

| | |
|----------|--|
| 氏名 | うえ お はる まさ 上 尾 治 正 |
| 学位(専攻分野) | 博 士 (薬 学) |
| 学位記番号 | 薬 博 第 627 号 |
| 学位授与の日付 | 平 成 19 年 3 月 23 日 |
| 学位授与の要件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当 |
| 研究科・専攻 | 薬 学 研 究 科 医 療 薬 科 学 専 攻 |
| 学位論文題目 | ヒト腎有機アニオントランスポータ hOAT1及びhOAT3の輸送特性及び活性調節に関する研究 |
| 論文調査委員 | (主 査) 教 授 乾 賢 一 教 授 高 倉 喜 信 教 授 橋 田 充 |

論 文 内 容 の 要 旨

腎臓からの薬物排泄において、尿細管分泌は糸球体濾過と並び重要な役割を担っており、血管側側底膜を介した取り込みと管腔側刷子縁膜を介した排出の二段階からなる。腎近位尿細管上皮細胞に存在する有機アニオン輸送系は抗ウイルス薬、利尿薬、非ステロイド性抗炎症薬等の多様なアニオン性薬物の尿細管分泌に関与している。尿細管側底膜における有機アニオン取り込みを媒介する分子実体としてヒト有機アニオントランスポータ hOAT1 及び hOAT3 がクローニングされているが、著者らの研究室では腎皮質におけるこれらトランスポータの mRNA 発現量が他の有機アニオントランスポータ群と比べて高いことから、両トランスポータが側底膜での有機アニオン取り込みにおいて主要な役割を果たしていることを報告している。これまで尿細管側底膜における有機アニオン輸送は、種々の *in vitro* 及び *in vivo* 実験系により代表的な有機アニオンであるパラアミノ馬尿酸 (PAH) を基質として用いて解析されているが、PAH は hOAT1 における代表的基質であり、尿細管側底膜での有機アニオン輸送における hOAT1 及び hOAT3 の個別の役割については不明な点が多い。従って、種々アニオン性薬物の尿細管分泌機構を解明するためには hOAT1 及び hOAT3 の機能特性について詳細に解析し、各トランスポータが尿細管側底膜において果たす役割を個別に解明する必要がある。そこで著者は、hOAT1 及び hOAT3 の基質認識性及び活性調節について検討し、以下の新知見を得た。

I. hOAT1 及び hOAT3 の基質認識性の解析

これまで、hOAT1 及び hOAT3 を介した有機アニオン輸送に対する阻害効果から、種々薬物の両トランスポータに対する親和性が算出されている。しかしながら、著者らの研究室ではセファゾリンの hOAT1 及び hOAT3 に対する IC₅₀ 値が同程度であるにも拘らず hOAT3 のみがセファゾリンを輸送することを報告しており、トランスポータの薬物に対する認識性を明らかにするためには阻害効果のみではなく輸送活性についても検討する必要がある。そこで hOAT1 及び hOAT3 の基質認識性について、輸送活性までを含めた解析を行った。

まず hOAT1 あるいは hOAT3 安定発現 HEK293 細胞 (HEK-hOAT1 及び HEK-hOAT3) を作成し、対照はベクターのみを導入した細胞とした。これら発現細胞による種々化合物の取り込みについて検討したところ、HEK-hOAT1 による取り込みは PAH, カプトプリル, オクラトキシン A 及びロイコボリンにおいて高く、HEK-hOAT3 による取り込みはエストロン硫酸, メトトレキサート, シメチジン及びデヒドロエピアンドロステロン硫酸において高かった。従って、hOAT1 及び hOAT3 による認識性は基質により異なることが示された。

hOAT1 及び hOAT3 の基質認識性についてさらに解析するため、HEK-hOAT1 及び HEK-hOAT3 による有機アニオン取り込みに対する種々セフェム系抗生剤の阻害効果について検討したところ、両発現細胞において顕著な差は認められなかった。次に、これら発現細胞による種々セフェム系抗生剤の取り込みについて検討したところ、セファロリジン, セフジニル及びセフォチアムの取り込みは HEK-hOAT3 において対照と比較して 35~50 倍であった。一方、HEK-hOAT1 への取り込みは、対照と比較して 2 倍以内であった。さらに今回検討した全てのセフェム系抗生剤の取り込みは HEK-hOAT1

よりも HEK-hOAT3 において高かった。

以上の結果から、hOAT1 及び hOAT3 による認識性は基質により異なること、セフェム系抗生剤において阻害効果より算出した親和性と輸送活性は対応せず、これら抗生剤の輸送活性は hOAT1 よりも hOAT3 において高いことが示された。また、尿細管側底膜での有機アニオン輸送における hOAT1 及び hOAT3 の関与は基質に依存することが示唆された。

II. hOAT1 及び hOAT3 の活性調節の解析

Cl⁻ は血中において最も多量に存在する無機アニオンであり、細胞容積の調節、細胞内 pH の調節及び血中浸透圧の維持等の種々生理過程に関与している。著者らの研究室では以前、ラット腎側底膜小胞による有機アニオン取り込みを種々アニオン共存下において検討し、Cl⁻ 共存下において最も高い取り込み活性が認められることを見出した。従って、Cl⁻ は尿細管側底膜での有機アニオン輸送において重要な役割を果たしていることが示唆された。しかしながら、この現象に関する分子レベルでの検討は皆無に等しく、Cl⁻ が尿細管側底膜の主要な有機アニオントランスポーターである hOAT1 及び hOAT3 に及ぼす影響は不明である。そこで、hOAT1 及び hOAT3 の活性調節因子として Cl⁻ に着目し、両トランスポーターを介した種々化合物の輸送に及ぼす Cl⁻ の影響について解析した。

