

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590180

研究課題名(和文)炎症性サイトカインによる尿細管薬物トランスポータの機能制御とその役割解明

研究課題名(英文)Regulation of functions of drug transporters in renal tubules by inflammatory cytokines and implication of its significance

研究代表者

奥田 真弘 (OKUDA, Masahiro)

三重大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70252426

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：リポポリ多糖類(LPS)投与により作製した炎症モデルラットにメトトレキサート(MTX)を静脈内投与したところ、LPSラットではMTXの血漿クリアランス(CL)が対照に比べ約50%まで低下した。LPS処置によるMTXの腎CL低下には、糸球体ろ過速度に加え尿細管分泌低下の関与が示唆された。MTXの腎組織/血漿中濃度比、腎組織から管腔への排泄CLはLPSラットで低下し、有機アニオントランスポータ群(rOAT1、rOAT3、rMRP2、rMRP4)の発現量低下と対応していた。結果、LPS処置ラットではMTXの腎CLが顕著に低下し、糸球体ろ過低下と有機アニオントランスポータの発現低下の寄与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Plasma clearance of methotrexate (MTX) decreased about 50% in the inflammatory rat model, which is prepared by the administration of lipopolysaccharide (LPS). Involvement of glomerular filtration as well as tubular secretion were suggested in the decreased renal clearance of MTX by LPS. Renal tissue/plasma concentration ratio and efflux clearance from renal tissue to the tubular lumen also decreased in LPS rats, and were comparable to the decreased expression levels of organic anion transporters (rOAT1, rOAT3, rMRP2, rMRP4) in the kidney. In conclusion, the renal clearance of MTX markedly decreased in the LPS-treated rats and the contribution of decreased glomerular filtration as well as decreased expression levels of organic anion transporters in the renal tubules were suggested.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：メトトレキサート リポ多糖 ラット 有機アニオントランスポータ 腎クリアランス

1. 研究開始当初の背景

リポ多糖 (LPS) はグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であり、脂質及び多糖から構成される糖脂質である。LPS は内毒素 (エンドトキシン) であり、菌体より大量の LPS が生体内に放出されると、Toll 様受容体 4 を介したシグナル伝達が活性化されサイトカイン産生が亢進する。この細菌由来の LPS によるサイトカイン過剰産生によって引き起こされる病態が敗血症である。敗血症の治療法は現在でも様々な研究がなされ、LPS 投与モデル動物が汎用されている。またサイトカインは炎症反応を司る重要な化学伝達物質の一つである。

腎臓は、糸球体ろ過や尿細管分泌、再吸収の過程を経て生体内不要物を尿中へ排泄している。尿細管分泌の過程において、腎上皮細胞の側底膜側および刷子縁膜側にはそれぞれトランスポーターが発現し、これらは、基質物質を速やかに尿中へ除去する重要な役割を果たしている。葉酸代謝拮抗作用により抗がん作用を示すメトトレキサートは、腎排泄型の薬物であり、ヒトにおける未変化体の尿中排泄率は投与後 4 時間で平均 65%、24 時間で平均 90%あるいはそれ以上である。

メトトレキサートは様々なトランスポーターの基質となることが報告されている。そのうち尿細管分泌に関わるトランスポーターとして、側底膜側では SLC トランスポーターである腎有機アニオントランスポーター (Organic anion transporters; OATs)、刷子縁膜側では ABC トランスポーターである多剤耐性関連タンパク質 (Multidrug resistance-associated proteins; MRPs) 等が報告されている。メトトレキサートは糸球体ろ過に対して尿細管分泌の寄与が 2 倍程度と大きいことが知られていることから、これらトランスポーターの機能と発現量の変動は、その腎排泄過程に大きな影響を与えることが予想される。我々の研究室ではメトトレキサートの腎排泄が発熱時に低下することを見出しているがその要因解明には至っていない。

一般に敗血症時には腎糸球体ろ過速度が低下することが知られている。近年、ラットにおいて LPS の投与量に依存的に rOAT1、rOAT3 のタンパク質発現量が減少することが報告されている。さらに LPS 投与後メトトレキサートの腎クリアランスが低下し、腎臓においては rMRPs のタンパク質発現量が減少することも報告されている。しかし、LPS 誘発炎症時におけるメトトレキサートの腎排泄過程において、これら 3 つの変動因子 (糸球体ろ過速度の低下、側底膜側に発現している OATs のタンパク質発現量の減少、刷子縁膜側に発現している MRPs のタンパク質発現量の低下) の寄与とその相関については詳細な検討がなされていない。また近年、炎症性サイトカインが肝臓での種々のトランスポーターの機能と発現量を調節していると報告されているが、腎臓での OATs ならびに MRPs の機

