薬 剤 学, **78** (5), 224–227 (2018)

≪若手研究者紹介≫

薬物動態を基軸とした薬物誘発性肝毒性評価に関する研究

関 根 秀 一* Shuichi Sekine
千葉大学大学院 薬学研究院 生物薬剤学研究室

1. は じ め に

近年のテクノロジーの発達に呼応するように，疾病に対する治療手段も低分子化合物，ペプチド（中分子）薬，抗体医薬を含む蛋白質医薬，核酸医薬，細胞医薬，再生医療といったように多様化しており「モダリティ」というキーワードを耳にする機会が増えている．そのため「薬剤学」においても益々，多様化が求められている．筆者が所属している千葉大学大学院薬学研究院にも,「薬剤学」に関連する研究室は「生物薬剤学（伊藤晃成教授)」,「製剤工学（森部久仁一教授)」,「薬物学（秋田英万教授)」,「臨床薬理学（樋坂章博教授)」があり，4 研究室合同の発表会も定期的に開催され交流も盛んであるが，各研究分野が益々，高度化・細分化されていることを肌で感じることができる．

そんな薬剤学の領域に身を置く筆者の元に「薬剤学」が配信されるたびに，まず開くのは「若手研究者紹介」である．それは同じ薬剤学という領域にいながら，近そうで遠い（遠そうで近い）分野の著者の先生方の人となりや，研究のプロセスが分かりやすく書かれているだけでなく，心に残るメッセージがあるからである．本稿への執筆を依頼されて以降，自分に何か書けるようなことがあるのか？ と途方に暮れ，原稿の締め切りが迫ってくる恐怖と戦いながら，この機会に自らの研究生活を振り返らせて頂いた．読んで頂いた方の中の数％の方にでもメッセージとして残るものがあれば幸いである．

*2004 年 3 月千葉大学薬学部卒業，2005 年 3 月千葉大学大学院医学薬学府中退，2012 年 9 月に博士（薬学）を授与される．2005 年 4 月～2007 年 3 月千葉大学薬学部助手，2007 年 4 月～2014 年 3 月千葉大学大学院薬学研究院助教，2012 年 11 月～2013 年 3 月 Groningen University（オランダ）研究留学（Geny Groothuis 教授），2014 年 4 月より現職（千葉大学大学院薬学研究院講師）．2016 年日本毒性学会技術賞，2017 年日本薬物動態学会奨励賞．趣味：野球，スキューバダイビング．連絡先：〒260–8675 千葉市中央区亥鼻 1–8–1
E-mail: ssekine@faculty.chiba-u.jp

2. 生物薬剤学研究室との出会い

千葉大学薬学部に入学した 18 年前を思い返してみると，「人を幸福にするもの（＝薬）をつくりたい」との想いで薬学部の門をたたき,「薬をつくるために大事な分野は何か？」の答えを学部時代に追い求めた結果，当時の筆者が見出した答えは，薬の効果や副作用に密接に関わる「薬物動態」であった．その当時「薬物動態」を領域とする研究室は,「生物薬剤学（堀江利治教授)」と「薬物学（千葉寛教授)」の 2 つあったが，当時所属していた野球部でバッテリーを組んでいた先輩が在籍していたという理由で生物薬剤学研究室を選択した．そこから現在に至るまで，約 14 年間という期間を生物薬剤学研究室という恵まれた教育・研究環境において集中して過ごすことができたのは，とても幸運なことであったと思う．

3. 生物薬剤学研究室での生活で得られたもの

研究室に配属され，当時，助手として研究室に所属されていた伊藤晃成先生の指導のもと胆汁排泄に関わるトランスポーターである Multidrug resistance associated protein 2（MRP2）の遺伝子変異による輸送活性への影響を調べる研究テーマを与えられ，サブクローニングをするところから研究がス

タートしたが，プレートに撒いた大腸菌を 100 個拾っても目的のプラスミドを得ることができず，何度トライしても結果は同じであった．腕が悪いのかと諦めかけていた中，修士課程への入学試験のため，生化学を復習していた時に，ベクターの脱リン酸化処理が原因であるような気がして，酵素が失活しているのではと考えるようになった．研究を始めたばかりであったため仕方がなかったのかもしれないが，うまくいかない原因を考え，試験管の中で起こっていることを意識しながら実験をする必要があるということを自身の失敗の中から学ぶことができたのは，その後の教育研究活動をしていく中においては不幸中の幸いであった．

