

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460196

研究課題名(和文)腎不全進行抑制を目的とした尿毒症物質の代償性排泄経路の解明とその誘導

研究課題名(英文)Evaluation of the intestinal secretion of indoxyl sulfate as a possible compensative excretion pathway in chronic kidney disease

研究代表者

森本 かおり (MORIMOTO, Kaori)

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90401009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク結合性が高い尿毒症物質であるインドキシル硫酸(IS)の蓄積は慢性腎臓病(CKD)の進行を早め、循環器疾患の危険因子となる。このためISの除去法の開発が望まれている。ISは腎機能正常時には腎排泄型であるが、CKD時には非腎性の排泄が推察された。そこで消化管分泌がCKDにおいてISの代償性排泄経路として関与する可能性について検討し、ISの消化管排泄経路の寄与は僅かであるが腎不全時に誘導され、Na<sup>+</sup>を駆動力とする2次性能動輸送が関与することを明らかにした。消化管分泌経路の寄与は小さく、この経路の誘導がIS除去法として有用かどうかは今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：During chronic kidney disease (CKD), protein-bound uremic toxins such as indoxyl sulfate (IS) cannot be efficiently removed by hemodialysis. Progressive accumulation of IS is an important risk factor in the progression of CKD and cardiovascular disease. Previous report suggested that non-renal clearance was observed in CKD rat, in spite of the significant renal excretion in healthy condition. Therefore, we focused on the possibility of the involvement of intestinal secretion as an alternative excretion pathway of IS in CKD. We found that IS was secreted into jejunum lumen in normal and CKD rats. The contribution of the gut secretion to the total clearance was very low but increased dependent dosage. For cell-based assay, Na<sup>+</sup>-dependent vectorial transport of IS across a Caco-2 cell monolayer was observed, with higher transport in the basolateral-to-apical direction. These results suggest that IS is actively secreted into the gut predominantly via Na<sup>+</sup>-dependent efflux transporters.

研究分野：薬物動態学

キーワード：トランスポーター 消化管 腎不全 尿毒症

## 1. 研究開始当初の背景

尿毒症物質のひとつであるインドキシル硫酸 (Indoxyl sulfate: IS) は、炎症や酸化ストレスを惹起することにより腎機能を悪化させるほか、心血管疾患などの様々な病態を誘発する因子として知られている。しかし、IS は血中で約 95% がアルブミンと結合しているため血液透析によって除去されにくく、血液透析による減少率は 30% と低い。

IS は経口摂取されたタンパク質由来のトリプトファンが大腸菌などの腸内細菌によりインドールへと代謝され、その後肝臓にて酸化代謝および硫酸抱合を受けて生成する。体内で生成した IS は、99% が腎近位尿細管基底膜側に存在する有機アニオントランスポーター (Organic anion transporter: OAT) 1 および OAT3 を介して尿細管上皮細胞に取り込まれ、尿細管分泌により尿中に排泄される。しかし、腎不全患者においては腎機能の低下に伴い OAT の発現が低下するため IS の腎排泄は著しく低下し、腎不全末期には血中の IS レベルは健常者の 40 倍にも上昇することが報告されている。従って、新しい IS をはじめとする尿毒症物質の除去方法の開発は喫緊の課題となっている。唯一の IS の除去方法として球形活性炭 AST-120 (クレメジン®) が上げられるが、服薬量の多さなどからのコンプライアンスの問題や十分な腎不全抑制効果に至っていないなどの問題が至適されている。

本研究において、既報を再解析したところ、5/6 腎摘により作出した腎不全モデルラットにおいては IS の全身クリアランスは健常ラットの 1/10 程度まで低下するが、尿および胆汁中にほとんど排泄されていないことから、腎不全時には腎排泄、胆汁中排泄以外の何らかの代償性排泄経路が存在する可能性を推察した。

近年、尿酸の排泄臓器として小腸が注目されている。尿酸の小腸における分泌には一次性能動輸送体である Breast Cancer Resistant Protein (BCRP) が重要な役割を担っており、尿酸の全身クリアランスの 1/3 を担っていることが明らかにされている。尿酸と同様、IS は水溶性の有機酸であることから、IS も BCRP の基質となって消化管分泌される可能性を想定した。消化管排泄経路の存在を明らかにし、誘導することが出来れば、IS 除去の新たな可能性を示すことにも繋がると考えられる。

## 2. 研究の目的

腎不全時における IS の代償性消失経路として、消化管分泌が関与することを明らかにし、その分泌や誘導の機序解明により IS 除去方法の新たな可能性を実験的に示すことを目的に検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) ABC transporter family の尿毒症関連

