

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670074

研究課題名(和文) ヒト腎臓における薬物尿細管分泌を予測しうる in vitro 実験系の開発

研究課題名(英文) Development of in vitro model system to predict the renal secretion of drugs in human kidney

研究代表者

桂 敏也 (Katsura, Toshiya)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：10283615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腎臓の近位尿細管における薬物の運び屋タンパク質(トランスポーター)の働きを予測できる実験系の確立を目的として、トランスポーターを発現していない培養細胞を用いて様々な薬物で処理することによって、トランスポーターを発現するようになることを試みた。その結果、DNAのメチル化を阻害する薬物で処理した場合に、ある種のトランスポーターの発現が亢進することが判明し、その輸送機能も亢進していることが明らかになった。このような実験系が確立できれば、医薬品開発にも有用であると考えている。

研究成果の概要(英文)：To develop in vitro experimental model systems to predict the renal secretion of drugs in human kidney, we treated the human kidney-derived cultured cells by various reagents to stimulate the expression of drug transporters. When HK-2 cells were treated with DNA methyltransferase inhibitor, the expression of OCT2 mRNA was significantly enhanced. It was demonstrated that the transport function of OCT2 was also enhanced. Development of in vitro experimental model systems to predict the renal secretion of drugs in human kidney will be useful for drug discovery and development.

研究分野：医療系薬学

キーワード：薬物動態学 薬学 腎排泄 トランスポーター 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

腎臓における尿細管分泌は、肝臓における代謝と並んで薬物の主要な消失経路である。これまでの検討から、腎近位尿細管の血管側側底膜と管腔側刷子縁膜に発現する薬物トランスポーターが協調して働き、薬物の尿細管分泌を担っていることが明らかにされてきた。さらに、各々の薬物トランスポーターが分子的に同定され、機能的解析が進められてきた。しかし、トランスポーターの機能解析に用いる培養細胞等の遺伝子発現系は、一般的に過剰発現であることが多く、また実際の腎臓に発現している多くのトランスポーターを同時に発現させることは不可能である。一方、近位尿細管のモデル細胞としてブタ由来の培養腎上皮細胞 LLC-PK₁ やフクロネズミ由来の OK 細胞が用いられてきたが、これらは種差が問題となる。またヒト腎臓由来の培養細胞は、初代培養細胞や不死化細胞が入手可能であるが、これらヒト由来培養腎上皮細胞においては薬物トランスポーターの発現がヒト個体とは大きく異なっている。医薬品開発において、前臨床試験段階で新規化合物の腎排泄（尿細管分泌）やトランスポーターの寄与率を予測することは重要であるが現状では困難であり、その予測を可能にする新しい *in vitro* 試験系の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では細胞接着性と増殖分化の関連性に着目し、近年発見された細胞の接着や増殖、分化を促進する低分子化合物アドヘサミンを用いて、ヒト腎由来の初代培養上皮細胞等の接着性を調節することによって、上皮細胞の分化や薬物トランスポーターの発現変動を解析し、ヒト個体と同様の発現挙動を示す *in vitro* 試験系を構築することを目的とする。さらに、いくつかの薬物トランスポーターの臓器特異的発現が、そのプロモーター領域のメチル化によって制御されていることが明らかにされていることから、ヒト由来培養腎上皮細胞における DNA メチル化の程度とその発現量との関連、ならびに DNA メチル化阻害薬処理による影響について検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 正常ヒト腎上皮細胞やヒト近位尿細管上皮細胞などの初代培養細胞や、不死化ヒト正常腎近位尿細管上皮細胞株 HK-2 細胞を用い、種々濃度のアドヘサミン共存下で培養し、細胞増殖性や培養日数の継続性について検討する。また頂側膜指標酵素等の活性を測定し、細胞の分化度について確認する。

(2) アドヘサミン処理によって細胞増殖や分化の促進が認められた条件を用いてヒト正常腎由来細胞を培養し、SLC トランスポーターファミリーや ABC トランスポーターファ

