

論文の内容の要旨

抗ウイルス薬 Adefovir、Tenofovir の腎排泄及び腎毒性発症メカニズムの解析

今岡 知己

[序論] 核酸アナログである adefovir, cidofovir, tenofovir は B 型肝炎ウイルス、エイズウイルス に対する抗ウイルス薬として開発された。Adefovir と tenofovir はプリン塩基、cidofovir はピリミジン塩基の誘導体であり、細胞内でリン酸化を受け、活性体へと変換される。これらの薬物は主に腎臓で排泄され、糸球体ろ過の他に近位尿細管における能動的な分泌（尿細管分泌）を受ける。尿細管分泌は、近位尿細管の血管側から尿細管腔側への方向性輸送であり、側底膜側における取り込みトランスポーターと、刷子縁膜側におけるトランスポーターが協奏的に働くことにより、効率的な薬物輸送が達成されている。Adefovir, cidofovir, tenofovir は、生理学的 pH では負電荷を有している有機アニオン化合物である。遺伝子発現系を用いて、側底膜上の organic anion transporter 1 (OAT1/*SLC22A6*)と刷子縁膜上に発現する multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4/*ABCC4*)の基質となることが報告され

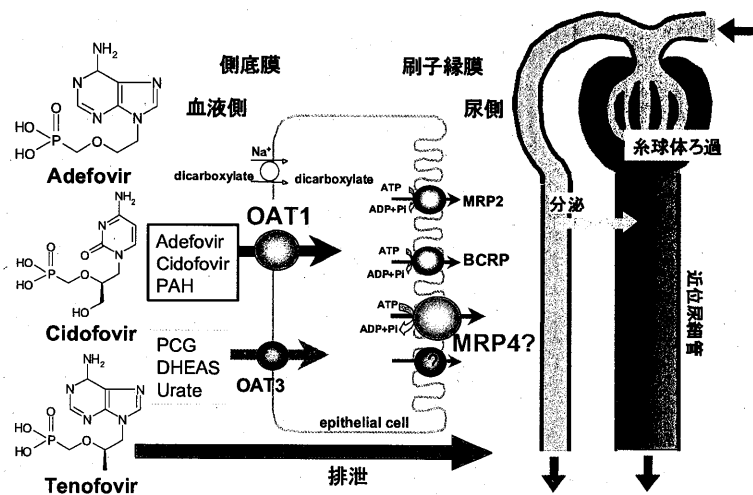


図1 Adefovir, Cidofovir, Tenofovirの腎排泄の模式図

図1 Adefovir, Cidofovir, Tenofovirの腎排泄の模式図

ているが、尿細管分泌におけるそれぞれの寄与率は明らかにされていない。そこで本研究では、OAT1、MRP4に着目し adefovir、cidofovir、tenofovir の腎排泄への関与について検討を加えた。

Adefovir は腎臓中への蓄積が dose-limiting toxicity に結びついていることが知られている。活性体である2リン酸化体はミトコンドリアのゲノム複製に関与している DNA polymerase γ を阻害することから、ミトコンドリア毒性が adefovir の腎毒性を誘発する要因となっていると考えられている。

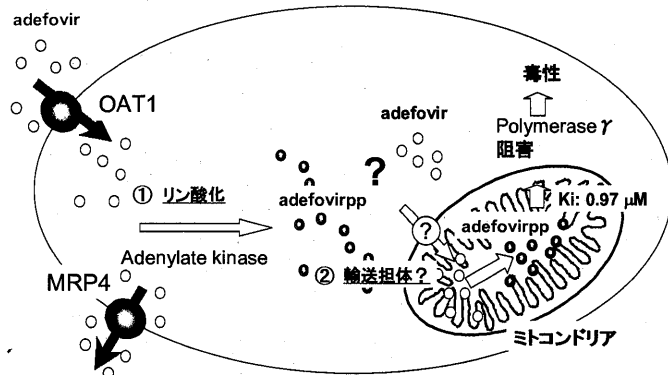


図2 考えられるAdefovirの毒性メカニズムの模式図

Adefovir の細胞内でのリン酸化、adefovir 及び活性体のミトコンドリア膜を介した膜輸送が活性体のミトコンドリアへの暴露を決定する因子であると考え、これら諸過程についても併せて検討を加えた。