物質の排出輸送への関与

タンパク結合性の高い尿毒症関連物質からフェニル酢酸 (PA)、IS、インドール-3-酢酸 (I3A)、馬尿酸 (HA)、キヌレニン酸 (KA) を選択した。MRP2、BCRP を高発現する Sf-9 由来細胞膜ベシクルへの特異的蛍光プローブの取込阻害実験および尿毒症物質自体の取込を測定した。

(2) IS のラット小腸粘膜の透過特性

筋肉層を除去したラット腸管標本を Diffusion chamber に装着後、粘膜側 (mucosal, M 側) には pH 6.5、漿膜側 (serosal, S 側) には pH 7.4 の Buffer 5mL を満たし、20 分間のプレインキュベーションを行った。その後、チャンバー内を薬液に置換し、両方向の輸送を測定した。薬液添加時を 0min とし、15, 30, 45, 60, 90 min でレシーバー側から 100  $\mu$ L 採取した。実験中は 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> でバブリングを行った。透過係数 (Permeability coefficient; Pc, cm/s) は以下の式より算出した。

$$Pc = \frac{dA}{dt \cdot S \cdot C_0}$$

但し、dA/dt: 消化管粘膜を介した IS の透過速度 (nmol/sec)、S: chamber の有効表面積 (cm<sup>2</sup>)、C<sub>0</sub>: 初濃度 ( $\mu$ M) を示す。

(3) 腎不全モデルラットにおける IS の消失への消化管排泄の寄与

アデニン硫酸塩 250mg/kg を 0.2% CMC 溶液に溶解し、20mL/kg を 1日1回、20日間経口投与することにより、腎不全モデルを作成した。モデルの評価は、血清クレアチニンおよび BUN により行った。対照群 (vehicle 投与群) および腎不全モデルラットを用い、空腸 single-pass perfusion 法により、IS を 6, 12, 60 mg/kg 急速静脈内投与後の空腸分泌クリアランスの測定を行った。

(4) IS の小腸粘膜分泌機構の解析

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞単層膜を介した IS の輸送の方向性、駆動力、阻害剤の影響について検討を行った。

## 4. 研究成果

(1) ABC transporter family の尿毒症関連物質の排出輸送への関与

尿酸が BCRP によって消化管で排出輸送を受けることが報告されていることから、同じ有機酸である IS も ABC transporter の基質となり消化管で排出輸送される可能性を考え検討を行った。IS の排出輸送に関与する ABC transporter の候補として、MRP2、BCRP を想定し、各 transporter を高発現する Sf-9 vesicle への特異的基質の取り込みに対する尿毒症関連物質の阻害効果を検討した。その結果、MRP2 の特異的基質である CDCF 輸送の阻害は、HA を除くすべての尿毒症物質 (3mM) で認められ、特に IS (40%) および KA (84%) で

顕著であった。また BCRP の特異的基質である Lucifer yellow の輸送を、IS および KA は、各々 46% および 58% 阻害した。しかし KA および IS の MRP2 ならびに BCRP 発現ベシクルへの ATP 依存的な取込は認められなかった。以上より、IS および KA は、MRP2 ならびに BCRP を阻害するが、それ自体は基質とはならないことが推察された。

### (2) IS のラット小腸粘膜の透過特性

IS が ABC transporters の基質とならない可能性が示されたことから、IS の消化管分泌機構は存在するのかを検討した。

まず消化管粘膜透過特性をリン酸含有緩衝液 (KHBB) を用いて検討した。ラット空腸、回腸、結腸における透過係数はマンニトール等の細胞間隙透過マーカーの透過係数 ( $1.0 \times 10^{-7} \text{ cm/sec}$ ) より高値を示したことから、経細胞輸送の関与が示唆された。透過係数は結腸と比較して空腸、回腸で高値を示したが、吸収方向、分泌方向で同等であった。

次にリン酸を輸送する transporter の関与を想定し、リン酸非含有緩衝液を用いて IS の消化管分泌機構を検討した。透過係数は細胞間隙マーカーより高値を示し、結腸と比較し空腸、回腸で高値となった。また、空腸において SM 方向が MS 方向に比較して有意に高値を示した ( $p < 0.01$ , MS;  $n=18$ , SM;  $n=15$ )。