能と発現量に対する炎症性サイトカインの影響はこれまでに報告されていない。

2. 研究の目的

炎症時の薬物腎排泄挙動の変動とその原因解明を目的として、LPS 投与により炎症を惹起したラットにおけるメトトレキサートの体内動態変動に関する詳細な検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 試薬・器具

メトトレキサートは和光純薬工業のもの、LPS はシグマアルドリッチ、その他の試薬は市販特級品を用いた。

(2) 実験

実験動物

動物実験は三重大学動物実験に関する指針を遵守して行った。Wistar 系雄性ラット (SLC) 9 週齢を自由摂餌、自由飲水下で飼育した。実験開始時における体重は 190 - 240 g であった。LPS 誘発炎症ラット (以下 LPS ラット) は、生理食塩液に溶解した LPS (4 mg/kg) を腹腔内投与することにより作成した。Sham ラットは生理食塩液を腹腔内投与することにより作成した。

in vivo 全身クリアランス実験

ラットをペントバルビタール (50 mg/mL) 麻酔下、頸静脈にカニユーレ (SP45、夏目製作所) を留置し、皮下を通して頸背部へ迂回することでフリームービング化した。なお、凝血防止のためカニユーレにはヘパリン (50 IU/mL) を満たしておいた。施術後、生理食塩液に溶解した LPS または生理食塩液のみをラットに投与し、それぞれ LPS 投与ラット、Sham ラットとした。投与後 12 時間後、メトトレキサート (5 mg/kg) をフリームービングより瞬時投与後、経時的に採血を行った。メトトレキサートの薬物血中濃度 時間曲線下面積 (AUC) を算出し、投与量/AUC から全身クリアランス (CL_{tot}) を算出した。また 2-コンパートメントモデルを用いた解析により、中心コンパートメントからの消失速度定数 (K_{el})、並びに分布容積 (V_d) を算出した。なお解析には WAPAS (パソコン用薬物動態解析ソフトウェア) を用い、重みを 2 に設定した。

in vivo 腎クリアランス実験

LPS 投与 12 時間後のラット (LPS ラット) と、Sham ラットをペントバルビタール (50 mg/ml) 麻酔下で、大腿静脈、大腿動脈および膀胱にカニユーレ (SP45、夏目製作所) を留置した。カニユーレ留置時に大腿動脈から採血し (500 μ L)、薬物血中濃度測定用の対照検体とした。なお、凝血防止のため大腿部カニユーレにはヘパリン (50 IU/mL) を満たしておいた。腎クリアランス実験は Habu 等

の方法に準じて行った (Biochem Pharmacol 2003; 66: 1107-14)。薬物投与は、速やかに定常状態を達成するため初回瞬時投与と持続注入によって行った。メトトレキサートの初回瞬時投与量を、86 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に設定し、イヌリン (73.4 mg/kg)、マンニトール (146 mg/kg) とともに生理食塩水に溶解し、カニューレを介して大腿静脈から注入した。その後、定速 (2.2 mL/hr) で持続注入 (メトトレキサート 61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ およびイヌリン 20 mg/mL 、マンニトール 40 mg/mL) を開始した。薬物投与直後から 60 分間を定常状態に達するまでの安定期間とし、その後、採尿及び採血を行った。採尿は 10 分毎に 3 回行い、比重を 1 とし測定した。採血は採尿時間の中間地点で行い、遠心分離後の血漿をサンプルとした。また、糸球体ろ過速度はイヌリンの腎クリアランスを測定することにより評価した。

