

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790149

研究課題名（和文） 腎疾患時のヒト腎近位尿細管における薬物トランスポータの変動と発現制御因子

研究課題名（英文） Expression levels of human drug transporters in renal proxima tubules and regulation of their expression under kidney diseases

研究代表者

本橋 秀之 (MOTOHASHI HIDEYUKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30359822

研究成果の概要（和文）：

腎臓は薬物排泄に重要な臓器であり薬物腎排泄には、尿細管に発現するトランスポータが重要な役割を果たしている。これらトランスポータの変動は尿中への薬物排泄に重要である。本研究では病態下におけるトランスポータの変動について検討するとともに腎疾患時に変動する調節因子との関連性について検討した。その結果アシドーシス時に有機アニオントランスポータが低下し、アニオン性薬物の排出低下を引き起こすことを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

The kidney is the most important organ for the drug excretion. In the proximal tubules, drug transporters play the important roles for renal drug secretion. In this study, changes of renal drug transporters under renal diseases and correlation of regulator factors for renal diseases with drug transporter expression. The authors found that organic anion transporter decreased under acidosis condition and then that anionic drug secretion was decreased.

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：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：トランスポータ、腎

1. 研究開始当初の背景

腎臓は肝臓とならび生体内の不要老廃物の排泄において主要な役割を果たす重要な臓器である。

腎臓からの排泄には糸球体濾過、尿細管分泌、尿細管再吸収の各過程が関与し、排泄方向には糸球体濾過及び尿細管分泌が重要となる。尿細管における物質輸送には細胞膜上に発現する膜タンパク輸送体が重要な役割

を果たしている。これら膜タンパクはトランスポータと呼ばれ、さまざまな駆動力によって細胞内外の物質輸送を媒介している。これまで、トランスポータの機能について詳細な解析が行われてきた。

一方、慢性腎疾患の進展には様々な生体因子が関与することが報告されている。特に transforming growth factor (TGF)等はメサンギウム増殖性糸球体腎炎や糖尿病性腎症

などの慢性腎疾患において尿細管の病変に深く関与することが報告されている。また Smad などの転写活性化因子などが腎疾患進展時に亢進するなどの報告がなされている。近年、薬物トランスポータの発現並びに機能変動については特に注目度が高く、申請者の所属研究施設のみならず多くの研究組織から *in vivo* 及び *in vitro* における成果が報告されている。しかし、これらの報告の多くは基礎転写に関わる因子であり、ヒト慢性腎疾患時において機能するような制御因子と薬物トランスポータの変動に関する情報は未だ皆無である。

アシドーシスは酸塩基平衡が崩れ血液が酸性に傾いた状態であり、臨床において腎疾患に最も起こりやすい病態の一つである。アシドーシス病態下で尿細管細胞の H⁺排泄に関わるトランスポータの活性及び発現量が変動することが報告されているが、薬物腎排泄能の変化について情報が乏しい。

2. 研究の目的

本研究では腎疾患の進展に関わる発現制御因子について、トランスポータの機能発現変動への関与について明らかにする。さらに病態時（アシドーシス時における腎薬物トランスポータの発現変動メカニズムと薬物動態学的意義についても解明を試みた。

- ・腎薬物トランスポータについて腎疾患時における発現を定量的に明らかにする。
- ・TGF- β をはじめとした腎疾患進展に関わる制御因子の発現について定量的に明らかにする。
- ・アシドーシス時の腎薬物トランスポータについて検討する。
- ・アシドーシス病態時における薬物腎排泄の変動と、トランスポータ発現変動との関連性について解析する。

3. 研究の方法

日本での主要な慢性腎疾患、メサンギウム増殖性糸球体腎炎の増悪に関与する増殖因子・サイトカイン類に焦点をあて、腎有機イオントランスポータ発現量との相関について解析する。具体的には TGF- β や PDGF、IL-6、BMP-7 等を中心に解析を進める。既得検体を用いることで、迅速に研究を開始する。組織学的解析：疾患分類並びに疾患の進展度については専門医が腎生検組織を用いて病理学的に判定する確定診断を用いる。また、患者の基礎情報（年齢や体重など）や腎機能検査値は臨床情報を用いる。増殖因子やサイトカイン類は糸球体や浸潤マクロファージなどにおいて発現が亢進することから、腎薬物トランスポータ群とこれらの調節因子との局在を比較するため腎生検組織を用いた免疫組織染色を行う。

mRNA 発現量の測定：腎生検組織より自動核酸抽出装置を用いて total RNA を精製する。mRNA 発現量の測定は Real-time PCR 法で測定する。測定を実施するために最低限必要な RNA 量は 100 ng 程度であり、10 回以上の Real-time PCR が可能である。

さらに、レーザーマイクロディセクション法により、糸球体、近位尿細管など種々の細胞を分別し、各細胞でのシグナル分子の変動とトランスポータ発現変動との関連についてさらに詳細に解析する。

さらに塩化アンモニウム処理により代謝性アシドーシスモデルラットを作成した。血液分析によりアシドーシスを確認した後、アニオン性薬物のモデルとして腎機能検査薬フェノールスルホンフタレイン (PSP) およびカチオン性薬物のモデルとして糖尿病治療薬メトホルミンを定速静注し薬物の尿中排泄について検討した。PSP は吸光光度法によって測定し、メトホルミンについてはすでに確立している高速液体クロマトグラフィーを用いた定量系によって測定した。さらにトランスポータ発現量についてはウェスタンブロット法によって検討した。