[方法および結果]

1. Adefovir の腎排泄メカニズムの解析

Adefovir の腎取り込み過程は OAT1 によって説明される。

Adefovir の血液側からの取り込み過程をヒト腎スライス法を用いて検討した。Adefovir のヒト腎スライスへの取り込みは飽和性を示し、その Km 値は $131\mu\text{M}$ であった。Adefovir の腎スライスへの取り込みに対する OAT1、OAT3 の寄与をそれぞれ OAT1、OAT3 選択的阻害剤である *p*-アミノ馬尿酸 (PAH)、ベンジルペニシリン (PCG) を用いて検討した。結果、adefovir の腎への取り込みは PAH によって濃度依存的に阻害されるが、PCG によっては阻害されず、OAT1 が主に関与していることが示唆された。

MRP4 は、Adefovir、Tenofovir を基質として輸送する

MRP4cDNA を組み替えたアデノウイルスを HEK293 細胞に感染させ、MRP4 を過剰発現した膜ベシクルを得た。MRP4 発現膜ベシクルを用いた輸送実験の結果、

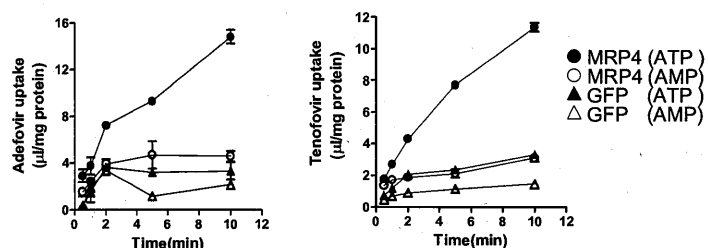


図3 MRP4を介したAdefovir, TenofovirのATP依存的な輸送

MRP4 を介した ATP 依存的な adefovir, tenofovir の輸送が観察された(図 3)。一方で, cidofovir の ATP 依存的な輸送は観察されなかった。ATP 依存的な adefovir, tenofovir の輸送は 1mM まで飽和せず、その Km 値は大きい(>1mM) ことが示唆された。

Mrp4(-/-)マウスにおいて Adefovir、Tenofovir の腎排泄クリアランスが低下する

野生型マウス、Mrp4(-/-)マウスに静脈内定速投与を行い、定常状態において adefovir、cidofovir、tenofovir の血漿中濃度、尿排泄速度、腎臓中濃度を測定した。マウスにおいても、全身クリアランスの大部分は腎クリアランスによって説明され、糸球体ろ過速度よりも大

Adefovir		CL _{total}	CL _{renal,plasma}	CL _{renal,kidney}	GFR	K _{p,kidney}
	ml/min/kg	ml/min/kg	ml/min/kg	ml/min/kg	ml/min/kg	
Wild type	24.8±1.2	23.7±1.6	0.857±0.037	12.9±0.9	13.1±0.7	
Mrp4(-/-)	18.8±0.3**	16.7±0.2*	0.319±0.031**	10.8±0.3	19.5±1.3*	

Tenofovir		CL _{total}	CL _{renal,plasma}	CL _{renal,kidney}	GFR	K _{p,kidney}
	ml/min/kg	ml/min/kg	ml/min/kg	ml/min/kg	ml/min/kg	
Wild type	28.0±2.2	24.9±0.7	0.860±0.073	14.5±1.2	12.7±0.3	** P<0.01
Mrp4(-/-)	28.1±2.0	26.0±1.3*	0.394±0.079*	14.8±2.1	29.5±5.5*	* P<0.05

表 Adefovir, Tenofovir の Mrp4(-/-)マウス及び野生型マウスにおける各動態学的パラメータ

きく、尿細管分泌の関与が示唆された。Adefovir, tenofovir の腎臓内濃度は Mrp4(-/-)マウスでは野生型に比べ有意に高く(それぞれ 130 vs 66, 191 vs 87 (pmol/g 組織)), 腎臓内濃度基準の腎排泄クリアランスは Mrp4(-/-)マウスにおいてそれぞれ約 40%に低下した(表)。また、腎臓中の adefovir 1リン酸化体(adefoviro-p)及び2リン酸化体(adefoviro-pp)の蓄積を陰イオン交換 HPLC を用いて測定したところ、いずれの代謝物も Mrp4(-/-)マウスにおいて野生型マウスに比べ顕著に上昇した。一方で、cidofovir に関しては、Mrp4(-/-)マウス、野生型マウスで動態学的パラメータに差異は認められなかった。