ウエスタンブロット分析

ラットを断頭し直後に腎臓を摘出後、3 倍容量のホモジナイゼーション用緩衝液 (0.25M Sucrose, 30mM Histidine, 1mM EDTA-2Na-2H₂O) を加え、テフロンホモジナイザーでホモジナイズした後、1,000 \times g, 4 で 15 分間遠心分離した。上清をさらに 7,000 \times g, 4 で 15 分間遠心分離した後、上清を 100,000 \times g, 4 で 45 分間遠心分離した。ペレットを氷冷したホモジナイゼーション用緩衝液に懸濁した後、ウエスタンブロット分析用の試料とした。試料 (タンパク質として 15 μg) を 1M メルカプトエタノールの存在下、10% SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜上に転写後、TBS-T (20 mM Tris/HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween20, pH7.5) で洗浄した。室温下、5% スキムミルクで 1 時間ブロッキングし、抗 rOAT1 ポリクローナル抗体 (1:1000) または抗 rOAT3 ポリクローナル抗体 (1:1000)、抗 rMRP4 ポリクローナル抗体 (1:500) とともに 4 で、一晚反応させた。PVDF 膜を TBS-T で洗浄後、HRP 標識した二次抗体を用いた化学発色法によって発色させ、Ras4000 (富士フィルム) を用いてバンド強度を数値化し、ImageJ を用いて定量した。なお、タンパク質は、Bradford の方法に従い、IgG をスタンダードとして測定した (Biochemistry 1976; 72: 248-54)。なおタンパク質発現量は villin の発現量を用いて補正した。

メトトレキサート濃度の測定

血漿中のメトトレキサート濃度は、Huo 等の方法に準じて測定した (Pharm Clin Res 2007; 15: 390-2)。すなわち、ラット血漿 200 μL に 50 μL の 10% HClO₄ を加え混和した後、14,000 \times g, 4 で 10 分間遠心分離した。上清を HPLC の分析試料とした。また、メトトレキサートのタンパク非結合率は血清を Ultra Centrifugal Filter (10K membrane,

Amicon) を用いて遠心した後、ろ過後の薬物濃度をろ過前の薬物濃度で除することによって算出した。ただし、移動相: 50 mM 酢酸アンモニウム液 / アセトニトリル = 93/7 (v/v)、検出波長 303 nm に設定した。HPLC 分析に用いた機器は、分光検出器 SPD-20A, LC-20AD ポンプ、DGU-20A3 デガッサー (以上、島津製作所) 分析カラム 5C18-AR-4.6 ID \times 150 mm (COSMOSIL) とした。

検定

データは平均 \pm S.D. で表記し、2 群間比較の検定には unpaired Student's t-test を用いた。酸化ストレス起因性肝虚血再灌流 (I/R) 障害モデルラットの作成

4. 研究成果

メトトレキサート (5 mg/kg) を大腿静脈より急速単回投与した後のメトトレキサート血中濃度の時間推移を Fig. 1 に示す。メトトレキサートの AUC は LPS 投与ラットでは Sham ラットに比べて約 2 倍に上昇し (Sham ラット及び LPS 投与ラットそれぞれ $135 \pm 16 \mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$, $279 \pm 62 \mu\text{g} \cdot \text{min}/\text{mL}$, $p < 0.01$)、CL_{tot} も約 1/2 に減少していた ($37.5 \pm 4.43 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$ vs $18.6 \pm 4.10 \text{ mL}/\text{min}/\text{kg}$, $p < 0.001$)。またメトトレキサート血中濃度時間推移曲線を 2-コンパートメントモデルに当てはめた解析では、中心コンパートメントの Ke₁ は LPS 投与ラットでは Sham ラットに比べて有意に低下していたが (Sham ラット及び LPS 投与ラットそれぞれ $0.112 \pm 0.019 \text{ min}^{-1}$, $0.050 \pm 0.010 \text{ min}^{-1}$ vs, $p < 0.01$)、V_d には両群間での差が認められなかった。メトトレキサートは、大部分が腎臓から未変化体として排泄されることから、LPS 処置によるメトトレキサートの消失遅延は、メトトレキサートの尿中排泄が何らかの要因によって低下したものと推察された。

