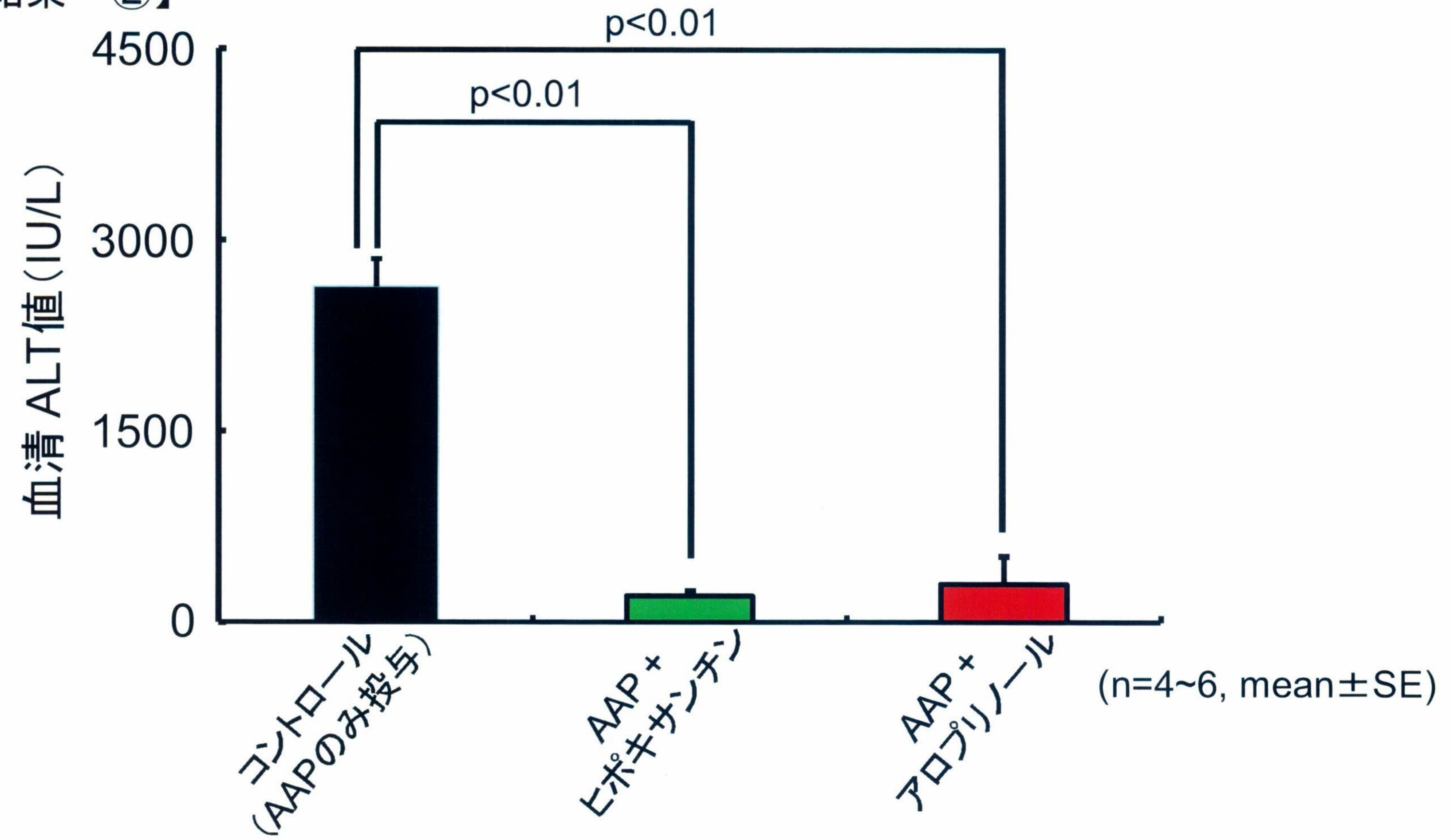
添付資料6-7

ヒポキサンチンによるAPP誘発性DILI改善作用のメカニズムの検討-②

【結果ー②】



アロプリノールはAAP誘発性DILIに対して、ヒポキサンチンと同程度の改善作用を示した。

添付資料6-8

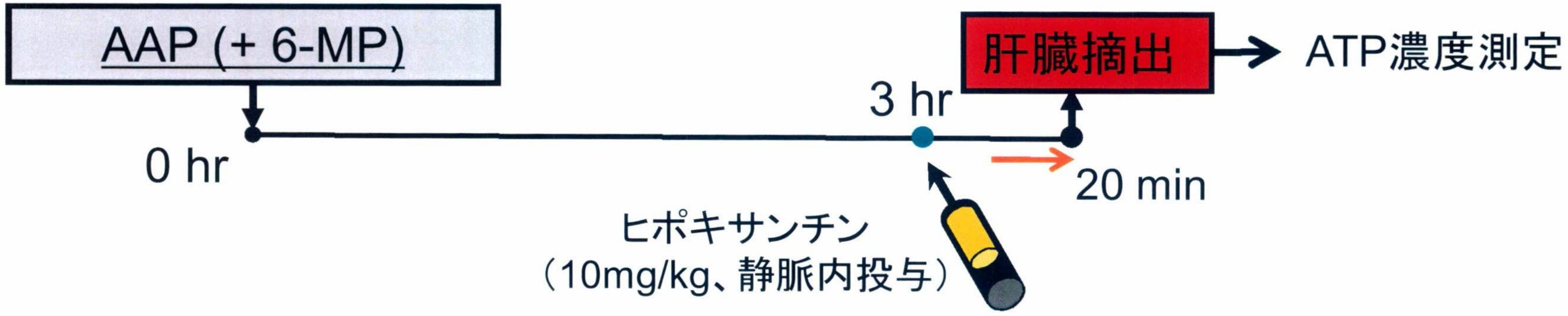
ヒポキサンチン投与時の肝臓内ATP量の変化

【実験目的】

