S1-14

肝臓におけるPhase-3 解毒：1次性能動輸送による低分子薬物から小ペプチドの胆汁排泄機構

○杉山雄一¹ 山田禎¹ 新沼佳世子¹ 申豪徹¹ 樋坂章博²
山崎雅代³ 加藤将夫¹ 寺崎哲也¹ 鈴木洋史¹

1)東京大(薬) 2)萬有製薬・つくば研究所 3)東邦大(薬)

Phase-3 Detoxification in the Liver: Biliary Excretion of small molecules and peptides by primary active transport mechanisms.

Yuichi SUGIYAMA, Tadashi YAMADA, Kayoko NIINUMA,
Ho-Chul SHIN, Akihiro HISAKA, Masayo YAMAZAKI,
Yukio KATO, Tetsuya TERASAKI, Hiroshi SUZUKI
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

【目的】 近年、胆管側膜を介した種々の物質(抗癌剤など)、各種抱合体やcysteinyl leukotriene類などの有機アニオン系化合物、および胆汁酸の胆汁排泄が一次性能動輸送機構によることを支持する多くの実験的証拠が提出され始めている。肝臓におけるこれら一次性能動輸送は、Phase-3 解毒¹⁾として位置づけられるものであり注目されている。また最近、当研究室では小ペプチド性化合物もこうした輸送ルートに乗ることを見出している。この分野の研究が飛躍的な発展をみせた理由として、(1)単離胆管側膜小胞(CMV)を用いた実験技術の進歩、(2)遺伝的にこれらリガンドの胆汁排泄能を欠損している変異ラット(EHBR)が発見されたことの2点が挙げられる。今回、有機アニオン類に対する輸送、生理的条件下で胆管側膜上に存在することが知られるP-糖蛋白が関与する輸送、さらには小ペプチド性化合物の輸送について、現在までに得られた知見を整理するとともに、排泄機構における多様性の生理的意義について考察したい。

【方法】 (1) In vivo実験： 種々の化合物を用いて、正常ラット(SD)および変異ラット(EHBR)の大腿静脈より定速静注し血漿中濃度ならびに胆汁排泄の時間推移と定常状態における肝臓中濃度を測定し、肝臓中濃度を基準とした胆汁排泄クリアランス(CL_h, bile)を測定した。(2) 肝灌流実験： 目的に応じて、single-passの持続灌流後の定常状態解析およびmultiple indicator dilution method(MID)を用いて、肝取り込み過程、排泄過程を分離評価する

ことを試みた。(3) In vitro実験: ラット肝臓より胆管側細胞膜ベシクル(CMV)を調製しATP(5 mM)およびATP-generating 系存在下での $[^3\text{H}]\text{BQ-123}$ の取り込みを急速濾過法により測定した。

【結果および考察】

(有機アニオンの胆汁排泄機構)

Glutathione抱合体としてS-(2,4-dinitrophenyl)-glutathione (DNP-SG)を用いてCMVへの取り込みを測定すると、顕著なATP-依存性、オーバーシュートが観察された。また、EHBRにおいてこのATP依存性取り込みは大きく低下した。同様の現象は、多くのglucuronidesにおいても観察されたが、sulfatesではATP-依存性、EHBRによる低下ともにみられなかった。さらに、in vivo系や肝灌流系においても、種々の有機アニオン類の胆汁排泄のEHBRにおいて顕著に減少することを証明した。これらの結果より、多くの有機アニオン類は、EHBRで欠損している1次性能動輸送担体、いわゆる multispecific organic anion transporter (MOAT)により胆汁排泄を受けることが示された。一方、in vivo系やCMVを用いたin vitro系での有機アニオン類相互間の阻害実験により、有機アニオン類に対する輸送系に多様性の存在することが示唆されている。

(ペプチド性化合物の胆汁排泄機構)

BQ-123はEndothelin receptorのうち ET_A に対して選択的に拮抗作用を有する5つのアミノ酸からなる環状ペプチドである。本化合物は分子内にアスパラギン酸を有することから、生理的条件下では有機アニオンとして存在する。また、somatostatinのanalogueであるoctreotideは8個のアミノ酸からなるカチオン性の環状ペプチドである。これらペプチドは、効率よく未変化体として胆汁に排泄される。これらの胆汁排泄を解析したところ、以下に示すように異なる機構で排泄されることが明かとなった。(1) EHBRを用いた解析: In vivo定常状態下での肝臓中濃度を基準とした胆汁排泄クリアランス(CL_h, bile)を算出したところ、BQ-123はEHBRで低下したものの、octreotideでは変化しなかった。これらの結果からanionic peptideであるBQ-123はEHBRで欠損したMOATによって胆汁排泄を受け、cationic peptideであるoctreotideは別の輸送系で排泄されることが示唆された。(2) CMVを用いたin vitro系での解析: このことを直接証明する目的で、CMVへの両ペプチドの取り込みのATP依存性を観察したところ、ATP非存在下に比べてATP存在下における取り込みは有意に高く、またATP存在下においての

