18S3-03

トログリタゾンによる肝障害の機序解明への薬物動態学的アプローチ
-UGTの多型は肝障害の要因となり得るか？-○吉ヶ江泰志¹⁾、渡辺稔之²⁾、小山久美子¹⁾、高崎渉²⁾、真鍋淳²⁾、池田敏彦¹⁾

1) 三共(株)・薬剤動態研究所、2) 三共(株)・安全性研究所

A metabolism-based approach to elucidating the mechanism of
liver dysfunction induced by troglitazone
-Is the liver dysfunction in patients treated with troglitazone related to
polymorphism of UGTs?-Yasushi YOSHIGAE¹, Toshiyuki WATANABE², Kumiko KOYAMA¹, Wataru TAKASAKI¹,
Sunao MANABE² and Toshihiko IKEDA¹1, Pharmacokinetics and Drug Delivery Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd., 2-58,
Hiromachi 1-chome, Shinagawa-ku, Tokyo 140-8710, Japan2, Medicinal Safety Research Laboratories, Sankyo, Co., Ltd., 717 Horikoshi, Fukuroi,
Shizuoka 437-0065, Japan

【目的】Thiazolizinedione 系経口抗糖尿病薬トログリタゾン (以下 TG) は 1997 年に発売後、希におこる重篤な肝障害のため、2000 年 3 月に販売中止に至った。これまで本剤による肝障害の機序解明を目的として、病態モデル動物を用いた安全性試験や肝細胞障害性試験、および TG 服用患者の遺伝子解析等が行われてきたが、未だ究明には至っていない。

一方、市販後の調査において、肝機能異常が検出され始めるのは服用開始から 2 ヶ月以降と発症が遅いこと、また、アレルギー反応も見られないことなどから、特異体質性の薬物代謝異常が肝障害の原因である可能性が指摘されている。ヒトにおける TG の代謝経路としては硫酸抱合やキノン体への酸化に加え、グルクロン酸抱合がある。グルクロン酸抱合酵素 (UGT) については、古くからビリルビングルクロン酸抱合酵素 (UGT1A1) の多型が知られており、UGT1A1 活性の欠損あるいは低下が Crigler-Najjar 症候群や Gilbert 症候群といった高ビリルビン血症の原因となっている。

我々は、UGT の欠損による TG 代謝プロファイルの変化や、高ビリルビン血症の増悪が肝障害の原因となり得る可能性を検討する目的で、遺伝的に UGT1 ファミリーを欠損した Gunn ラットを用いた安全性試験を行なった。また、TG 代謝に関わるラットおよびヒト UGT 分子種について *in vitro* で検討した。さらに、肝障害患者では血中ビリルビン濃度が増大することから、ビリルビン代謝に及ぼす TG の影響についても併せ検討した。

【方法】Gunn ラットにおける安全性試験：Gunn ラットおよびその親系統である Wistar ラットに、TG を 100 および 400 mg/kg で 3 ヶ月間経口投与し、血漿中 TG、硫酸抱合体およびグルクロン酸

抱合体濃度、および各種血液生化学値を測定した。

In vitro TG グルクロン酸抱合活性：5 mM uridine 5'-diphosphoglucuronic acid 存在下、非標識あるいは ¹⁴C 標識 TG を肝ミクロソームあるいは UGT 発現ミクロソームとインキュベーションした。生成する TG グルクロン酸抱合体は HPLC 法あるいは TLC 法にて定量した。TG 代謝に関わる UGT 分子種同定のための阻害実験には、UGT2 ファミリーの基質であるテストステロン、アンドロステロン、メントールを阻害剤として用いた。阻害様式は Dixon プロットにて解析し、K_i 値を算出した。

In vitro ビリルビングルクロン酸抱合活性：Heirwegh¹⁾らの方法にしたがって測定した。

【結果および考察】Gunn ラットにおける安全性試験：TG 投与後の TK 測定の結果、UGT1 ファミリーを欠損する Gunn ラットにおいても血漿中にグルクロン酸抱合体が検出された。また、雄の場合 Gunn ラットおよび Wistar ラットのいずれにおいても硫酸抱合体、TG、グルクロン酸抱合体の順に血漿中濃度が高く、代謝プロファイルに大きな系統差は認められなかった。いずれの血液生化学検査および病理組織学的検査においても、薬剤投与に起因した肝障害の徴候は認められなかった。また、Gunn ラットにおいて TG 投与により高ビリルビン血症が増悪することはなかった。

