

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：17401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790187  
 研究課題名（和文）尿毒症物質による薬物動態制御タンパク質機能調節を考慮した薬物の新規個別化投与設計  
 研究課題名（英文）Development of individualized drug therapy based on the regulation of drug metabolism and transport proteins by uremic toxins  
 研究代表者  
 渡邊 博志 (WATANABE HIROSHI)  
 熊本大学・薬学部・准教授  
 研究者番号：70398220

研究成果の概要（和文）：肝薬物代謝酵素発現に及ぼす各種尿毒症物質の影響について検討を行った。その結果、インドキシル硫酸 (IS)、*p*-クレジル硫酸 (PCS) 及び CMPF 添加群では、添加濃度依存的な CYP2E1 及び SULT1A1 発現量の上昇が観察された。一方、intact PTH は SULT1A1 の発現量を上昇させることを見出した。さらに、PCS による尿細管障害の分子機構について検討したところ、PCS は有機アニオントランスポータ(OAT)を介して尿細管上皮細胞に取り込まれた後、NADPH oxidase の活性化を介して活性酸素種(ROS)の産生を亢進させた。この時、TGF-β の発現が亢進することで尿細管障害/腎線維化が惹起されることを見出した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of uremic toxins on protein expression of hepatic drug metabolizing enzymes. As a results, IS, PCS and CMPF increased the expression of CYP2E1 and SULT1A1, and intact PTH also increased SULT1A1 in dose-dependent manner. Next we examined the effect of PCS on renal tubular toxicity. Intracellular accumulation of PCS via OATs in renal tubular cells enhanced NADPH oxidase activity and increased ROS production. This, in turn, triggers the induction of inflammatory cytokines that are involved in renal toxicity.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：尿毒症物質，薬物動態制御タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) においては、腎クリアランスの低下に加え、腎外クリアランスも低下することが、明らかとなってきた。事実、アトルバスタチン、プロプラノロールやテルミサルタンなどの肝代謝型薬物においても、添付文書では高齢者や腎機能低下患者での慎重投与が謳われている薬物も多い。しかしながら、一般に、肝代謝型薬物の場合には、CKD 患者での臨床試験を行わないため、腎外クリアランスの変化に伴う動態特性の変化

は市販後において初めて確認される。そこで、私達は、CKD における腎外クリアランス変動の予測ツールの開発を急務の課題と考え、予測分子マーカーとしての尿毒症物質 (UT) に着目した。

## 2. 研究の目的

(1) 肝薬物代謝酵素発現に及ぼす UT の影響について検討する。

(2) *p*-クレジル硫酸 (PCS) による腎障害進展作用及びその機序について精査する。

### 3. 研究の方法

(1) 健常ラット及びCKDラット(5/6腎臓摘出ラット)肝臓における薬物代謝酵素の発現について Western blot 並びに Real-time PCR を用いて解析した. ラット初代肝由来培養細胞を用いて薬物代謝酵素発現に及ぼす UT の影響について精査した. 健常ラット及びCKDラット肝臓 S9 画分を用いて IS の生合成について評価した.

(2) PCS による腎障害進展作用について, ヒト尿細管上皮細胞(HK-2)細胞を用いて検討した. *In vivo* における PCS の腎障害作用については, CKDラットに 50mg/kg の PCS を連日静脈内投与し, 強制負荷することで評価した.

### 4. 研究成果

(1) UT による肝代謝酵素誘導と IS 生合成自己誘導効果

はじめに, CKD ステージ 5 の透析患者における血清中 IS 濃度を測定した. 血清クレアチニン(Cr)濃度と血清中 IS 濃度との間には患者間で大きな変動があったことから, IS の体内蓄積には腎機能以外の要因が関与している可能性が示唆された(data not shown).

