

|             |                                                                                                                                             |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名         | たかやま あきら<br>高 山 明                                                                                                                           |
| 学位(専攻分野)    | 博 士 (医 学)                                                                                                                                   |
| 学 位 記 番 号   | 論 医 博 第 1514 号                                                                                                                              |
| 学位授与の日付     | 平 成 7 年 5 月 23 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 | Transport of cyclosporin A in kidney epithelial cell line (LLC-PK <sub>1</sub> )<br>(培養腎上皮細胞 LLC-PK <sub>1</sub> におけるシクロスポリン A の輸送特性に関する研究) |

|        |                                        |
|--------|----------------------------------------|
| 論文調査委員 | (主 査)<br>教 授 藤 田 潤 教 授 吉 田 修 教 授 乾 賢 一 |
|--------|----------------------------------------|

## 論 文 内 容 の 要 旨

免疫抑制剤 cyclosporin A (CsA) は臓器移植時に繁用されているが、その強い腎毒性は臨床上の問題となっている。これまで CsA の腎毒性発現機構として、腎血流量低下などの血管系機能障害及び尿細管上皮細胞の構造・機能障害が示唆されてきた。尿細管上皮細胞に対する毒性は、CsA の細胞内移行と密接に関連するものと考えられるが、その輸送機構については未だ明らかでない。近年、培養細胞系を用いた細胞の形態、機能解析に関する研究が進み、この実験系は薬物の細胞内移行や毒性発現の機構解明にも利用されつつある。そこで著者は、近位尿細管上皮細胞の性質を有することが知られているブタ腎臓由来の LLC-PK<sub>1</sub> 細胞を用い、CsA の輸送特性について検討を加えた。

LLC-PK<sub>1</sub> 細胞 (ATCC CRL-1392) は、10% FBS を含む Medium 199 にて 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で単層培養した、confluent に達した LLC-PK<sub>1</sub> 細胞を用い CsA の取り込みを経時的に測定したところ、インキュベート開始後約 1 分までは直線的に増加し、その後取り込み速度が漸次減少し 30 分でほぼ平衡に達した。取り込みの濃度依存性を調べるため、CsA 濃度を 1~30  $\mu$ M まで変化させ、1 分間の取り込み量を測定した。その結果、高濃度において飽和現象が認められ、非線形最小二乗法により算出した Km 値、Vmax 値はそれぞれ 17.1  $\mu$ M, 1.1 nmol/mg protein/min であった。次に各種阻害剤の影響について検討を加えた。CsA の誘導体である CsC や CsD 共存下では、取り込み初速度が有意に減少した。また、Ca 拮抗剤である verapamil が CsA の腎毒性を軽減するという報告もあることから、verapamil 共存下での取り込みを測定したところ、取り込み初速度の有意な減少が認められた。しかし、2, 4-dinitrophenol, rotenone 等の代謝阻害剤では全く影響が認められなかった。次に取り込みにおける温度の影響について検討した結果、0°C での取り込みはインキュベート開始後 10 分でも極めて小さく、温度の上昇とともに取り込みは増加し顕著な温度依存性が認められた。そこで 5~37°C の範囲で温度を変化させて初期取り込み速度を測定し、Arrhenius plot により解析したところ、約 25°C で折れ曲がり不連続性が認められた。この時の活性化エネルギーは、25°C 以上で 12.5 kcal/mol, 25°C 以下で 21.4 kcal/mol

であった。一方、単純拡散によって取り込まれる sulfanilamide では  $0^{\circ}\text{C}$  でも有意な取り込みが認められ、Arrhenius plot は直線性を示した。またその活性化エネルギーは CsA と比較して小さく 6 kcal/mol であった。従って、LLC-PK<sub>1</sub> 細胞における CsA の取り込み機構は sulfanilamide とは異なることが明らかになった。そこで次に細胞からの CsA の efflux について検討した。あらかじめ CsA を取り込ませた細胞を、薬物を含まない medium 中でインキュベートしたところ、10分間で約50%の薬物が細胞内より消失した。またこの過程は取り込みと同様、顕著な温度依存性を示し、低温下では著しく抑制された。

以上、培養腎上皮細胞 LLC-PK<sub>1</sub> における CsA の輸送には、1) 濃度依存性、2) 温度依存性、3) Arrhenius plot の不連続性、4) 阻害剤による取り込み初速度の減少、等が認められた。従って、LLC-PK<sub>1</sub> 細胞内への CsA の輸送は単純拡散では説明できず、特殊輸送系を介することが明らかとなった。これらの結果は CsA の腎挙動や毒性発現機構を解明する上で有用な基礎的知見であると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

免疫抑制剤シクロスポリン (CsA) は臓器移植時に繁用されているが、その腎毒性は臨床上問題となる。尿管上皮細胞に対する毒性は、CsA の細胞内移行と密接に関連すると考えられるが、その輸送機構については不明の点が多い。申請者は、ブタ腎由来の培養腎上皮細胞 LLC-PK<sub>1</sub> を用い、CsA の輸送特性について検討した。CsA の取り込みは飽和性を示し、シクロスポリン誘導体やベラパミル等の共存により有意に減少した。また CsA 取り込みには顕著な温度依存性が認められ、Arrhenius plot は不連続性を示した。一方、単純拡散で取り込まれるスルファニルアミドの Arrhenius plot は直線性を示し、活性化エネルギーも CsA に比べ小さかった。これらの結果より、培養腎上皮細胞 LLC-PK<sub>1</sub> における CsA の輸送には、特殊輸送系が関与することが明らかとなった。

以上の研究は CsA の腎挙動や毒性発現機構の解明に貢献し、医療薬剤学の発展に寄与するところが多い。

したがって本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成7年4月10日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。