ヒポキサンチンのHGPRTを介した最終代謝産物はATPであることから、ヒポキサンチン投与により肝臓中ATP濃度が上昇するかを確認する。

【実験方法】

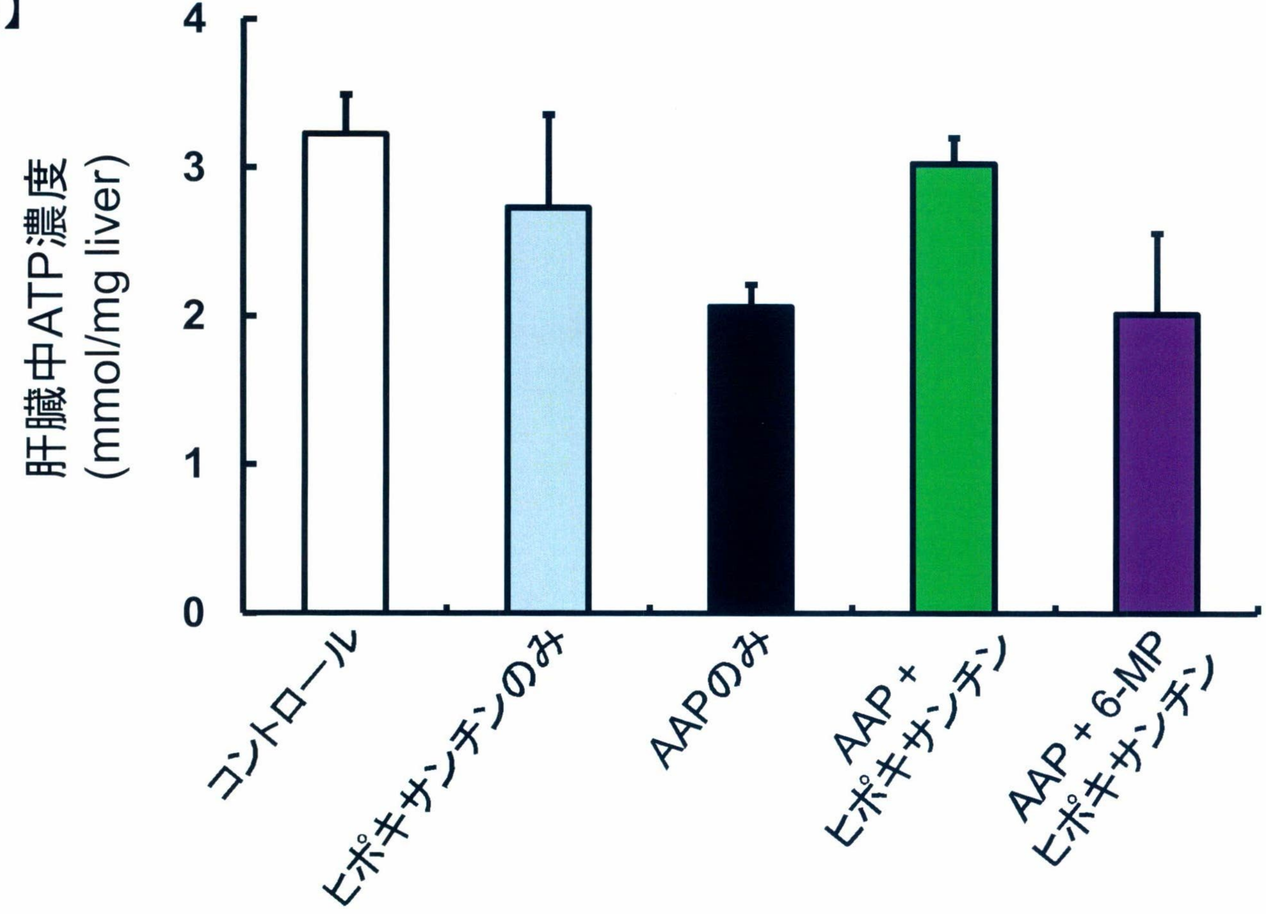
下記タイムコースに従い、ラットに6-MP（10mg/kg）併用あるいは非併用下でAPP（400mg/kg）を投与し、3hr後にヒポキサンチン（10mg/kg）を静脈内投与する。ヒポキサンチン投与後20min後に肝臓を摘出し、ATP濃度を測定する。