そこで, 次に CKD ラットを用いて検討した. まず, CKD ラットにおける IS 生合成能について, CKD ラット肝臓 S9 画分を用いて評価した. IS の代謝酵素である CYP2E1 および SULT1A1 を含むラット肝臓 S9 画分に, IS の原料であるインドールと, IS の代謝に必要な補酵素である NADPH 及び PAPS を添加し, 37°C でインキュベーション後, 生成した IS 量を HPLC により定量した. その結果, 時間依存的に IS の生成が確認され, CKD ラットでは健常群と比べ, IS 生成量の有意な増大が確認された(図 1).

次に CKD ラットにおける IS 生合成の亢進が, IS 生合成に関わる肝代謝酵素の発現上昇によるものであるか否かを確認するために, 肝臓の CYP2E1 と SULT1A1 の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR により評価した. その結果, CKD ラット肝臓では健常群に比べて, CYP2E1 及び SULT1A1 の mRNA 発現の有意な上昇が観察された(図 2).

さらに CYP2E1 と SULT1A1 の蛋白質発現量を Western Blotting により評価したところ, CKD ラット群において CYP2E1 及び

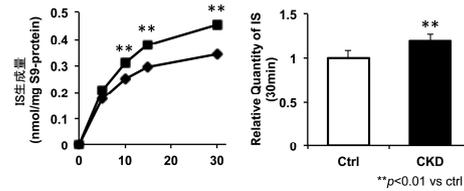


図 1 ラット肝臓 S9 画分を用いた IS 生成反応の時間推移(左)と反応 30 分後の IS 生成量(右)

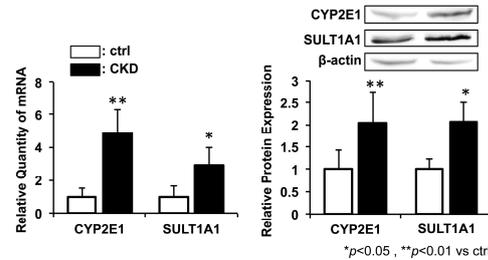


図 2 ラット肝臓における CYP2E1 及び SULT1A1 の発現量: Real time PCR (左) と Western blot (右)

SULT1A1 の発現量の有意な上昇が観察された.

これまでの結果より, CKD ラットにおいて IS の生合成が亢進していることを確認し, また, その際に IS の生合成に関わる酵素 CYP2E1 及び SULT1A1 の発現上昇が確認できた. 以前の報告で, IS が CYP1A2 の発現量を上昇させるといった報告や, PTH が CYP3A2 の発現量を減少させるといった報告もあることから, CKD 時に蓄積する各種 UT が CYP2E1 と SULT1A1 の発現変動に寄与する原因物質であると仮説を立て, ラット初代培養肝細胞を用いて検証した.

10%FBS を含む RPMI1640 で培養したラット初代培養肝細胞に対して, 各種 UT を添加し, 12 時間インキュベートした後, CYP2E1 及び SULT1A1 mRNA 発現の変化を定量的 RT-PCR により検討した. 添加した UT の最終濃度は, Vanholder らが報告した末期腎不全患者における各種 UT の平均血清中濃度または報告されている最大血清中濃度とした.

今回評価に用いた UT としては, IS, PCS, CMPF 及び intact PTH を用いた. その結果, IS 添加により濃度依存的に CYP2E1 と SULT1A1 の mRNA 発現の有意な増大が観察された. また, PCS 及び CMPF によっても, CYP2E1 と SULT1A1 の発現が有意に増大することが確認された. 一方, intact PTH は CYP2E1 の発現には影響を与えなかったが,

