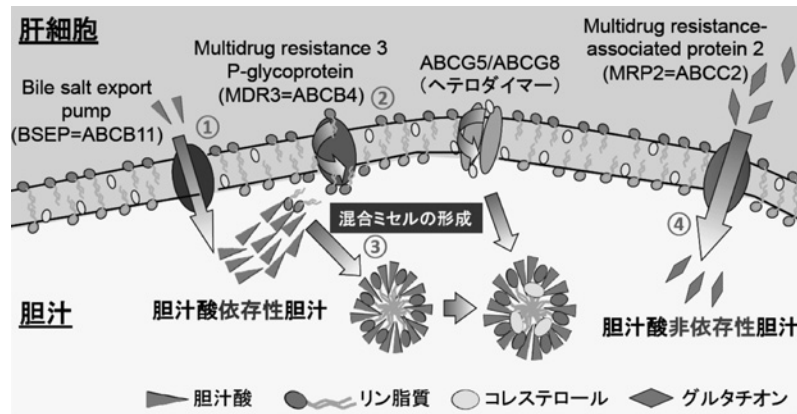


図1 肝臓における胆汁形成メカニズム

- 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, 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, 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.

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 (胆汁酸非依存性胆汁). MDR3 の遺伝的な機能低下は進行性家族性肝内胆汁うっ滞 3 型 (progressive familial intrahepatic cholestasis type 3: PFIC3) の原因となることが知られており, *in vitro* で詳細に解析することが本テーマの目的であった. 一方, BSEP の遺伝的な機能低下は PFIC2 の原因となることで知られるが, 既に BSEP 発現系を用いた変異体の解析が行われていた¹⁾.

さて, 興味深いテーマをいただいたものの, ヒト MDR3 というのはなかなかクセのある遺伝子で, サブクローニングをしようとするとうらない変異が入ったり, 大腸菌のトランスフォーメーション後に増えてきたと思ったら謎の配列に変わっていたり (他の遺伝子で経験された方もいらっしゃると思うが), 苦勞の連続であった. 同時期にサブクローニングを行っていた他の ABC トランスポーターでも同じような経験をしたことから, 引きが悪いと思うしかない. それでも最終的には組換えアデノウイルスを用いた発現系を構築し, リン脂質の一種であるホスファチジルコリン (PC) の細胞外排出を評価する系を構築した. 同様に構築した変異体の発現系と発現量・局在・活性を比較することで, 何とか修士課程の発表をすることができた. 恥ずかしながら論文化までは至らずに博士後期課程からは別のテーマをやるこ

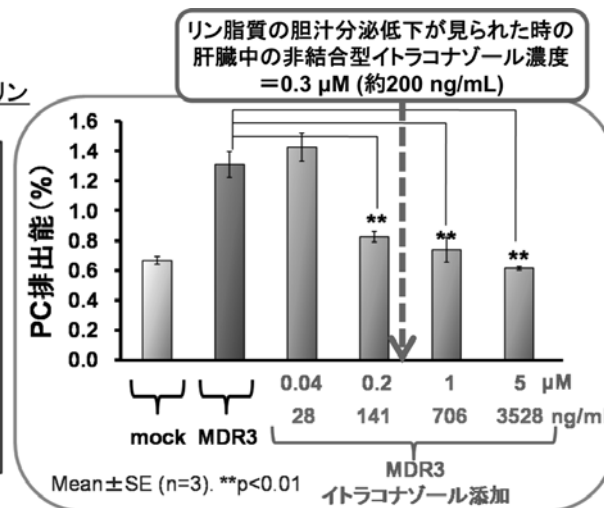
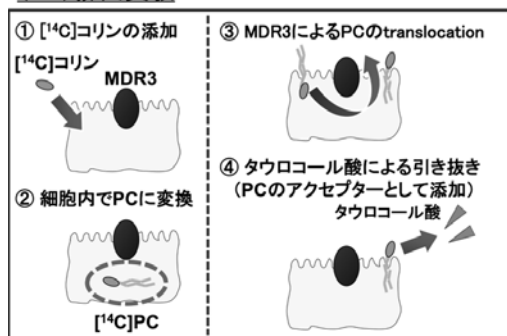
とになったが, それまでの経験が次の項で示す MDR3 を介した薬物誘発性胆汁うっ滞に関する研究へと生かされた. また, 直接の指導教官ではなかったが, 実験系や論理で悩んだ時に伊藤晃成先生 (現千葉大学大学院薬学研究院教授), 本間雅先生 (現東京大学医学部附属病院 22 世紀医療センター薬理動態学講座准教授), 樋坂章博先生 (現千葉大学大学院薬学研究院教授) にもご指導いただくことができ, とても貴重な時間であったと感じている.

