

氏名	たけうちあやこ 竹内綾子
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第529号
学位授与の日付	平成15年3月24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	腎局在性有機アニオントランスポータ OAT-K1 及び OAT-K2 の薬物動態学的役割に関する研究
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

腎尿細管上皮細胞に発現する薬物トランスポータ群は、生体異物や代謝老廃物の尿細管分泌を媒介しており、生体防御のための重要な役割を担っている。近年、トランスポータの遺伝子クローニングが進展し、複数種のトランスポータによる薬物尿細管輸送の機序が分子レベルで解明されつつある。著者らの研究室では腎臓特異的、特に近位尿細管刷子縁膜に発現するラット有機アニオントランスポータ OAT-K1 及び OAT-K2 の単離に成功し、構造・機能特性に関する研究を行ってきた。しかし、OAT-K1 及び OAT-K2 が媒介する薬物輸送の方向性を含めた機能特性の詳細、並びに薬物腎排泄における寄与は未解明である。また、尿細管刷子縁膜における両トランスポータの生理的・薬物動態学的役割には不明の点が多い。そこで著者は、OAT-K1 及び OAT-K2 の生理的・薬物動態学的役割の解明を目的として、両トランスポータの輸送特性と病態時における機能的・分子の変動に関する詳細な解析を行い以下の新知見を得た。

I. 腎局在性有機アニオントランスポータ OAT-K1 及び OAT-K2 の薬物排出特性

MDCK を宿主とする OAT-K1 または OAT-K2 安定発現細胞 (MDCK-OAT-K1 または MDCK-OAT-K2) を用い、両トランスポータの薬物排出特性を評価した。その結果、対照と比較して OAT-K1 発現細胞において、腎指向型アニオン性抗癌剤であるメトトレキサート取り込みの顕著な上昇並びに速やかな排出活性が認められた。同様に、OAT-K2 を介する胆汁酸の一種であるタウロコール酸の取り込み及び排出は、著しく増大していた。また、両トランスポータ共通の輸送基質であるメトトレキサートの細胞内からの排出は、フォルリン酸をはじめとする種々葉酸類似化合物を細胞外に添加した場合に顕著に促進された。以上の結果から、OAT-K1 及び OAT-K2 は基質の細胞内への取り込みのみならず、強い排出活性を有するトランスポータであることが明らかとなった。また、両トランスポータが細胞内メトトレキサートと細胞外の葉酸類似化合物との交換輸送、すなわち尿細管上皮細胞内に蓄積したメトトレキサートと尿細管管腔中に存在するフォルリン酸などの構造類似化合物との交換輸送を媒介することが示唆された。

II. OAT-K1 及び OAT-K2 のメトトレキサート腎排泄における寄与の解明

OAT-K1 及び OAT-K2 のメトトレキサート尿細管分泌、特にメトトレキサート・フォルリン酸救援療法時における薬物動態学的・病態生理学的役割について明らかにするために、腎不全モデルとして 5/6 腎摘出ラットを選択し、以下の解析を行った。腎組織の病理学的解析並びに各種生化学的検査値から、5/6 腎摘出による組織学的・機能的腎不全の進行を確認した。OAT-K1 及び OAT-K2 の mRNA 発現量を RNase protection assay 法を用いて評価した結果、いずれの mRNA 発現量も 5/6 腎摘出により顕著に低下することが判明した。一方、尿細管刷子縁膜に局在する他のトランスポータ mRNA 発現に変化は認められなかった。また、5/6 腎摘出ラットにおいてメトトレキサート血中濃度の上昇並びに腎クリアランスの低下が観察され、OAT-K1 及び OAT-K2 mRNA 発現量の低下と対応する結果を得た。さらに、模擬処置ラットではフォルリン酸投与によるメトトレキサート血中濃度の低下並びに腎クリアランスの増大効果、すなわちメトトレキサート・フォルリン酸救援療法が再現されたのに対し、5/6 腎摘出ラットではこれらの効果は消失していた。従って、OAT-K1 及び OAT