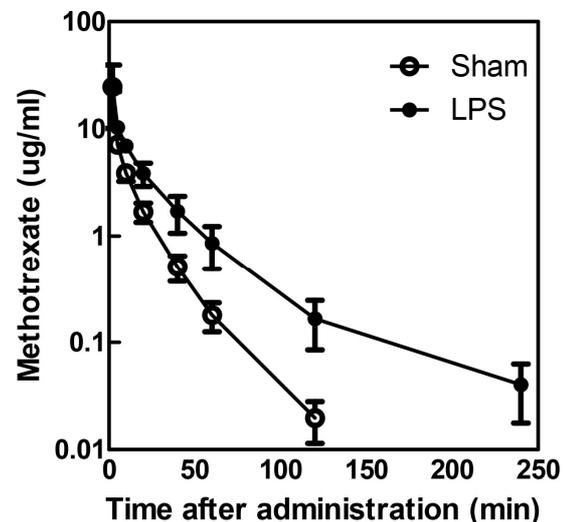


Fig. 1 Sham ラットと LPS ラットにおけるメトトレキサートの血中濃度推移

次に *in vivo* 腎クリアランス実験を行った。定常状態でのメトトレキサート血中濃度は Sham ラットに比べ LPS 投与ラットでは有意に上昇し ($0.71 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$ vs $2.82 \pm 0.92 \mu\text{g/mL}$, $p < 0.01$)、 CL_{tot} も低下していた ($3.19 \pm 0.29 \text{ mL/min}$ vs $0.85 \pm 0.25 \text{ mL/min}$, $p < 0.001$)。また、メトトレキサートの CLR は LPS 投与ラットでは Sham ラットに比べ顕著に低下し ($1.64 \pm 0.72 \text{ mL/min}$ vs $0.15 \pm 0.04 \text{ mL/min}$, $p < 0.01$)、糸球体ろ過速度も有意に低下していたが ($1.41 \pm 0.55 \text{ mL/min}$ vs $0.14 \pm 0.04 \text{ mL/min}$, $p < 0.01$)、メトトレキサートのタンパク結合率には両群間での差は認められなかった。メトトレキサートの未変化体の糸球体ろ過速度は有意に低下し ($0.77 \pm 0.28 \text{ mL/min}$ vs $0.10 \pm 0.05 \text{ mL/min}$, $p < 0.01$)、尿細管分泌も顕著に低下していた ($0.87 \pm 0.46 \text{ mL/min}$ vs $0.05 \pm 0.04 \text{ mL/min}$, $p < 0.05$)。よって LPS ラットにおけるメトトレキサートの排泄遅延は、腎臓での GFR の低下に伴う糸球体ろ過量の低下ならびに尿細管分泌の低下が原因であると考えられた。