ミリーのうち腎臓において重要なものを選択し、その発現量について mRNA レベル (RT-PCR や real-time PCR) やタンパク質レベル (ウェスタンブロットング) により検討を行う。HK-2 細胞については SLC22A ファミリー (OAT1, OAT3, OCT2) の発現が認められず、ABCB1 (MDR1) や MRP ファミリーが発現していることが報告されており、アドヘサミンのこれらトランスポーター発現に及ぼす影響について比較検討を行う。

(3) 正常ヒト腎上皮細胞やヒト近位尿細管上皮細胞などの初代培養細胞や、不死化ヒト正常腎近位尿細管上皮細胞株 HK-2 細胞を用い、細胞を 5-アザシチジンやゼブラリンなどのメチル化阻害薬で処理して、その濃度依存性や時間依存性について脱メチル化の程度を指標に検討する。DNA の脱メチル化が認められた条件において薬物トランスポーターの発現量について検討し、エピジェネティックな制御について明確にする。

(4) ヒト個体に近い薬物トランスポーターの発現挙動を示すメチル化阻害薬の処理条件を用いて、多孔性フィルター上に培養した細胞を処理し、薬物の経細胞輸送実験を行う。分泌クリアランスを算出してヒト個体との対応を評価するとともに、各薬物トランスポーターに対する特異的阻害剤を用いて経細胞輸送に及ぼす影響について検討し、薬物相互作用の評価系としての妥当性について検証する。

4. 研究成果

(1) まず、不死化ヒト正常腎近位尿細管上皮細胞株 HK-2 細胞の増殖に及ぼすアドヘサミンの影響について検討したところ、アドヘサミンの処理によって増殖が促進することが示された。次に、頂側膜指標酵素である aminopeptidase, alkaline phosphatase, -glutamyl transferase の活性を測定したところ、これらの活性にアドヘサミン処理の影響は認められなかった。したがって、HK-2 細胞においてアドヘサミンはその増殖は促進するが分化には影響しないことが示唆された。さらに、ヒト培養腸上皮細胞 Caco-2 を用いて検討を行ったところ、HK-2 細胞と同様にアドヘサミン処理による増殖促進効果が認められた。

(2) HK-2 細胞における種々薬物トランスポーター mRNA の発現について、RT-PCR 法によって確認したところ、OCT2, PEPT1 の発現が弱いながら認められた。一方、MATE1 や MATE2-K の発現は認められなかった。次にアドヘサミンで処理した細胞におけるこれらトランスポーターの発現について検討したところ、いずれのトランスポーターも未処理の場合と比べてその発現に変化は認められなかった。したがって、アドヘサミンは

薬物トランスポーターの発現には影響しないものと考えられた。

(3) 5-アザシチジンやゼブラリンなどのメチル化阻害薬で処理した HK-2 細胞における薬物トランスポーターの発現について、RT-PCR 法で検討した。5-アザシチジン処理した HK-2 細胞において、OCT2 の発現が顕著に亢進していた。一方、PEPT1 や MATE1, MATE2-K の発現には変化が認められなかった。また、ゼブラリンで処理した場合にはいずれのトランスポーターもその発現に変化は認められなかった。OCT2 の腎臓特異的な発現は、そのプロモーター領域のメチル化によって制御されていることが報告されており、本研究結果はこれと対応するものであると考えられる。また、これらのメチル化阻害剤を用いた場合の DNA 脱メチル化の程度については現在検討中であり、今後脱メチル化の程度と OCT2 発現変動の関係について明確にする予定である。一方、PEPT1 や MATE1 に関してもその近位プロモーター領域に CpG アイランドが存在することが報告されており、DNA メチル化によりその発現が制御されている可能性が考えられる。今後これらのトランスポーターについても、DNA メチル化 / 脱メチル化の程度について詳細に解析する必要があると考える。

(4) DNA メチル化阻害薬で処理した際に MATE の発現が変動していた場合には、多孔性フィルター上に培養した細胞を用いて薬物の経細胞輸送を測定する予定であったが、その影響が OCT2 についてのみ認められたため、ディッシュを用いた取り込み実験を行った。5-アザシチジンで処理した HK-2 細胞において、OCT2 基質であるメトホルミンの取り込みについて検討したところ、未処理の場合に比べてその取り込みは亢進していた。