-K2はメトトレキサートの腎排泄を担う主要なトランスポータであること、メトトレキサート・フォリン酸救援療法時における標的因子として機能することが示唆された。

Ⅲ. 尿細管刷子縁膜における OAT-K1 及び OAT-K2 の多選択的基質認識特性

著者らの研究室では、OAT-K1が LLC-PK₁ 安定発現細胞 (LLC-OAT-K1) においてメトトレキサートの側底膜輸送を媒介すること、一方 MDCK 細胞を宿主とした場合には、ラット *in vivo* と同様に翻訳後の小分子化修飾を受けて頂側膜側で機能することを報告している。そこで、小分子化による OAT-K1 の輸送特性の変化、並びに尿細管刷子縁膜における OAT-K1 及び OAT-K2 の生理的役割の解明を目的として、MDCK 安定発現細胞を用いた解析を行った。間接蛍光抗体法によって、OAT-K1 及び OAT-K2 が MDCK 安定発現細胞の頂側膜に局在することを確認した。種々標識化合物を用いた輸送実験の結果、OAT-K1 及び OAT-K2 はメトトレキサート、抱合ステロイド、タウロコール酸及び甲状腺ホルモンなど構造的に多様な化合物を輸送基質として認識すること、これらの化合物に対して両トランスポータが類似の親和性を示すことが判明した。LLC-OAT-K1 はタウロコール酸を輸送しないことから、MDCK 安定発現細胞では、小分子化により OAT-K1 の基質認識特性が変化することが示された。また、OAT-K1 及び OAT-K2 を介する輸送基質間での相互阻害の程度は弱く、両トランスポータ分子内に複数の基質認識部位が存在することが示唆された。従って、OAT-K1 及び OAT-K2 は尿細管刷子縁膜において、内因性物質共存の影響を受けずに薬物の効率的な尿細管分泌を媒介するトランスポータであることが推察された。

以上、著者は *in vitro* 並びに *in vivo* 実験系を用いた系統的な解析により、OAT-K1 及び OAT-K2 の生理的・薬物動態学的役割について新知見を得た。本研究成果は、異物や代謝老廃物の尿細管分泌という生体防御機構の分子機序を解明するうえで重要な基礎的情報を提供するとともに、異物解毒ネットワークの構成単位である薬物トランスポータ群の分子情報を考慮に入れた、合理的な薬物投与設計構築のための基盤となりうると考える。

論文審査の結果の要旨

腎尿細管上皮細胞の薬物トランスポータ群は、医薬品など異物の尿細管分泌を媒介し、生体防御のための重要な役割を果たしている。申請者らの研究室では、これまで腎近位尿細管刷子縁膜に局在するラット有機アニオントランスポータ OAT-K1 及び OAT-K2 の単離と構造・機能解析を進めてきたが、これらの機能特性については未だ不明の点が多い。申請者は、OAT-K1 及び OAT-K2 の生理的・薬物動態学的役割の解明を目的として、両トランスポータの輸送特性と病態時における機能的・分子の変動の解析を行い以下の新知見を得た。

MDCK 安定発現細胞を用いた解析によって、OAT-K1 及び OAT-K2 は基質の細胞内への取り込みのみならず、強い排出活性を有するトランスポータであること、細胞内に蓄積したメトトレキサートと細胞外の葉酸類似化合物の交換輸送を媒介することが明らかとなった。そこで、OAT-K1 及び OAT-K2 のメトトレキサート尿細管分泌、特にメトトレキサート・フォリン酸救援療法時における薬物動態学的・病態生理学的役割について明らかにするために、腎不全モデル 5/6 腎摘出ラットを作成し検討を行った。その結果、OAT-K1 及び OAT-K2 の mRNA 発現量は 5/6 腎摘出により顕著に低下することが判明した。また、5/6 腎摘出によるメトトレキサート血中濃度の上昇並びに腎クリアランスの低下は、OAT-K1 及び OAT-K2 mRNA 発現量の低下と対応するものであり、模擬処置ラットで認められたフォリン酸投与によるメトトレキサート血中濃度の低下並びに腎クリアランスの増大効果（救援効果）は、5/6 腎摘出ラットでは消失していた。以上より、OAT-K1 及び OAT-K2 はメトトレキサートの腎排泄を担う主要なトランスポータであると共に、メトトレキサート・フォリン酸救援療法時における標的因子として機能することが実証された。

OAT-K1 は、LLC-PK₁ 安定発現細胞において機能的に側底膜に発現すること、一方 MDCK 安定発現細胞では、ラット *in vivo* に対応した小分子化後の頂側膜側での発現や基質輸送活性を示すことから、翻訳後修飾による OAT-K1 の機能変化及び両トランスポータの生理的役割の解明を目的として、MDCK 安定発現細胞を用いた解析を行った。その結果、両トランスポータはメトトレキサート、抱合ステロイド、タウロコール酸及び甲状腺ホルモンなど構造的に多様な化合物を輸送基質として認識すること、これらに対し両トランスポータが類似の親和性を示すことが判明した。側底膜型 OAT-K1 はタウロコール酸を輸送しないことから、OAT-K1 の基質認識特性は小分子化後の頂側膜発現によって変化することが示唆

された。また、OAT-K1 及び OAT-K2 を介する輸送基質間での相互阻害の程度は弱く、両トランスポータ分子内に複数の基質認識部位が存在すること、すなわち両トランスポータは内因性物質共存の影響を受けずに効率的な薬物尿細管分泌を媒介するトランスポータであることが結論された。

以上、本研究は OAT-K1 及び OAT-K2 の生理的・薬物動態学的役割を明らかにしたものであり、尿細管における薬物分泌の分子機構、薬物トランスポータを中心とした異物解毒ネットワークの解明に貢献するところ大であり、医療薬剤学の発展に寄与するものとする。

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15年2月25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。

以上