2. Adefovir の腎毒性メカニズムの解析

非発現細胞に比べて、OAT1 発現 HEK293 細胞では adefovir に対する感受性が増加する。以降の実験は全て、OAT1 発現 HEK293 細胞を用いて行った。

Adefovir 処理によりミトコンドリア毒性が生じる。

Adefovir 存在下で OAT1 発現 HEK293 細胞を培養し、細胞内 ATP レベルに対する影響を検討した。暴露 96 時間後の細胞内 ATP レベルは、adefoviro の濃度依存的に減少した。さらに、adefoviro によるミトコンドリア DNA(mtDNA)複製阻害についても検討した。定量的 PCR によって測定した mtDNA ゲノムのコピー数 (mtDNA (cytochrome b) 量/核ゲノム DNA (serum albumin) 量) は、adefoviro の濃度依存的に減少した。

Adefovir リン酸化酵素 (AK2, AK3, AK4) 過剰発現によって毒性が上昇する。

Adefovir 耐性細胞において adefovir リン酸化酵素活性が低下していることが知られている。

Adefovir リン酸化酵素の候補として Adenylate Kinase (AK) 2, AK3, AK4 に着目して検討を加えた。各酵素の細胞内分布は図 4 に示した。AK2/OAT1、AK3/OAT1、AK4/OAT1 共発現 HEK293 細胞を構築し、MTT 法により、

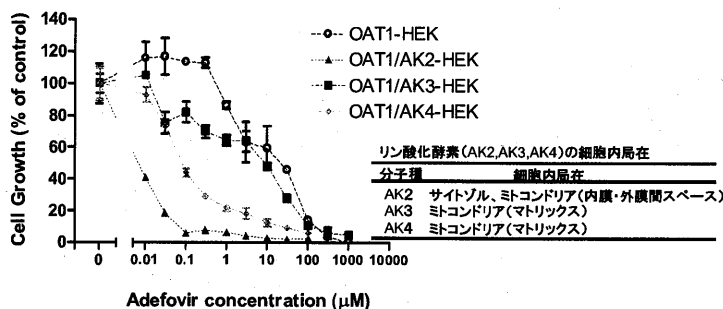


図4 AK2,AK3,AK4/OAT1共発現系、OAT1発現系、コントロール細胞における Adefovirの濃度依存的な細胞毒性

AK2、AK3、AK4 強制発現による adefovir の毒性への影響を調べた。結果、AK2/OAT1、AK4/OAT1 発現細胞、若干ではあるが AK3/OAT1 細胞において OAT1 発現細胞、コントロール細胞に比べ、adefovir の細胞毒性は上昇した(図 4)。AK2/OAT1、AK3/OAT1、AK4/OAT1 発現系において細胞内の有意なリン酸化体の上昇が観察された。Adefovir-p、および adefovir-pp の割合は AK2/OAT1 細胞でそれぞれ 26%、45%、AK3/OAT1 細胞で 23%、25%、AK4/OAT1 細胞で 15%、35%であり、コントロール細胞(OAT1)では、13%、23%であった。

$[^3\text{H}]$ dATP、 $[^3\text{H}]$ dCTP の HEK より調製したミトコンドリアへの取り込みに対する adefovir、adefovir-pp の阻害効果の検討

ミトコンドリア内膜を介した adefovir、adefovir-pp の輸送について検討を加えた。dATP、dCTP の輸送に対する adefovir、adefovir-pp の阻害効果を検討したところ、2mM adefovir では dATP、dCTP のミトコンドリアを介した輸送が促進され、一方で 2mM adefovir-pp においては dATP、dCTP の輸送が阻害された(図 5)。