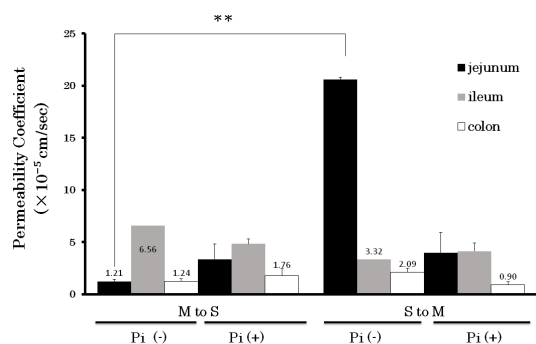


図1 ラット空腸、回腸、結腸における IS の透過に及ぼす無機リン酸の影響

### (3) 腎不全モデルラットにおける IS の消失への消化管排泄の寄与

In vitro では空腸において IS は排出輸送を受けることが明らかとなった。そこで病態動物および正常動物を用いて、in vivo における消化管分泌の寄与率および特性を明らかにする目的で、in situ single pass perfusion 法により IS の空腸分泌クリアランスの測定を行った。

アデニン硫酸塩投与による腎不全の評価を行ったところ、対照群およびアデニン硫酸塩投与群における血清クレアチニン値は、各々 1.06 mg/dL ( $n=15$ ), 1.43 mg/dL ( $n=21$ ) でありアデニン投与群で有意に高値を示した ( $p < 0.01$ )。対照群およびアデニン硫酸塩投与群における BUN は、各々 11.91 mg/dL ( $n=15$ ), 33.21 mg/dL ( $n=21$ ) であり、アデニン硫酸塩投与群で有意に高値を示した

( $p < 0.001$ )。以上の結果より、アデニン硫酸塩投与により中程度の腎不全の病態を示す動物が作出できたと考えた。

本モデルを用いて空腸 single pass perfusion 法を行ったところ、対照群、CKD モデルともに IS の AUC および投与 60 分後までの空腸分泌累積量は投与量依存的に上昇する傾向を示した。IS の AUC は、対照群と比較して CKD モデルにおいて高値であったことから、病態による IS の腎排泄能の低下を反映した結果であると考えられる。全身クリアランスは、投与量 6mg/kg ~ 12mg/kg の範囲で線形であったが、CKD 群においては投与量依存的に増加傾向 (非線形) を示した。CKD 群における分布容積は、投与量依存的に増大する傾向を示したが、全身クリアランスの上昇を説明できないことから何らかの消失過程の誘導が推察された。IS の空腸における透過係数 (対照群  $69.3 \pm 31.8 \sim 90.33 \pm 31.2 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ , CKD 群  $69.5 \pm 16.7 \sim 235.0 \pm 21.3 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}$ ) は、マンニトールの腸管細胞間隙透過係数 ( $16.0 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}^{16}$ ) およびポリエチレングリコール 400 の腸管細胞間隙透過係数 ( $2.5 \times 10^{-6} \text{ cm/sec}^{17}$ ) より高値を示したことから、経細胞輸送の関与が示唆された。対照群における IS の透過係数は、検討した投与量範囲内で線形であったが、CKD 群において投与量依存的に増大した。なお、IS の全身クリアランスに対する腸管分泌クリアランスの寄与率は、対照群の 6 mg/kg および 12 mg/kg の各々において 0.76 ~ 1.10% とほぼ一定であったが、CKD モデルの 6 mg/kg, 12 mg/kg および 60 mg/kg 投与群の各々では、 $1.62 \pm 0.36$ ,  $3.42 \pm 0.77\%$  および  $3.17 \pm 0.50\%$  であり、対照群と比較して約 2 ~ 3 倍高値であり、投与量依存的に増大する傾向を示した。このことは腎不全時に消化管分泌経路が代償性に誘導されることを示唆するものと考えられた。

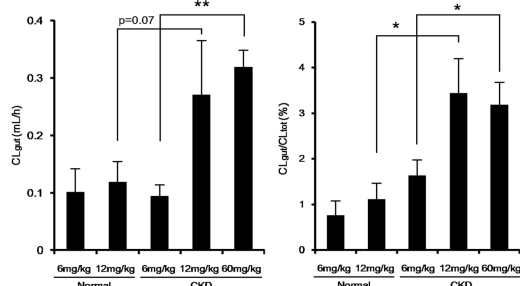


図2 ラットにおける IS の空腸分泌クリアランス (左) および全身クリアランスに占める割合 (右)

### (4) IS の小腸粘膜分泌機構の解析

IS の空腸における分泌機構を検討するため、ヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞単層膜を用いた IS 輸送の検討を行った。IS の Caco-2 細胞単層膜を介した輸送は排泄方向に優位であった。IS の輸送には MRP2 および BCRP が関与しなかったことから、二次性能動輸送系

が関与する可能性を検討した。緩衝液中に含まれる NaCl を同濃度の N-methylglucamine で置換すると、吸収方向への輸送が有意に増加し、排泄方向への輸送が有意に減少した。この結果から、Caco-2 細胞単層膜を介した IS の排出輸送には、Na<sup>+</sup>あるいは Cl<sup>-</sup> の濃度勾配を駆動力とする二次性能動輸送系が関与することが示唆された。