余談ではあるが, ほぼ研究室に籠る毎日であったとは言え, それなりに研究室生活を楽しんでいたことも記しておく. 親切な先生・先輩方, 気の合う同期, 良い後輩にも恵まれ, 特に初期はアットホームな雰囲気を感じられた (貸別荘での研究室旅行においてバーベキューや朝食を皆で囲んだことなど, とても良い思い出である). また, 当時は 4 年制であったため, 薬剤師国家試験合格後には「今逃すと一生やる機会がないかもしれない」ということで, 調剤薬局でアルバイトとして働かせていただいた. もともと薬剤部に入ったこともあり興味はあったが, 調剤・監査・服薬指導の流れを実践しながら学べたことは, 理想とする研究に何らかの形で役立つ貴重な体験だったと信じている.

3. 薬物誘発性胆汁うっ滞に関する研究

さて, 博士後期課程に進学したものの, 挑戦と葛藤の日々が待っていた. 修士課程のテーマをそのまま持ち込まず新しいテーマを探した理由は, よりイ

MDR3-LLCPK1細胞を用いたホスファチジルコリン (PC) 排出実験



Yoshikado et al. Mol Pharmacol 79: 241-250, 2011

図2 MDR3機能評価系を用いた薬物誘発性胆汁うっ滞の解析²⁾

イトラコナゾールによるMDR3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一因となったことが示唆された。

インパクトが大きく臨床データをもとにした研究を行うためである。指導教官と教授に納得していただけるテーマを提案することは簡単なことではないのだが、焦れば焦るほど空回りする。結果的には、修士課程までに構築した実験系を生かして、インパクトのある研究に繋がる可能性があるテーマに挑戦することとなった。当時から現在に至るまで重要な課題であり続ける薬物性肝障害 (drug-induced liver injury: DILI) の発症機構の一つと考えられている、薬物誘発性胆汁うっ滞へのトランスポーターの関与を明らかにする研究である。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。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の関与が考えられた。

文献検索で胆汁うっ滞型DILIの報告が多い薬物を選び、MDR3機能評価系を用いた阻害実験を行ったところ、いくつかの薬物で阻害作用が見られた。そのうち抗真菌薬であるイトラコナゾール(ITZ)では特に低濃度で阻害が見られたことから注目したが、ほぼ同時期に行われていたDILIのプロジェクトにおいてITZが原因と考えられるDILIの3症例が見出され、うち2症例で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よりも上昇していた。これらの結果をもとに、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DILI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の分泌量が大きく減少していた。さらには、MDR3機能評価系を用いた詳細な検討を行い、ITZはMDR3に対して0.2 μMという低濃度から阻害作用を示すことを確認した(図2)。*in vivo*実験におけるラット肝臓中のITZの非結合形濃度は約0.3 μM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、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、ITZによるMDR3阻害が胆汁中リン脂質の減少をもたらす、薬物誘発性胆汁うっ滞の一つの要因となったことが示唆された。最終的には原著論文としてまとめることができたが²⁾、初