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 8 件)

1. Kumagai M, Marui A, Tabata Y, Takeda T, Yamamoto M, Yonezawa A, Tanaka S, Yanagi S, Ito-Ihara T, Ikeda T, Murayama T, Teramukai S, Katsura T, Matsubara K, Kawakami K, Yokode M, Shimizu A, Sakata R. Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. *Heart Vessels*, 31: 713-721 (2016) 査読有 DOI: 10.1007/s00380-015-0677-x
2. Mizuno T, Fukudo M, Fukuda T, Terada T, Dong M, Kamba T, Yamasaki T, Ogawa O, Katsura T, Inui K, Vinks AA, Matsubara K. The effect of ABCG2 genotype on the

population pharmacokinetics of sunitinib in patients with renal cell carcinoma. *Ther. Drug Monit.*, 36: 310-316 (2014) 査読有 DOI: 10.1097/FTD.000000000000025

3. Ishii T, Hatano E, Taura K, Mizuno T, Kawai T, Fukudo M, Katsura T, Uemoto S. Sorafenib in a hepatocellular carcinoma patient with end-stage renal failure: A pharmacokinetic study. *Hepatol. Res.*, 44: 685-688 (2014) 査読有 DOI: 10.1111/hepr.12156

4. 山際岳朗、古依孝明、矢野育子、石橋直哉、深津祥央、小林政彦、桂 敏也、荒川芳輝、宮本 享、松原和夫. 悪性神経膠腫患者に対する temozolomide・放射線併用療法における有害反応解析. *日本病院薬剤師会雑誌*, 50: 299-304 (2014) 査読有

5. Kato K, Mori H, Kito T, Yokochi M, Ito S, Inoue K, Yonezawa A, Katsura T, Kumagai Y, Yuasa H, Moriyama Y, Inui K, Kusuhara H, Sugiyama Y. Investigation of endogenous compounds for assessing the drug interactions in the urinary excretion involving multidrug and toxin extrusion proteins. *Pharm. Res.*, 31: 136-147 (2014) 査読有 DOI: 10.1007/s11095-013-1144-y

6. Motohashi H, Nakao Y, Masuda S, Katsura T, Kamba T, Ogawa O, Inui K. Precise comparison of protein localization among OCT, OAT, and MATE in human kidney. *J. Pharm. Sci.*, 102: 3302-3308 (2013) 査読有 DOI: 10.1002/jps.23567

7. Kunimatsu S, Mizuno T, Fukudo M, Katsura T. Effect of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein inhibition on the pharmacokinetics of sunitinib in rats. *Drug Metab. Dispos.*, 41: 1592-1597 (2013) 査読有 DOI: 10.1124/dmd.112.050286

8. Fukudo M, Ikemi Y, Togashi Y, Masago K, Kim YH, Mio T, Terada T, Teramukai S, Mishima M, Inui K, Katsura T. Population pharmacokinetics/pharmacodynamics of erlotinib and pharmacogenomic analysis of plasma and cerebrospinal fluid drug concentrations in Japanese patients with non-small cell lung cancer. *Clin. Pharmacokinet.*, 52: 593-609 (2013) 査読有 DOI: 10.1007/s40262-013-0058-5

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 上島 智, 宮川 幸典, 目片 茉柚, 桂 敏也. エンタカポンのグルクロン酸抱合反応における個体間変動の定量的評価. 第 36 回日本臨床薬理学会学術総会、平成 27 年 12 月 11 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)
2. Katsura T. Role of MATE1 in Renal Excretion and Tissue Distribution of Cationic Drugs. 2nd International Symposium on Epithelial Barrier and Transport, 平成 26 年 11 月 1 日、立命館大

学 BKC (滋賀県草津市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

桂 敏也 (KATSURA, Toshiya)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号 : 10283615

(4) 研究協力者

上島 智 (UESHIMA, Satoshi)

立命館大学・薬学部・助教