添付資料6-8

ヒポキサンチン投与時の肝臓内ATP量の変化

【結果】



(n=4, mean±SE)

DILI発症時には肝臓中ATP濃度は低下しており、ヒポキサンチンは、投与後のHGPRTを介して代謝され、最終的にATP濃度が回復することが示された。

① Suzuki H, Yoshikado T, Yamamoto T, Yamaji H, Ito K, Takada T:
Effect of itraconazole on the biliary secretion of phospholipids in vitro and in vivo.
3rd FEBS Special Meeting ABC2010 要旨集 P164 PP-184
② 小沢政成, 本間雅, 千葉厚, 曽我朋義, 吉田晴彦, 山本武人, 池淵祐樹, 伊藤晃成, 鈴木洋史:
ラット肝障害モデルに対するヒポキサンチンの肝障害発症抑制効果の検討.
第 24 回日本薬物動態学会 要旨集 P199 1-B1-17-3
③ 山本武人, 本間雅, 曽我朋義, 徳永勝士, 松下正毅, 横田浩充, 矢冨裕, 吉田晴彦, 後藤順, 辻省次, 鈴木洋史:
薬物誘発性肝障害患者のゲノム・メタボローム解析.
第 24 回日本薬物動態学会 要旨集 P199 1-B1-17-2
④ 吉門崇, 高田龍平, 山本武人, 山道寛子, 伊藤晃成, 三田智文, 鈴木洋史:
胆汁脂質輸送体発現系を用いた薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズム解析.
第 31 回胆汁酸研究会 要旨集 P16 4
⑤ 本間雅, 千葉厚, 山本武人, 曽我朋義, 横田浩充, 矢冨裕, 吉田晴彦, 後藤順, 辻省次, 鈴木洋史:
薬物性肝障害の新規治療法の検討.
第 17 回クリニカルファーマシーシンポジウム 要旨集 P190 118
⑥ 本間雅, 千葉厚, 山本武人, 曽我朋義, 横田浩充, 矢冨裕, 吉田晴彦, 後藤順, 辻省次, 鈴木洋史:
臨床で観察される薬物誘発性肝障害の解析(2).
日本薬剤学会第 24 年会 要旨集 P123 21-5-12
⑦ 山本武人, 本間雅, 曽我朋義, 徳永勝士, 松下正毅, 横田浩充, 矢冨裕, 吉田晴彦, 後藤順, 辻省次, 鈴木洋史:
臨床で観察される薬物誘発性肝障害の解析(1):薬物誘発性肝障害患者を対象としたゲノム・メタボローム解析.
日本薬剤学会第 24 年会 要旨集 P122 21-5-11
⑧ 吉門崇, 高田龍平, 山本武人, 山道寛子, 伊藤晃成, 三田智文, 横田浩充, 矢冨裕, 吉田晴彦, 後藤順, 辻省次, 鈴木洋史:
臨床で観察される薬物誘発性肝障害の解析(3):胆汁形成阻害を介したイトラコナゾール誘発性肝障害:
日本薬剤学会第 24 年会 要旨集 P123 21-5-13
⑨ Suzuki H, Yoshikado T, Ito K and Takada T.
Functional analysis of ABCB4 and its mutants in vitro.
2nd FEBS Special Meeting ABC2008 要旨集 P153 PP-126

PP-183 A bacterial multidrug ABC transporter, BmrA, investigated by H/D exchange mass spectrometry

Shahid Mehmood, Jean-Michel Jault, Eric Forest

Institut de Biologie Structurale, 41, rue Jules Horowitz, Grenoble, 38027, France

BmrA (*Bacillus* multidrug resistance ATP) is a homo-dimer belonging to the ABC transporter family and some of its members are known to be responsible for resistance against a broad spectrum of antibiotics and chemotherapeutic drugs in bacteria and mammalian cells. Excretion of toxic substances from cells is another vital function performed by these transporters while in prokaryotes they are also involved in import of small molecules like sugar, peptides and metal ions.

Here, H/D exchange in combination with mass spectrometry was used to determine the accessibility of different regions of the transporter, transmembrane helices (TMH), intracellular loops (ICL) and nucleotide-binding domain (NBD), in different conformations.

Deuterium exchange was carried out on different conformations of wild-type BmrA, either in the apo form or in the presence of ATP + Mg ± Vi. The deuterium exchange profile was also monitored for the mutant E504A which is unable to hydrolyse ATP and forms a tight complex with ATP-Mg mimicking the closed form of wild-type BmrA. Local H/D exchange kinetics were performed by digesting the deuterated samples with two acidic proteases separately resulting in some overlapping peptides. These overlapping peptides were helpful to obtain more precise information about some specific regions of BmrA. H/D exchange data of the apo protein showed an overall good correlation with the BmrA topology predicted by homology with the 3-D structures of Sav1866 or MsbA, except for ICL2. Peptides covering *cis*-ICL2 of transmembrane domain interacting with *trans*-NBD showed the highest difference in deuterium intake, strongly suggesting the free and restricted movement of the loop in open and closed states, respectively. The regions which are involved in NBD-NBD interaction clearly showed less exchange in BmrA-ADP-Vi complex and for the mutant E504A (ATP-Mg complex). Also significant difference was noticed at Walker B and following adjacent region which are involved in ATP binding and dimerization of NBDs, respectively.

