

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07216

研究課題名(和文)尿細管のプロトン/脂溶性有機カチオン対向輸送系の機能特性と生理的役割

研究課題名(英文)Renal tubular transept function and physiological role of proton/lipophilic organic cation antiport system

研究代表者

橋本 征也 (HASHIMOTO, Yukiya)

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・教授

研究者番号：90228429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓における脂溶性カチオンの輸送機構と生理的役割を明らかにする目的で、培養イヌ、ブタ、ヒト腎尿細管細胞における脂溶性カチオンの取り込み活性を測定するとともに、ラットにおける腎排泄クリアランスを評価した。その結果、尿細管細胞においては種を超えて、新たなプロトン/脂溶性カチオン対向輸送系が発現しているとともに、ラットにおいて脂溶性カチオンが尿細管分泌を受けること、および尿のアルカリ化によって、分泌が低下することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では培養腎上皮細胞およびラットを用いて、脂溶性有機カチオンの尿細管分泌には、水溶性カチオンの輸送トランスポーターであるMATEとは異なるプロトン/脂溶性カチオン対向輸送系が関わることを示した。また、酸性リン脂質を添加したリボソームを作成することによって、脂溶性カチオンの輸送が酸性リン脂質によって顕著に増加することから、プロトン/脂溶性カチオン対向輸送系の分子実体は、従来予想されてきたタンパク質によって構成されるトランスポーターではない可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate renal tubular excretion of lipophilic organic cations, we used MDCK, LLC-PK1, and HEK293 cells. In three cell lines, lipophilic organic cations were transported via the proton anti-transport system. In addition, renal tubular excretion was evaluated in rats. Lipophilic organic cations were excrete via renal tubular secretion in rats, and alkalization of urine reduced the renal tubular secretion. These results indicated that lipophilic organic cations are excreted via proton/lipophilic cation anti-transport system in vitro and vivo.

研究分野：薬物動態学

キーワード：キニジン ビソプロロール 尿細管分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

水溶性の有機カチオンの腎排泄(尿細管分泌)は、尿細管上皮細胞の側底膜に存在する OCT と呼ばれる膜電位依存型のトランスポーターと、管腔側膜に発現する MATE と呼ばれるプロトンとの対向輸送型のトランスポーターが協働的に機能して行われる。その代表的な基質は、テトラエチルアンモニウム (TEA) やメトホルミンであり、シメチジンやプロカインアミドも基質として認識される。しかし、キニジンのような脂溶性が高い有機カチオンの多くは、OCT や MATE の基質としては認識されないことが明らかとなってきた。一方、最近申請者は、イヌ腎上皮由来 MDCK 細胞を用いてキニジンの取り込み・排出実験を行なった。その結果、MDCK 細胞におけるキニジンの取り込みは細胞外液の酸性化によって減少し、塩化アンモニウムの前処理による細胞内の酸性化によって取り込みが増加するのに対して、塩化アンモニウムの急性処理による細胞内のアルカリ化によって取り込みが減少することから、プロトンとの対向輸送によってキニジンが取り込まれることが明らかとなった。この輸送系は 4 °C で顕著に活性が低下するが、細胞外 Na や K 濃度の影響を受けないことから、Na は駆動力とはならず、また膜電位の影響も無いことが分かった。さらに、MDCK 細胞からのキニジンの排出に対する細胞外 pH の影響を評価したところ、細胞外酸性化によってキニジンの排出が促進されることから、脂溶性カチオンの尿細管分泌にこの輸送系が関わる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

この MDCK 細胞におけるプロトン / 脂溶性カチオン対向輸送系が、イヌという種を超えて存在し、薬物の尿細管分泌に対して生理学的な役割を担うことを、MDCK 以外の腎上皮細胞およびラットを用いて評価する。また、このプロトン / 脂溶性カチオン対向輸送系の分子実体の解明を目指して研究を追加する。

3. 研究の方法

ブタ腎上皮由来 LLC-PK1 細胞を用いてキニジンと臨床的に繁用されるピソプロロールの取り込み・排出実験を行うとともに、ラットにおけるピソプロロールの腎排泄クリアランスを測定する。また、ヒト腎由来 HEK293 細胞を用いて、キニジンの取り込みを評価するとともに、臨床的に繁用されるフレカイニドのラットにおける腎排泄クリアランスを測定する。さらに、中性リン脂質に酸性リン脂質を添加したリポソームを作成し、ピソプロロールの取り込みの増加を評価することによって、腎臓におけるプロトン / 脂溶性カチオン対向輸送系の分子実体に対して考察を加える。

4. 研究成果

ブタ腎上皮由来 LLC-PK1 細胞、およびヒト腎由来 HEK293 細胞におけるキニジンの取り込みは細胞外 pH の酸性化によって減少し、塩化アンモニウムの前処理による細胞内の酸性化によって取り込みが増加するのに対して、塩化アンモニウムの急性処理による細胞内のアルカリ化によって取り込みが減少することから、MDCK 細胞と同様にプロトン / 脂溶性カチオン対向輸送系が、イヌのみならずブタやヒトにおいても発現していると考えられた。また、ラットにおけるピソプロロールとフレカイニドの腎排泄クリアランスは、糸球体ろ過速度を有意に超えており、また NaHCO₃ をラットに与えて尿 pH をアルカリ化させることによって、顕著に低下することから、ラットにおいても両薬物がプロトンとの対向輸送によって尿細管分泌を受けていることが明らかとなった。

一方、ホスファチジルコリン (PC) にホスファチジルセリン (PS) を添加したリポソームを作成し、ピソプロロールの取り込みを評価したところ、PC 単独で作成したリポソームに比べ顕著に増加したことから、酸性リン脂質が脂溶性カチオンの輸送に関わるものと考えられた。水溶性カチオンの腎上皮細胞における輸送に MATE と呼ばれるタンパク質が関わることが知られているのに対し、脂溶性カチオンではタンパク質以外の生体成分が関わるとの知見は我々の研究成果が初めてであり、学術的価値が高いものと考えられた。

一方、HEK293 細胞では基質の取り込み活性と基質の脂溶性や極性表面積と有意な相関が認められたのに対し、PC / PS リポソームでは、基質の取り込み活性と基質の極性表面積との間に

は有意な相関が認められなかったことから、PS 以外の生体成分が脂溶性カチオンの尿細管分泌に関わることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 松浦佳輔、南部翔、池田恵介、橋本征也	4. 巻 47
2. 論文標題 ブタ腎上皮LLC-PK1細胞と5成分含有リボソームにおける脂溶性カチオン輸送の類似性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医療薬学	6. 最初と最後の頁 185-191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松浦佳輔、池田恵介、中野実、橋本征也	4. 巻 46
2. 論文標題 ホスファチジルコリン・ホスファチジルセリン含有リボソームにおけるピソプロロールの取り込み特性： 尿細管プロトン/脂溶性カチオン対向輸送系との比較	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医療薬学	6. 最初と最後の頁 38-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------