取り込み実験に用いる緩衝液中の Cl⁻ を種々アニオンに置換することによって、Cl⁻ が hOAT1 及び hOAT3 の輸送活性に及ぼす影響について検討した。Cl⁻ あるいはグルコン酸共存下において HEK-hOAT1 及び HEK-hOAT3 による種々化合物の取り込み活性を評価したところ、これら化合物の取り込みはグルコン酸共存下よりも Cl⁻ 共存下において高かった。従って、Cl⁻ の hOAT1 及び hOAT3 に対する影響は基質に非依存的であり、Cl⁻ は両トランスポーターの輸送活性を上昇させることが明らかとなった。

Cl⁻ による hOAT1 及び hOAT3 に対する影響についてさらに詳細に解析するために、hOAT1 及び hOAT3 の代表的基質である PAH 及びエストロン硫酸を用いて、速度論的解析を行い、グルコン酸から Cl⁻ への置換による速度論的パラメータの変動について検討した。グルコン酸を Cl⁻ へ置換することによって、HEK-hOAT1 による PAH 取り込みにおいては V_{max} 値のみが 3 倍まで増加し、HEK-hOAT3 によるエストロン硫酸取り込みにおいては K_m 値のみが 1/3 まで減少した。従って、Cl⁻ が輸送の速度論的パラメータに及ぼす影響は hOAT1 及び hOAT3 において異なることが示された。

以上の結果から、尿細管側底膜での有機アニオン輸送に対する Cl⁻ の関与が分子レベルにおいても示された。さらに、Cl⁻ は hOAT1 及び hOAT3 の輸送活性を上昇させるものの、その活性調節機構は異なり、hOAT1 においては基質の trans-location 過程に、hOAT3 においては基質の認識過程に関与することが推察された。

以上、著者は hOAT1 及び hOAT3 による認識性が基質に依存すること、さらに Cl⁻ による両トランスポーターの活性調節機構が異なることを示した。本研究成果は、尿細管側底膜での有機アニオン輸送系における hOAT1 及び hOAT3 の役割を個別に明らかにし、アニオン性薬物の尿細管分泌機構の解明に貢献するものであると考える。

論文審査の結果の要旨

腎臓は体内からの薬物排泄を司る主要な臓器である。ヒト有機アニオントランスポーター hOAT1 及び hOAT3 は、尿細管側底膜の有機アニオン輸送において主要な役割を果たすと考えられている。しかし hOAT1 及び hOAT3 の個別の役割については不明な点が多い。そこで申請者は、各トランスポーターの機能特性について明らかにするために、hOAT1 及び hOAT3 の基質認識性及び活性調節について比較解析し、以下の新知見を得た。

hOAT1 及び hOAT3 の基質認識特性の差異について、hOAT1 あるいは hOAT3 安定発現 HEK293 細胞 (HEK-hOAT1 及び HEK-hOAT3) を作成し検討した。HEK-hOAT1 による取り込みはパラアミノ馬尿酸 (PAH)、カプトプリル、オクラトキシン A 及びロイコポリンにおいて高く、一方、HEK-hOAT3 による取り込みはエストロン硫酸、メトトレキサート、シメチジン及びデヒドロエピアンドロステロン硫酸において高かった。さらに種々セフェム系抗生剤の取り込みについて検討を加えたところ、検討した全てのセフェム系抗生剤の取り込みは HEK-hOAT1 よりも HEK-hOAT3 において高かった。しかし hOAT1 及び hOAT3 に対する種々セフェム系抗生剤の阻害効果には顕著な差は認められなかった。以上の結果から、hOAT1 及び hOAT3 による認識性は基質によって異なること、セフェム系抗生剤の阻害効果と輸送活性との間には相関関係が認められないこと、これら抗生剤の輸送活性は hOAT1 よりも hOAT3 において高いことが明ら

かとなった。

次に hOAT1 及び hOAT3 の活性調節機構について検討した。これまでラット腎側底膜小胞を用いた検討において、Cl⁻ は尿細管側底膜における有機アニオン輸送に対して調節因子として働くことが知られていた。しかしながら、この活性調節に関する分子レベルでの情報は不明であった。そこで、hOAT1 及び hOAT3 の活性調節因子として Cl⁻ に着目し、両トランスポータを介した種々化合物の輸送に及ぼす Cl⁻ の影響について解析した。バッファー中の Cl⁻ をグルコン酸に置換することによる、HEK-hOAT1 及び HEK-hOAT3 の取り込み活性への影響について評価したところ、検討した化合物の取り込みはすべてグルコン酸共存下よりも Cl⁻ 共存下において高かった。さらに hOAT1 及び hOAT3 の代表的基質である PAH 及びエストロン硫酸を用いて速度論的解析を行った。グルコン酸を Cl⁻ へ置換することによって、HEK-hOAT1 による PAH 取り込みの V_{max} 値のみが 3 倍まで増加し、一方 HEK-hOAT3 によるエストロン硫酸取り込みにおいては K_m 値が 1/3 まで減少した。従って、Cl⁻ は hOAT1 及び hOAT3 の輸送活性を上昇させるものの、その活性調節機構は異なり、hOAT1 においては基質の translocation 過程に、一方 hOAT3 においては基質の認識過程に関与することが示唆された。

以上の研究は hOAT1 及び hOAT3 による基質認識特性並びに活性調節機構が異なることを示した。本研究成果は、尿細管側底膜の有機アニオン輸送系における hOAT1 及び hOAT3 の役割を個別に明らかにし、アニオン性薬物の尿細管分泌機構の解明に貢献するものであり、薬物動態学の発展に寄与するところ大である。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成19年2月20日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。