The conditions are being optimized to carry out the deuterium exchange in membranes with overexpressed protein and/or after reconstitution of protein in liposomes.

PP-184 Effect of itraconazole on the biliary secretion of phopholipids in vitro and in vivo

Hiroshi Suzuki, Takashi Yoshikado, Takehito Yamamoto, Hiroko Yamaji, Kousei Ito, Tappei Takada

Dept of Pharmacy, The University of Tokyo Hospital, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655, Japan

The multidrug resistance gene 3 (MDR3/ABCB4) and the bile salt export pump (BSEP/ABCB11) on the canalicular membrane of hepatocytes mediate the biliary secretion of phospholipids and bile salts, respectively, and genetic defects in these transporters cause the progressive familial intrahepatic cholestasis. In the present study, we focused on the effects of itraconazole on the function of these two transporters, since this drug may cause the drug-induced cholestasis. After intravenous administration of itraconazole to rats, the biliary secretion of phospholipids, rather than that of bile salts, was markedly decreased. Itraconazole had little effect on the function of BSEP in MDCK II cells doubly transfected with cDNAs for Na^{+}/taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP/SLC10A1) and BSEP. In contrast, the cellular extrusion of isotopically labeled phosphatidylcholine in MDR3-overexpressing cells was significantly decreased by itraconazole in a concentration-dependent manner. These results suggested that the inhibitory effect of itraconazole on the MDR3-mediated extrusion of phosphatidylcholine is involved in the itraconazole-induced cholestasis. The evaluation system used for the functional analyses of BSEP and MDR3 in the present study may be useful in analyzing the mechanisms of drug-induced cholestasis and in evaluating the risks of drug-candidates to cause cholestasis.

1-B1-17-2

GENOMIC AND METABOLOMIC ANALYSIS OF PATIENTS SUFFERED FROM DRUG INDUCED LIVER INJURY

Takehito Yamamoto[1], Masashi Honma[1], Tomoyoshi Soga[2], katsushi Tokunaga[3], Masaki Matsushita[4], Hiromitsu Yokota[5], Yutaka Yatomi[5], Haruhiko Yoshida[6], Jun Goto[7,8], Shoji Tsuji[7,8] and Hiroshi Suzuki[1]
[1]Department of Pharmacy [5]Department of Clinical Laboratory, [6]Department of Gastroenterology, [7]Department of Neurology and [7]Department of Genome medicine, The University of Tokyo Hospital, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, [2]Institute for Advanced Biosciences, Keio University, 246-2 Kakuganji-Azamizukami, Tsuruoka, Yamagata 997-0052, [3]Department of Human Genetics, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, [4]Institute for Biotechnology Research, Wakunaga Pharmaceutical, 1624 Shimokoutachi-Koudacho, Akitakata, Hiroshima 739-1195,

[Purpose] This study aims to investigate the mechanisms and risk factors of drug induced liver injury (DILI) from genomic and metabolomic perspectives. [Methods] DNA samples were obtained from DILI patients in our hospital, and were subjected to genomic analysis especially focusing the drug metabolizing enzymes, transporters and human leukocyte antigen (HLA) gene. Residual serum samples were also collected from clinical laboratory and were subjected to the metabolomic analysis. [Results and Discussion] HLA-B*27 allele, which is very rare in Japanese and thought to modulate the immune response, was detected in 2 DILI patients, indicating that immune systems plays some role in onset of DILI. Furthermore, metabolomic analysis revealed that serum levels of ophthalmate related compounds, putative marker of glutathione depletion, tend to increase along with the progression of DILI in certain patients, indicating that the glutathione depletion is the key step for onset or progression of certain type of DILI. From these results, it is expected that the advanced classification of DILI is achieved by utilizing the ophthalmate related compounds in addition to the typical liver markers, and our understandings of the mechanisms of DILI is promoted.

1-B1-17-3

HYPOXANTHINE ATTENUATES THE DEVELOPMENT OF ACUTE LIVER FAILURE VIA THE INCREASE OF INOSINE MONOPHOSPATE (IMP) IN RATS

Masanari Kozawa[1], Masashi Honma[1], Atsushi Chiba[1], Tomoyoshi Soga[2], Haruhiko Yoshida[3], Takehito Yamamoto[1], Yuki Ikebuchi[1], Kousei Ito[1] and Hiroshi Suzuki[1]
[1]Department of Pharmacy, The University of Tokyo Hospital, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan, [2]Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Yamagata 997-0017, Japan, [3]Department of Gastroenterology, The University of Tokyo Hospital, Tokyo 113-8655, Japan.