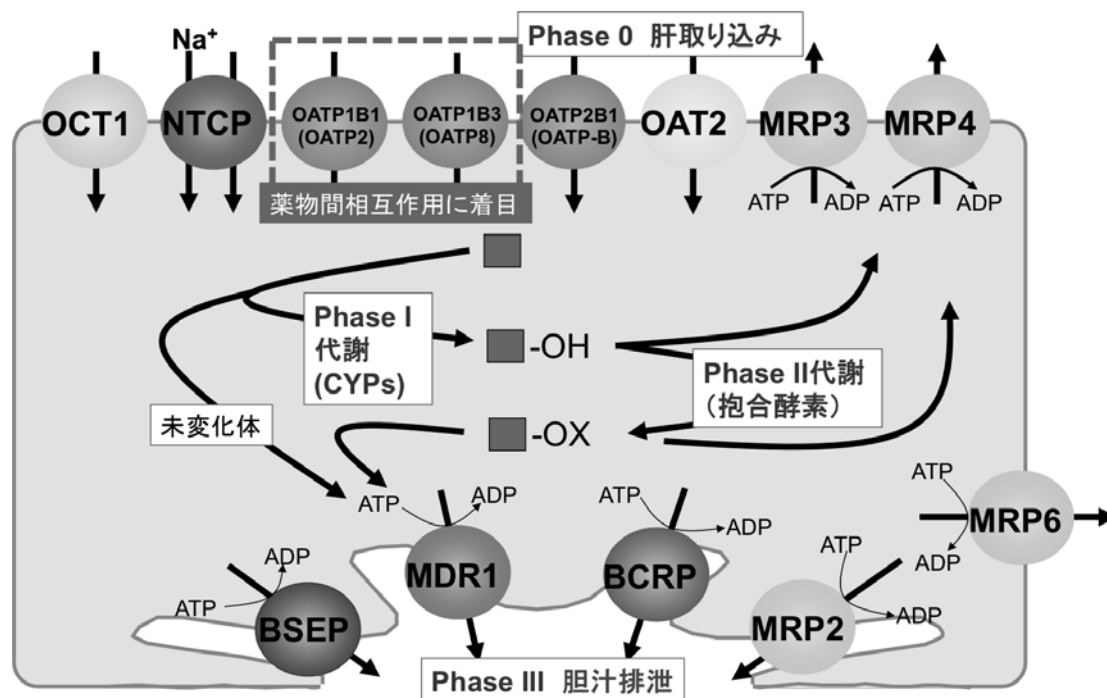


図3 肝臓における薬物解毒メカニズム

トランスポーターによる能動輸送・受動拡散による取り込み過程, 肝臓内から血管側への排出過程, 薬物代謝酵素による代謝過程, トランスポーターによる未変化体の胆汁排泄過程からなる。

の論文文化ということで自分の未熟さを露呈し、高田先生と鈴木先生に沢山のご指導・叱咤・激励をいただいた。現在でも論文を書く度に学ぶことばかりであるが、初回に得た経験は最も印象に残るものであり、貴重であった。

本テーマの途中で博士後期課程を中退し、東京大学大学院薬学系研究科臨床分子解析学教室の特任助教に着任した。三田智文先生（現東京大学大学院薬学系研究科医療薬学教育センター教授）のもと、研究室配属された学生とともにLC-MSの高感度化試薬に関する研究を行いながら、博士課程のテーマを継続してやらせていただいた。今から見ても当時のように未熟な自分が学生を教えるなど怖れ多いのであるが、決して無駄ではなかったと思う（教えるのが嫌いではないことが分かった）。さて、ITZに続いて注目したのが、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た抗血小板薬チクロピジン (TIC) である。TICをSDラットに静注すると、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 μM

であるのに対し、20 μMという高濃度に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。その後様々な検討を重ね、TICが肝臓においてCYP代謝を受けた後にグルタチオン (GSH) 抱合を受けて生成するGSH抱合型TIC代謝物 (TIC-SG) が、MRP2により過剰に胆汁排泄されることで、胆汁酸-リン脂質混合ミセルの形成が滞ったことが胆汁中リン脂質低下の原因であることが示唆された。また、SDラットおよびMRP2欠損ラット (Eisai hyperbilirubinemic rat : 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の投与後に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。以上のように何とも複雑な機構となってしまったが、論文文化して報告した³⁾。