みオーバーシュート現象が確認された。さらに、ATPase阻害剤である Vanadate によって ATP 依存的な取り込みは大きく低下したことから、ATP を輸送駆動力とする一次性能動輸送であることが裏付けられた。また、EHBR から調製した膜においては、BQ-123 の ATP 依存性取り込みが大きく低下したが (図 1)、octreotide の取り込みは変化しなかった。また、有機アニオンである DBSP やいくつかの BQ-123 に構造の類似したペプチドによって、BQ-123 の取り込みはコントロールの約 1/4 にまで低下した。このことは、BQ-123 が主に MOAT によって輸送されているという結論と一致する。これら結果より、同じ環状ペプチドであってもその構造もしくは charge によって、認識される輸送担体は全く異なることが証明された。

(胆汁排泄における多様性が持つ生理的意義)

異物解毒という生物が生きていくための重要な機能に関わる蛋白質 (酵素、輸送担体) には必ず多様性の存在することが明かにされてきた。また、薬物代謝酵素、一部の輸送担体においては遺伝的多型の存在も知られている。こうした異物解毒機構の持つ多様性・遺伝的多型の存在は、適応進化の過程において生物が種々の異物に対して獲得してきた生体防御機能を反映しているものと考えられる。今後、これら輸送機構の実体を生化学的、分子生物学的手法を用いて明かにし、各蛋白、遺伝子の構造解明を行うことが必須である。

Fig.1: Comparison of the ATP-dependent BQ-123 uptake by CMV between normal rats and EHBR. The data in the inset indicate the ATP-dependent uptake of taurocholate (TCA), being no difference between the two rats

[Abstract] Recently, for many endogenous and exogenous compounds(including drugs), it has been reported that carrier-mediated primary active transport contributes to biliary excretion. Compounds known to be excreted by this mechanism are anticancer drugs, endogenous bile acids and organic anions including glutathione and glucuronic anid conjugates. Primary active excretion into bile means the positive removal of xenobiotics from the body, and the elimination process is now designated as "Phase III" (T.Ishikawa, Trends Biochem.Sci., 17, 1992) in the detoxification mechanisms for xenobiotics in addition to Phase I by P-450 and Phase II by conjugation. There exist multiplicities in the biliary excretion mechanisms. Clarification of these multiplicities in transport is necessary not just from a biochemical point of view, but for our understanding of the physiological adaptability of the living body in terms of the removal (detoxification) of xenobiotics. This may provide a lot of important informations for studying the pharmacokinetics of new drugs. In this presentation, I would like to summarize the latest experimental results on carrier-mediated biliary excretion systems and the multiplicities in the biliary excretion of xenobiotics, including small peptides.

[REFERENCES]

- (1) T.Ishikawa: The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. Trends Biochem.Sci., 17: 463-468 (1992).
- (2) H.C.Shin, Y.Kato, T.Yamada, A.Hisaka and Y.Sugiyama: Hepatobiliary transport mechanism for the cyclopeptide endothelin antagonist, BQ-123. Am.J. Physiol., submitted.
- (3) T.Watanabe, S.Miyauchi, Y.Sawada, T.Iga, M.Hanano, M.Inaba and Y.Sugiyama: Kinetic analysis of hepatobiliary transport of vincristine in perfused rat liver: Possible roles of P-glycoprotein in biliary excretion of vincristine. J.Hepatol., 16: 77-88 (1992).
- (4) K.Sathirakul, H.Suzuki, K.Yasuda, M.Hanano, O.Tagaya, T.Horie and Y.Sugiyama: Kinetic analysis of hepatobiliary transport of organic anions in Eisai hyperbilirubinemic mutant rats. J.Pharmacol. Exp.Therap. 265: 1301-1312 (1993).
- (5) K.Sathirakul, H.Suzuki, T.Yamada, M.Hanano and Y.Sugiyama: Multiple transport systems for organic anions across the bile canalicular membrane. J.Pharmacol. Exp.Therap. 268: 65-73 (1993).
- (6) H.Shimamura, H.Suzuki, M.Hanano, A.Suzuki, O.Tagaya, T.Horie and Y.Sugiyama: Multiple systems for the biliary excretion of organic anions in rats: Liquiritigenin conjugates as model compounds. J.Pharmacol.Exp.Therap., 271: 370-378 (1994).
- (7) O.Takenaka, T.Horie, H.Suzuki and Y.Sugiyama: The biliary excretion systems for conjugative metabolites: Comparison of glucuronide and sulfate in Eisai hyperbilirubinemic rats(EHBR). J.Pharmacol.Exp.Ther., in press.
- (8) O.Takenaka, T.Horie, H.Suzuki, K.Kobayashi and Y.Sugiyama: Kinetic analysis of hepatobiliary transport for conjugative metabolites in the perfused liver of mutant rats (EHBR) with hereditary conjugative hyperbilirubinemia. Pharm.Res., in press.
- (9) T.Watanabe, H.Suzuki, Y.Sawada, M.Naito, T.Tsuruo, M.Inaba, M.Hanano and Y.Sugiyama: Induction of hepatic P-glycoprotein enhances biliary excretion of vincristine in rats. J.Hepatol., in press.