[Purpose] Previously we analyzed 60 serum samples obtained from drug-induced liver injury (DILI) patients using capillary electrophoresis mass spectrometry and found that the concentration of hypoxanthine tends to decrease with increasing the severity of DILI. However, the involvement of hypoxanthine in DILI development has been poorly understood. The aim of the present study was to investigate the role of purine-metabolites in the development of acute hepatic failure. [Methods] Acute liver injury was induced by administration of α-naphthyl isothiocyanate (ANIT), carbon tetrachloride (CCl_4) intraperitoneally to wistar rats. Adenine, adenosine, guanine, guanosine, hypoxanthine and inosine were administered, respectively after administration of ANIT and CCl_4. Plasma levels of alanine aminotransferase (ALT) and bilirubin were measured as indicators of liver injury. [Results and Discussion] Hypoxanthine and inosine treatment significantly suppressed the elevation of ALT and bilirubin in ANIT-induced liver injury, but other purine-metabolites showed no effect. Hypoxanthine also reduced the ALT value in CCl_4-treated rats. In addition, 6-mercaptopurine, an inhibitor of salvage pathway from hypoxanthine to inosine monophosphate, blocked the effect of hypoxanthine on ANIT-induced cholestatic injury. Now, we are analyzing the change in concentrations of purine-nucleotides in the liver after co-administration of hypoxanthine with ANIT and CCl_4 in order to particularly investigate the involvement of ATP in the development of acute liver injury.

4.　胆汁脂質輸送体発現系を用いた薬物誘発性胆汁うっ滞のメカニズム解析

吉門崇[1,2]、高田龍平[1]、山本武人[1]、山道寛子[1]、伊藤晃成[1]、三田智文[2]、鈴木洋史[1]
1）東京大学医学部附属病院・薬剤部、2）東京大学大学院薬学系研究科・臨床分子解析学

【背景・目的】肝細胞毛細胆管膜に発現する bile salt export pump（BSEP/ABCB11）と multidrug resistance 3（MDR3/ABCB4）は、胆汁中への胆汁酸およびリン脂質の分泌を担う輸送体であり、遺伝的な機能欠損はそれぞれ進行性家族性肝内胆汁うっ滞2型および3型(PFIC2, PFIC3)をもたらす。一方、臨床においては副作用として胆汁うっ滞を誘発し得る薬物が数多く知られており、そのメカニズムとしてBSEPもしくはMDR3の阻害を介する可能性が考えられる。本研究では、胆汁うっ滞型肝障害の報告が特に多い抗真菌薬イトラコナゾールについて、BSEPおよびMDR3発現細胞を用いたin vitro阻害作用の評価と、ラットin vivoにおける胆汁脂質分泌の解析を行い、イトラコナゾール誘発性胆汁うっ滞のメカニズムについて検討した。

【方法・結果】BSEPおよび胆汁酸取り込み輸送体である Na^+/taurocholate cotransporting polypeptide（NTCP/SLC10A1）の共発現系を用いた ^{3}H-タウロコール酸の経細胞輸送実験を行い、イトラコナゾールによる阻害作用の有無を評価した。MDR3に対する作用は、発現系を用いた ^{14}C-ホスファチジルコリン（リン脂質の一種）の排出実験を行うことで評価した。In vivo実験においては、ラットにイトラコナゾールを静脈内投与し、胆汁中の胆汁酸・リン脂質濃度を酵素反応法により測定した。

【考察】イトラコナゾールによる阻害作用は、BSEPおよびNTCPによる ^{3}H-タウロコール酸の経細胞輸送に比べ、MDR3による ^{14}C-ホスファチジルコリンの排出においてより顕著であった。また、イトラコナゾール投与によってラット胆汁中へのリン脂質分泌は顕著に減少した。以上の結果は、イトラコナゾールがMDR3の機能阻害を介して胆汁中へのリン脂質分泌低下をもたらし、胆汁うっ滞を誘発する可能性を示唆するものである。

117

非アポトーシス型細胞死の抑制作用を指標とした新規虚血心筋保護薬の探索

武庫川女子大学薬学部

○中瀬　朋夏、冨田　奈津子、西田　京子、賀来　あかね、高橋　幸一

【目的】病態形成に関与する細胞死にはアポトーシスが重要な役割を担うと考えられている。一方、アポトーシスだけでは説明のつかない現象も多数報告され、細胞死を標的とした薬物治療法の開発において、非アポトーシス型細胞死の存在は無視できない。本研究では、心不全の基礎病態である虚血誘発心筋細胞死に着目し、非アポトーシス型細胞死分子機構の解明と、これに基づいた心筋保護薬の開発を目的とする。

【方法】新生児ラット心筋細胞を低酸素・低グルコース培養することにより、細胞死を誘導した。核の形態変化、アポトーシスの発現、細胞障害性、細胞死関連分子の発現変動を検討することにより、細胞死の解析と薬物投与による心筋保護効果について検証した。

【結果・考察】虚血24時間後、80％の細胞において著しい核の収縮を伴う細胞死が観察され、この細胞死は、caspase阻害剤z-VADに影響されないこと、アポトーシス関連の指標にネガティブな結果を示したことから、caspaseが関与しない非アポトーシス型細胞死であることが明らかとなった。非アポトーシス型細胞死における核収縮因子として同定されているiPLA$_2$ (calcium-independeent phospholipase A$_2$)について検討したところ、虚血処置による核収縮と細胞死はiPLA$_2$阻害剤によって著明に抑制された。次に、ニューロペプチドUrocortin (10nM)あるいはペプチドホルモンLeptin (60nM)を虚血前1時間処置したところ、虚血による核収縮は消失し、虚血障害によるLDHの遊離を有意に抑制した。この細胞死抑制の機序として、Urocortin、Leptinの前投与処置によるiPLA$_2$の発現抑制が大きく関与していることを明らかにした。

