

氏名 永井純也
 学位(専攻分野) 博士(薬学)
 学位記番号 論薬博第616号
 学位授与の日付 平成11年9月24日
 学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当
 学位論文題目 培養腎上皮細胞OKを用いた有機アニオン輸送機構及びその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 川 寄敏祐 教授 市川 厚

論文内容の要旨

生体内に投与された多くの有機アニオン性薬物は、腎臓の近位尿細管上皮細胞において能動的に分泌される。これまでに近位尿細管における有機アニオン性薬物の分泌機構は全身レベル、臓器レベル、膜レベルで解析が進められ、その尿細管分泌には有機アニオン輸送系と称される特殊輸送系が関与することが明らかにされている。しかし、細胞レベルでの有機アニオン輸送研究は適当なモデル細胞系が確立されていないことから、他の物質輸送系に比べ立ち遅れていた。最近、京都大学医学部附属病院薬剤部研究室においてフクロネズミ腎由来のOK細胞が有機アニオン輸送のモデル薬物である *p*-aminohippurato (PAH) を側底膜側から頂側膜側(尿細管分泌方向に相当)へと方向選択的に経細胞輸送することが見出された。そこで本研究では、OK細胞におけるPAH輸送特性について系統的な解析を行い、腎有機アニオン輸送のモデル細胞系としての有用性を明確にするとともに、有機アニオン輸送の方向性を決定する要因、基質認識性、細胞内代謝系の関与等について精査した。さらに、細胞内情報伝達系を介した有機アニオン輸送の活性調節についても検討を加えた。

I. 培養腎上皮細胞OKにおける有機アニオン輸送特性

PAHが分泌方向選択的に経細胞輸送される要因を明らかにするため、側底膜及び頂側膜におけるPAH輸送について解析した。その結果、側底膜においては細胞の外から内へのPAH輸送がその逆方向に比べ大きく、一方頂側膜においては細胞内から外への輸送がその逆方向に比べて大きいことが認められた。さらに、両細胞膜におけるPAH輸送は、低温下あるいは有機アニオン輸送阻害剤probenecid共存下によって阻害された。従って、OK細胞におけるPAH経細胞輸送の方向性は両細胞膜にPAHを輸送する特殊輸送系が存在し、かつそれぞれの輸送が方向性を有していることによって生じるものと推察された。

次に、OK細胞におけるPAH輸送系の基質認識性について評価した。PAHの経細胞輸送及び側底膜輸送はbenzylpenicillin (PCG)等の β -ラクタム抗生物質によって阻害された。また、PCGは側底膜側から頂側膜側へのみ経細胞輸送され、その輸送はprobenecidあるいはPAH共存によって阻害された。さらに、側底膜PAH輸送に及ぼす炭素数の異なる種々のジカルボン酸の影響について検討した。その結果、側底膜PAH輸送は負電荷間の距離が約5Åまでのジカルボン酸では影響がなく、6-8Åあるいは10Å以上で強い阻害効果が認められた。以上の結果はこれまでに報告されている腎有機アニオン輸送の現象とよく対応しており、OK細胞におけるPAH輸送系は腎尿細管上皮細胞の有機アニオン輸送系と同一、またはきわめて近い基質認識性を有することが示された。

近年、側底膜におけるPAH輸送は細胞内の α -ketoglutarate (α -KG)との交換輸送であることが示唆されている。OK細胞において細胞内から側底膜側にeffluxされる α -KGは側底膜側にPAHを添加することによって顕著に上昇したことから、OK細胞側底膜PAH輸送は α -KGとの交換輸送であることが示された。また、代謝阻害剤antimycin A処理によって側底膜PAH輸送は阻害されるとともに、細胞内 α -KG濃度の低下が観察された。従って、ATP枯渇下におけるPAH輸送の減少はcounterionである細胞内 α -KGの濃度低下が関与する可能性が示唆された。

以上、OK細胞は腎有機アニオン輸送を解析する上で有用なモデル細胞系であることが示されるとともに、PAH経細胞輸送の方向性が決定される要因、PAH輸送系の基質認識性及び細胞内代謝系の関与等について明確にすることができた。

