

## 審査の結果の要旨

氏名 長谷川 真絹

腎臓は電解質や水の排泄を調節し、体液の恒常性を維持するとともに、異物解毒を司る重要な臓器であり、水溶性の老廃物・異物及びその代謝物の多くは腎臓から尿中へと排泄される。腎臓から尿中への薬物の排泄過程は糸球体ろ過とそれに続く尿細管分泌、さらに尿細管を介した再吸収過程より構成されている。近位尿細管は血管側には側底膜、管腔側には刷子縁膜構造を有する極性をもつ上皮細胞より構成されている。側底膜、刷子縁膜上には種々の水溶性有機アニオン・カチオンを基質とするトランスポーターが発現し、受動拡散による細胞膜透過性の低い水溶性化合物のベクトル輸送を行っている。

腎側底膜上には有機アニオントランスポーターOAT1 および OAT3 が発現している。申請者は修士課程において OAT1, OAT3 の遺伝子発現系とラット腎切片を用いた速度論的解析により、腎取り込みにおける OAT1 と OAT3 の寄与率は遺伝子発現系から予測可能であることを明らかにした。

尿細管におけるベクトル輸送には血管側の取り込みトランスポーターだけでなく、管腔側の排出トランスポーターが必須である。腎刷子縁膜ベシクルを用いた解析により尿中への有機アニオンの排泄には交換輸送系と膜電位依存性のトランスポーターが関与することが示唆されている。さらに近年、腎刷子縁膜には一次性能動輸送担体も発現していることが明らかにされてきた。これらのトランスポーターはいずれも広範な基質認識性を示すことが報告されているが、腎刷子縁膜を介した輸送の分子メカニズムについては明らかにされていない。

本研究では有機アニオンの尿細管分泌メカニズムを明らかにすることを最終目標として種々の検討を行った。はじめに有機アニオンの尿細管分泌の *in vitro* 評価系を構築し、刷子縁膜を介した輸送メカニズムを解明することを目的として極性を有するブタ腎臓近位尿細管由来 LLC-PK1 細胞を用いた解析を行った。次に有機アニオントランスポーターを介して尿細管分泌を受け、尿細管腔より薬効を示すことが知られている利尿薬について、Mrp4 ノックアウトマウスを用いた *in vivo* での薬物動態の比較を行った。

### (1) LLC-PK1 細胞を介した有機アニオンのベクトル輸送の評価

LLC-PK1 細胞 はブタ近位尿細管由来の極性細胞であり、多孔性フィルター上に単層培養することで物質の方向性輸送を評価することができる。LLC 単独では有機アニオンの方向性のある輸送は観察されないが、血管側の有機アニオントランスポーターの Organic Anion Transporter 1 (rOat1) および rOat3 を安定発現させることで、代表的な基質 (rOat1;

*p*-aminohippurate (PAH), rOat3; dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS)) の basal から apical 方向への輸送の増加が観察された。また、OAT の典型的な基質や内因性有機アニオンおよび尿細管分泌を受けることが知られているアニオン系薬物について同様に経細胞輸送を評価すると多くの化合物において basal から apical 方向へのベクトル輸送が観察された。

LLC-PK1 細胞に発現する内因性の排出トランスポーターの発現を RT-PCR により評価したところ、multidrug resistance associated protein 2 (MRP2), MRP4 および breast cancer resistance protein (BCRP)、膜電位依存性のトランスポーターである uric acid transporter/channel (UAT)、voltage-driven organic anion transporter 1 (OATv1) が発現していた。Western blotting により、タンパク質レベルでの MRP2, MRP4 および OATv1 の発現が確認された。

rOat1-LLC における PAH 輸送は Na<sup>+</sup>イオンを K<sup>+</sup>イオンに置換したことにより低下し、細胞内蓄積量は増加した。apical 側膜を介した輸送クリアランスは K<sup>+</sup>置換により約 1/4 に低下した。他の有機アニオンについても K<sup>+</sup>置換の効果は観察されたが、その程度は化合物により異なっていたことから、LLC-PK1 細胞における輸送には膜電位依存性のトランスポーターの他に輸送駆動力の異なるトランスポーターも寄与していることが示唆された。さらに膜電位依存性トランスポーターの候補のひとつである UAT に関して阻害剤と siRNA の効果を検討した。どちらの検討においても PAH の輸送には影響がなく、UAT の寄与は小さいことが示唆された。もう一方の候補トランスポーターである OATv1 が寄与しているかについては今後の検討課題である。MRP4 遺伝子について MRP4 に対する siRNA を恒常的に発現する安定発現系を作製し、PAH の輸送を検討したところ、PAH の basal から apical への輸送が約 2/3 に低下したことから PAH の輸送には一部 MRP4 が寄与していると推察された。