【結論】虚血心筋においてiPLA$_2$が関与する新規細胞死機構を明らかにし、その抑制を介したUrocortin、Leptinの新たな心筋保護効果を見出した。

118

薬物性肝障害の新規治療法の検討

[1] 東京大学医学部附属病院薬剤部、
[2] 東京大学医学部附属病院検査部、
[3] 東京大学医学部附属病院消化器内科、
[4] 東京大学医学部附属病院ゲノム診療部・神経内科、
[5] 慶應義塾大学先端生命科学研究所

○本間　雅[1]、千葉　厚[1]、山本　武人[1]、曽我　朋義[5]、横田　浩充[2]、矢冨　裕[2]、吉田　晴彦[3]、後藤　順[4]、辻　省次[4]、鈴木　洋史[1]

【目的】薬物性肝障害は、臨床上最も一般的に認められる薬物の有害作用であり、薬物治療の安全性を確保する上で重要な課題である。また、薬物性肝障害が発症した際には、起因薬物の投与を中止して経過観察をするのが一般的であり、治療上重要性の高い薬物であったとしても、その後の投薬を中止せざるを得ない例が多い。本研究では東京大学医学部附属病院(以下当院)にて発症した薬物性肝障害症例の解析を通じて、新規治療法の確立を目指して検討を行った。

【方法・結果】当院で薬剤性肝障害を生じた患者の血清を、メタボローム手法を用いて解析した結果、肝障害の進行に伴ってヒポキサンチン濃度が低下する傾向を見出した。同様の変動は、四塩化炭素およびα-naphthyl isothiocyanate(ANIT)処理によるラット急性肝障害モデルにおいても観察され、薬物性肝障害発症時には肝臓内でのヒポキサンチン枯渇が生じている可能性が考えられた。次に、ヒポキサンチンあるいは関連プリン誘導体を投与することで肝障害の発症を抑制可能であるかを検討した。その結果、ヒポキサンチンおよび対応するヌクレオシドであるイノシンを投与した群では、有意にALT値・ビリルビン値の上昇抑制が認められ、肝障害発症が強く抑制されていると考えられた。他のプリン誘導体ではこのような肝障害発症抑制効果は認められなかった。また、これらの効果はヒポキサンチンの酸化代謝を阻害しても影響が認められなかった一方で、核酸へのサルベージ代謝経路を阻害した場合には減弱することが示された。

【考察】ヒポキサンチンは生体内における核酸合成の中心的な原料である。薬物性肝障害の発症に伴って、肝臓内ではヒポキサンチンの消費上昇・枯渇が生じており、これが肝障害進展に密接に関連していることが示唆された。また、ヒポキサンチンが薬物性肝障害の新規治療薬となりうる可能性が示唆された。

21-5-12

臨床で観察される薬物誘発性肝障害の解析（2）
薬物誘発性肝障害に対する新規治療法の検討

○本間雅[1]、千葉厚[1]、山本武人[1]、曽我朋義[5]、横田浩充[2]、矢冨裕[2]、吉田晴彦[3]、
後藤順[4]、辻省次[4]、鈴木洋史[1]

([1]東大病院・薬剤部、[2]同・検査部、[3]同・消化器内科、[4]同・臨床ゲノム診療部/神経内科、
[5]慶應義塾大・先端生命科学研)

【目的】薬物誘発性肝障害（Drug Induced Liver Injury, DILI）が発症した際には、起因薬物の投与を中止して経過観察するのが一般的であり、治療上重要性の高い薬物であったとしても、その後の投薬を中止せざるを得ない例が多い。本研究ではDILIの解析を通じて、新規治療法の確立を目指して検討を行った。【方法・結果】東京大学医学部附属病院でDILIを発症した患者の血清を、メタボローム解析した結果、肝障害の進行に伴ってヒポキサンチン濃度が低下する傾向を見出した。同様の変動は、四塩化炭素およびα-naphthyl isothiocyanate (ANIT) 処理によるラット急性肝障害モデルにおいても観察され、DILI発症時には肝臓内でのヒポキサンチン枯渇が生じている可能性が考えられた。また、ヒポキサンチンおよび対応するヌクレオシドであるイノシンを投与した群では、有意にALT値・ビリルビン値の上昇抑制が認められた。他のプリン誘導体ではこのような効果は認められなかった。【考察】ヒポキサンチンは生体内における核酸合成の中心的な原料である。DILIの発症に伴って、肝臓内ではヒポキサンチンの消費上昇・枯渇が生じており、これが肝障害進展に密接に関連していることが示唆された。また、ヒポキサンチンがDILIの新規治療薬となりうる可能性が示唆された。

21-5-13

臨床で観察される薬物誘発性肝障害の解析（3）：
胆汁形成阻害を介したイトラコナゾール誘発性肝障害

○吉門崇[1,2]、高田龍平[2]、山本武人[2]、山道寛子[2]、伊藤晃成[2]、三田智文[1]、横田浩充[3]、
矢冨裕[3]、吉田晴彦[4]、後藤順[5]、辻省次[5]、鈴木洋史[2]