II. OK細胞における有機アニオン輸送の活性調節

栄養物質や無機イオン等の輸送系が、ホルモン刺激やそれに続くプロテインキナーゼ系の活性化によって調節を受けることが知られている。しかし、腎有機アニオン輸送系の活性調節に関する検討はほとんど行われていない。そこで、OK細胞を用いて protein kinase C (PKC) 活性化による PAH 輸送への影響について検討した。PKC 活性化剤 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で処理した結果、PAH の経細胞輸送及び細胞内蓄積量は著しく低下した。さらに、側底膜 PAH 輸送は PMA 処理濃度及び処理時間依存的に阻害され、その阻害効果は PKC 阻害剤 staurosporine によって消失した。一方、protein kinase A 活性化剤を用いて OK 細胞を処理した場合、PAH 輸送に対する影響は観察されなかった。次に、副甲状腺ホルモン (PTH) による PAH 輸送の活性調節について検討した。その結果、OK 細胞における PAH の経細胞輸送及び細胞内蓄積量は PTH によってともに減少した。さらに、側底膜 PAH 輸送は PTH により処理濃度及び処理時間依存的に阻害された。また、PTH による PAH の細胞内蓄積量の減少は staurosporine によって消失した。従って、PTH による PAH 輸送阻害には PKC 活性化が、少なくとも一部関与しているものと推察された。

以上、申請者は OK 細胞における有機アニオン輸送特性及びその活性調節機構について系統的な解析を行った。その結果、OK 細胞が腎近位尿細管上皮細胞における有機アニオン輸送系を解析する上できわめて有用なモデル細胞系であることを明らかにすることができた。さらに、OK 細胞を用いた検討から、腎有機アニオン輸送がホルモンやそれに続くプロテインキナーゼ系の活性化によって活性調節を受ける可能性があるという新しい知見を得ることができた。本研究で得られた結果は、有機アニオン性薬物の腎排泄挙動やその調節機構を理解する上で重要な基礎的知見となるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

アニオン性薬物の多くは、腎臓の近位尿細管において有機アニオン輸送系を介して尿中に能動分泌される。有機アニオンの分泌機序は、従来より個体レベル、臓器レベル、膜レベルでの解析が進められてきたが、細胞レベルでの経細胞輸送機構については未だ不明の点が多い。申請者はフクロネズミ腎由来 OK 細胞が有機アニオン p-aminohippurate (PAH) 輸送能を保持していることに着目し、多孔性フィルター上に単層培養した細胞シートを用いて有機アニオン経細胞輸送の解析系を確立するとともに、有機アニオン輸送の調節・制御機構について以下の研究成果を得た。

OK 細胞の側底膜及び頂側膜における PAH 輸送について解析した結果、両細胞膜に有機アニオン輸送系が存在し、かつそれぞれの輸送が方向性を有し、分泌方向選択的に経細胞輸送されることが明らかとなった。PAH の経細胞輸送及び側底膜輸送は、benzylpenicillin (PCG) 等の β -ラクタム抗生物質によって阻害され、更に側底膜 PAH 輸送に及ぼす炭素数の異なる種々のジカルボン酸の影響について検討した結果、OK 細胞における PAH 輸送系は腎尿細管上皮細胞の有機アニオン輸送系と極めて近い基質認識性を有することが判明した。また、側底膜における PAH 輸送は、細胞内の α -ketoglutarate (α -KG) との交換輸送であることが示唆されているが、細胞レベルでは未だ証明されていない。OK 細胞において細胞内から側底膜側に efflux される α -KG は、側底膜側に PAH を添加することによって顕著に上昇したことから、側底膜 PAH 輸送は α -KG との交換輸送であることが実証された。以上、OK 細胞は有機アニオン輸送を解析する上で有用なモデル細胞系であり、PAH 経細胞輸送の方向性を決定する要因、PAH 輸送系の基質認識性及び細胞内代謝系の関与等について初めて細胞レベルで明らかにすることができた。

有機アニオン輸送系の活性調節に関する検討は、これまでほとんど行われていない。OK 細胞を用いて protein kinase C (PKC) 活性化による PAH 輸送への影響について検討するために、PKC 活性化剤 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で処理したところ、PAH の経細胞輸送及び細胞内蓄積量は著しく低下した。更に、側底膜 PAH 輸送は PMA 処理濃度及び処理時間依存的に阻害され、その阻害効果は PKC 阻害剤 staurosporine によって消失した。一方、protein kinase A 活性化剤は、PAH 輸送に影響しなかった。次に、副甲状腺ホルモン (PTH) による PAH 輸送の活性調節について検討した結果、PTH による PAH 輸送阻害には PKC 活性化が、少なくとも一部関与していることが示された。

以上、本研究は OK 細胞が近位尿細管上皮細胞における有機アニオン輸送を解析する上で極めて有用なモデル系であること、有機アニオン輸送がホルモンやプロテインキナーゼの活性化によって調節を受けることを細胞レベルで初めて明らかにしたものである。これらの研究成果は、腎尿細管におけるアニオン性薬物の分泌機構の解明に貢献するところ大であり、薬物動態研究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 11 年 8 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。