

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790150

研究課題名（和文）

病態時におけるIgGの全身・組織細胞動態およびFcRnの発現・機能の変動解析

研究課題名（英文）

Pharmacokinetics of IgG and FcRn expression under normal and disease conditions

研究代表者

永井 純也（NAGAI JUNYA）

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20301301

研究成果の概要（和文）：

本研究では、正常時および病態時におけるIgGの体内動態およびFcRnの発現について解析するとともに、培養腸および腎上皮細胞におけるIgG輸送特性について検討した。その結果、シスプラチン誘発腎障害マウスにおいて、FITC-IgGの血漿中半減期や腎におけるFcRn mRNA発現は変動しなかったものの、FITC-IgGの腎蓄積量は正常群より有意に増加した。また、腸由来Caco-2細胞および腎尿細管由来OK細胞におけるFITC-IgG取り込みは、それぞれFcRn介在性エンドサイトーシスおよびメガリン/キュービリン介在性エンドサイトーシスが関与することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed the pharmacokinetics of IgG and FcRn expression under normal and disease conditions. In addition, the transport mechanisms of IgG in cultured intestine and kidney epithelial cells were investigated. In rats with CDDP-induced nephrotoxicity, there were no changes in the plasma half life of FITC-IgG and renal FcRn mRNA expression when compared to control rats. On the other hand, renal accumulation of FITC-IgG in rats with CDDP-induced nephrotoxicity was significantly higher than that in control rats. Furthermore, we found that the uptakes of FITC-IgG by human intestinal Caco-2 cells and opossum kidney OK cells are due to FcRn-mediated and megalin/cubilin-mediated endocytosis, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：抗体(IgG)、レセプター、エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な疾患の発症機構が分子レベルで急速に解明されていることに伴い、特定の分子をターゲットとする分子標的薬の

開発が活発に進められている。中でも、IgGを基本構造とする抗体医薬はその代表的なものであり、世界中において熾烈な開発競争が繰り広げられている。最近、IgGの組

織細胞動態に FcRn と呼ばれるレセプターが極めて重要な役割を担っていることがわかってきた。しかし、抗体医薬は様々な疾患を有する患者に投与される可能性があるにも関わらず、そのような疾患時において、FcRn の発現や機能がどのように影響を受け、また、その結果として、IgG の全身動態がどのように変化するかなどについては、本研究の申請時点においてほとんど情報が無いという現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、病態時あるいは薬物投与時における IgG の体内動態変動と FcRn の発現・機能変化との関係について精査することを目的とした。そこで、抗腫瘍薬シスプラチン (CDDP) の投与によって惹起した腎障害誘発マウスにおける IgG の体内動態および組織移行性について、対照群と比較検討した。

また、IgG 輸送を担う受容体として FcRn が発現していることが報告されている小腸および腎近位尿管上皮細胞における IgG の輸送機構を明確にすることを目的として、腸由来培養細胞 Caco-2 及び培養腎上皮細胞 OK を用いた FITC-IgG の細胞内移行特性についても解析を行った。

3. 研究の方法

In vivo 全身動態解析 : ddy 系マウスの尾静脈から FITC 標識ヒト IgG (FITC-IgG) (50 mg/kg) を単回投与し、投与後 15 日間にわたり経日的に採血した。血漿サンプルを SDS-PAGE 後、イメージアナライザーにより血漿中 FITC-IgG 濃度を定量した。CDDP の投与は、腹腔内に 5 mg/kg を単回または 7 日おきに計 3 回投与した。腎障害の誘発は、血中尿素窒素 BUN を指標として確認した (対照群 : 17.2 ± 0.8 mg/dL, CDDP 投与群 : 48.5 ± 3.8 mg/dL)。腎に蓄積した FITC-IgG 量は、FITC-IgG 投与 3 日後に摘出した腎をホモジナイズし、遠心後の上清の蛍光強度を蛍光分光光度計で測定することで定量した。また、腎ホモジネート中におけるインタクトな FITC-IgG とその分解物由来の蛍光を分離評価するため、遠心後の上清画分を 5% トリクロロ酢酸で処理した。

mRNA 発現解析 : 生食あるいは CDDP を投与したマウスから摘出した腎より total RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により mRNA 発現解析を行った。

細胞培養 : ヒト腸由来 Caco-2 細胞は、10% ウシ胎児血清、1% 非必須アミノ酸、1% L-グルタミン、100 IU/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシンを含む DMEM を用い、CO₂