TG の代謝に関与するラット UGT：Gunn ラット肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝反応を検討したところ、Gunn ラットにおいても TG はグルクロン酸抱合されることが明らかとなった。この結果は *in vivo* 安全性試験の結果を反映したものであり、ラットにおいて TG は UGT2 ファミリーによって代謝されることが明らかとなった。また、阻害実験の結果、TG のグルクロン酸抱合反応は

UGT2B2 の基質であるアンドロステロンによって競合的に阻害され、 K_i 値は $9 \mu\text{M}$ であった。他の阻害剤では K_i 値が高く、阻害も非競合的であることから、TG のグルクロン酸抱合反応には UGT2B2 が寄与する可能性が強く示唆された。

TG の代謝に関与するヒト UGT: ヒト UGT1 発現系を用いて TG のグルクロン酸抱合反応を検討したところ、Fig.1 に示すように、いずれの発現系においても活性が見られたが、その活性は低かった。次に、ヒト肝ミクロソームの活性に対する UGT1A1 の寄与率について、UGT1A1 の特異的な基質であるビリルビンのグルクロン酸抱合活性を指標として検討した。その結果、Table 1 に示すように、ヒト肝ミクロソームの活性に対する UGT1A1 の寄与率は約 30% と予測された。また、阻害実験の結果、 K_i 値は比較的高いものの、UGT2 ファミリーの基質であるテストステロンおよびアンドロステロンは TG のグルクロン酸抱合反応を競合的に阻害することが明らかとなった。また、UGT2 発現系において弱いながら活性がみられた。このように、TG のグルクロン酸抱合反応は UGT1A1 が約 30% 程度、その他は UGT1A1 以外の UGT1 分子種あるいは UGT2 分子種が関与することが示唆された。したがって、遺伝子多型によって UGT1A1 の活性が低下した患者においても、代謝プロファイルが大きく変化する可能性は低いと考えられた。

***In vitro* ビリルビングルクロン酸抱合に及ぼす TG の影響:** ヒト UGT1A1 の発現系あるいはヒト肝ミクロソームを用いて検討したところ、いずれの系においても、TG は $100 \mu\text{M}$ までの濃度においてビリルビングルクロン酸抱合反応を阻害しなかった。したがって、TG 投与による肝障害患者において血中ビリルビン濃度が高値を示すのは、ビリルビンの抱合が TG により阻害されたためではなく、肝障害が起こった結果であると考えられた。

【結論】 UGT1 ファミリーを欠損した Gunn ラットと同様、UGT1A1 活性が低下した患者においても TG の代謝プロファイルが変動する可能性は極めて低いことが示された。また、Gunn ラットを用いた安全性試験において肝障害の徴候は全く認められないことから、UGT の多型は肝障害の原因となり得ないと考えられた。

Fig. 1 Troglitazone UGT activity in UGT expression system.

Table 1. Estimation of UGT1A1 contribution to troglitazone glucuronidation.

	Activity (pmol/min/mg protein)	
	Troglitazone	Bilirubin
HLM	32.9 ± 1.9	77.6 ± 2.7
UGT1A1	3.4 ± 1.0	26.4 ± 0.4
UGT1A1/HLM	10.3%	34.0%
Contribution of UGT1A1	30.3 %	

HLM: human liver microsomes.

【Abstract】 We investigated whether or not the liver dysfunction in patients treated with troglitazone (TG) is related to polymorphism in UDP-glucuronosyltransferases (UGTs), which are partially responsible for TG metabolism. In the toxicological study of TG using Gunn rats, which are hereditarily deficient in the UGT1 family, the metabolic profile of TG in Gunn rats was very similar to that of Wistar rats, the parent strain of Gunn rats, and no sign of the liver dysfunction was observed in both rats. UGTs involved in TG glucuronidation in rats and humans have been characterized. The experiments using liver microsomes of Gunn rats suggested that the enzyme responsible for glucuronidation in rats was UGT2B2, an androsterone UGT, by inhibition studies. In humans, contribution of UGT1A1 was estimated to be about 30% of the total TG glucuronidation by UGTs, using human liver microsomes and recombinant UGTs. Other UGT1 and UGT2 enzymes seem to be responsible for the remaining 70% of TG glucuronidation. The multiplicity of UGTs involved in TG glucuronidation in humans may even allow patients lacking bilirubin UGT (UGT1A1) activity to metabolize TG to the glucuronide. These observations suggest that the polymorphism of UGT is not the reason for the liver dysfunction induced by the TG treatment.

【References】 1) Heirwegh, K.P.M., Van de Vijver, M. and Fevery, J. (1972): Biochem. J. **129**, 605-618.