

氏名	はぶやすし 土生康司
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第530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	腎尿細管の有機アニオン輸送活性とその変動に関する研究

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

腎臓の近位尿細管上皮細胞に局在する有機アニオン輸送系は、パラアミノ馬尿酸 (PAH) やメトトレキサートなど種々アニオン性薬物の尿中への分泌を媒介する。側底膜に存在するジカルボン酸と有機アニオンとの交換輸送系や、刷子縁膜に存在する電位依存性有機アニオン輸送系およびアニオン交換輸送系は、環境因子を利用して有機アニオンを方向選択的に輸送することが報告されている。尿細管上皮細胞を介した分泌は血管側側底膜および管腔側刷子縁膜の両膜を介した輸送の総和と考えられるが、有機アニオンの経細胞輸送に対する個々の膜輸送の役割について情報は不足していた。また、尿酸は有機アニオン輸送系の基質となる内因性物質であり、有機アニオン輸送活性は基質によって誘導されるとの報告もある。一方、高尿酸血症が進行した場合には腎障害を誘発するが、高尿酸血症時のアニオン性薬物の体内動態については不明である。そこで本研究では、有機アニオン輸送能を保持するフクロネズミ腎由来 OK 細胞を用い、側底膜と頂側膜における PAH 輸送特性の評価を試みるとともに、高尿酸血症モデルラットにおけるアニオン性薬物の尿細管分泌について検討し、以下の新知見を得た。

I. 培養腎上皮細胞 OK における有機アニオン輸送特性

細胞外 PAH $5\mu\text{M}$ における側底膜側から頂側膜側への輸送は、頂側膜側から側底膜側への輸送よりも大きく、分泌優位な方向選択性が認められた。あらかじめ細胞内外の薬物濃度を平衡状態にし、頂側膜側チャンバー、細胞内、側底膜側チャンバーからなる 3-コンパートメントモデルを仮定した線形速度論モデルに基づいて、各コンパートメント間の輸送活性を評価した。その結果、頂側膜を介した両方向の輸送クリアランスはほぼ同程度と推定された。一方側底膜側では、細胞内からの排出クリアランスはほぼゼロと推定されたのに対し、細胞内への取り込みクリアランスは顕著に大きく、側底膜と頂側膜における PAH 輸送特性に顕著な違いが認められた。細胞外 PAH を $50\mu\text{M}$ に上昇させたところ、輸送の方向性が減少するとともに各膜輸送クリアランスは半分程度に低下し、この濃度領域において飽和性が認められた。また、細胞内 α -ケトグルタル酸濃度は約 1.4mM と高く、細胞内外の α -ケトグルタル酸濃度勾配が側底膜における PAH 輸送の方向性を規定する要因であることが示された。

さらに、速度論的に両方向性を示した頂側膜の PAH 輸送特性について詳細な検討を行った。電位依存性有機アニオン輸送系を阻害しアニオン交換輸送系には影響を与えないジエチルピロカーボネートの前処理や細胞外高 K^+ の条件下、細胞内から頂側膜側への PAH 排出は減少した。一方、細胞外 pH や Cl^- の影響は認められなかった。また、頂側膜側からの PAH 取り込みは種々アニオン性薬物およびジカルボン酸によって特異的に阻害された。従って、頂側膜の PAH 輸送は電位依存的な細胞内から排出方向への輸送系と、それとは別の取り込み方向に働く輸送系から成ることが示された。

II. 高尿酸血症モデルラット腎における有機アニオン輸送活性の変動

尿酸とその代謝阻害剤であるオキソ酸投与によって作製した高尿酸血症モデルラットでは、血中クレアチニン値や尿素窒素値が有意に上昇しており、腎機能の低下が認められた。また、腎切片への PAH やメトトレキサートの取り込みは有意

に減少しており、側底膜の有機アニオン輸送活性は低下していることが判明した。さらに、側底膜型有機アニオントランスポータ OAT1 や OAT3 発現量は有機カチオントランスポータ OCT2 発現量とともに顕著に減少していたが、OCT1 発現量に変動は認められなかった。また、高尿酸血症モデルラットにおいて、メトトレキサートの *in vivo* 腎クリアランスは顕著に低下したが、刷子縁膜のメトトレキサート輸送を媒介する腎局在性有機アニオントランスポータ OAT-K1 および OAT-K2 の発現量に変動は認められなかった。従って、高尿酸血症時におけるメトトレキサートの *in vivo* 腎クリアランスの低下には OAT1 と OAT3 の特異的な発現量減少が寄与するものと考えられた。

