

氏名	うわ い ゆう いち 上 井 優 一
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 501 号
学位授与の日付	平成 14 年 3 月 25 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	腎尿細管有機アニオントランスポータ rOAT1 の薬物動態学的意義に関する研究
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は、複数の有機アニオントランスポータからなる有機アニオン輸送系が局在し、多様なアニオン性薬物の能動的な尿細管分泌を媒介している。従って、腎尿細管有機アニオントランスポータ群の構造・機能解析は、医薬品の適正使用を実施する上で有用な情報を提供するものと考えられる。有機アニオン輸送系の研究は、*p*-アミノ馬尿酸 (PAH) を典型的基質として *in vivo* または *in vitro* レベルで様々な解析が行われてきた。その結果、尿細管上皮細胞の刷子縁膜 (管腔側) と側底膜 (血管側) には、それぞれ機能の異なる有機アニオントランスポータが局在することが示唆されている。1997年、Sekineら及び Sweetらはアフリカツメガエル卵母細胞への PAH 取り込み活性を指標にして、ラット腎 cDNA ライブラリーより有機アニオントランスポータ rOAT1 の cDNA 単離に成功した。しかし、PAH の尿細管分泌や薬物動態における rOAT1 の役割については不明な点が多い。そこで著者は、rOAT1 の発現分布と機能特性について系統的な解析を行い、以下の新知見を得た。

#### I. *p*-アミノ馬尿酸の尿細管分泌における rOAT1 の役割

rOAT1 の cDNA は、報告された配列を参考にしてラット腎 cDNA ライブラリーより単離した。rOAT1 に対する特異抗体を作成し、ウェスタンブロット解析及び免疫染色を行った結果、rOAT1 は近位尿細管側底膜に局在していることが判明した。rOAT1 の PAH 輸送特性について解析するため、卵母細胞発現系を用いた薬物輸送実験を行った。rOAT1 の cRNA を卵母細胞に注入することによって、卵母細胞への PAH 取り込みは顕著に増加した。 $\alpha$ -ケトグルタル酸の卵母細胞への注入が、rOAT1 を介した PAH 輸送を促進させたことから、rOAT1 は PAH とジカルボン酸の交換輸送体であることが判明した。また、rOAT1 を介した PAH 取り込みは、緩衝液中の  $\text{Cl}^-$  イオンをグルコン酸や  $\text{SO}_4^{2-}$  イオンに置換することによって顕著に低下した。rOAT1 による PAH 輸送に及ぼす炭素鎖長の異なる種々ジカルボン酸の影響について解析した結果、メチレン基が 3 つ以上のジカルボン酸共存下で、rOAT1 を介した PAH 取り込みは著しく阻害されたが、メチレン基数が 1 または 2 のジカルボン酸による影響は認められなかった。これら rOAT1 の PAH 輸送特性は、尿細管側底膜における特性と対応するものであった。以上の結果より、rOAT1 は PAH の側底膜輸送を担う有機アニオントランスポータであると考えられた。

#### II. アニオン性薬物の腎排泄における rOAT1 の役割

PAH の尿細管分泌を担う有機アニオントランスポータは、アニオン性利尿薬やセファロsporin系抗生物質、葉酸代謝拮抗薬メトトレキサート (MTX) の尿中排泄に関与する。そこでこれらアニオン性薬物の尿細管分泌における rOAT1 の関与について検討するため、卵母細胞への薬物取り込み実験を行った。その結果、rOAT1 はアニオン性利尿薬のアセタゾラミド、ヒドロクロロチアジド、フロセミド、腎排泄型セファロsporin系抗生物質、MTX を輸送することが判明した。従って、rOAT1 は PAH のみならず構造的に多様なアニオン性薬物の腎排泄を媒介するトランスポータであることが示唆された。

### Ⅲ. rOAT1 を介した薬物間相互作用

有機アニオン輸送系の代表的阻害剤であるプロベネシドは、アニオン性薬物の排泄遅延を引き起こす。その分子機構を解明するため、卵母細胞発現系を用い、rOAT1 に対するプロベネシドの阻害効果について検討したところ、プロベネシドは rOAT1 を競合的に阻害することが明らかとなった。さらに rOAT1 は、臨床上高頻度に薬物間相互作用を誘発する経口血糖降下薬や非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) によっても、強い競合阻害を受けることが判明した。従って、NSAIDs と MTX の併用によって、MTX の血中濃度上昇に伴う中毒症状が惹起された症例においては、rOAT1 が NSAIDs と MTX の相互作用部位として関与している可能性が示唆された。