メトトレキサートの腎組織/血中薬物濃度比は Sham ラットに比べて LPS 投与ラットで

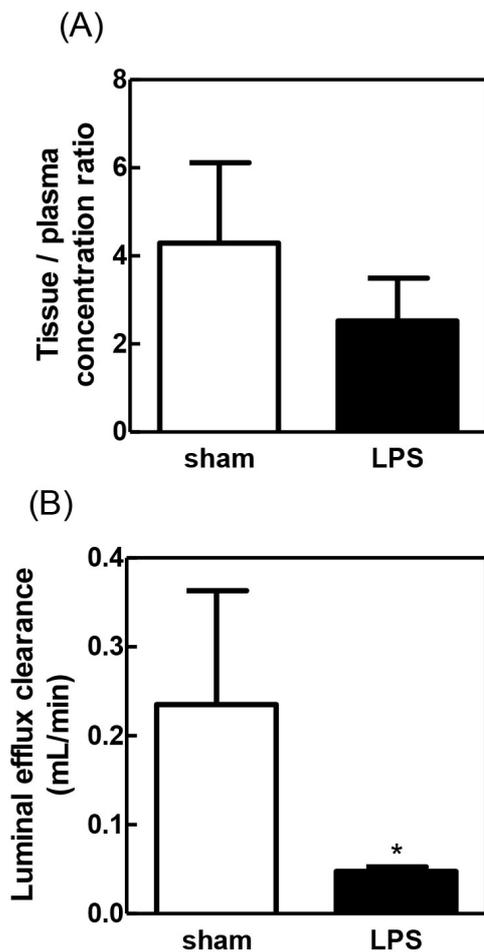


Fig. 2 腎組織/血漿中濃度比(A)及び管腔中排泄クリアランス(B)に及ぼすLPS投与の影響

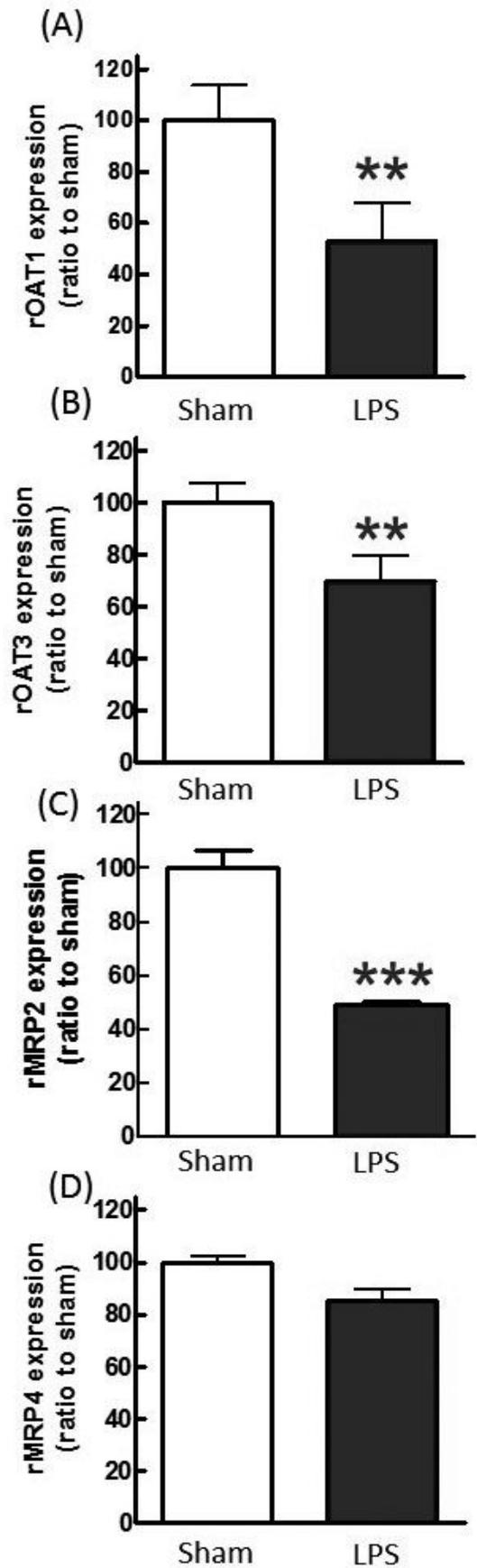


Fig. 3 ラット腎皮質粗膜画分の rOAT1 (A)、rOAT3 (B)、rMRP2 (C)及び rMRP4 (D)タンパク発現量に及ぼすLPS投与の影響

は、有意な差ではないものの減少傾向が認められた (4.29 ± 0.91 vs 2.53 ± 0.49 , $p=0.14$)。また腎組織から管腔側への排泄クリアランスは Sham ラットに比べて LPS 投与ラットでは有意に低下していた (0.24 ± 0.06 mL/min vs 0.05 ± 0.003 mL/min, $p<0.05$) (Fig. 2)。

LPS 投与ラット及び Sham ラットから抽出した腎皮質の粗膜画分を調製し、抗 rOAT1 抗体または抗 rOAT3 抗体、抗 rMRP4 抗体を用いたウエスタンブロット分析を行ったところ、腎皮質の側底膜に発現する rOAT1、rOAT3 のタンパク質発現量は、LPS 投与ラットでは Sham ラットに比べてそれぞれ有意に減少していた (rOAT1: $100 \pm 6.8\%$ vs $52.8 \pm 7.7\%$, $p<0.01$. rOAT3: $100 \pm 3.9\%$ vs $70.0 \pm 4.9\%$, $p<0.01$) (Fig. 3)。また刷子縁膜に発現する rMRP2、rMRP4 の発現量も LPS 投与ラットでは Sham ラットに比べて有意に低下していた (rMRP2: $100 \pm 3.8\%$ vs $49.3 \pm 0.6\%$, $p<0.001$. rMRP4: $100 \pm 1.2\%$ vs $85.0 \pm 2.2\%$, $p<0.001$) (Fig. 3)。また、免疫染色の予備検討では、LPS ラットでは MRP4 の刷子縁膜局在が拡散傾向にあった (データ非掲載)。メトトレキサートの腎組織/血漿中薬物濃度比は 58% まで低下し、OAT1 及び OAT3 のタンパク質発現量はそれぞれ Sham ラットの 53% 及び 70% まで低下していたことから、これらトランスポータのタンパク質発現量の低下がメトトレキサートの腎組織への取り込み量の低下に深く関与していることが明らかとなった。一方で、メトトレキサートの腎組織から管腔中への排泄クリアランスは約 20% に低下し、MRP4 のタンパク質発現量の低下 (Sham の約 85%) と対応していないと考えられる。メトトレキサートの腎組織から管腔側への排泄クリアランスの低下は、MRPs のタンパク質発現量の減少以外の要因も大きく関与していると考えられ、今後もより詳細な検討が必要であると考えられる。

以上 LPS 投与ラットを用いた解析の結果、LPS 誘発炎症時におけるメトトレキサートの腎排泄遅延の一因として、腎尿細管におけるトランスポータの関与が示唆された。今後、炎症時におけるメトトレキサートの排泄遅延機構を明らかにすることで、メトトレキサートの臨床投与と設計に応用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Ikemura K, Iwamoto T, Okuda M. MicroRNAs as regulators of drug transporters, drug-metabolizing enzymes, and tight junctions: Implication for intestinal barrier function. *Pharmacol Ther.* 2014 Mar 11. doi: 10.1016/j.pharmthera.2014.03.002 [Epub ahead of print]. (査読有)