4. 研究成果

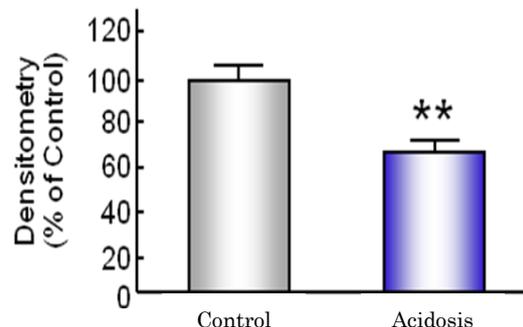


図1. アシドーシスモデルラットにおける有機アニオントランスポータ OAT3 の発現変動

①代謝性アシドーシスにおける薬物トランスポータの変動と薬物腎排泄への影響

本研究において研究代表者はアシドーシス病態時における薬物トランスポータの変動について検討したところ、OAT3 発現量がアシドーシス病態時において顕著に低下していることがあきらかとなった。さらにアニオン性薬物フェノールスルホンフタレイン (PSP) の尿中排泄速度はアシドーシス時において有意に低下することが示された。しかし他のアニオントランスポータである OAT1 や近位尿細管の刷子縁膜に発現する Multi-drug-resistance associated protein MRP2 や MRP4 には発現の変動が認められな

った。一方、有機カチオントランスポータ OCT2 には発現の変動が認められず、またメトホルミンの尿中排泄速度にもアシドーシスの影響は認められなかった。したがってアシドーシス時には薬物トランスポータの発現量が低下し、アニオン性薬物の尿中への排泄が低下することが示唆された。

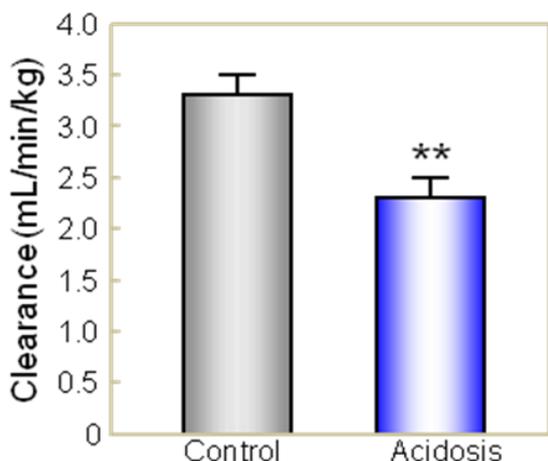


図2. アシドーシスモデルラットにおけるアニオン性薬物 PSP の腎クリアランスの変動

②近位尿細管におけるトランスポータの局在

日本での主要な慢性腎疾患、メサンギウム増殖性糸球体腎炎の増悪に關与する増殖因子・サイトカイン類に焦点をあてた。具体的には TGF-beta や PDGF、IL-6、BMP-7 等を中心に解析を進めた。まず、これらサイトカインの発現量を測定するため、Real-time PCR による測定条件を確立した。またレーザーマイクロダイセクション法による腎近位尿細管の単離及び RNA の精製にも成功した。そこで、TGF-beta、PDGF、IL-6、BMP-7 について、予備的な検討をおこなったところ、腎皮質においてこれらサイトカインの発現が確認された。しかしながら、これら予備的検討において、サイトカインとトランスポータ発現量との間に相関は認められなかった。本年度は限られた例数での検討において有意な相関は観察されなかったが、さらに症例数を重ねて増殖因子・サイトカイン類と薬物トランスポータの機能・発現変動との関連について検討を進めていく予定である。また、トランスポータタンパクの発現変動についても検討を加える予定である。

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1件)

①Gaowa A, Motohashi H, Katsura T, Inui K. Effects of metabolic acidosis on expression levels of renal drug transporters. Pharm Res. 28(5):1023-1030 2011.

〔学会発表〕(計6件)

① Hideyuki Motohashi, Arong Gaowa, Toshiya Katsura, Ken-ichi Inui “Changes of renal drug transporters in the metabolic acidosis and its effects on urinary drug excretion” 3rd Asian Pacific ISSX Meeting, 2009年5月10~12日、The Imperial Queen’s Park Hotel、Bangkok、Thailand

②関根 寛子、本橋 秀之、桂 敏也、乾 賢一「腎臓の発達過程における有機アニオントランスポータの発現変動」日本薬学会第130年会、2010年3月28日~3月30日、岡山コンベンションセンター

③野村 麻貴、本橋 秀之、関根 寛子、桂 敏也、乾 賢一「発達過程における近位尿細管アニオントランスポータの発現変動」第60回日本薬学会近畿支部総会・大会、2010年10月30日、摂南大学

④ Hideyuki Motohashi, Arong Gaowa, Toshiya Katsura “Effects of Metabolic Acidosis on Expression Levels of Renal Drug Transporters”第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム2010年11月27、28日、東京大学本郷キャンパス武田先端知ビル

⑤ Maki Nomura, Hideyuki Motohashi, Hiroko Sekine, Toshiya Katsura “The Changes of Anion Transporters under The Kidney Development”第4回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム2010年11月27、28日、東京大学本郷キャンパス武田先端知ビル

⑥シンポジウム9「トランスポータ研究の臨床薬理」本橋 秀之「ヒト腎薬物トランスポータの臨床薬理」第31回臨床薬理学会年会、2010年12月1~3日、国立京都国際会館

〔図書〕(計1件)

①乾 賢一、本橋 秀之：3-5-3 腎臓における薬物トランスポータの役割、金井 好克、竹島 浩、森 泰生、久保 義弘編：トランスポートソームの世界—膜輸送研究の源流から未来へ—、pp274-271、京都廣川書店、2011年3月

[その他]

ホームページ等

[http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~yakuzai/
main.htm](http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~yakuzai/main.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本橋 秀之 (MOTOHASHI HIDEYUKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30359822