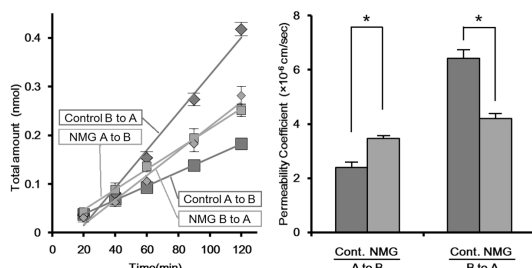


図3 ISのCaco-2細胞単層膜透過におけるNa<sup>+</sup>依存性

次に IS の輸送に関わるトランスポーターの同定を目的として検討を行った。多基質認識性 NPT ホモログである SLC17A4 は小腸刷子縁膜側に発現し、Na<sup>+</sup> を駆動力としてリン酸を輸送するトランスポーターである。この SLC17A4 が、細胞膜の電氣的勾配および Cl<sup>-</sup> を駆動力として尿酸やパラアミノ馬尿酸の排泄に関与していることが最近示されたことから、同様に水溶性酸性物質である IS の排泄輸送にも SLC17A4 が関与している可能性を考え検討を行った。

アニオン交換輸送系阻害剤である DIDS およびエバンスブルー (EB) は SLC17A4 の機能を阻害することが知られている。これらを共存させた際の IS 輸送への影響を検討した結果、DIDS 共存下において吸収方向への輸送が増加し、排泄方向への輸送が減少傾向を示した。一方で、EB 共存下における IS 輸送は影響が見られなかった。また SLC17A4 の基質として報告されている尿酸、パラアミノ馬尿酸および無機リン酸を共存させた際には、IS の輸送に対する影響はほとんど見られなかった。

さらに、RNAi により SLC17A4 タンパク質の発現量を低下させた際の、IS の細胞内蓄積量への影響について検討を行った。siRNA を用いた RNAi により SLC17A4 mRNA 発現量は、negative control の 29% まで低下した。同条件で IS の Caco-2 暴露 5 分における細胞内蓄積量を比較したが、IS の細胞内蓄積量には RNAi による影響が見られなかった。以上の結果より、Caco-2 細胞における IS の排泄方向への輸送に、SLC17A4 は関与していないことが示唆された。

#### (5) まとめ

ラット空腸には IS を排出輸送する機構が存在し、この経路はわずかながら腎不全時に代償的に誘導されることを示唆する結果が得られた。この機序を検討するため、Caco-2 単層膜を用いて検討した結果、Na<sup>+</sup>あるいは

Cl<sup>-</sup> の濃度勾配を駆動力とする二次性能動輸送系が IS の排泄方向への輸送に関与している可能性が示唆され、また DIDS 共存下において IS の吸収方向への輸送が増大したことから、IS の輸送にはアニオン交換輸送系が関与している可能性が推察されたが、輸送体の同定には至らなかった。今後、輸送体を同定するとともに、より重篤な腎不全時での寄与率の推定、この経路の誘導方法の検討が必要である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

富永雄太、インドキシル硫酸の代償性排泄経路としての消化管分泌の関与、宮城腎と薬剤研究会第 5 回学術集会、2016 年 4 月 23 日、東北医科薬科大学(宮城県仙台市)

富永雄太、尿毒症物質インドキシル硫酸の消化管分泌機構の解析、2015 年 11 月 12 日~2015 年 11 月 14 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

森本かおり、今から始める腎臓病薬物療法シリーズ「よくわかる尿毒症」、第 9 回日本腎臓病薬物療法学会学術集会・総会 2015、2015 年 10 月 24 日~2015 年 10 月 25 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

富永雄太、インドキシル硫酸の代償性排泄経路としての消化管分泌の関与、2015 年 10 月 24 日~2015 年 10 月 25 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

宮本将成、尿毒症物質インドキシル硫酸の消化管透過機構の解析、2014 年 10 月 5 日、いわき明星大学(福島県いわき市)

我妻雄太、尿毒症物質による MRP2 ならびに BCRP の阻害、2014 年 5 月 20 日~2014 年 5 月 22 日、大宮ソニックホール(2014 年 5 月 20 日(埼玉県大宮市))

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森本 かおり (MORIMOTO, Kaori)  
東北薬科大学・薬学部・講師  
研究者番号：90401009

### (2) 研究分担者

富田 幹雄 (TOMITA, Mikio)  
東北薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：60207610

### (3) 研究分担者

荻原 琢男 (OGIHARA, Takuo)  
高崎健康福祉大学・薬学部・教授  
研究者番号：60448886

### (4) 研究分担者

矢野 健太郎 (YANO, Kentaro)  
高崎健康福祉大学・薬学部・助手  
研究者番号：40644290