4. 薬物動態研究から薬物誘発性肝毒性評価への研究テーマの転換

大学入学時の「人を幸福にできる医薬品をつくりたい」との想いを実現するため，製薬企業の採用試験を受け，希望する製薬企業から内定を頂くことができた．しかし同時に，堀江利治教授から，修士課程を中退して助手になり論文博士にて学位を取得する道を示され，何か人とは違った経験ができるかもという興味も湧いてきたため，教員として大学での研究活動を続けることにした．その当時の研究テーマは，肝細胞内の MRP2 が毛細胆管側膜から局在変化することで，胆汁うっ滞に繋がる機序を解明するというものであった．実際，ヒトの肝疾患時に見られる胆汁うっ滞時には，毛細胆管側膜における MRP2 の局在性が低下している研究成果もいくつか報告されており，この研究を遂行することにより治療薬の開発に結び付くことから，研究の意義は十分あると考えた．そこでラットやヒトの初代培養肝細胞や実験動物においてモデルを作製し，MRP2 の局在性が低下する機序の解明を試みた．その研究の過程では，膜裏打ち蛋白質やリン酸化シグナルが協奏しながら MRP2 の局在性を可逆的に変化させている分子機序を見つけることができ，当初の予定通り，無事に論文博士にて学位を取得することができた．しかし博士論文の発表の際に副査の先生から“今回，明らかにした分子機序から，新たな胆汁うっ滞に対する治療薬ができるのか？”という本質的な指摘を受けた．もちろん想定内の指摘であり，その場では事前に用意していた返答で乗り切れたものの，創薬に結び付くと思い研究を始めた当初の目的からは，少し距離が離れてしまったように感じた．

ここでの気づきを踏まえて，博士号の学位を取得してからは初心に立ち返り「創薬に直接役に立つ研究がしたい」と強く意識するようになり，薬物動態に重要な薬物代謝酵素やトランスポーターが関わる薬物誘発性肝毒性（Drug induced liver injury：DILI）を評価するための研究に舵を切ることにした．特に医薬品開発における臨床試験や市販後において，重篤な DILI の発現は，心毒性と並び特に避けるべき副作用であり，前臨床段階でこれらリスクの低い薬物を選別することが，医薬品開発の成功確率を上昇させることにつながる鍵であると考えられている．そのため研究を始めるにあたり，「個々の薬物による DILI の発症機序を詳しく解明する研究」よりは，「既知の発症機序に対して前臨床段階で DILI の発症を予測するために実際に使える評価手法」というコンセプトで研究を始めた．

5. 薬物誘発性肝毒性の評価に関する研究

肝臓は，高いエネルギー産生や自己修復能力に加えて，胆汁排泄能，異物代謝能など特徴的な機能を有しているため，DILI の発症から増悪に関わる機序も多岐にわたると考えられている．中でも米国ファイザー社の Dr. Yvonne Will 等は「胆汁酸の胆汁中への排泄に関わる Bile salt export pump（BSEP）の阻害」と「ミトコンドリアにおけるエネルギー産生の障害」の両方を強力に阻害する薬物において，臨床における肝毒性リスクと関連することを報告している[1]．

DILI の発症機序の多様性から，医薬品候補化合物の DILI 発現ポテンシャルの評価のためには，*In vivo* の肝機能を再現（保持）することが可能な培養モデルが重要となる．そのため国内外において生体内の臓器を *In vitro* において再現する Microphysiological System（MPS）技術が盛んに研究されている．筆者は 3 次元培養技術など数ある MPS 技術の中で，薬物動態の領域でも使用されるサンドイッチ培養技術を用いている．その大きな特徴は，コラーゲンなどの細胞外基質を重層することで，通常の培養時に失われる細胞の極性が回復し，毛細胆管構造の形成や薬物代謝酵素の機能を賦活化させることである．しかし MPS 技術により高機能化された細胞のみで

は，医薬品候補化合物の DILI の発現ポテンシャルの予測は依然として難しく，そこには DILI の発現機序に合わせた工夫（＋“α”）が重要となると考え，以降の研究を行ったので簡単に紹介したい．

5.1 サンドイッチ培養肝細胞＋“胆汁酸”による胆汁うっ滞誘発性薬物の評価系

肝臓に特有の機能である胆汁排泄を担う MRP2 や BSEP などの ABC トランスポーターは，それぞれビリルビン（グルクロン酸抱合体）や胆汁酸などを濃縮的に胆汁中へ排泄し，生じる浸透圧差を利用して水の流入が起こり胆汁流を生成する．これら類似の機能を持つ MRP2 と BSEP のうち MRP2 の遺伝的機能欠損は ALT などの酵素の逸脱を伴わない黄疸（Dubin-Johnson 症候群）につながるのに対して，BSEP は，より毒性の高い胆汁酸の蓄積により肝移が必要となる（進行性家族性肝内胆汁うっ滞症 2 型）．そのため前述の通り，薬物による胆汁うっ滞を伴う肝毒性の発現には特に BSEP の阻害が注目されている．しかし，細胞内では，胆汁酸は BSEP のみならず，抱合代謝や血管側への排泄過程も関わることが知られている．これらを包括的に評価するためには，胆汁排泄能を保持したサンドイッチ培養が適していると考えた．また胆汁酸は体内で腸肝循環をしているため，肝細胞内に存在している胆汁酸は，肝外にプールされている胆汁酸量に比べてわずかであり，*In vitro* において胆汁酸の蓄積に伴う肝毒性を再現するためには，ヒト血清中に存在する胆汁酸組成を模倣した胆汁酸混合物を加える必要があるとの発想（＋“α”）に至り，胆汁うっ滞誘発性薬物の臨床でのリスクを予測可能な評価系を構築することができた[2]．