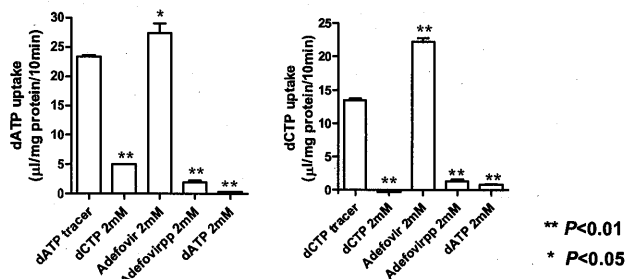


図5 $[^3\text{H}]$ dATP、 $[^3\text{H}]$ dCTP の HEK より調製したミトコンドリアへの取り込みに対する adefovir、adefovir-pp の阻害効果

[考察]

本研究により、抗ウイルス薬である adefovir の腎排泄に関して、血液側からの取り込み過程には OAT1 が、管腔側への排泄過程には MRP4 が協奏的に機能していることを MRP4 発現膜ベシクル及び Mrp4(-/-)マウスを用いて明らかにした。ただし、Mrp4(-/-)マウスでも尿管分泌は完全に消失しておらず、他のトランスポーターも刷子縁膜側の排泄過程に参与しているものと考えている。Mrp4(-/-)マウス腎臓において、adefovir リン酸化体の蓄積は有意

に高く、一方で adefovir に対するリン酸化体の割合は Mrp4(-/-)マウス、野生型マウスともに変化は見られず、Mrp4 ノックアウトにより腎臓内 adefovir が上昇した結果、リン酸化体が上昇したものと考えられる。MRP4 が直接 adefovir リン酸化体を輸送するか否かについては今後の検討が必要である。Tenofovir も adefovir 同様、Mrp4(-/-)マウスで腎臓中濃度基準の分泌クリアランスは有意に低下し、Mrp4 が関与していることを明らかにした。一方で、cidofovir も尿細管分泌を受け、adefovir、tenofovir と同じく OAT1 の基質となるが、MRP4 の基質とはならず、別のトランスポーターが管腔側への排出に関与していることが明らかとなった。

Adefovir は活性体である adefovir-pp が DNA polymerase γ 阻害活性を有していることから、adefovir-pp によるミトコンドリア DNA 複製阻害が細胞毒性の主要因と考えられている。DNA polymerase γ はミトコンドリアマトリックス内に局在していることから、DNA polymerase γ 阻害定数のみならず、adefovir-pp のミトコンドリアへの暴露も毒性を支配する因子である。AK2、AK4 発現系において毒性は顕著に上昇、AK3 発現系でもわずかながら上昇したことから、AK2、AK3、AK4 が adefovir のリン酸化に関与していることが示唆された。AK2 は細胞質及びミトコンドリア膜間スペースに、一方で AK4 はミトコンドリアマトリックス内に局在していることから、AK2 は細胞質及びミトコンドリア膜間スペース内で adefovir から adefovir-p へ、AK3、AK4 はミトコンドリアマトリックス内で adefovir から adefovir-p、adefovir-p から adefovir-pp の両過程を促進しているものと考えられる。

ミトコンドリア膜を介した dCTP、dATP の輸送に対して adefovir により dATP 輸送および dCTP 輸送が trans-stimulation を示し、これら核酸と輸送系を共有していることが示唆された。Adefovir-pp についても dATP、dCTP 輸送を cis-inhibition したことから、dATP、dCTP のミトコンドリア輸送に関わるトランスポーターの基質となる可能性がある。今後、adefovir、adefovir-pp 輸送の直接的な測定を含めた詳細な解析が必要であると考えられる。

Adefovir、tenofovir、cidofovir などの逆転写酵素阻害薬の薬効メカニズムは、細胞質内でのウイルスの逆転写酵素の阻害であることを考慮すると、ミトコンドリアへの活性代謝物の暴露を最小限にすることで抗ウイルス薬の副作用を回避することが可能になると考えられる。ミトコンドリア膜を介したトランスポーターあるいは、AK2-AK4 によるリン酸化によるミトコンドリア内への活性代謝物の暴露を回避した創薬研究への応用が期待される。

[参考文献]

Imaoka T, Kusuhara H, Adachi M, Schuetz J D, Takeuchi K, and Sugiyama Y, Functional involvement of multidrug resistance associated protein 4 (MRP4/ABCC4) in the renal elimination of the anti-viral drugs, adefovir and tenofovir, Mol.Pharmacol. in press