インキュベーター (37°C、5% CO₂-95% air) 内で培養した。培地交換は 2 日毎、継代は 5~7 日毎に行い、実験には 20~22 日間培養した細胞を用いた。フクロネズミ腎由来 OK 細胞は 10% ウシ胎児血清を含む Medium 199 を用い、CO₂ インキュベーター内で培養した。培地交換は 2 日毎、継代は 5~7 日毎に行い、実験には 5~7 日間培養した細胞を用いた。

FITC-IgG の細胞内移行特性解析 : 12-well plate に培養した Caco-2 細胞あるいは OK 細胞に PBS (G) を加えてプレインキュベーションした後、FITC-IgG を含む溶液を添加し、37°C あるいは 4°C で一定時間インキュベーションを行った。その後、氷冷 PBS (+) を加えて洗浄し、セルスクレーパーでかきとった細胞を遠心によって洗浄し、0.1% Triton X-100 溶液で可溶化したサンプル中に含まれる蛍光強度を測定した。タンパク定量は Bradford 法により行った。なお、37°C 及び 4°C 条件下における FITC-IgG 量を、それぞれ association 及び binding 量を表すものとして評価した。

4. 研究成果

CDDP 誘発腎障害時における FITC-IgG の体内動態

まず、本実験における in vivo 解析の妥当性を評価するため、マウスに FITC-IgG を投与後 2 日目から連続 4 日間にわたってヒト γ-グロブリンの大量投与を行った。その結果、血漿中 FITC-IgG 濃度は、ヒト γ-グロブリンの大量投与によって顕著に低下することが認められた。この結果は、ヒト γ-グロブリンの大量投与によって、エンドソームにおける FcRn への FITC-IgG の結合が競合的に阻害されたために、血中にリサイクリングされずにリソソームに移行したものと考えられ、マウスにおける FITC-IgG 動態に FcRn が関与していることを示すものである。そこで、次に、CDDP 投与群における FITC-IgG の血漿中濃度推移を調べた結果、対照群とほぼ同様のプロファイルであった。一方、FITC-IgG 投与後 3 日目における腎蓄積量は、対照群に比べ、CDDP 投与群で約 1.8 倍上昇していた。

CDDP 誘発腎障害時におけるレセプター発現変動

また、同様の処置条件で mRNA 発現解析を行ったところ、FcRn mRNA 発現レベルには有意な変動は観察されなかったが、megalin および cubilin の mRNA 発現レベルはそれぞれ 2.3 倍および 2.5 倍に増加していることが認められた。

Caco-2 細胞における FITC-IgG の輸送特性解析

Caco-2 細胞における FITC-IgG 取り込みの温度及び pH 依存性について検討した。その結果、FITC-IgG の association 及び binding は pH 7.4 条件下と比較して、pH 6.0 条件下で有意に高く、pH 依存性が認められた。FcRn と IgG の結合親和性は酸性条件下で高いことから、Caco-2 細胞における FITC-IgG の細胞内移行過程に FcRn が関与する可能性が示唆された。次に、エンドソーム酸性化阻害剤処理による FITC-IgG 取り込みに及ぼす影響について検討した。その結果、エンドソーム酸性化阻害剤処理によって、pH 6.0 条件下における FITC-IgG の association は有意に上昇した。この結果は、エンドソーム酸性化の阻害によって、エンドソーム内における FcRn と FITC-IgG の結合が抑制され、FcRn を介した細胞内からの放出が低下したことによるものと考えられた。また、FITC-IgG の association はエネルギー代謝阻害剤処理で有意に低下したものの、クラスリンあるいはカベオラ介在性エンドサイトーシス阻害剤処理による影響を受けなかった。これらの結果より、Caco-2 細胞における FITC-IgG の細胞内移行に FcRn が関与する可能性が示されたが、その内在化はクラスリンやカベオラに非依存的なエンドサイトーシス経路を介することが示唆された。

OK 細胞における IgG の輸送特性解析

OK 細胞における FITC-IgG 取り込みの温度及び pH 依存性について検討したところ、FITC-IgG の association は pH 6.0 条件下と比較し、pH 7.4 条件下において有意に高いことが示され、Caco-2 細胞の場合とは対照的なパターンを示した。次に、pH 7.4 条件下における FITC-IgG 取り込みに及ぼすエンドソーム酸性化阻害剤処理の影響について検討した。その結果、FITC-IgG の association はエンドソーム酸性化阻害剤処理により有意に低下した。また、pH 7.4 条件下における FITC-IgG の association は、エネルギー代謝阻害剤及びクラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤処理により有意に低下し、FITC-IgG の細胞内移行過程にクラスリン介在性エンドサイトーシスが関与することが示唆された。さらに、FITC-IgG の細胞内移行過程に megalin あるいは cubilin が関与するかについて検討するため、FITC-IgG 取り込みに及ぼす megalin/cubilin リガンド共存の影響について検討した。その結果、FITC-IgG の association は megalin/cubilin リガンドである cytochrome c 及び gentamicin によって濃度依存的に低下し、FITC-IgG の細胞内移行に megalin あるいは cubilin が関与する可能性が示唆された。