([1]東大院薬・臨床分子解析学、[2]東大病院・薬剤部、[3]同・検査部、[4]同・消化器内科、
[5]同・臨床ゲノム診療部/神経内科)

【背景・目的】東京大学医学部附属病院で薬物誘発性肝障害（Drug Induced Liver Injury, DILI）を発症した症例を解析したところ、抗真菌薬イトラコナゾール（ITZ）の関与が疑われる例が見出された。本研究では、ITZによる肝障害発症機構を明らかとすることを目的として、以下の検討を行った。【方法・結果】入院治療中の患者2例において、血漿中ITZ濃度の上昇に伴う肝障害マーカーの増悪が見られた。ラットを用いたin vivo実験を行ったところ、ITZ投与は胆汁流量の減少をもたらし、胆汁成分分析の結果、胆汁酸に比べリン脂質分泌の減少が顕著であった。胆管側膜胆汁酸排出ポンプ（BSEP/ABCB11）発現系を用いた ^{3}H タウロコール酸の経細胞輸送実験およびリン脂質排出ポンプ（MDR3/ABCB4）発現系を用いた ^{14}C ホスファチジルコリンの排出実験により、ITZはBSEPに比べMDR3に対してより強い阻害作用を有することが明らかとなった。【考察】in vivoにおけるリン脂質の胆汁分泌の低下とin vitro実験で見出されたMDR3阻害作用から、ITZは主にMDR3によるリン脂質分泌を妨げることによりDILIを誘発している可能性が示された。種々の化合物により生じる胆汁うっ滞を予測・解析する際には、本研究で用いた輸送評価系は有用なツールとなりうるものと考えられた。

21-5-10

ジルチアゼム塩酸塩長期経口徐放システムの最適設計

○菊地伸吾、髙山幸三

（星薬大）

【目的】薄板スプライン補間を利用した非線形応答曲面法（RSM-S）は、製剤処方の定量的最適化に有用であることが報告されている。本研究では、水溶性の高いモデル薬物としてジルチアゼム塩酸塩を選択し、24時間にわたり0次放出する経口徐放システムの設計を試みた。最適設計の予測手法としてRSM-Sを適用し、bootstrap（BS）法により信頼区間を推定した。また、検証実験により予測精度を評価した。
【方法】アニオン性のdextran sulfate（DS）、カチオン性の[2-(diethylamino)ethyl] dextran（EA）及びhypromellose（HPMC）を処方因子として選択した。これらの因子をextreme vertices design計画に割り付け、マトリックス型錠剤を14種類調製した。JP15溶出試験第2法（パドル法）により崩壊試験用第1液及び第2液中でのジルチアゼム塩酸塩の放出率を求め、さらにdifference factorとsimilarity factorを推定した。これらの放出特性にRSM-SとBS法を適用し、最適解及び信頼区間を推定した。
【結果・考察】Leave-one-out cross validationの結果から、いずれの製剤特性もRSM-Sにより高精度に推定できることが示された。また、推定された最適解の実測値は放出液のpHに依らず安定な放出率を示し、いずれも推定値と良好な一致が見られた。本システムでは、DSとEAが放出液中で不溶性高分子複合体を形成し、そのネットワーク内でゲル化したHPMCによりジルチアゼム塩酸塩の放出が制御されるものと考えられる。RSM-Sにより最適化されたマトリックス型錠剤は、24時間にわたる薬物の0次放出を可能とし、水溶性の高い薬物でも長期経口徐放システムの設計が可能であることが示唆された。

21-5-11

臨床で観察される薬物誘発性肝障害の解析（1）
薬物誘発性肝障害患者を対象としたゲノム・メタボローム解析

○山本武人[1]、本間雅[1]、曽我朋義[5]、徳永勝士[6]、松下正毅[7]、横田浩充[2]、矢冨裕[2]、吉田晴彦[3]、後藤順[4]、辻省次[4]、鈴木洋史[1]

（[1]東大病院・薬剤部、[2]同・検査部、[3]同・消化器内科、[4]同・臨床ゲノム診療部/神経内科、[5]慶應義塾大・先端生命科学研、[6]東大院医・人類遺伝学、[7]湧永製薬・バイオ事業開発部）

【目的・方法】薬物性肝障害（Drug Induced Liver injury, DILI）は、臨床上最も一般的に認められる薬物の有害作用であり、その克服は薬物治療の有効性・安全性を確保する上で重要な課題である。東京大学医学部附属病院では、DILIの発症に関わる遺伝的素因や起因薬物を解明するため、DILI患者を対象とした薬物動態関連因子や、ヒト白血球抗原（Human Leukocyte Antigen, HLA）遺伝子座を中心としたゲノム解析、ならびにDILI発症時の血清検体を用いた解析を実施している。**【結果・考察】**DILI症例24例において、日本人では極めて稀なHLA-B*27アリルが2例検出された。HLA-B*27は免疫系に影響を与えることが示唆されており、免疫応答を介した機構が、少なくとも一部のDILI発症に関与している可能性が考えられた。一方、Affymetrix社DMET Plusによる解析の結果、DILI患者におけるGST mu/theta欠損などのSNPs頻度は、日本人における頻度と有意な差はなかった。血清検体を用いてメタボローム解析を実施したところ、DILI発症患者ではオフタルミン酸に関連する生体内因性物質の濃度上昇が認められた。なお、この上昇は多岐にわたる被疑薬の種類に依存せずに観察された。オフタルミン酸関連物質の血清中濃度上昇は、肝臓内のグルタチオン濃度低下を反映することが、アセトアミノフェン誘発ラット肝障害モデルで示されていることから、DILI発症には、肝臓における酸化ストレスが関与している可能性が考えられた。