以上、著者は有機アニオントランスポータ rOAT1 が尿細管側底膜を介した PAH 輸送において、主要な役割を果たしていることを明らかにした。また、rOAT1 は種々アニオン性薬物の尿細管分泌に関与することや、薬物間相互作用の標的分子になる可能性を見出した。本研究成果は、腎尿細管有機アニオントランスポータ群による薬物排泄機構を解明し、医薬品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考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

腎臓の近位尿細管上皮細胞には有機アニオン輸送系が局在し、多様なアニオン性薬物の能動的な腎排泄を媒介している。腎尿細管に発現する有機アニオントランスポータ群の構造・機能解析は、医薬品適正使用や創薬・製剤開発にも有用な情報を提供するものと考えられる。従来の研究より、尿細管上皮細胞の刷子縁膜 (管腔側) と側底膜 (血管側) には、それぞれ機能的に異なる有機アニオントランスポータが局在することが示唆されてきた。1997年、Sekine ら及び Sweet らはラット腎 cDNA ライブラリーより有機アニオントランスポータ rOAT1 の cDNA 単離に成功したが、薬物動態における rOAT1 の役割については不明な点が多く残されていた。本論文は、rOAT1 の発現分布と機能特性について系統的な解析を行ったものであり、得られた成果は以下の通りである。

rOAT1 cDNA は、既知の塩基配列を参考にしてラット腎 cDNA ライブラリーより単離された。rOAT1 に対する特異抗体を作成し、ウェスタンブロット解析及び免疫組織染色を行った結果、rOAT1 は近位尿細管側底膜に局在していることを実証した。rOAT1 の cRNA を卵母細胞に注入して rOAT1 を発現させた場合、PAH 取り込みは顕著に増加した。 $\alpha$ -ケトグルタル酸を卵母細胞へ注入することによって PAH 輸送が促進されたことから、rOAT1 は PAH とジカルボン酸の交換輸送体であることが判明した。また、rOAT1 を介した PAH 取り込みは、緩衝液中の  $\text{Cl}^-$  イオンをグルコン酸や  $\text{SO}_4^{2-}$  イオンに置換することによって顕著に低下した。rOAT1 による PAH 輸送に及ぼす炭素鎖長の異なる種々ジカルボン酸の影響について解析した結果、メチレン基が3つ以上のジカルボン酸共存下で、PAH 取り込みは著しく阻害されたが、メチレン基数が1または2のジカルボン酸による影響は認められなかった。これら rOAT1 の PAH 輸送特性は、尿細管側底膜における特性と対応するものであり、rOAT1 は PAH の側底膜輸送を担う有機アニオントランスポータであることを明らかにした。さらに、rOAT1 はアニオン性利尿薬のアセタゾラミド、ヒドロクロロチアジド、フロセミド、腎排泄型セファロsporin系抗生物質、アニオン性抗癌剤メソトレキサートを輸送することが判明した。従って、rOAT1 は構造的に多様なアニオン性薬物の腎排泄を担うトランスポータであることを機能面から実証した。

有機アニオン輸送系の代表的阻害剤であるプロベネシドは、アニオン性薬物の排泄遅延を引き起こす。その分子機構を解明するため、卵母細胞発現系を用い、rOAT1 に対するプロベネシドの阻害効果について検討した結果、プロベネシドは rOAT1 を競合的に阻害することを明らかにした。さらに rOAT1 は、臨床上薬物間相互作用を誘発する経口血糖降下薬や非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) によっても強い競合阻害を受けることが判明した。従って、NSAIDs とメソトレキサートの併用によってメソトレキサートの血中濃度上昇に伴う中毒症状が惹起された症例では、rOAT1 がこれら薬物の相互作用部位として関与している可能性を提唱した。

以上の研究は、アニオン性薬物の腎排泄機構の分子的解明と共に、有機アニオントランスポータを介した薬物間相互作用の解明、薬物投与計画、並びにトランスポータを標的とした創薬・製剤開発など応用面にも有用な基礎情報を提供し得るものであり、医療薬剤学の発展に寄与するものと考えられる。

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14年2月21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。