5.2 サンドイッチ培養肝細胞＋“酸素”によるミトコンドリア毒性誘発性薬物の評価系

肝臓に入る血管には，消化管で吸収される栄養素を豊富に持つ門脈と酸素濃度が高い血液が心臓から直接運ばれる肝動脈の 2 つの血管系があるという，他の臓器にはない特徴を有することで，生体におけるエネルギーの産生の中心を担っている．そのため肝細胞は，他の細胞と比較してミトコンドリアでの電子伝達系と共役する酸化的リン酸化により効率的に ATP が産生されており，高い酸素要求性を持っている．そのため前述の通り，薬物による肝毒性の発現機序として，ミトコンドリアにおけるエネルギー産生の障害が注目されている．これまで，ヒト肝がん由来細胞 HepG2 細胞を用いて，糖源をグルコースからガラクトースに置換することで，がん細胞が持つ特有の解糖系でのエネルギー産生からミトコンドリアでの酸化的リン酸化へシフトさせることで肝毒性リスクが高い薬物を検出可能となることが報告されている[3]．しかし HepG2 細胞では CYP による代謝機能が低いなどの問題点を持つため，ヒト肝細胞での予備検討として，サンドイッチ培養したラット肝臓より単離した肝細胞を用いた．そこで既報に習い糖源をグルコースからガラクトースに変更したが，期待していた結果は得られずに悩んでいた時に，東京大学生産技術研究所酒井康行先生の総説（Liver Stem Cells 2011）[4] に運良く出会うことができた．その総説によるとラットの肝細胞における酸素消費速度（40～90 pmol/sec/cm^2）に対して，培地を 3 mm の高さで大気中から供給可能な酸素の透過速度（17 pmol/sec/cm^2）であるとの記載があり，ラット肝細胞は虚血状態であるとの知見を得た．この知見からミトコンドリア毒性を評価するためには適切に酸素を補ってあげる必要があるとの発想（＋“α”）に至った．そこで，ラット肝細胞の酸素消費速度を満たす供給速度を達成するためにインキュベータ内の酸素濃度を 20% から 80% にまで上昇させ，糖源をグルコースからガラクトースに置換することにより，ミトコンドリア毒性に起因する DILI の発症ポテンシャルを予測可能な評価系を構築することができた[5]．

6. お わ り に

以上の研究を進めていく中で，*In vitro* と *In vivo* において細胞がおかれている環境は予想以上の乖離があることに気付かされることが多くある．そのため今後，薬物動態や安全性評価のフィールドにおいても，様々なモダリティに対応するためにも益々 MPS の領域が重要となることは，間違いないと考えている．

最後に，筆者が生物薬剤学研究室に配属された 14 年前には既に，堀江利治先生はミトコンドリアと肝障害に着目された研究を，桝渕泰宏先生（現：千葉科学大学教授）は代謝酵素による活性代謝物と肝障害の研究を展開され，筆者の指導教員として研究者としての基礎を築いて頂いた伊藤晃成先生は胆汁排

泄トランスポーターの研究を展開されていた．その中で学生として2年間という短いながらも充実した研究生活を送れたことが，現在進めている研究の糧になっていることを改めて強く実感し，諸先生方に心より感謝いたします．

引 用 文 献

1) M. D. Aleo, Y. Luo, R. Swiss, P. D. Bonin, D. M. Potter, Y. Will, Human drug-induced liver injury severity is highly associated with dual inhibition of liver mitochondrial function and bile salt export pump, *Hepatology*, **60** (3), 1015–1022 (2014).
2) T. Susukida, S. Sekine, M. Nozaki, M. Tokizono, K. Ito, Prediction of the clinical risk of drug-induced cholestatic liver injury using an *in vitro* sandwich cultured hepatocyte assay, *Drug Metab. Dispos.*, **43** (11), 1760–1768 (2015).
3) L. D. Marroquin, J. Hynes, J. A. Dykens, J. D. Jamieson, Y. Will, Circumventing the Crabtree effect: replacing media glucose with galactose increases susceptibility of HepG2 cells to mitochondrial toxicants, *Toxicol. Sci.*, **97** (2), 539–547 (2007).
4) Y. Sakai, M. Nishikawa, F. Evenou, M. Hamon, H. Y. Huang, K. P Montagne, N. Kojima, T. Fujii, T. Niino, Engineering of implantable liver tissues, In: Liver Stem Cells (T. Ochiya, ed), Humana Press, New York, 2011, pp. 189–216.
5) C. Liu, S. Sekine, K. Ito, Assessment of mitochondrial dysfunction-related, drug-induced hepatotoxicity in primary rat hepatocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **302**, 23–30 (2016).