SULT1A1 の発現を増大させた。

以上、今回得られた知見より、CKD 時には腎機能低下に伴い UT の一つである IS の蓄積が生じるが、この蓄積した IS が CYP2E1 及び SULT1A1 の発現をさらに上昇させることで、IS 自身の生合成を亢進させることが示唆された。また、IS 以外の UT に関しても、PCS と CMPF は CYP2E1 と SULT1A1 の発現を上昇させ、intact PTH は SULT1A1 の発現を上昇させることで、IS 生合成の亢進に寄与することが示唆された。すなわち、各種 UT による IS 生合成の亢進作用により、IS の体内蓄積が助長されるというこれまでとは異なった観点からの新たな UT 間相互作用を初めて見出した。言い換えると、今回の結果は、CKD において蓄積する各種 UT が、肝代謝酵素を誘導して IS の生合成を促進することで、さらに IS が蓄積するという悪循環をもたらす可能性を示唆するものであり、この作用により蓄積した IS が腎機能をさらに悪化させることも、IS が CKD において高濃度に蓄積する一因である可能性が考えられる。また、肝代謝酵素の誘導作用により、蓄積した IS は肝代謝型薬物の体内動態変動を引き起こすことが考えられ、従って、今後は IS をはじめとする UT の生体内蓄積を阻止し、IS 蓄積の悪循環を阻止する CKD 治療法の開発が切望される。

## (2) PCS による NADPH oxidase 活性化を介した尿細管障害作用

ラット腎スライスにおける PCS の取り込みを評価した結果、腎スライス内への能動的な取り込みが観察された ( $K_m=231.6 \mu\text{M}$ )。その際、PCS の腎取り込みは probenecid、PCG、PAH 及び ES によって顕著に抑制されたことから、PCS の腎取り込み過程において有機アニオントランスポーター (OAT) の寄与が示唆された。同様の実験を OAT の基質となる他の UT 存在下で行ったところ、PCS の取り込みは IS や CMPF により著しく阻害された。一方、IA と HA による阻害は軽度であった。また HK-2 においても PCS の能動的な取り込みが観察され、OAT 阻害剤により顕著に阻害された。以上の結果から、PCS の腎近位尿細管上皮細胞への移行機序として、OAT を介した取り込み経路の存在が強く示唆された。

次に PCS の CKD 状態でのレドックス特性を HK-2 により検討した結果、PCS は PKC 及び PI3K 経路を介した NADPH oxidase の

活性化により細胞内 ROS 産生を増大させた。その際、NADPH oxidase のサブユニットである NOX4 及び p22<sup>phox</sup> のタンパク質発現が増大していた。PCS は線維化に関連する TGF-beta1、TIMP-1 及び Pro- $\alpha$ 1 (I) collagen の mRNA 及び active TGF-beta1 のタンパク質発現を増大させた。これらの作用は、probenecid 及び NOX4 と p22<sup>phox</sup> の siRNA により抑制されことから、PCS による ROS 産生並びに腎線維化には PCS の細胞内蓄積とそれに伴う NADPH oxidase 活性化が大きく寄与していることが判明した。PCS 負荷 CKD ラットでは、血清中 PCS 濃度の上昇に伴い、腎尿細管変性と線維化の亢進が観察された。その際、腎臓における NOX4 と p22<sup>phox</sup> 発現上昇及び NADPH oxidase 活性化に加え、TGF-beta1 の産生亢進が認められた。IS や CMPF とは異なり、健常人で観察される低濃度域の PCS はレドックス活性を示さなかった。以上の結果から、CKD 状態で尿細管細胞内に蓄積した PCS は NADPH oxidase の活性化を介して ROS 産生を誘導し、active TGF-beta1 等の線維化関連因子の産生を亢進する結果、尿細管変性や腎線維化を惹起することが示唆された。

## 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 12 件)

1. Tanaka R, Watanabe H, Kodama A, Chuang VT, Ishima Y, Hamasaki K, Tanaka KI, Mizushima T, Otagiri M, Maruyama T. Long-acting human serum albumin-thioredoxin fusion protein suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis progression. *J Pharmacol Exp Ther.* 345 271-283 (2013) 査読有
2. Watanabe H, Miyamoto M, Honda D, Tanaka H, Wu Q, Endo M, Noguchi T, Kadowaki D, Ishima Y, Kotani S, Nakajima M, Kataoka K, Kim-Mitsuyama S, Tanaka M, Fukagawa M, Otagiri M, Maruyama M. p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress through the activation of NADPH oxidase. *Kidney Int.* 83 582-592 (2013) 査読有
3. Kodama A, Watanabe H, Tanaka R, Tanaka H, Chuang VTG, Miyamoto Y, Wu Q, Endo M, Hamasaki K, Ishima Y, Fukagawa M,