## (2) 利尿薬の尿細管分泌および薬理作用における multidrug resistance associated protein 4 (Mrp4) の関与

ループ利尿薬、チアジド系利尿薬は有機アニオントランスポーターを介して尿細管分泌を受けた後、尿細管腔から薬効を示す。LLC-PK1 細胞を用いた経細胞輸送実験の結果より、ループ利尿薬の bumetanide, furosemide、チアジド系利尿薬の trichlormethiazide, hydrochlorothiazide の刷子縁膜を介した輸送には膜電位依存性のトランスポーターの他に膜電位非依存性のトランスポーターも寄与していることが示唆された。本研究では利尿薬の尿細管分泌について MRP4 ノックアウトマウスを用いた解析を行った。

腎近位尿細管での発現が報告されている MRP2, MRP4, BCRP について、アデノウィルスを用いた発現細胞膜ベシクルへの典型的な基質の取り込みに対する種々利尿薬の阻害効果を

検討した。その結果、ループ利尿薬 (bumetanide, furosemide, ethacrynic anid), チアジド系利尿薬 (trichlormethiazide, hydrochlorothiazide), 炭酸脱水酵素阻害薬の acetazolamide は、MRP2 への基質の取り込みに対して 促進効果を示した。MRP4 への基質の取り込みに対しては全ての利尿薬が阻害効果を示した。ループ利尿薬の IC50 値は 10~100  $\mu$ M であったのに対し、チアジド系利尿薬や炭酸脱水酵素阻害薬の IC50 値は 500  $\mu$ M 以上であった。BCRP に対しても MRP4 と同程度の阻害効果が観察されたが hydrochlorothiazide では阻害効果は見られなかった。

臨床で繁用されている furosemide, hydrochlorothiazide を WT マウス (BL6/129) と Mrp4 ノックアウトマウス (BL6/129) に定速静注し、定常状態条件下での血漿中、尿中薬物濃度を測定し薬物動態パラメーターを算出した。furosemide においては WT マウスと KO マウスの間に有意な差は認められなかった。hydrochlorothiazide では尿中排泄速度が約 60%に低下し、腎クリアランスも約 60%に低下した。さらに、利尿薬の薬効の指標となる累積尿量を測定したところ、furosemide では累積尿量が KO マウスにおいて有意に低下し、hydrochlorothiazide についても KO マウスで低下する傾向が観察された。以上の結果より hydrochlorothiazide の尿細管分泌と薬効発現には一部 MRP4 が寄与していることが示唆された。また、furosemide の薬効発現にも一部 MRP4 が関与していることが推察された。

以上、本研究結果よりブタ近位尿細管由来 LLC-PK1 細胞には内因性 apical 側トランスポーターが複数発現しており、血管側の取り込みトランスポーター OAT1, OAT3 を発現させることで尿細管分泌をうける有機アニオンの経細胞輸送を評価できることが示唆された。また、LLC-PK1 細胞を介した有機アニオンの輸送には膜電位依存性のトランスポーターが一部寄与しており、MRP4 など他の輸送駆動力によるトランスポーターと協調的に apical 側の輸送を担っていることが示唆された。in vivo 実験より、利尿薬の尿細管分泌と薬効発現に MRP4 が一部寄与していることが示唆された。OAT 発現 LLC-PK1 細胞は尿細管の in vitro モデルとして有用であり、医薬品のスクリーニングや薬物間相互作用の予測、人工透析にも応用できると考えている。また、本研究は MRP4 が有機アニオンの尿細管分泌に関与することを示した初めての例である。今後、OATv1 ノックアウトマウスの作製などにより、腎刷子縁膜を介した有機アニオン輸送における膜電位依存性のトランスポーターの分子メカニズムを解明できるのではないかと考えられる。

本研究は腎臓における有機アニオン輸送研究に対する端緒を開く研究であると考えられ、博士 (薬学) の学位に値するものと認めた。