PP-125 Functional analysis of ABCB4 and its mutants in vitro

Hiroshi Suzuki, Takashi Yoshikado, Kousei Ito, Tappei Takada

Dept of Pharmacy, The University of Tokyo Hospital, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8655, Japan

ABCB4 (MDR3) on the bile canalicular membrane mediates the efflux of phospholipids into bile. Mutations in ABCB4 are known to cause liver disorders ranging from gallstone disease, intrahepatic cholestasis of pregnancy (ICP) to progressive familial intrahepatic cholestasis 3 (PFIC3). In the present study, we performed in vitro functional analysis of ABCB4 and its mutations reported in PFIC3 (V425M) and ICP (A546D) patients. For the analysis, we prepared the recombinant adenoviruses carrying the wild type and mutated type of human MDR3, and infected them to LLC-PK1 cells. The Western blot analysis indicated that the wild-type and V425M mutant were predominantly detectable as a mature and fully-glycosylated form, whereas A546D mutant may be expressed as an immature form. It is expected that the less glycosylation results from its retain in the endoplasmic reticulum. Treatment with MG132, a proteasome inhibitor, increased the expression of immature form, suggesting that A546D mutant may be degraded via ubiquitin-proteasome pathway. In addition, immunostaining and cell surface biotinylation experiments indicated that A546D mutant was expressed intracellularly, whereas the wild-type and V425M mutant were predominantly localized on the apical membrane of LLC-PK1 cells. We also examined the function of wild type and mutated ABCB4 by detecting [^{14}C]phosphatidylcholine (PC) after preincubation of the cells with [^{14}C]choline. For this experiment, 2 mM of taurocholic acid (TCA) was used as an acceptor of PC. The efflux of PC from LLC-PK1 cells infected expressing the wild-type and V425M mutant ABCB4 was significantly higher than that from control cells, whereas A546D mutation caused large reduction in the efflux of PC. We also examined the effect of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), which is effective in the treatment of some kinds of cholestatic diseases. We found that the efflux of PC from LLC-PK1 cells expressing the wild-type ABCB4 was more efficient in the presence of 1 mM TCA and 1 mM tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) rather than that in the presence of 2 mM TCA. Collectively, the function of A546D ABCB4 was impaired due to its defect in the protein maturation, whereas V425M mutation showed no significant difference from the wild-type ABCB4 in our experiments. The results of the present study also suggested that the pharmacological effect of TUDCA might be partly accounted for by the facilitation of ABCB4 activity.

PP-126 Regulation of ATP-binding cassette transporters in human end-stage heart failure: Impact on channel conductivity and drug disposition

Thomas F. Solbach, Barbara Paulus, **Oliver Zolk**, Martin F. Fromm

Institute of Clinical Pharmacology and Clinical Toxicology, University Erlangen-Nuremberg, Fahrstrasse 17, Erlangen, 91054, Germany

Introduction: ATP-binding cassette (ABC) transporters are involved in energy-dependent transport of substrates across biological membranes. We hypothesized that their expression is altered during heart failure suggesting a (patho-) physiological role.

Methods and results: Changes in the expression profile of all 48 human ABC transporters were investigated systematically in left ventricular tissue samples from 18 explanted failing hearts (NYHA III-IV) and 11 non-failing (NF) donor hearts. We identified multiple alterations in ABC transporter expression. These include a loss of CFTR (ABCC7) chloride channels and a changed expression of SUR1/SUR2 (ABCC8/ABCC9) isoforms, which most likely contribute to impaired channel conductance and increased risk of cardiac arrhythmia. Of note, BCRP, an efflux pump for xenobiotics/drugs, was expressed at much higher levels in failing hearts compared to non-failing control samples. BCRP was found in cardiac capillary endothelial cells and the sarcolemma of cardiomyocytes. ABCG2 was found in cardiac capillary endothelial cells and cardiomyocytes. Experiments in cells stably transfected with human ABCG2 revealed that the PPAR-□ agonist rosiglitazone was transported by ABCG2 but also inhibited the export of the prototypical ABCG2 substrate pheophorbide A (IC50 25 µM). Furthermore, the antiarrhythmic drug propafenone significantly interacts with BCRP (IC50 262 µM). In contrast, aldosterone and the commonly prescribed cardiovascular drugs propranolol, metoprolol, bisoprolol and digoxin were excluded as BCRP substrates.

Conclusion: The results suggest that altered ABC transporter expression in failing hearts might contribute to impaired channel conductance or might affect the cardiac disposition of drugs.