さらに、尿酸とオキソンの投与を中止することにより、高尿酸血症からの回復過程における有機アニオン輸送活性とトランスポータの発現量について検討した。その結果、高尿酸血症の速やかな回復とともに腎機能検査値の改善が認められた。一方、OAT1 と OAT3 発現量は OCT2 と同様に経日的に増加することが判明し、それに伴い側底膜の有機アニオン輸送活性の回復が認められた。従って、高尿酸血症時に OAT1 と OAT3 の発現は可逆的に制御されており、アニオン性薬物の腎排泄における変動因子となることが明らかとなった。

以上、著者は OK 細胞を用いて、側底膜と頂側膜の PAH 輸送特性が異なることを速度論的に評価するとともに、頂側膜の輸送特性を明らかにした。さらに、高尿酸血症の発症および回復過程において、有機アニオントランスポータの発現量変動を伴い、薬物の尿細管分泌能が可逆的に変化し得ることを明らかにした。本研究成果は、医薬品の開発や病態時における適正使用を推進する上で有用な基礎的知見になるものとする。

論文審査の結果の要旨

腎臓の近位尿細管上皮細胞に局在する有機アニオン輸送系は、種々アニオン性薬物の尿中への分泌を媒介することが知られている。尿細管上皮細胞を介した分泌は血管側側底膜および管腔側刷子縁膜の両膜を介した輸送の総和であるが、有機アニオンの経細胞輸送に対する個々の膜輸送の役割について未だ十分解明されていない。また、尿酸は有機アニオン輸送系の基質となる内因性物質であるが、高尿酸血症時のアニオン性薬物の体内動態についても不明の点が残されている。本論文は、有機アニオン輸送能を保持するフクロネズミ腎由来 OK 細胞を用い、側底膜と頂側膜における PAH 輸送特性を評価するとともに、高尿酸血症時におけるアニオン性薬物の尿細管分泌変動について明らかにしたものである。

OK 細胞におけるパラアミノ馬尿酸の輸送特性について検討したところ、頂側膜を介した両方向の輸送クリアランスはほぼ同程度であるが、側底膜側では細胞内からの排出クリアランスに比べ、細胞内への取り込みクリアランスは極めて大きな値を示した。従って、両膜の PAH 輸送特性は速度論的観点から顕著な違いのあることが判明した。さらに、頂側膜の PAH 輸送特性について検討したところ、ジエチルピロカーボネート前処理や細胞外高 K^+ 条件下、細胞内から頂側膜側へのパラアミノ馬尿酸の排出は減少したが、細胞外 pH や Cl^- の影響は認められなかった。一方、頂側膜側からのパラアミノ馬尿酸取り込みは種々アニオン性薬物によって特異的に阻害された。従って、頂側膜のパラアミノ馬尿酸輸送は電位依存的な細胞内から排出方向への輸送系と、それとは別の取り込み方向に働く輸送系から成ることを明らかにした。

次に、高尿酸血症モデルラットにおけるアニオン性薬物の尿細管分泌を検討したところ、腎機能の低下とともに腎切片へのパラアミノ馬尿酸やメトトレキサートの取り込み減少が観察された。さらに、側底膜型有機アニオントランスポータ OAT1 や OAT3 発現量は有機カチオントランスポータ OCT2 発現量とともに顕著に減少していたが、OCT1 発現量に変動は認められなかった。さらに、高尿酸血症からの回復過程において検討した結果、OAT1 と OAT3 発現量は OCT2 と同様に経日的に増加し、それに伴い側底膜の有機アニオン輸送活性の回復が認められた。従って、高尿酸血症時に OAT1 と OAT3 の発現は特異的かつ可逆的に制御されており、これらトランスポータの発現変動がアニオン性薬物の腎排泄における変動因子となることが結論された。

以上の研究成果は、腎尿細管の有機アニオン輸送活性とその変動因子について明らかにしたものであり、医薬品の開発や病態時における適正使用を推進する上で有益な知見であり、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する。

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。