これら2つの論文をまとめた後、次の項で示すように新しい研究を始めることになるが、現在に至る

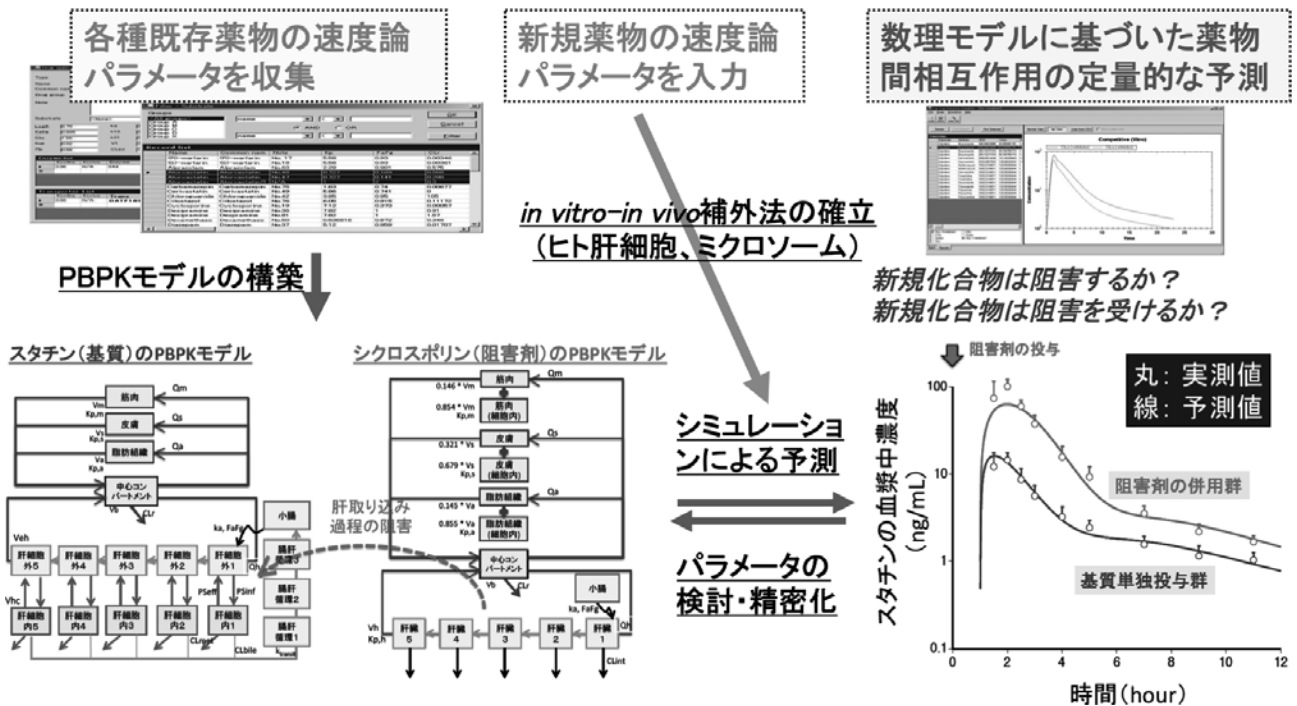


図4 生理学的薬物速度論 (PBPK) モデルを用いた薬物間相互作用の定量的解析
 肝 OATP 阻害を介したスタチン vs. シクロスポリンの解析例を示した。信頼性の高い *in vivo* パラメータを得た上で、*in vitro* 試験で得られたパラメータから *in vivo* を予測する (IVIVE) 方法論を確立する必要がある。

まで DILI に対する興味と意欲は失っておらず、継続している。今後はより定量的な議論をするためにデータを蓄積し、DILI の一つのメカニズムとして MDR3, BSEP の重要性を提起していきたいと考えている。

4. 薬物間相互作用の予測に関する研究

2012 年度より、理化学研究所杉山特別研究室の杉山雄一先生のもとで働く機会をいただいた。前年度まで東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室教授であった杉山先生が定年退官されたタイミングであった。学部生時代に授業を受けてはいたが、杉山先生の主催される PKPD セミナーに参加したことがご縁であったと思う。当時より生理学的薬物速度論 (PBPK) モデルを用いた薬物間相互作用 (DDI) の解析をテーマに勉強を開始していたが、今から見ると考えられないくらい理解しておらず叱咤・激励の連続であった。それでも杉山特別研究室に来てからは着々と理論・解析法が固まり、最近になってようやく一つの達成感が得られつつある。少し内容を紹介すると、スタチン系薬剤に代表されるアニオン性化合物は肝取り込みトランスポーター organic

anion transporting polypeptides (OATPs) による能動輸送および受動拡散によって血管側から肝臓内に取り込まれた後、肝臓内から血管側へと再び排出されるか、薬物代謝酵素による代謝、もしくは毛細胆管膜上に発現するトランスポーターによる未変化体の胆汁排泄によって体内から除去される (図 3)。この OATPs を介した DDI が近年多く報告されており、一例として筆者が担当したスタチンとシクロスポリン (CsA) との相互作用がある。

