

京都大学	博士（薬学）	氏名	津田 真弘
論文題目	遺伝子発現系及びノックアウトマウスを用いたH ⁺ /有機カチオンアンチポータMATEの薬物動態学的役割に関する研究		
（論文内容の要旨） 腎臓におけるカチオン性薬物の尿細管分泌には、近位尿細管上皮細胞に発現する有機カチオン輸送系が重要な役割を果たしている。血管側側底膜に発現する有機カチオントランスポータ2 (OCT2) は、血液中から細胞内への取り込み過程を媒介している。一方、管腔側刷子縁膜にはH⁺/有機カチオンアンチポータが局在し、細胞内から管腔中へのカチオン性薬物の排泄を担っている。2005年にヒトmultidrug and toxin extrusion 1 (hMATE1) がH⁺/有機カチオンアンチポータとして機能していることが報告され、著者の所属研究室においてもラット (r) MATE1、hMATE1及びhMATE2-Kを同定し、基質認識特性や発現分布などの分子的特徴を明らかにしてきた。本研究では、MATEの薬物動態学的役割の解明を目指し、遺伝子発現系や新たに作製した<i>Mate1</i>ノックアウトマウスを用いてMATEの機能解析を行い、以下の新知見を得た。 I. MATE1及びMATE2-Kの駆動力の同定 rMATE1を安定的に発現させた細胞から調製した膜小胞を用いて、MATEの典型的基質である[¹⁴C]テトラエチルアンモニウム (TEA) の輸送実験を行った。その結果、逆向きのH⁺勾配存在下でのみ[¹⁴C]TEA取り込みの一過性の上昇（オーバーシュート現象）が観察された。また、[¹⁴C]TEAの取り込みは小胞内負の膜電位には依存しなかった。同様にhMATE1及びhMATE2-K安定発現細胞から調製した膜小胞においても、逆向きのH⁺勾配存在下でのみオーバーシュート現象が観察された。従って、MATE1及びMATE2-Kの駆動力は、基質と逆向きのH⁺勾配であることが判明した。 II. 親和性比較に基づく有機カチオン輸送系を介した薬物相互作用の評価 hMATE1及びhMATE2-Kを介した[¹⁴C]TEA輸送に対する阻害実験を行い、種々カチオン性薬物の阻害定数K_iを算出した。算出したK_i値とこれまでに報告されているhOCT2に対する親和性を比較したところ、多くのカチオン性薬物はhOCT2よりもhMATEsに対して低親和性を示した。一方、ヒスタミンH₂受容体拮抗薬シメチジンは、hOCT2よりもhMATEsに対して高親和性を示し、各トランスポータに対するK_i値はそれぞれ147 μM (hOCT2)、1.1 μM (hMATE1)、7.3 μM (hMATE2-K) と算出された。シメチジンの最高血中濃度は4 - 12 μMと報告されており、上皮細胞内でhMATE1を阻害する濃度に達することが想定された。そこで、著者の所属研究室で構築されたhOCT2/hMATE1ダブルトランスフェクタントを用い、両者の基質であるシメチジンと血糖降下薬メトホルミンの相互作用について精査した。その結果、血中濃度に近い1 μMのシメチジンを側底膜側に共存させると、[¹⁴C]メトホルミンの側底膜側から頂側膜側への経細胞輸送は減少したが、細胞内への蓄積は増加した。一方、1 mMシメチジンの共存は、経細胞輸送及び細胞内蓄積をいずれも強く阻害した。これらの結果より、hMATE1がシメチジンとメトホルミンの尿細管分泌にお			

る相互作用に関与していることが示された。

III. *Mate1*ノックアウトマウスを用いた薬物動態解析

MATE1の*in vivo*における役割を明らかにするために、*Mate1*ノックアウトマウスを作製した。*Mate1*ノックアウトマウスは正常に成育し、体重や臓器の組織像に異常は認められなかった。メトホルミンを頸静脈より単回投与したところ、野生型マウスと比較して*Mate1*ノックアウトマウスのメトホルミン血中濃度及び腎組織中濃度は顕著に上昇し、尿中排泄量は有意に減少した。速度論的解析により求めたメトホルミンの腎クリアランス及び分泌クリアランスは、*Mate1*ノックアウトマウスにおいて有意に減少した。これらの結果より、*in vivo*においてMATE1がメトホルミンの尿細管分泌に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

以上、著者は遺伝子発現系を用いて、基質と逆向きのH⁺勾配がMATE1及びMATE2-Kの駆動力として働くこと、シメチジンとメトホルミンの尿細管分泌における相互作用にMATE1が関与していることを明らかにした。さらに、ノックアウトマウスを用いた解析によって、MATE1がメトホルミンの尿細管分泌に重要な役割を担っていることを実証した。本研究成果は、カチオン性薬物の適正使用を推進する上で有用な基礎的知見を提供するものとする。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

腎臓の近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜には、 H^+ /有機カチオンアンチポータが局在しカチオン性薬物の排泄を担っているが、その分子実体は長らく不明であった。申請者の所属する研究室では、ラットやヒトの H^+ /有機カチオンアンチポータ (multidrug and toxin extrusion: MATE) の遺伝子を単離し、基質認識特性や発現分布などの分子的特徴を明らかにしてきた。しかし、*in vivo*におけるMATE1の薬物動態学的役割については十分に解明されていなかった。そこで申請者は、遺伝子発現系や新たに作製した*Mate1*ノックアウトマウスを用いてMATEの機能解析を行い、以下の新知見を得た。

先ずラットMATE1の安定的発現細胞から膜小胞を調製し、TEAの輸送実験を行った。その結果、逆向きの H^+ 勾配存在下でのみTEA取り込みのオーバーシュート現象が観察され、基質と逆向きの H^+ 勾配が駆動力であることが判明した。一方、TEAの取り込みは小胞内負の膜電位には依存しなかった。同様にヒトMATE1やヒトMATE2-Kにおいても、逆向きの H^+ 勾配が駆動力であることが確認された。

次に、hMATE1及びhMATE2-Kの各基質に対する親和性を算出し、hOCT2の親和性と比較した。その結果、シメチジンは、hOCT2よりもhMATEsに対して高親和性を示し、その臨床濃度を考慮すると、上皮細胞内でhMATE1を阻害することが想定された。そこで、hOCT2/hMATE1ダブルトランスフェクタントを用いて、シメチジンと血糖降下薬メトホルミンの相互作用について精査したところ、シメチジンの臨床濃度ではhMATE1が特異的に阻害されていることが実証された。

最後に、*Mate1*ノックアウトマウスを新たに作製し、薬物動態学的役割を*in vivo*で精査した。その結果、*Mate1*ノックアウトマウスのメトホルミン血中濃度は、野生型マウスと比較して顕著に上昇した。さらに、メトホルミンの腎分泌クリアランスは、*Mate1*ノックアウトマウスにおいて有意に減少した。従って、カチオン性薬物の尿細管分泌におけるMATE1の役割が、*in vivo*で直接的に証明された。

以上の研究は、 H^+ /有機カチオンアンチポータ (MATE) の機能特性を、駆動力と親和性の観点から解明するとともに、ノックアウトマウスの作製を通じて、MATE1の薬物動態学的役割を*in vivo*で初めて実証したものである。これらの研究成果は、カチオン性薬物の腎排泄機構の全貌解明に貢献すること大であり、薬物動態学の発展に寄与するところが多い。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成22年2月23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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降