- Otagiri M, Maruyama T. A human serum albumin-thioredoxin fusion protein prevents experimental contrast-induced nephropathy. *Kidney Int.* 83, 446-454 (2013) 査読有
4. Miyamoto Y, Iwao Y, Mera K, Watanabe H, Kadowaki D, Ishima Y, Chuang VT, Sato K, Otagiri M, Maruyama T. A uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furan propionate induces cell damage to proximal tubular cells via the generation of a radical intermediate. *Biochem Pharmacol.* 84, 1207-1214 (2012) 査読有
  5. Komori H, Watanabe H, Shuto T, Kodama A, Maeda H, Watanabe K, Kai H, Otagiri M, Maruyama T.  $\alpha_1$ -Acid glycoprotein up-regulates CD163 via TLR4/CD14 pathway: Possible protection against hemolysis-induced oxidative stress. *J Biol Chem.* 31, 30688-30700 (2012) 査読有
  6. Watanabe H, Noguchi T, Miyamoto Y, Kadowaki D, Kotani S, Nakajima M, Miyamura S, Ishima Y, Otagiri M, Maruyama T. Interaction between two sulfate conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin. *Drug Metab Dispos* 40, 1423-1428 (2012) 査読有
  7. Komori H, Nishi K, Uehara N, Watanabe H, Shuto T, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Characterization of hepatic cellular uptake of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AGP), part 2: Involvement of hemoglobin  $\beta$ -chain on plasma membranes in the uptake of human AGP by liver parenchymal cells. *J Pharm Sci.* 101, 1607-1615 (2012) 査読有
  8. Nishi K, Komori H, Kikuchi M, Uehara N, Fukunaga N, Matsumoto K, Watanabe H, Nakajou K, Misumi S, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. Characterization of the hepatic cellular uptake of  $\alpha_1$ -acid glycoprotein (AGP), part 1: A peptide moiety of human AGP is recognized by the hemoglobin  $\beta$ -chain on mouse liver parenchymal cells. *J Pharm Sci.* 101, 1599-1606 (2012) 査読有
  9. Furukawa M, Tanaka R, Chuang VTG, Ishima Y, Taguchi K, Watanabe H, Maruyama T, Otagiri M. Human serum albumin-thioredoxin fusion protein with long blood retention property is effective in suppressing lung injury. *J Control Release.* 154, 189-154 (2011) 査読有
  10. Anraku M, Takeuchi K, Watanabe H, Kadowaki D, Kitamura K, Tomita K, Kuniyasu A, Suenaga A, Maruyama T, Otagiri M. CYS34 on antioxidative properties of HSA quantitative analysis of cysteine-34 on the antioxidative properties of human serum albumin in hemodialysis patients. *J Pharm Sci.* 100, 3968-3976 (2011) 査読有
  11. Nishi K, Ono T, Nakamura T, Fukunaga N, Izumi M, Watanabe H, Suenaga A, Maruyama T, Yamagata Y, Curry S, Otagiri M. Structural insights into differences in drug binding selectivity between two forms of human  $\alpha_1$ -acid glycoprotein genetic variants, the A and F1\*S forms. *J Biol Chem.* 286, 14427-14434 (2011) 査読有
  12. Miyamoto Y, Watanabe H, Noguchi T, Kotani S, Nakajima M, Kadowaki D, Otagiri M, Maruyama T. Organic anion transporters play an important role in the uptake of p-cresyl sulfate, a uremic toxin, in the kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 26, 2498-2502 (2011) 査読有
- [学会発表] (計 11 件)
1. 渡邊博志, 宮本洋平, 本田大輔, 田中寿絵, 深川雅史, 異島優, 小田切優樹, 丸山徹, 尿毒症物質 p-クレジル硫酸は OATs を介して近位尿細管上皮、血管内皮及び血管平滑筋細胞に取り込まれ酸化ストレス障害を誘発する, 日本薬物動態学会 第 27 回年会, 2012. 11. 20, タワーホール船堀 (千葉)
  2. 宮本洋平, 渡邊博志, 本田大輔, 門脇大介, 異島優, 深川雅史, 小田切優樹, 丸山徹, 尿毒症物質 p-クレジル硫酸のレドックス特性と腎障害、心血管疾患発症機序解明, 第 34 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム, 2012. 11. 15, 京都大学 (京都)
  3. Hiroshi Watanabe, Daisuke Honda, Yohei Miyamoto, Tsuyoshi Noguchi, Daisuke Kadowaki, Yu Ishima, Motoko Tanaka, Hisae Tanaka, Masafumi Fukagawa, Masaki Otagiri and Toru