本研究によって得られた結果に基づいて

考察した内容を以下に述べる。

まず、CDDP 誘発腎障害モデルマウスを用いた解析から、腎障害時において IgG の血中濃度推移はほとんど変化しないものの、腎への IgG 蓄積量が増加することが示された。この結果は、正常時においては、ほとんど糸球体ろ過されない IgG が、腎障害に伴う糸球体のサイズバリアー機能の低下によって尿細管腔側への漏出が起これ、尿細管上皮細胞における IgG の再取り込みが増加したためと考えられる。また、尿細管上皮細胞における IgG の取り込みには、アルブミンや低分子量タンパク質などの様々なタンパク質やペプチドを認識するエンドサイトーシスレセプターであるメガリンやキュビリンが関与する可能性が培養腎上皮細胞 OK を用いた解析によって示唆された。CDDP 誘発腎障害時に観察されたメガリンおよびキュビリンの mRNA 発現の上昇が観察されたが、これらのレセプター mRNA 発現の上昇は、正常時に比べ尿細管腔中に過剰に漏出してきたタンパク質やペプチドを回収するための代償機構が働いて誘導されたことによる可能性も考えられるが、この点について更なる精査が必要である。また、培養腸上皮細胞を用いた解析から、消化管上皮細胞における IgG の取り込みに FcRn 介在性エンドサイトーシスが関与することが示され、腎尿細管上皮細胞とは異なる機構であることが示唆された。このように各組織細胞の特性やその近傍の環境に関連して、IgG 輸送が営まれているものと考えられ、IgG の組織細胞動態は、疾患の状態や特徴に応じて複雑に変動する可能性が考えられる。今後、様々な疾患モデルを用いて IgG 動態をさらに詳細に解析していく必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Nagai, J., Takano, M.: Molecular-targeted approaches to reduce renal accumulation of nephrotoxic drugs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*; 査読有り, 6: 1125-1138 (2010).

2. Sato, K., Nagai, J., Mitsui, N., Yumoto, R., Takano, M.: Effects of endocytosis inhibitors on internalization of human IgG by Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Life Sci.*, 査読有り, 85: 800-807 (2009).

[学会発表] (計 7 件)

1. 岡田結実、永井純也、佐藤公也、湯元良子、高野幹久、ヒト腎近位尿細管上皮細胞由来

HK-2 におけるアルブミン取り込み特性の解析、日本薬学会第 131 年会、平成 23 年 3 月 28～31 日（誌上発表）

2. 永井純也、三牧沙織、佐藤公也、湯元良子、高野幹久、腎障害性薬物シスプラチン投与時における IgG 動態の変動解析、第 32 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、平成 22 年 11 月 29～30 日、富山市
3. 米田卓司、永井純也、澤田健史、湯元良子、高野幹久、培養腎上皮 OK 細胞におけるアミノグリコシド系抗生物質の取り込みに及ぼすプロタミンの影響、第 49 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、平成 22 年 11 月 6～7 日、米子市
4. 佐藤公也、永井純也、湯元良子、高野幹久、培養腎上皮細胞における IgG 輸送機構の解析、日本薬物動態学会第 25 回年会、平成 22 年 10 月 7～9 日、さいたま市
5. 澤田健史、永井純也、湯元良子、高野幹久、アミノグリコシド腎移行阻害能を有するペプチドの動態制御、日本薬剤学会第 25 年会、平成 22 年 5 月 12～14 日、徳島市
6. 三牧沙織、永井純也、湯元良子、高野幹久、IgG の体内動態に及ぼすシスプラチン投与の影響、日本薬学会 第 130 年会、平成 22 年 3 月 28～30 日、岡山市
7. 佐藤公也、永井純也、満井尚子、湯元良子、高野幹久、ヒト腸由来 Caco-2 細胞における FITC-IgG の細胞内移行機構の解析、日本薬物動態学会第 24 回年会、平成 21 年 11 月 27～29 日、京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 純也 (NAGAI JUNYA)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授

研究者番号：20301301

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：