Kurata T, Iwamoto T, Kawahara Y, Okuda M. Characteristics of pemetrexed transport by renal basolateral organic anion transporter hOAT3. *Drug Metab Pharmacokinet* 29(2): 148-153 (2014). (査読有)

Ikemura K, Nakagawa E, Kurata K, Iwamoto T, Okuda M. Altered pharmacokinetics of cimetidine caused by down-regulation of renal rat organic cation transporter 2 (rOCT2) after liver ischemia-reperfusion injury. *Drug Metab Pharmacokinet* 28(6): 504-509 (2013). (査読有)

Ikemura K, Yamamoto M, Miyazaki S, Mizutani H, Iwamoto T, Okuda M. MicroRNA-145 post-transcriptionally regulates the expression and function of P-glycoprotein in intestinal epithelial cells. *Mol Pharmacol* 83(2): 399-405 (2013). (査読有)

Ikemura K, Inoue K, Mizutani H, Oka H, Iwamoto T, Okuda M. An antioxidant Trolox restores decreased oral absorption of cyclosporine A after liver ischemia-reperfusion through distinct mechanisms between CYP3A and P-glycoprotein in the small intestine. *Eur J Pharmacol* 690(1-3): 192-201 (2012). (査読有)

Iwamoto T, Yuta A, Tabata T, Sugimoto H, Gabazza EC, Hirai H, Kojima S, Okuda M. Evaluation of basophil CD203c as a predictor of carboplatin-related hypersensitivity reaction in patients with gynecologic cancer. *Biol Pharm Bull* 35(9): 1487-1495 (2012). (査読有)

〔学会発表〕(計 6 件)

池村健治、山本弥里、宮崎さおり、水谷秀樹、岩本卓也、奥田真弘、miR-145 による小腸上皮細胞 P-糖蛋白質の転写後発現調節機構、第 59 回日本薬学会東海支部総会・大会、2013 年 7 月 6 日、名城大学八事キャンパス (名古屋市)

池村健治、山本弥里、宮崎さおり、水谷秀樹、岩本卓也、奥田真弘、miR-145 は小腸上皮細胞 P-糖蛋白質の発現・機能調節に関与する、日本薬剤学会第 27 年会、2012 年 5 月 24 日 (神戸市)

倉田朋彦、岩本卓也、河原佑樹、奥田真弘、ペメトレキサートの尿細管分泌機構における有機アニオントランスポーター-3 の役

割、日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 31 日、北海道大学（札幌市）

Tomohiko Kurata, Yuichi Muraki, Takuya Iwamoto, Masahiro Okuda,
Pathophysiological Role of
Chenodeoxycholic Acid on Hepatic
Disposition of Metformin via Organic
Cation Transporter 1 in Acute
Cholestasis、日本薬剤学会第 26 年会、
2011 年 10 月 29 日、タワーホール船堀（東京都江戸川区）

池村健治、井之上浩一、水谷秀樹、岡 尚
男、村木優一、岩本卓也、奥田真弘、肝虚
血再灌流障害時の Cyclosporine A の経口
bioavailability 低下における酸化スト
レスの役割、日本薬剤学会第 26 年会、2011
年 10 月 29 日、タワーホール船堀（東京都
江戸川区）

池村健治、水谷秀樹、岩本卓也、奥田真弘、
虚血再灌流障害時における酸化ストレス
を介した小腸 CYP3A 及び P-糖蛋白質の発
現上昇による cyclosporine A の経口吸収
低下、第 5 回次世代を担う若手医療薬科学
シンポジウム、2011 年 11 月 26 日、名古
屋大学医学部附属病院（名古屋市）

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：マイクロ RNA145(miR-145) による
MDR1/P-糖タンパク質(P-gp)の転写後発現調
節

発明者：池村健治、岩本卓也、奥田真弘

権利者：国立大学法人三重大学、学校法人金
城学院

種類：特許

番号：特願 2012-096869

出願年月日：2012 年 4 月 20 日

国内外の別：国内外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 真弘 (OKUDA Masahiro)

三重大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：70252426

(2) 研究分担者

岩本 卓也 (IWAMOTO Takuya)

三重大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30447867

(3) 連携研究者

該当なし