DDI の予測法としては、第一に、阻害剤の理論上の最大血中濃度をもとに予測する static モデルがあり、簡便でありスクリーニングには有効であるが、相互作用を常に過大評価する懸念がある。第二に、阻害剤の濃度推移を組み入れた dynamic モデルでは、被相互作用薬の血中濃度推移まで含めた精度の高い予測が可能であり、臨床第 II 相試験における薬効用量の推定や第 III 相試験における薬効・副作用の推定に応用可能である。本研究は dynamic モデルに基づいたものであり、スタチンと CsA の PBPK モデルを構築して妥当性を何度も検証しつつ、ヒトにおけるスタチン単独投与時と CsA 併用時の血中濃度推移に対して非線形最小二乗法に基づいた最適化

計算 (フィッティング) を行うことで *in vivo* の事象を再現しうる PBPK モデル上のパラメータを求めた (図 4). 結果として, CsA の OATPs に対する阻害定数 (Ki 値) は複数の DDI 例で似た値が得られた. その値は, *in vitro* において基質と CsA との co-incubation 時に得られた Ki 値よりも低く, CsA の pre-incubation 時に得られた Ki 値に近いものであった. 一方, 本解析で得られた素過程のクリアランス (取り込み, 血管側排出, 胆汁排泄, 代謝) のパラメータについては, 必ずしも一通りに決定できたわけではない. これは血中濃度推移のみを用いてフィッティングを行うことの限界と考えられる. 今後は臓器内濃度推移まで非侵襲的にリアルタイムで測定可能な positron emission tomography (PET) 標識体を用いた解析により, より信頼性の高い *in vivo* パラメータ決定法を構築するとともに, 各種 *in vitro* 試験で得られたパラメータから *in vivo* を予測するための *in vitro-in vivo* extrapolation (IVIVE) の手法を確立する必要がある. 特に筆者が取り組んでいることとして, サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いた胆汁排泄過程の評価があり, 日本薬剤学会年会でも発表させていただいた⁴⁾. これらの方法論が確立してこそトランスポーター・薬物代謝酵素の両方に関わる複雑な薬物動態と DDI を予測することが可能になるため, 創薬および臨床において大きな意味を持つ研究と考えて進めている.

5. おわりに

杉山特別研究室における研究は今回ご紹介できな

かった内容もあるが, どれも目標とする translational research/reverse translational research と密接に関わることから, 有難い環境でやらせていただいていると感じている. 今回執筆機会をいただいたことで今までを振り返り, 自分の立ち位置と今後歩む道がより明確になった気がした. 未熟な自分であるが, 毎日を大切に研究生活を営んでいきたい.

最後に, 現在に至るまでご指導いただきました東京大学医学部附属病院薬剤部の先生方, 東京大学大学院薬学系研究科の先生方, 理化学研究所杉山特別研究室の杉山雄一先生と客員の先生方, ご支援いただきました同僚の方々と支えてくれた家族・友人に, この場を借りて御礼を申し上げます.

引用文献

- 1) H. Hayashi, T. Takada, H. Suzuki, H. Akita, Y. Sugiyama, Two common PFIC2 mutations are associated with the impaired membrane trafficking of BSEP/ABCB11, *Hepatology*, **41**, 916–924 (2005).
- 2) T. Yoshikado, T. Takada, T. Yamamoto, H. Yamaji, K. Ito, T. Santa, H. Yokota, Y. Yatomi, H. Yoshida, J. Goto, S. Tsuji, H. Suzuki, Itraconazole-induced cholestasis: involvement of the inhibition of bile canalicular phospholipid translocator MDR3/ABCB4, *Mol. Pharmacol.*, **79**: 241–250 (2011).
- 3) T. Yoshikado, T. Takada, H. Yamamoto, J. K. Tan, K. Ito, T. Santa, H. Suzuki, 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 (2013).
- 4) 吉門 崇, Rafal P. Witek, 杉山雄一, サンドイッチ培養ヒト肝細胞を用いたスタチンの肝消失律速過程の予測, 日本薬剤学会第 30 年会, 長崎 (2015).