- Maruyama, p-Cresyl sulfate causes renal tubular cell damage by inducing oxidative stress through the activation of NADPH oxidase, 49th ERA-EDTA Congress, Paris 2012, 2012.5.24, Paris (France)
4. Yohei Miyamoto, Yasunori Iwao, Katsumi Mera, Hiroshi Watanabe, Daisuke Kadowaki, Yu Ishimal, Victor Tuan Giam Chuang, Keizo Sato, Masaki Otagiri and Toru Maruyama, A uremic toxin, CMPF accumulates in proximal tubular cells and induces cell damage through increasing oxidative stress, 49th ERA-EDTA Congress, Paris 2012, 2012.5.24, Paris (France)
  5. 渡邊博志, 本田大輔, 宮本洋平, 野口剛, 門脇大介, 異島優, 小谷俊介, 中島誠, 深川雅史, 小田切優樹, 丸山徹, 尿毒症物質, p-クレジル硫酸の酸化ストレス誘導を介した腎障害作用, 日本薬学会第132年会, 2012.3.28, 北海道大学 (北海道)
  6. 村田道哉, 児玉彬, 渡邊博志, 異島優, 小田切優樹, 丸山徹, 尿毒症物質はインドキシル硫酸の生合成を促進する, 第28回日本薬学会九州支部大会, 2011.12.10, 福岡大学薬学部 (福岡)
  7. Watanabe H, Miyamoto Y, Noguchi T, Suenaga A, Kadowaki D, Otagiri M, Maruyama T, Interaction between p-cresol sulfate and indoxyl sulfate during body disposition can influence their serum free concentrations in chronic kidney disease, Asian Federation For Pharmaceutical Sciences Conference, 2011.12.9, Kuala Lumpur (Malaysia)
  8. 野口剛, 宮本洋平, 渡邊博志, 小田切優樹, 丸山徹, 尿毒症物質 p-クレジル硫酸とインドキシル硫酸との相互作用の動態学的機序解明, 日本薬剤学会 26 年会, 2011.5.29, タワーホール船堀 (千葉)
  9. 本田大輔, 宮本洋平, 渡邊博志, 門脇大介, 小田切優樹, 丸山徹, 尿毒症物質 p-クレジル硫酸が慢性腎臓病の酸化ストレスに及ぼす影響, 日本薬剤学会 26 年会, 2011.5.29, タワーホール船堀 (千葉)
  10. Yohei Miyamoto, Yasunori Iwao, Katsumi Mera, Hiroshi Watanabe, Daisuke Kadowaki Keizo Sato, Masaki Otagiri, Toru Maruyama, Uremic toxin, CMPF causes renal cell damage via oxidative stress induction, 7th International Congress on Uremia Research and Toxicity 2011, 2011.5.12, Nagoya Congress Center (Nagoya)
  11. Yohei Miyamoto, Yasunori Iwao, Yuka Tasaki, Keizo Sato, Yu Ishima, Hiroshi Watanabe, Daisuke Kadowaki, Toru Maruyama and Masaki Otagiri, The uremic solute indoxyl sulfate acts as an antioxidant against superoxide anion radicals under normal-physiological conditions, 4<sup>th</sup> Asia Pacific ISSX Meeting 2011, 2011.4.22 Tainan (Taiwan)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/Yakuzai/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡邊 博志 (WATANABE HIROSHI)

熊本大学・薬学部・准教授

研究者番号：70398220